UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA

ANDREIA DE ARAUJO ALMEIDA

Estudo comparativo da fototoxicidade das protoporfirinas IX
endógena e sintética e seus fotoprodutos contra células malignas

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

ANDREIA DE ARAUJO ALMEIDA

Estudo comparativo da fototoxicidade das protoporfirinas IX
endógena e sintética e seus fotoprodutos contra células malignas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Orientador: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

RIBEIRÃO PRETO - SP
2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Andreia de Araujo.

Estudo comparativo da fototoxicidade das protoporfirinas IX endógena e sintética e seus fotoprodutos contra células malignas / Andreia de Araujo Almeida; orientador Iouri Borissevitch – Ribeirão Preto, 2010.

77f. : il.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2010.

1. Terapia fotodinâmica, 2. protoporfirina IX, 3.fotoprodutos, 4.fotocitotoxicidade, 5.melanoma.

Nome: ALMEIDA, Andreia de Araujo

Título: Estudo comparativo da fototoxicidade das protoporfirinas IX endógena e sintética e seus fotoprodutos contra células malignas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos,
e ao meu noivo, que sempre se fizeram
presentes com carinho e incentivo*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch, pela orientação dedicada, pela amizade e confiança depositadas.

Ao Prof Dr. Auro Nomizo, pelos ensinamentos e por disponibilizar o seu laboratório para a realização deste trabalho.

À todos do laboratório de Fotobiofísica, pelo apoio e amizade.

À todos do laboratório LIIP, em especial ao Carlos pela ajuda nos experimentos de fluorescência.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, e pelo apoio e carinho incondicionais.

Ao Milton, pela paciência, amor e cumplicidade nestes anos.

Ao técnico de laboratório Carlão, pela ajuda.

À Denise e ao Ciro pela grande ajuda nos experimentos, pelas boas conversas e amizade.

À Andressa, por estar ao meu lado, mesmo no momento mais difícil.

Aos amigos de Ribeirão Preto, Érika, Joyce, Flávio, Jorge, Ernando, por toda a ajuda e amizade.

À secretária da pós, Nilza.

Ao Departamento de Física e Matemática.

À CAPES, pelo apoio financeiro através de bolsa de estudos.

Resumo

A protoporfirina IX (PpIX) ocupa um lugar especial entre a família das porfirinas devido ao seu importante papel na natureza e diversas aplicações, inclusive em terapia fotodinâmica. Sob ação da luz visível, a PpIX transforma-se em fotoprodutos que podem ser citotóxicos ou fotocitotóxicos, e isto pode, de um lado, aumentar a eficiência do tratamento e, por outro lado, apresentar toxicidade no escuro, prejudicando o paciente. Como as características da sua fototransformação dependem do ambiente onde elas se encontram, tornam-se importantes os estudos dos efeitos do ambiente nas características da sua fototransformação. As propriedades espectroscópicas da PpIX sintética e endógena, extraída das glândulas harderianas de ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, e seus fotoprodutos e a atividade citotóxica foram estudadas no escuro e sob ação da luz visível em uma cultura de células malignas, em comparação com Photogem® e a porfirina TPPS₄. A localização das protoporfirinas e seus fotoprodutos dentro da estrutura celular também foram observadas. Foi notado que existe uma diferença entre os espectros de absorção e fluorescência das PpIX endógena e sintética e também de seus fotoprodutos, e do grau de sua fototransformação. Associou-se estes efeitos à diferença do ambiente onde as porfirinas se encontravam, devido a interação da PpIX endógena e de seu fotoproduto com compostos celulares que poderiam estar presentes depois da purificação da PpIX obtida da glândula. A fotocitotoxicidade das PpIX sintética e endógena foram comparáveis. Os fotoprodutos, tanto da PpIX sintética quanto endógena não apresentaram fotocitotoxicidade ou mostraram fotocitotoxicidade menor do que a das porfirinas, resultado contrário ao encontrado na literatura. Em relação ao padrão Photogem®, as protoporfirinas apresentaram uma fotocitotoxicidade comparável a ele, mas uma citotoxicidade no escuro maior. A TPPS₄ demonstrou tanto uma fototoxicidade, como uma citotoxicidade no escuro menor que o Photogem®. Da análise da distribuição intracelular das porfirinas PpIX e seus fotoprodutos com a de marcadores padrões de estruturas celulares, pode ser concluído que eles não penetraram no núcleo da célula, e sua distribuição nas demais partes do citoplasma foi difusa, sem nenhuma localização preferencial.

ABSTRACT

The protoporphyrin IX (PpIX) occupies a special place among the porphyrins family due their important role in nature and several applications, including Photodynamic Therapy. Under the action of visible light, PpIX becomes photoproducts that can be cytotoxic or photocytotoxic and these effects can, on one hand, increase the treatment efficiency and, on the other hand, be toxic in the dark, harming the patient. Since the characteristics of its phototransformation depend on the environment where they are finding, studies of the effects of environment on the characteristics of its phototransformation are important. The spectroscopic properties and cytotoxic activity were studied in the dark and under visible light action of synthetic and endogenous PpIX, extracted from mice harderian gland of the *Rattus norvegicus albinus* species and its photoproducts, in a culture of malignant cells, compared with Photogem® and TPPS4 porphyrin. The cellular localization of protoporphyrin and its photoproducts inside cellular structure also were observed. It was observed that there is a difference between the fluorescence and absorption spectra of synthetic and endogenous PpIX and between its photoproducts and also the degree of its phototransformation. These effects can be linked to the difference of the environment where the porphyrins were, due the interaction of endogenous PpIX and its photoproducts with cellular components that could be present after purification of PpIX obtained from the gland. The photocytotoxic of synthetic and endogenous PpIX were comparable. The photoproducts of both synthetic and endogenous PpIX showed no photocytotoxic or were smaller than of porphyrins, a contrary result to that it was found in the literature. In relation to pattern composite Photogem®, the protoporphyrin showed a photocytotoxic comparable to it, but protoporphyrin a higher cytotoxicity in the dark. The TPPS4 demonstrated both a lower phototoxicity as a cytotoxicity in the dark than Photogem®. From analysis of intracellular distribution of the porphyrin PpIX and its photoproducts with markers patterns of cellular structures, may be concluded that they did not penetrate into the cell nucleus and its distribution in other parts of the cytoplasm was diffuse, without preferential location.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da TFD	4
Figura 2: Mecanismos dos tipos I e II para geração de ROS [9].....	5
Figura 3: Macrociclo tetrapirrólico comum das porfirinas.	7
Figura 4: (a) porfirina desprotonada; (b) porfirina monoprotionada; (c) porfirina biprotionada	8
Figura 5: Estrutura molecular da PpIX	9
Figura 6: Estrutura molecular da porfirina TPPS ₄	10
Figura 7: Estrutura molecular do Photogem®.....	11
Figura 8: Diagrama de Jablónski- as linhas onduladas representam processos não radiativos	22
Figura 9: Foto do irradiador usado nos experimentos de fototoxicidade	28
Figura 10: Esquema da placa de cultura usada nos experimentos	29
Figura 11: Redução do MTT em azul de formazona [46]	30
Figura 12: Espectro de absorção da PpIX sintética em água e em solução de ACN:DMSO (3:1)	33
Figura 13: Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN:DMSO (3:1).....	34
Figura 14: Espectro de absorção da PpIX endógena em solução aquosa	34
Figura 15: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em água. $\lambda_{ex}=530nm$	35
Figura 16: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em água. $\lambda_{ex}=530nm$	36
Figura 17: Determinação do coeficiente de absorção molar da PpIX sintética em DMSO. $\lambda=629nm$	37
Figura 18: Determinação do coeficiente de absorção molar da TPPS ₄ em água, pH =4,0, em $\lambda=644nm$	37
Figura 19: Espectro de absorção da TPPS ₄ em água. pH = 7,0	38
Figura 20: Espectro de emissão de fluorescência da TPPS ₄ em água. pH = 7,0	39
Figura 21: Citotoxicidade da solução ACN:DMSO (3:1) nas células B16F-10 em função da sua concentração no escuro e sob irradiação [56,7 J/cm ²].	40
Figura 22: Citotoxicidade da PpIX sintética (a) e endógena(b) na faixa de concentrações de 0,1-10 μM nas células B16F-10, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm ²	41

Figura 23: Citotoxicidade da PpIX sintética (a) e endógena (b) na faixa de concentrações de 0,1-10 μM nas células C8161, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm^2	41
Figura 24: Citotoxicidade do Photogem® na faixa de concentrações de 0,1-10 μM nas células B16F-10 e C8161, com e sem irradiação, tempo de incubação de 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm^2	42
Figura 25: Citotoxicidade da TPPS ₄ na faixa de concentrações 1-20 μM nas células HT29, com e sem irradiação, tempo de incubação de 1-9 horas, dose de irradiação 40 J/cm^2	43
Figura 26: Citotoxicidade do Photogem® na faixa de concentração 1-20 μM nas células HT29, com e sem irradiação, tempos de incubação de 1-9 horas, dose de irradiação 40 J/cm^2	44
Figura 27: Espectros de absorção da PpIX sintética (1mM em água) e de seu fotoproducto (1mM em água) depois de 70 h35min e 84h30min de irradiação	45
Figura 28: Espectros de absorção da PpIX endógena e de seu fotoproducto depois de 16 horas de irradiação	45
Figura 29: PpIX sintética 1mM na presença de micelas	46
Figura 30: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética e de seu fotoproducto (depois de 71 horas de irradiação). $\lambda_{\text{ex}}=530\text{nm}$	47
Figura 31: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena e de seu fotoproducto (depois de 16 horas de irradiação). $\lambda_{\text{ex}}=530\text{nm}$	47
Figura 32: Citotoxicidade do fotoproducto da PpIX sintética (a) e endógena (b) na faixa de concentrações de 0,1-10 μM nas células B16F-10, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm^2	48
Figura 33: Citotoxicidade do fotoproducto da PpIX sintética (a) e endógena (b) na faixa de concentrações de 0,1-10 μM nas células C8161, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm^2	49
Figura 34: Imagens de fluorescência da PpIX sintética incubada por A) 1min B)5min C)15min e seu fotoproducto D) 1min E)5min F)15min	50
Figura 35: Imagens de fluorescência da PpIX endógena incubada por A) 1min B)5min C)15min e seu fotoproducto D) 1min E)5min F)15min	50
Figura 36: Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX sintética por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A) PpIX sintética, B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição da A, B e C	52
Figura 37: Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX sintética por 15min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). E) PpIX sintética, F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G	52

Figura 38: <i>Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX endógena por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A) PpIX endógena B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição de A, B e C.....</i>	53
Figura 39: <i>Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX endógena por 15 min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias).E) PpIX endógena F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G.....</i>	53
Figura 40: <i>Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproducto da PpIX sintética por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A) FPpIX endógena B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição de A, B e C</i>	54
Figura 41: <i>Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproducto da PpIX sintética por 15 min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). E) FPpIX sintética F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G.....</i>	54
Figura 42: <i>Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproducto da PpIX endógena por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A)FPpIX endógena B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição de A, B eC.....</i>	55
Figura 43: <i>Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproducto da PpIX endógena por 15min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). E) FPpIX endógena F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G.....</i>	56
Figura 44: <i>Imagens de fluorescência das células HT29 após incubação com A) TPPS₄ B) Rodamina 123[47].....</i>	56

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrilo
ALA	Ácido δ -aminolevulínico
ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECT	Efeito Citotóxico
FDA	Food and Drug Administration
FPp	Fotoprotoporfirina
FS	Fotossensibilizador
HpD	Hematoporfirina
MTT	brometo de 3,-(4,5-dimetil-2-tiazolil)2,5-difenil-2H-tetrazólico)
PBS	Tampão fosfato (da sigla em inglês Phosphate Buffered Saline)
PpIX	Protoporfirina IX
ROS	Espécies reativas de oxigênio (da sigla em inglês: Reactive Oxygen Species)
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (da sigla em inglês: Sodium Dodecyl Sulfate)
TFD	Terapia Fotodinâmica
TPPS4	Porfirina Meso-tetrasulfonatofenil

Sumário

1. Introdução Teórica	2
1.1 Câncer	2
1.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)	3
1.2.1 Princípio da Terapia Fotodinâmica	3
1.2.2 Mecanismos de ação	4
1.3 Fotossensibilizadores (FS)	6
1.3.1 Porfirinas	7
1.3.2 Protoporfirina IX	8
1.3.3 Meso-tetrasulfonatofenil porfirina (TPPS4)	9
1.3.4 Photogem®	10
1.4 Fotodecomposição dos fotossensibilizadores	11
1.5 Localização dos FS e danos aos alvos subcelulares	12
1.6 Culturas de células	13
2. Justificativa e Objetivos	17
3. Técnicas Experimentais	20
3.1 Medidas de absorção ótica	20
3.2 Espectroscopia de fluorescência e microscopia de imagem por fluorescência	21
4. Materiais e Métodos	24
4.1 Protoporfirina IX sintética	24
4.2 Protoporfirina IX endógena	24
4.3 Meso-tetrasulfonatofenil porfirina (TPPS4)	25
4.4 Photogem®	25
4.5 Marcadores	25
4.6 Preparações das amostras	26

4.6.1 Fotossensibilizadores -----	26
4.6.2 Marcadores -----	26
4.7 Irradiação das protoporfirinas -----	27
4.8 Experimentos com cultura de células -----	27
4.8.1 Cultura de células -----	27
4.8.2 Experimentos de fototoxicidade -----	28
4.8.3 Localização celular das protoporfirinas -----	31
5. Resultados e Discussões -----	33
5.1 Espectros de absorção óptica e de fluorescência das PpIX sintética e endógena --	33
5.2 Determinação dos coeficientes de absorção molar -----	36
5.3 Espectros de absorção óptica e de fluorescência da TPPS4 -----	38
5.4 Citotoxicidade -----	39
5.4.1 Teste de citotoxicidade da solução de ACN:DMSO (3:1) -----	39
5.4.2 Citotoxicidade das PpIX sintética e endógena -----	40
5.4.3 Citotoxicidade da TPPS ₄ -----	43
5.5 Fotólise das porfirinas -----	44
5.5.1 Mudanças espectrais das protoporfirinas sintética e endógena devido à irradiação -----	44
5.5.2 Citotoxicidade dos fotoprodutos -----	48
5.6 Localização celular -----	50
6. Conclusões -----	58
7. Referências -----	60

1. Introdução Teórica

1. Introdução Teórica

1.1 Câncer

Câncer é um termo usado para doenças em que células anormais passam a se dividir sem controle, apresentando a capacidade de invadir outros tecidos através do sangue ou sistema linfático. Existem mais de cem tipos diferentes de câncer.

Células normais de um organismo crescem e se dividem de maneira controlada e quando se tornam velhas ou danificadas morrem e são substituídas por novas células. Quando este processo ordenado falha, o material genético de uma célula (DNA) pode tornar-se danificado e produzir mutações que afetam o crescimento e as divisões normais. Quando isto acontece, as células não morrem mais quando deveriam e novas células são formadas sem que o corpo necessite delas. As células extras podem formar uma massa de tecido chamada tumor. Nem todos os tumores são cancerosos, tumores benignos podem frequentemente ser removidos e não se espalham para outras partes do corpo. Tumores malignos são cancerosos, podem invadir tecidos próximos e se espalham para outras partes do corpo (metástase) [1].

Atualmente, as terapias usadas no combate ao câncer consistem em retirar ou matar totalmente as células tumorais. Convencionalmente usa-se a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia sendo que, em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. Os métodos convencionais possuem grande eficiência no tratamento de vários tipos de tumores malignos, mas causam severos efeitos colaterais negativos ao organismo do paciente. Dentre estes, os mais perigosos são a redução da resistência do organismo devido à alta citotoxicidade, causada pela ação de quimioterápicos e/ou devido à ação da radiação ionizante, e a indução de novas neoplasias pelo uso de radiação ionizante. Além disso, os efeitos colaterais da quimioterapia são: fraqueza, diarreia, perda ou aumento de peso, feridas na boca, queda de cabelos, enjoo, vômitos, tonteadas. Como efeitos colaterais da radioterapia, temos: cansaço, perda de apetite, reações na pele [2]. Além disso, a recidiva tumoral, ocasionada

pela não eliminação da totalidade de células malignas durante a cirurgia ainda é frequentemente observada.

Frente a estes graves efeitos colaterais, alternativas são constantemente propostas e, entre elas, destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD), uma modalidade relativamente nova no tratamento de câncer e outras doenças, como AIDS e psoríase.

1.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A TFD é um tratamento que elimina rapidamente tumores locais, resultando na cura de doenças em fases iniciais e atenuação de casos avançados, estando também associada a um aumento da imunidade antitumoral. A TFD é aprovada pela FDA (US Food and Drug Administration) e iniciou-se no Brasil em 1997, com o primeiro paciente tratado em 1999 [3]. Como característica principal a TFD apresenta uma grande seletividade tumoral e devido a esta seletividade não possui efeitos colaterais, pois diminui o dano às células saudáveis podendo ser usada em conjunto com outras terapias, como a radioterapia e a cirurgia.

Tendo sido desenvolvida originalmente como terapia antitumoral, tem sido empregada com sucesso no tratamento de doenças não malignas.

1.2.1 Princípio da Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) usa uma droga sensível à luz, chamada de fotossensibilizador (FS) e luz visível juntamente com oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio (ROS - reactive oxygen species) que são citotóxicas e matam as células malignas por apoptose e/ ou necrose e ainda estimulam o sistema imune do paciente [4]. A técnica consiste em:

a) administração tópica ou sistêmica do FS,

b) espera de um intervalo adequado de tempo para a acumulação da droga nos tecidos tumorais,

c) irradiação do tumor com luz visível,

A irradiação resulta na formação de espécies reativas de oxigênio através do FS ativado e subsequente oxidação de estruturas celulares (lipídios, proteínas e/ou ácidos nucleicos) que induzem a necrose e a apoptose celular, induzindo a transcrição e liberação de mediadores inflamatórios pelas ROS [5; 6].

Estes passos estão ilustrados esquematicamente na figura (1).

Figura 1: Representação esquemática da TFD

1.2.2 Mecanismos de ação

Uma vez que o FS é ativado pela luz ($h\nu$) ele passa do seu estado fundamental singlete (FS) para o primeiro estado excitado singlete ($^1\text{FS}^*$). A partir daí, o FS pode

voltar ao estado fundamental, diretamente emitindo fluorescência que, devido à localização preferencial do FS no tumor, pode ser usada clinicamente para diagnóstico por fluorescência [7]. Depois, o FS pode sofrer uma transição para seu estado excitado tripleto ($^3\text{FS}^*$) através do cruzamento intersistemas (CIS). O FS nos estados excitados singlete ou tripleto pode reagir com o alvo e/ou outras moléculas vizinhas e formar radicais ou íons radicais que interagem com o oxigênio, formando ROS (mecanismo do tipo I). Alternativamente ele pode transferir a energia do estado excitado tripleto para o oxigênio molecular, formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que reage com estruturas celulares, induzindo a morte das células (mecanismo do tipo II) [6; 7].

No mecanismo do tipo I, as espécies reativas de oxigênio incluem radicais livres, tais como, o superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-), e moléculas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO). O oxigênio singlete formado no mecanismo do tipo II tem características especiais por ser a única espécie reativa formada que está em um estado eletronicamente excitado. Em contraste com as ROS formadas no mecanismo do tipo I, que são produzidas em baixos níveis durante os processos fisiológicos normais das células, o oxigênio singlete é geralmente produzido quando um FS endógeno ou exógeno absorve um fóton apropriado na presença de oxigênio [8; 9].

Figura 2: Mecanismos dos tipos I e II para geração de ROS [9]

O oxigênio singleto formado é a espécie reativa mais danosa formada durante a TFD e pode existir somente por um curto espaço de tempo no estado excitado antes de voltar para o estado fundamental pela dissipação de energia por colisões com as moléculas do ambiente e, ao voltar para o estado fundamental, perde sua reatividade.

O tempo de vida do oxigênio singleto é cerca de 4 μ s em solução aquosa homogênea [8]. Devido a este curto tempo de vida o oxigênio singleto não pode atingir alvos distantes, deste modo, a eficácia da TFD depende da localização celular do FS, pois as moléculas do FS que não estiverem ligadas as células ou que não penetrarem no seu interior não serão fototóxicas. O oxigênio singleto gerado distante dos seus alvos (lipídeos não saturados, aminoácidos e ácidos nucleicos) possui baixa fototoxicidade [9].

A eficácia da TFD depende do tipo de FS, da concentração da droga e da localização celular, dose de luz e disponibilidade de oxigênio.

1.3 Fotossensibilizadores (FS)

Fotossensibilizadores orgânicos são compostos sensíveis à luz e geralmente apresentam em sua estrutura um cromóforo, que é um sistema desenvolvido de conjugação π de forma linear ou de anéis aromáticos, pirrólicos, etc. Nestes compostos, o cromóforo é o responsável pela absorção seletiva dos fótons.

Um FS ideal, de um modo geral, deveria ter as seguintes propriedades [10]:

- a) *Fotofísicas*: alta absorção em comprimentos de onda entre ~ 600- 850 nm.
- b) *Fotoquímicas*: alta eficiência de produção de oxigênio singleto, para uma alta eficiência fotodinâmica.
- c) *Químicas*: alta estabilidade, ser simples, possuir espécies moleculares puras; síntese fácil e de baixo custo; ser solúvel em água.
- d) *Biológicas*: possuir baixa toxicidade no escuro e localizar-se seletivamente nos tecidos a serem tratados perto de alvos celulares e subcelulares suscetíveis.

Uma propriedade particularmente importante é a absorção entre ~ 600- 850nm, chamada “janela terapêutica”, pois radiações de comprimentos de onda mais curtos sofrem um maior espalhamento pelos tecidos e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos que absorvem nesta faixa, principalmente a hemoglobina, diminuem a penetração da luz. Quanto maior o comprimento de onda da radiação incidente, maior é o grau de penetração, possibilitando o tratamento de tumores grossos, porém acima de 800 nm ocorre a absorção da radiação pela água [11]. Por estes motivos os FS desenvolvidos para TFD devem ser corantes que absorvem na região indicada.

1.3.1 Porfirinas

As porfirinas são compostos orgânicos muito relevantes, amplamente encontrados na natureza e participam de importantes processos biológicos tais como a fotossíntese. Além disso, os derivados de porfirinas foram os primeiros a serem utilizados como FS em terapia fotodinâmica [12; 13]. Estes compostos apresentam em sua estrutura um cromóforo tetrapirrólico cíclico conjugado (anel porfirínico, figura 3) que confere às porfirinas sua coloração intensa com forte absorção na região visível da luz.

Figura 3: *Macrociclo tetrapirrólico comum das porfirinas.*

Além disso, esta estrutura faz com que as porfirinas sejam rígidas, caracterizando um alto rendimento quântico e um longo tempo de vida do estado tripleto. A estrutura do anel porfirínico contém 4 átomos de nitrogênio, dentre os quais dois podem ser

facilmente protonados, desprotonados ou ligados com átomos de metais. Os termos porfirina desprotonada, monoprotonada e biprotonada são usados como referência às cargas 0, +1 e +2, respectivamente, e podem ser representadas como H_2P , H_3^+P e $H_4^{2+}P$ (figura 4).

Figura 4: (a) porfirina desprotonada; (b) porfirina monoprotonada; (c) porfirina biprotonada

Atualmente, derivados de porfirinas são os compostos mais utilizados na clínica médica em TFD. Vários tipos de tumores, como bexiga, pulmão, pele, gástrico são tratados através de TFD com porfirinas [14]. Além do uso em oncologia, derivados de porfirinas são aplicados no tratamento de infecções virais, inclusive AIDS [15], psoríase [5], degeneração macular relacionada à idade [16], ou ainda como agente de contraste em tomografia de fluorescência de tumores [17].

1.3.2 Protoporfirina IX

A Protoporfirina IX (figura 5) ocupa um lugar específico entre a família de porfirinas. Sua estrutura faz parte de um grande grupo de tetrapirrólicos naturais responsáveis pelas funções vitais dos organismos aeróbios como o transporte (hemoglobina) e depósito do oxigênio (mioglobina), a desintoxicação, a síntese de hormônios sexuais e de compostos anti-inflamatórios. A combinação de propriedades

fotofísicas, de baixa toxicidade sistêmica, afinidade por tecidos que se proliferam rapidamente, tornam a protoporfirina IX muito promissora para o uso em diagnósticos, TFD, em doenças dos olhos e os outros campos da medicina [18].

Figura 5: Estrutura molecular da PpIX

A PpIX apresenta absorção relativamente alta na região espectral de 635 até 710nm. Quando irradiada, novas bandas de fluorescência são observadas, e estas novas bandas correspondem à formação de fotoprodutos [19; 20]. Como composto endógeno, não possui efeitos negativos no organismo. Além disso, devido sua elevada velocidade de metabolismo nos tecidos tumorais, a concentração da PpIX neste tecido é maior que nos tecido sadios, especialmente quando ácido δ -aminolevulínico (ALA), precursor do síntese da PpIX, é introduzido. Por este motivo, a PpIX é um dos FS atualmente mais utilizados em TFD.

1.3.3 Meso-tetrasulfonatofenil porfirina (TPPS4)

A TPPS₄ (meso-tetrasulfonatofenil porfirina) é uma porfirina aniônica, solúvel em água. Na forma de base livre apresenta um alto coeficiente de absorção na região visível, uma notável fluorescência [21] e uma efetiva produção de oxigênio singlete.

Figura 6: Estrutura molecular da porfirina TPPS4

Esta porfirina foi aplicada clinicamente em PDT em fase de teste e apresentou resultados promissores [22; 23]. Sua composição pura e sua capacidade superior de se concentrar em tumores são características recomendáveis na utilização da TPPS₄ como modelo na avaliação das diversas etapas que envolvem o estudo de FS em potencial para a terapia fotodinâmica em humanos. Por este motivo esta porfirina é útil para comparar sua eficiência com outros FS.

1.3.4 Photogem[®]

O Photogem[®] é um derivado de Hematoporfirina (HpD) e sua fração ativa faz parte da primeira geração de agentes fototerápicos utilizados em aplicações clínicas no tratamento de tumores [24]. O Photogem[®] (LLC<<PHOTO GEM>>, Moscou, Rússia) é uma porfirina com carga zero (desprotonada) e solúvel em água. Quando em solução aquosa, apresenta um máximo de absorção em $\lambda = 630 \text{ nm}$ e coeficiente de absorção molar igual $\epsilon = 3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. No Brasil, ele foi aprovado pela ANVISA em 2003 (08/04/03, processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4). Por este motivo o Photogem[®] pode ser utilizado como um padrão para estudos da fototoxicidade relativa de fotossensibilizadores.

Figura 7: Estrutura molecular do Photogem®.

1.4 Fotodecomposição dos fotossensibilizadores

A fotodecomposição significa as modificações induzidas pela luz que ocorrem com os FS, tanto em soluções quanto em meios complexos. Estas modificações resultam na diminuição da intensidade inicial de absorção e de fluorescência e inclui os seguintes fotoprocessos [25]:

- a) *Fotodegradação:* conversão do FS em produtos que não absorvem significativamente a luz visível.
- b) *Fototransformação:* leva a formação de novos fotoprodutos que absorvem na região visível.

Na maioria dos exemplos de fotodecomposição em TFD, onde o oxigênio está necessariamente presente, os processos são oxidativos e usualmente envolvem o oxigênio singlete ou ROS [26].

Para a PpIX, a fototransformação resulta em uma diminuição acentuada da absorção e na formação de um ou mais fotoprodutos, caracterizados por intensa fluorescência na região de 670nm do espectro [27]. Dois destes fotoprodutos, tipo

clorina, são formados devido à redução da dupla ligação de dois isômeros da molécula de PpIX, este processo envolve reações com o oxigênio [28]. O fotoproduto, chamado fotoprotoporfirina (FPp), provavelmente é o resultado da ciclo adição do 1O_2 em um ou em ambos os grupos vinil da PpIX, com redução da dupla ponte adjacente. Um terceiro fotoproduto observado deve ser proveniente da fotodegradação da uroporfirina (UP) e/ou da coproporfirina (CP) que são produzidos nos passos intermediários da via de biossíntese da heme [29]. O fotoproduto formado a partir da PpIX compete com a PpIX por alguns sítios de ligação de proteínas induzindo a diminuição do número de moléculas de PpIX ligadas a cada proteína em até 80% [30].

A velocidade, mecanismo de fototransformação, e a estrutura final dos FS dependem do ambiente em que ele se encontra, assim é importante comparar os fotoprodutos formados em soluções homogêneas, dentro de organismos, e na presença dos sistemas que modelam as estruturas celulares nativas, tais como soluções de biopolímeros, micelas, vesículas etc. Sob este ponto de vista, existe especialmente um interesse no estudo de tecidos biológicos que apresentam substâncias endógenas que absorvem radiações óticas similares ao processo da TFD. A glândula harderiana dos ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* sintetiza e armazena no lúmen dos ácinos uma alta concentração de protoporfirina IX [31], e foi usada como um modelo experimental para o entendimento do efeito fotodinâmico [32].

1.5 Localização dos FS e danos aos alvos subcelulares

A localização do FS é um parâmetro extremamente importante na compreensão do mecanismo de fototoxicidade envolvido em TFD. Visto que a distância de migração das espécies reativas formadas pelo FS é pequena, a eficácia e o mecanismo de ação destes compostos dependem do alvo celular envolvido (DNA, proteínas, membrana celular externa ou interna, etc).

A localização preferencial de um FS na superfície da célula ou no seu interior pode determinar a eficiência da ação fotodinâmica e o tipo de morte celular (necrose ou apoptose) [33]. FS que se localizam na mitocôndria, como o Photofrin®, ou que são

produzidos na mitocôndria, como a Protoporfirina IX, induzidos pelo ALA, geralmente induzem a apoptose (morte celular programada), provocada pela quebra da cadeia respiratória celular [34; 35]. FS localizados na membrana plasmática possuem uma maior probabilidade de causar necrose durante exposição à luz. Isso ocorre porque o $^1\text{O}_2$ tem curta distância de propagação, devido ao seu curto tempo de vida, agindo mais próximo da membrana e aumentando a probabilidade de danos a esta [36]. Portanto, um dos principais parâmetros que governam a eficiência de um FS é a sua habilidade, após a localização na membrana plasmática, de atravessá-la e atingir alvos intracelulares. Assim, a determinação da localização dos FS nas células é um passo importante para determinar o mecanismo de ação do FS no tratamento.

A seletividade celular e distribuição subcelular de um FS *in vitro* dependem de vários fatores, tais como o mecanismo pelo qual o FS entra na célula, a estrutura química do FS (hidrofobicidade/hidrofiliidade, o tipo e número de cargas, etc.) e as características bioquímicas e fisiológicas do tumor [24]. *In vivo*, a situação é ainda mais complicada. Quando o FS é introduzido na corrente sanguínea, ele interage com várias biomoléculas, como por exemplo, as proteínas do sangue e/ou lipoproteínas, e conseqüentemente sua penetração nas células será determinada não somente pelas suas propriedades, mas também pelas propriedades dos componentes sanguíneos que o carregam [37].

1.6 Culturas de células

As células animais removidas dos tecidos continuam a crescer se estiverem em um meio líquido ou semissólido contendo os nutrientes essenciais ao crescimento e sobrevivência. Quando realizado em um laboratório, o processo é chamado cultura de célula. O processo da cultura permite que células atuem como unidades independentes, sendo capazes de se dividir e crescer.

A motivação original para o desenvolvimento da cultura de células foi estudar, sob o microscópio, eventos fisiológicos normais como o desenvolvimento de um nervo. A cultura de células animais só se tornou uma técnica de laboratório rotineira no princípio

da década 1950, quando vários avanços tornaram a cultura viável. O desenvolvimento de antibióticos foi um deles, já que a taxa de crescimento das células animais é relativamente baixa comparada com a as bactérias. A necessidade de cultura de células, especialmente em grandes escalas, tornou-se evidente com a necessidade de vacinas virais. As epidemias de poliomielite nos anos 40 e 50 promoveram um grande esforço no desenvolvimento de uma vacina eficaz. A vacina da poliomielite, produzida a partir do vírus desativado, foi um dos primeiros produtos comerciais cultura de células [38].

Culturas de células são usadas para: investigar a fisiologia ou a bioquímica normal das células, por exemplo, estudos do metabolismo, testar o efeito de vários compostos químicos ou drogas em tipos específicos de células, estudar a combinação sequencial ou paralela de vários tipos de células, por exemplo, para gerar pele artificial. A vantagem principal de se usar a cultura de células para algumas das aplicações acima é a consistência e a reprodutibilidade dos resultados. A desvantagem é que, após um período de crescimento contínuo, as características da célula podem mudar e se tornarem completamente diferentes daquelas encontradas na população inicial. As células podem igualmente adaptar-se ao ambiente da cultura variando suas atividades enzimáticas [38].

Existem dois tipos de cultura celular [39; 40]:

- a) *Cultura primária*: as células são removidas de um tecido e colocadas em um meio de cultura apropriado onde crescerão e se dividirão.
- b) *Cultura secundária*: quando as células da cultura primária crescem, elas podem ser removidas e colocadas em novas garrafas para cultivar. Este processo pode ser repetido várias vezes, mas não indefinidamente para células normais.

Células tumorais com frequência se proliferam indefinidamente em cultura, e através da cultura podemos estudar as diferenças entre células tumorais e normais. As células tumorais em cultura servem também como um sistema de teste para determinar drogas apropriadas e métodos para a morte seletiva de tipos de câncer. Neste trabalho utilizamos as seguintes células:

B16F-10: melanoma de camundongos C57BL/6.

C8161: melanoma humano.

HT29: adenocarcinoma colorretal humano

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina) e tem predominância em adultos brancos. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão e é um dos mais graves devido à sua agressividade e alta possibilidade de metástase. No Brasil, foram estimados 5930 novos casos de melanoma em 2010 [2].

O câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. É tratável e, na maioria dos casos, curável, quando detectado precocemente, quando ainda não se espalhou para outros órgãos. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso [2].

2. Justificativa e Objetivos

2. Justificativa e Objetivos

Atualmente, os fotossensibilizadores orgânicos são amplamente utilizados em TFD, para o tratamento de patologias como simples lesões de pele e erradicação de diferentes tipos de tumores benignos e/ou malignos, e também para fins de diagnóstico não invasivo por fluorescência. Os FS podem sofrer transformações durante sua fotoativação que ocorrem com uma velocidade proporcional às reações resultantes do efeito fotodinâmico e, por este motivo, a formação dos fotoprodutos pode ser usada como indicador da eficiência da TFD. Os fotoprodutos formados podem também ser fluorescentes e fotoativos, podendo assim também ser utilizados para diagnóstico e TFD. Os mecanismos de formação dos fotoprodutos e suas estruturas finais dependem do ambiente onde o FS encontra-se, porém esta influência do meio ainda não está bem estabelecida atualmente.

Visando esclarecer os efeitos da interação com os tecidos biológicos nos processos de fototransformação dos FS e, conseqüentemente, na sua eficiência na aplicação em TFD, objetivamos um estudo comparativo entre as características ópticas e fototóxicas *in vitro* da protoporfirina IX sintética e a extraída das glândulas harderianas de ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* e seus fotoprodutos, em comparação com a fotocitotoxicidade do Photogem® e da TPPS₄, usados como padrões.

Para realizar esta proposta definimos como objetivos deste trabalho:

1. Comparar os efeitos citotóxico e fotocitotóxico das porfirinas PpIX sintética e extraída da glândula harderiana de ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* (endógena), do Photogem® e da TPPS₄ *in vitro* contra as linhagens de células tumorais.
2. Realizar estudos comparativos entre os espectros de absorção óptica e de fluorescência da protoporfirina IX sintética e extraída da glândula harderiana de ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, e seus produtos de fototransformação em soluções homogêneas sob a ação da luz na região espectral $\lambda > 630$ nm.

3. Comparar a fototoxicidade da protoporfirina IX e seus fotoprodutos *in vitro* em culturas de células neoplásicas, com intuito de monitorar a evolução do efeito fotodinâmico de destruição celular sob ação da luz.
4. Investigar a localização intracelular das porfirinas TPPS₄, PpIX endógena e sintética e seus fotoprodutos.

3. Técnicas Experimentais

3. Técnicas Experimentais

Quando a luz interage com um objeto, sua energia pode ser absorvida, refletida ou espalhada. Esta energia absorvida pode ser reemitida posteriormente na forma de fluorescência ou fosforescência. Estes fenômenos são a base de métodos espectroscópicos de análise dos objetos. Neste trabalho utilizamos dois tipos de espectroscopia: de absorção óptica e de fluorescência.

3.1 Medidas de absorção ótica

O espectro de absorção ótica de uma molécula é a medida da intensidade da energia absorvida pela amostra em cada comprimento de onda da radiação aplicada. A condição necessária para que a energia da luz possa ser absorvida é a igualdade entre a energia do seu fóton e a diferença das energias, ΔE , do estado inicial e final da transição:

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda \quad (1)$$

Em que: h é a constante de Planck, ν e λ são a frequência e o comprimento de onda do fóton respectivamente e c é a velocidade da luz.

O gráfico apresentado como absorbância versus comprimento de onda (λ) é chamado espectro de absorção e dois parâmetros são usados para caracterizar este espectro: a posição do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e sua intensidade. A medida experimental da intensidade em um comprimento de onda particular é o coeficiente de absorção molar (ϵ) dado pela Lei de Lambert-Beer [41].

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = \varepsilon Cl \quad (2)$$

Em que A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação incidente na amostra, I_t é a intensidade da radiação transmitida, C é a concentração da amostra, l é o caminho ótico e ε é o coeficiente de absorção molar.

O $\varepsilon(\lambda)$ é uma característica intrínseca de cada composto e depende da sua estrutura eletrônica. Qualquer alteração na estrutura química altera também a estrutura eletrônica do composto e, conseqüentemente, altera seu espectro de absorção ótica. Assim, medindo o espectro de absorção podemos confirmar a mudança na estrutura da molécula e a formação dos produtos dessa mudança.

Neste trabalho, a espectroscopia de absorção ótica foi usada para determinar as concentrações das protoporfirinas endógena e sintética, da TPPS₄, controlar o processo de fototransformação da PpIX e nos testes de citotoxicidade.

3.2 Espectroscopia de fluorescência e microscopia de imagem por fluorescência

A luminescência envolve dois processos: a absorção de radiação e a subsequente emissão. A emissão de radiação pode ocorrer entre a transição de estados de mesmo spin (singletos: S_0 , S_1 , S_2 ...), por exemplo, entre o estado excitado singlete S_1 e o estado fundamental singlete S_0 , o que caracteriza a fluorescência, ou entre estados com spin diferentes, por exemplo, entre o estado excitado singlete S_1 e o estado fundamental tripleto, como acontece para o oxigênio molecular, este é caso da fosforescência. A fosforescência também ocorre pela emissão de luz de um estado excitado tripleto (T_1 , T_2 ,...) [42].

Figura 8: Diagrama de Jablónski- as linhas onduladas representam processos não radiativos

A dependência da intensidade de fluorescência com o comprimento de onda de emissão é o espectro de emissão da fluorescência/fosforescência, e a dependência da intensidade emitida com comprimento de onda da luz de excitação é o espectro de excitação da fluorescência/fosforescência.

Neste trabalho foi utilizado o fenômeno da fluorescência nas medidas dos espectros de fluorescência das PpIX sintética e endógena e dos seus fotoprodutos, e nos experimentos com a microscopia de imagem por fluorescência para determinar a localização intracelular das PpIX endógena e sintética e seus fotoprodutos. Para determinar essa localização, foi comparada a distribuição intracelular da intensidade da fluorescência dos objetos em estudo com a distribuição da intensidade da fluorescência para marcadores específicos de organelas.

4. Materiais e métodos

4. Materiais e Métodos

4.1 Protoporfirina IX sintética

A PpIX sintética obtida da Sigma-Aldrich possui grau de pureza $\geq 95\%$ e foi usada sem purificação adicional, é pouco solúvel em água e solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO). Nos experimentos, a PpIX foi usada em uma solução de acetonitrilo (ACN) e DMSO (3:1), em DMSO e em água. A protoporfirina IX é foto-degradável por um processo de foto-oxidação e seus produtos tem uma banda de absorção característica em $\lambda=670\text{nm}$ [27].

4.2 Protoporfirina IX endógena

A protoporfirina IX endógena foi extraída e cedida pelo Doutor Edmyr Rosa dos Reis, da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (UNICAMP).

Para a obtenção da PpIX endógena foram usados 20 ratos da linhagem Wistar da espécie *Rattus norvegicus albinus* do sexo masculino, de massa aproximadamente 150g e idade mínima de sete semanas. Os animais foram cedidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP), mantidos em condições ambientais normais e alimentados com ração comercial para ratos (Labina Purina) e água. Para a retirada das glândulas, os animais foram anestesiados com injeção 0,3 ml/100g de tiopental (Thiopental Sódico) 25 mg/ml e após a retirada foram sacrificados por aprofundamento do anestésico.

Após a extração as glândulas foram lavadas três vezes em solução de cloreto de sódio 0,99M, fragmentadas e colocadas em um homogeneizador de vidro contendo uma solução de ACN:DMSO (3:1). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 15000 rpm, a 5°C durante 5 minutos. Após o descarte do pélete, o sobrenadante foi colocado em frasco âmbar e estocado a 5°C [43]. O espectro de emissão de fluorescência

foi monitorado utilizando um espectrômetro da Ocean Optics OIB³² e a excitação da fluorescência foi realizada em comprimento de onda de 380nm. Após este procedimento, parte do material foi estocada a uma temperatura de 5°C e outra foi tratada para formação do fotoproduto.

4.3 Meso-tetrasulfonatofenil porfirina (TPPS4)

A TPPS₄, obtida da *Porphyrin Products Inc.*, é solúvel em água e foi utilizada sem purificação adicional.

4.4 Photogem®

O Photogem® foi obtido da empresa LLC "PHOTOGE" (Moscou, Rússia) com grau de pureza garantida $\geq 95\%$ e foi usado sem purificação adicional. O composto é solúvel em água e em solução aquosa apresenta: $\epsilon^{630\text{nm}} = 3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.5 Marcadores

O DAPI (marcador de ácido nucléico) e o MitoTracker Green FM (marcador de mitocôndria) foram obtidos da invitrogen™. O DAPI apresenta uma fluorescência no azul com máximo de emissão em $\lambda = 460\text{nm}$, marcando preferencialmente o DNA do núcleo da célula e, por isso, é considerado um marcador de núcleo. O MitoTracker Green FM marca a mitocôndria, possuindo uma fluorescência verde brilhante e apresenta um máximo de emissão em $\lambda = 516\text{nm}$.

4.6 Preparações das amostras

4.6.1 Fotossensibilizadores

Com a PpIX sintética (Sigma-Aldrich) foi preparada uma solução estoque 5mM em DMSO e a concentração foi determinada usando o valor do coeficiente de absorção molar ($\epsilon^{628\text{nm}}=4,0 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A partir da solução estoque, foi preparada uma solução 1mM em água de qualidade Mili-Q que foi usada nos experimentos e na fotólise. A fotólise foi realizada com uma fonte de luz com emissão na região espectral $\lambda > 630 \text{ nm}$ e a fotodecomposição foi monitorada através dos espectros de absorção da solução.

A PpIX endógena foi cedida em uma solução de ACN:DMSO(3:1) e sua concentração foi determinada usando o valor do coeficiente de absorção molar determinado para a PpIX sintética em ACN:DMSO(3:1) ($\epsilon^{628\text{nm}}=4,4 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Nos experimentos de citotoxicidade foram utilizadas as concentrações: 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM , 5 μM e 10 μM das protoporfirinas endógenas e sintéticas. Nos experimentos de localização celular a concentração usada foi de 6 μM .

As soluções de TPPS₄ foram preparadas em água de qualidade Mili-Q, as concentrações foram determinadas em pH 7,0, através do espectro de absorção em $\lambda=515\text{nm}$ e do coeficiente de absorção molar $\epsilon^{515\text{nm}}=1,3 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As variações de pH foram induzidas com a adição de soluções estoque de NaOH e HCl, o pH foi controlado através do pH-metro CORNING pH meter 430 e todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($\approx 24^\circ\text{C}$). Nos experimentos de citotoxicidade foram utilizadas as concentrações: 1 μM ; 2 μM ; 5 μM , 10 μM ; 15 μM e 20 μM .

4.6.2 Marcadores

O DAPI foi diluído em PBS (1X) e usado na concentração de 0,0001 mg/ml e o MitoTracker Green foi usado em solução 400nM em PBS (1X).

4.7 Irradiação das protoporfirinas

Inicialmente, antes das amostras serem irradiadas, foram medidos os espectros de absorção e fluorescência das amostras de protoporfirinas.

A amostra de protoporfirina IX endógena foi colocada em um Becker em banho de gelo, sob agitação constante e irradiada por um LED de emissão no vermelho (centrado em 636,61nm) por 14 horas, para a obtenção dos fotoprodutos. Para a confirmação da formação do fotoproduto foi realizada uma nova medida do espectro de emissão de fluorescência da amostra.

No caso da protoporfirina IX sintética, os fotoprodutos foram obtidos da seguinte forma: foi preparada uma solução estoque 5mM em DMSO e, a partir desta, uma solução 1mM em água de qualidade Mili-Q. A amostra em água foi colocada em uma cubeta de quartzo de 10 mm de espessura, sob agitação constante e irradiada por uma fonte de luz composta por uma lâmpada de Xenônio de alta pressão de potência 75W acoplada a um filtro de vidro com espectro de transmissão na região espectral $\lambda > 630$ nm. Inicialmente foram monitorados os espectros de absorção e de emissão de fluorescência da PpIX. O processo de fototransformação foi acompanhado pelas medidas dos espectros de absorção da amostra em função do tempo de irradiação. A amostra foi irradiada até que o espectro de absorção não mais se alterasse (≈ 72 horas). Neste momento foram medidos os espectros de fluorescência do fotoproduto.

4.8 Experimentos com cultura de células

4.8.1 Cultura de células

As células B16F-0, B16F-10 e C8161 foram cultivadas em meio de cultura RPMI com vermelho de fenol suplementado com 20mM de L-glutamina, 2g/l de bicarbonato

de sódio, 2,38g/l de tampão HEPES, soro bovino fetal (7,5%), penicilina (1:100) e fungizona (1:200). Todos os reagentes foram obtidos da invitrogen™. Para os experimentos, as células foram dispersas com tripsina, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 10°C, contadas e semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços (TPP) (10^4 cél/poço). Todas as células utilizadas foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC).

4.8.2 Experimentos de fototoxicidade

As placas contendo as células semeadas foram deixadas para crescer por 24 horas em uma estufa (5% CO₂, 37°C, atmosfera úmida). Depois deste tempo, o meio RPMI com vermelho de fenol foi substituído por meio RPMI sem vermelho de fenol, e os FS foram adicionados em cada poço para se obter concentrações finais entre 0,1µM e 10 µM. As placas foram novamente colocadas em uma estufa por um período de incubação de 12 horas. Após a incubação, os FS foram retirados de cada poço e substituídos por RPMI incolor, as placas receberam então uma dose de irradiação de 56,7 J/cm² através de um irradiador de lâmpada halógena (OSRAM) 250W. A distância entre a fonte e a placa de cultura foi de 25cm (Figura 9). Os controles em cada experimento foram baseados na presença e na ausência de irradiação e, além disso, na presença e na ausência de FS. Sendo assim, foram preparados os seguintes controles: células com FS sem receber irradiação e células sem FS irradiadas.

Figura 9: Foto do irradiador usado nos experimentos de fototoxicidade

Figura 10: Esquema da placa de cultura usada nos experimentos

Terminada a irradiação, as placas foram colocadas na estufa por 24 horas e depois deste tempo a viabilidade celular foi medida através da determinação da atividade mitocondrial pelo método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)2,5-difenil-2H-tetrazólico) de acordo com Mosmann [44]. Para este teste foi adicionado 10µl de uma solução de MTT em PBS (5mg/ml) a cada poço e as placas foram postas para incubar por 3 horas em uma estufa. Depois deste tempo cada poço recebeu 50µl de solução a 20% de SDS em HCl 0,01N. Em seguida, as placas foram abrigadas da luz e mantidas em temperatura ambiente por 24 horas.

O efeito citotóxico (ECT) foi calculado da seguinte forma:

$$ECT = \frac{[células]_{controle} - [células]_{final}}{[células]_{controle}} \quad (3)$$

ou

$$ECT = 1 - \frac{[células]_{final}}{[células]_{controle}} \quad (4)$$

Em que: $[células]_{final}$ é a concentração final de células vivas que foram incubadas com FS; e $[células]_{controle}$ é a concentração de células vivas nos correspondentes poços de controle (células sem FS e com mesmo tempo de incubação) [45].

A concentração de células vivas pode ser determinada pelo fato de o MTT ser reduzido a um composto azul (azul de formazona), apenas nas células vivas.

Figura 11: Redução do MTT em azul de formazona [46]

A subsequente adição de SDS em HCl serviu para dissolver o azul de formazona e, deste modo, as densidades óticas das placas foram então determinadas em 570nm no espectrofotômetro μ Quant Bio-tek Instruments. Uma vez que a absorbância (Abs) das amostras é proporcional à concentração de células vivas, podemos calcular a porcentagem do efeito citotóxico (%ECT) do seguinte modo:

$$\%ECT = \left[1 - \frac{(Abs)_{amostras}}{(Abs)_{controle}} \right] * 100 \quad (5)$$

Onde: $(Abs)_{amostras}$ é a absorbância dos poços contendo células e FS; e $(Abs)_{controle}$ é a absorbância dos poços contendo apenas células.

Os resultados apresentados são os valores médios da %ECT $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com o teste t Student com nível de significância de 5% e para este teste utilizou-se o software Prism 5.0 Version.

4.8.3 Localização celular das protoporfirinas

Para este experimento foram usadas as células B16F-10. As células foram contadas e semeadas (2×10^4 células/poço) em uma placa para cultura de células de 8 poços (TPP) e incubadas por 16 horas em uma estufa (5% CO₂, 37°C, atmosfera úmida). No dia do experimento o meio de cultura foi retirado, os poços lavados com PBS 1x morno. As células foram então incubadas com solução 6 μ M das protoporfirinas e seus fotoprodutos por: 1, 5 e 15 minutos. A droga foi retirada, os poços lavados com PBS 1x e adicionado 200 μ l de MitoTracker Green 400nM em cada poço. Depois de 30 minutos de incubação o marcador foi retirado, os poços lavados com PBS 1x e as células fixadas com paraformaldeído 2% por 15 minutos seguido de uma lavagem com glicina 0,1M. Depois da fixação e lavagem, foram adicionados 200 μ l de DAPI em cada poço, deixando incubar por 5 minutos.

As imagens de fluorescência foram realizadas utilizando o microscópio de fluorescência Leica DM 5000 B.

5.Resultados e Discussões

5. Resultados e Discussões

5.1 Espectros de absorção óptica e de fluorescência das PpIX sintética e endógena

Nas figuras 12, 13 e 14 são apresentados os espectros de absorção óptica das PpIX sintética e endógena em água e em uma solução de ACN:DMSO (3:1).

Figura 12: Espectro de absorção da PpIX sintética em água e em solução de ACN:DMSO (3:1)

Figura 13: *Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN:DMSO (3:1)*

Figura 14: *Espectro de absorção da PpIX endógena em solução aquosa*

Comparando os resultados apresentados, podemos ver que os espectros de absorção das PpIX endógena e sintética, tanto em água quanto em ACN:DMSO são similares. Este resultado indica que o produto endógeno das glândulas dos animais possui características semelhantes ao sintético.

Entretanto, a análise comparativa dos espectros de emissão de fluorescência da PpIX em solução aquosa (figuras 15 e 16) demonstra uma diferença considerável entre os dois produtos. A análise da PpIX endógena, aponta um aumento do ombro na região de 700nm, podendo ser consequência de sua interação com estruturas celulares, que restaram após a purificação. Estas estruturas celulares podem ser proteínas, fragmentos de membrana, resíduos de organelas, etc.

Figura 15: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em água. $\lambda_{ex}=530nm$

Figura 16: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em água. $\lambda_{ex}=530\text{nm}$

5.2 Determinação dos coeficientes de absorção molar

Devido a uma grande dispersão de dados encontrados na literatura, sobre os coeficientes de absorção molar da PpIX em diferentes solventes, foi decidido determiná-los nos solventes utilizados neste trabalho. A determinação dos coeficientes de absorção molar foi realizada através de medidas de absorção ótica de soluções das porfirinas, em várias concentrações diferentes, partindo de uma concentração baixa para evitar a influência de interações entre as moléculas em estudo (agregação). A partir do espectro de absorção em cada concentração foi feito um gráfico de absorção, nos comprimentos de onda máximos nas bandas de absorção, pela concentração das soluções.

Na ausência de agregação, a dependência entre a absorbância e a concentração da solução deve ser linear, resultado que foi realmente encontrado (figuras 17,18).

Figura 17: Determinação do coeficiente de absorção molar da PpIX sintética em DMSO. $\lambda=629\text{nm}$

Figura 18: Determinação do coeficiente de absorção molar da TPPS₄ em água, pH =4,0, em $\lambda=644\text{nm}$

Nestas condições, o coeficiente de absorção molar é igual a tangente do ângulo de inclinação da dependência absorbância-concentração (equação 2, sessão 3.1).

Os valores obtidos para o coeficiente de absorção molar da PpIX em uma solução de DMSO foram: $\epsilon^{505\text{nm}}=1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{540\text{nm}}=9,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{574\text{nm}}=6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{629\text{nm}}=4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para as soluções em água, foi obtido: $\epsilon^{440\text{nm}}=4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{533\text{nm}}=2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{589\text{nm}}=1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{641\text{nm}}=6,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Em solução de ACN:DMSO (3:1), foi encontrado: $\epsilon^{502\text{nm}}=1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{537\text{nm}}=1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{573\text{nm}}=6,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{628\text{nm}}=4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os valores dos coeficientes para PpIX sintética e endógena foram próximos.

Para a TPPS₄ em água e em pH 7,0 foi obtido: $\epsilon^{515\text{nm}} = 1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon^{552\text{nm}} = 5,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{578\text{nm}} = 5,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{632\text{nm}} = 3,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e em pH 4,0 foi achado: $\epsilon^{593\text{nm}} = 9,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon^{644\text{nm}} = 3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

5.3 Espectros de absorção óptica e de fluorescência da TPPS₄

A figura 19 mostra o espectro de absorção da TPPS₄ em água e pH=7,0.

Figura 19: Espectro de absorção da TPPS₄ em água. pH = 7,0

Em pH=7,0, a TPPS₄ está desprotonada e seu espectro de absorção é caracterizado por bandas centradas em 513nm (bandas Soret) e 552, 578 e 632nm (bandas Q) [47].

A figura 20 apresenta o espectro de emissão de fluorescência da TPPS₄ em solução aquosa e pH=7,0. Nestas condições o espectro foi caracterizado por uma banda com máximo em 642nm e um ombro em 701nm.

Figura 20: Espectro de emissão de fluorescência da TPPS₄ em água. pH = 7,0

5.4 Citotoxicidade

5.4.1 Teste de citotoxicidade da solução de ACN:DMSO (3:1)

A PpIX endógena foi obtida em uma solução de ACN:DMSO (3:1). Para verificar a fotocitotoxicidade de ACN:DMSO, foi feito um teste utilizando somente esta solução, em

uma concentração máxima de $10\mu\text{M}$. A figura 21 mostra um exemplo nas células B16F-10, demonstrando que a toxicidade desta solução pode ser considerada desprezível.

Figura 21: Citotoxicidade da solução ACN:DMSO (3:1) nas células B16F-10 em função da sua concentração no escuro e sob irradiação [$56,7\text{ J}/\text{cm}^2$].

5.4.2 Citotoxicidade das PpIX sintética e endógena

As figuras 22 e 23 apresentam os resultados dos testes de citotoxicidade para as PpIX sintética e endógena, contra as células B16F-10 e C8161.

Figura 22: Citotoxicidade da PpIX sintética (a) e endógena (b) na faixa de concentrações de 0,1-10 µM nas células B16F-10, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm²

Figura 23: Citotoxicidade da PpIX sintética (a) e endógena (b) na faixa de concentrações de 0,1-10 µM nas células C8161, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm²

Tanto a PpIX sintética quanto a endógena apresentam um ECT comparável, sendo que a citotoxicidade no escuro foi menor que nas células que foram irradiadas. Comparando o efeito citotóxico da PpIX sintética entre as células B16F-10 e C8161, nota-

se que o ECT pode ser comparável entre estas células, no entanto, na PpIX endógena, o ECT foi um pouco maior nas células C8161.

Também foi comparável a citotoxicidade para as duas protoporfirinas, tanto para a B16F-10 quanto para a C8161, exceto na concentração de 5 μ M no escuro da PpIX endógena nas células C8161.

O Photogem[®] é utilizado em clínicas em vários países, inclusive no Brasil e por este motivo foram feitos testes em paralelo com este composto para efeito comparativo. A figura 24 mostra os resultados destes testes nas células B16F-10 e C8161.

Figura 24: Citotoxicidade do Photogem[®] na faixa de concentrações de 0,1-10 μ M nas células B16F-10 e C8161, com e sem irradiação, tempo de incubação de 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm²

A comparação dos resultados das PpIX endógena e sintética com o Photogem[®], mostrou que as PpIX atingiram um patamar mais rapidamente que o Photogem[®] para mesma faixa de concentrações e dose de irradiação, tanto para as células B16F-10 como para as células C8161. Foi observado também que, contrariamente às PpIX, a citotoxicidade no escuro é desprezível para o Photogem[®].

5.4.3 Citotoxicidade da TPPS₄.

O teste de citotoxicidade da porfirina TPPS₄ em comparação com Photogem[®] foi realizado em cultura de células HT29. Foi observado (figuras 25 e 26) que a citotoxicidade da TPPS₄ no escuro atingiu valores negativos. Este resultado indica que na presença da TPPS₄ as células continuam se proliferando, ou seja, a TPPS₄ não possui toxicidade no escuro. Este resultado foi diferente do resultado para o Photogem[®], que possui pouca toxicidade no escuro, que no caso das PpIX é mais baixa.

Além disso, foi verificado que a TPPS₄ apresenta um efeito fotocitotóxico consideravelmente menor que o Photogem[®] (figuras 25 e 26).

Figura 25: Citotoxicidade da TPPS₄ na faixa de concentrações 1-20 μM nas células HT29, com e sem irradiação, tempo de incubação de 1-9 horas, dose de irradiação 40 J/cm²

Figura 26: Citotoxicidade do Photogem® na faixa de concentração 1-20 μM nas células HT29, com e sem irradiação, tempos de incubação de 1-9 horas, dose de irradiação 40 J/cm^2

5.5 Fotólise das porfirinas

5.5.1 Mudanças espectrais das protoporfirinas sintética e endógena devido à irradiação

Na figura 27 são mostrados espectros de absorção da PpIX sintética 1mM em água, antes e depois de ser irradiada. A figura 28 mostra o espectro de absorção da PpIX endógena antes de ser irradiada e após 16 horas de irradiação.

Figura 27: Espectros de absorção da PpIX sintética (1mM em água) e de seu fotoproduto (1mM em água) depois de 70 h35min e 84h30min de irradiação

Figura 28: Espectros de absorção da PpIX endógena e de seu fotoproduto depois de 16 horas de irradiação

Alguns trabalhos já demonstraram que durante a fotólise da PpIX em DMSO e DMF, aparece um novo pico de absorção em 670 nm [19; 27]. No presente estudo, irradiando a

PpIX em meio aquoso, não foi observado a formação destes picos de absorção nem para a PpIX sintética, nem para a endógena. Estes resultados mostram que a natureza do ambiente pode influenciar o processo de fototransformação da PpIX. Este efeito pode ser responsável pela diferença observada nos espectros de fotoprodutos das PpIX sintética e endógena, que mostra um maior grau de fototransformação para PpIX endógena. Esta diferença pode ser devida a interação da PpIX endógena com restos de estruturas celulares que restaram após a purificação. O mesmo ocorre nos espectros de fluorescência das PpIX (ver sessão 5.1).

Para confirmar esta hipótese, foi realizada a fotólise da PpIX sintética na presença de micelas, formadas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (figura 29). A PpIX sintética foi diluída para uma concentração final de 1mM em uma solução 50mM de SDS.

Figura 29: *PpIX sintética 1mM na presença de micelas*

Comparando os gráficos das figuras 27 e 29, foi observado que não há diferença considerável entre a fotólise da PpIX sintética em solução aquosa homogênea e na presença de micelas. Este resultado pode ser considerado preliminar, e para uma conclusão mais fundamentada é necessário um estudo mais aprofundado.

As figuras 30 e 31 demonstram os espectros de emissão de fluorescência da PpIX sintética e endógena e seus fotoprodutos.

Figura 30: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética e de seu fotoproduto (depois de 71 horas de irradiação). $\lambda_{ex}=530nm$

Figura 31: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena e de seu fotoproduto (depois de 16 horas de irradiação). $\lambda_{ex}=530nm$

Comparando os espectros apresentados acima, nota-se uma diferença tanto entre os picos de emissão, quanto entre os perfis dos espectros das protoporfirinas e seus fotoprodutos. Esta diferença pode, provavelmente, estar associada à diferença de ambiente entre a PpIX endógena e a sintética. A PpIX endógena e seu fotoproduto pode possivelmente interagir com compostos celulares, tais como proteínas, fragmentos de membrana, resíduos de organelas, etc.

5.5.2 Citotoxicidade dos fotoprodutos

As figuras 32 e 33 mostram os resultados dos testes de citotoxicidade dos fotoprodutos das protoporfirinas IX sintética e endógena contra as células B16F-10 e C8161.

Figura 32: Citotoxicidade do fotoproduto da PpIX sintética (a) e endógena (b) na faixa de concentrações de 0,1-10 μM nas células B16F-10, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm²

Figura 33: Citotoxicidade do fotoproduto da PpIX sintética (a) e endógena (b) na faixa de concentrações de 0,1-10 µM nas células C8161, com e sem irradiação, tempo de incubação 12 horas, dose de irradiação 56,7 J/cm²

Analisando os resultados do efeito citotóxico da FPpIX sintética nas células B16F-10 e C8161, foi observado que a citotoxicidade no escuro é maior para células B16F-10. Para ambas as linhagens, o efeito citotóxico no escuro e sob irradiação são praticamente iguais. Assim, pode-se considerar ausência da fotocitotoxicidade do fotoproduto da PpIX sintética. Pode-se concluir também que, a citotoxicidade do fotoproduto no escuro é comparável com a da PpIX.

Os produtos da fotólise da PpIX endógena apresentam uma toxicidade maior que os fotoprodutos da PpIX sintética em ambas linhagens de células. Diferentemente dos fotoprodutos da PpIX sintética, os fotoprodutos da PpIX endógena apresentam uma maior toxicidade para as células C8161, tanto no escuro quanto para as células irradiadas. Além disso, foi observado que há uma diferença entre a citotoxicidade do fotoproduto da PpIX endógena, para as células irradiadas e no escuro contra as células B16F-10. Este resultado significa que a FPpIX endógena apresenta fototoxicidade contra as células B16F-10, já para a linhagem C8161, sua citotoxicidade no escuro e sob irradiação é igual, mostrando a ausência de fotocitotoxicidade contra esta linhagem.

5.6 Localização celular

Primeiramente foi estudada a internalização das PpIX endógena e sintética, para tanto, as células B16F-10 foram incubadas com estas protoporfirinas por: 1, 5 e 15 minutos. As imagens foram feitas por microscopia de fluorescência ótica e são mostradas nas figuras 38 e 39.

Figura 34: Imagens de fluorescência da PpIX sintética incubada por A) 1min B)5min C)15min e seu fotoproduto D) 1min E)5min F)15min

Figura 35: Imagens de fluorescência da PpIX endógena incubada por A) 1min B)5min C)15min e seu fotoproduto D) 1min E)5min F)15min

Após 1min de incubação da PpIX sintética, foi observado que as partículas fluorescentes se localizam preferencialmente na superfície das células. Com 5min de incubação, a fluorescência já aparece no interior das células e com 15 minutos de incubação foi observada uma grande concentração das protoporfirinas difusas em todo o citoplasma das células, concentrando-se principalmente no espaço pré-nuclear.

Analizando a distribuição de fotoprodutos da PpIX sintética (D, E e F - figura 34) e endógena (D, E e F - figura 35), foi visualizado que a intensidade da fluorescência do fotoproduto é muito mais baixa que a da PpIX. Entretanto, foi observado que depois de 1 minuto de incubação, uma grande concentração de fotoproduto se encontrava no interior das células. Com 15 minutos, o fotoproduto foi encontrado distribuído dispersamente no citoplasma celular, estando concentrado principalmente no espaço pré-nuclear.

Para determinar os sítios de localização das PpIX sintética e endógena e de seus fotoprodutos, foi utilizada as células B16F-10 e comparada a distribuição da sua fluorescência com a de marcadores padrões de organelas intracelulares. As células foram incubadas com as protoporfirinas e seus fotoprodutos por 1 e 15 minutos. As figuras 36-43 apresentam as imagens obtidas para cada Protoporfirina ou fotoproduto, marcador e a sobreposição das imagens.

Figura 36: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX sintética por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A) PpIX sintética, B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição da A, B e C*

Figura 37: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX sintética por 15min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). E) PpIX sintética, F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G*

Figura 38: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX endógena por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A) PpIX endógena B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição de A, B e C*

Figura 39: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com PpIX endógena por 15 min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). E) PpIX endógena F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G*

Figura 40: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproduto da PpIX sintética por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A) FPpIX endógena B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição de A, B e C*

Figura 41: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproduto da PpIX sintética por 15 min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). E) FPpIX sintética F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G*

Figura 42: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproduto da PpIX endógena por 1min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). A)FPpIX endógena B) DAPI, C) Mitotracker, D) sobreposição de A, B eC*

Figura 43: *Imagens de fluorescência de células B16F-10 incubadas com o fotoproduto da PpIX endógena por 15min e com os marcadores: DAPI (núcleo de células) e Mitotracker (mitocôndrias). E) FPpIX endógena F) DAPI, G) Mitotracker, H) sobreposição de E, F e G*

As imagens obtidas mostraram que tanto no caso de ambas porfirinas, quanto dos seus fotoprodutos, não houve penetração no núcleo da célula. Suas distribuições no citoplasma foi difusa e sem localizações preferenciais. O mesmo resultado foi obtido para a porfirina TPPS₄ dentro das células HT29.

Figura 44: *Imagens de fluorescência das células HT29 após incubação com A) TPPS₄ B) Rodamina 123[47]*

6. Conclusões

6. Conclusões

A partir da análise comparativa dos espectros de absorção e de fluorescência da PpIX sintética e endógena e seus fotoprodutos, pode-se concluir que existe uma diferença considerável entre os compostos. Tal diferença pode ser consequência do ambiente onde estes compostos se encontram. Este efeito do ambiente pode ser devido a interação da PpIX endógena e seu fotoproduto com compostos celulares tais como, proteínas, fragmentos de membrana, resíduos de organelas etc., que poderiam estar presentes depois da purificação da PpIX obtida da glândula. Para confirmar esta hipótese, foi utilizado um sistema modelo (micelas SDS) e realizado estudos de fototransformação da PpIX sintética neste ambiente. Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa entre a fototransformação da PpIX em solução aquosa homogênea e na presença de micelas de SDS. Entretanto, espera-se realizar no futuro um estudo mais aprofundado da influência do ambiente no processo de fototransformação da PpIX.

A análise comparativa da citotoxicidade das PpIX sintética e endógena e dos seus fotoprodutos, no escuro e sob ação da luz visível mostrou que:

- a) As PpIX sintética e endógena, apresentaram uma citotoxicidade sempre menor no escuro que sob ação da luz, o que significa a presença de fotocitotoxicidade.
- b) As PpIX sintética e endógena possuíram fotocitotoxicidade comparável.
- c) A citotoxicidade no escuro da PpIX sintética e de seu fotoproduto foram comparáveis.
- d) O fotoproduto da PpIX sintética não possuiu fotocitotoxicidade, diferente dos resultados encontrados na literatura.
- e) A citotoxicidade no escuro do fotoproduto da PpIX endógena foi maior no escuro que a citotoxicidade da PpIX endógena.

f) O fotoproduto da PpIX endógena apresentou fotocitotoxicidade em cultura de células de melanoma de camundongos C57BL/6 (B16F-10), e não apresentou fotocitotoxicidade em cultura de células de melanoma humano (C8161).

Foi associado também à diferença de ambiente, a diferença observada entre as características de toxicidade das porfirinas PpIX sintética e endógena.

Os efeitos citotóxicos das porfirinas PpIX, TPPS₄ e do Photogem[®] demonstraram que as porfirinas PpIX endógena e sintética possuem uma fototoxicidade comparável a do Photogem[®], sendo que a citotoxicidade no escuro das PpIX são maiores. A porfirina TPPS₄ não possuiu citotoxicidade no escuro, e apresentou uma fototoxicidade menor do que o Photogem[®].

A comparação da distribuição intracelular, das porfirinas PpIX e seus fotoprodutos com a de marcadores padrões de estruturas celulares, mostrou claramente que as PpIX sintética e endógena e seus fotoprodutos não penetraram no núcleo da célula. A distribuição destes compostos nas demais partes do citoplasma foi difusa, sem nenhuma localização preferencial.

Perspectivas futuras

Com base nos resultados dos estudos realizados neste projeto, foi considerado que para melhor esclarecimento da ação da PpIX endógena é necessário realizar alguns estudos adicionais. Entre eles:

1. Realizar um estudo mais detalhado do efeito do ambiente no processo de fototransformação da PpIX sintética.
2. Realizar um estudo comparativo da fototoxicidade dos fotoprodutos da PpIX sintética, e entre o extraído diretamente da glândula Harderiana.
3. Estudar melhor o mecanismo de fotocitotoxicidade da PpIX endógena em comparação com a sintética.

7. Referências

- [1] National Cancer Institute. Disponível em:<<http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>> Acesso em: 4 out. 2010.
- [2] Instituto Nacional de Câncer. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br>> Acesso em: 5 out. 2010.
- [3] BAGNATO, V. S. et al. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 107-118, 2005.
- [4] CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 535-545, Jul 2006. Jul.
- [5] CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006 - Part 1: Photochemistry and photobiology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 3, p. 293-302, Mar 2007. Mar.
- [6] BONNETT, R. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 19-33, Feb 1995. Feb.
- [7] TRIESSCHEIJN, M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034-1044, 2006.
- [8] REDMOND, R. W.; KOICHEVAR, I. E. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1178-1186, Sep-Oct 2006. Sep-Oct.
- [9] RIBEIRO, J. N. et al. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v. 32, p. 7-14, 2007.
- [10] WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 9, p. R61-R109, May 7 2008. May 7.
- [11] SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002.

- [12] CHAKRABORTI, A. S. Interaction of porphyrins with heme proteins – a brief review. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 49-54, 2003.
- [13] SACZKO, J. et al. Intracellular distribution of Photofrin (R) in malignant and normal endothelial cell lines. **Folia Biologica**, v. 53, n. 1, p. 7-12, 2007.
- [14] SCHUITMAKER, J. J. et al. Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 34, n. 1, p. 3-12, Jun 1996. Jun.
- [15] NORTH, J.; NEYNDORFF, H.; LEVY, J. G. New trends in photobiology: Photosensitizers as virucidal agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 17, n. 2, p. 99-108, 1993.
- [16] STANESCU, D.; WATTENBERG, S.; COHEN, S. Y. Photodynamic therapy for choroidal neovascularization secondary to choroidal nevus. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n. 3, p. 575-576, 2003.
- [17] TAKEMURA, T.; NAKAJIMA, S.; SAKATA, I. Tumor-localizing fluorescent diagnostic agents without phototoxicity. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 366-370, Mar 1994. Mar.
- [18] PAVLOV, V. Y. Modern aspects of the chemistry of protoporphyrin IX. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 1-34, Jan 2007. Jan.
- [19] THEODOSSIOU, T.; MACROBERT, A. J. Comparison of the photodynamic effect of exogenous photoporphyrin and protoporphyrin IX on PAM 212 murine keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 5, p. 530-537, Nov 2002. Nov.
- [20] BONNETT, R. et al. Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin(m-THPBC). A comparative study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 53, n. 1-3, p. 136-143, 1999.
- [21] KUBÁT, P.; MOSINGER, J. Photophysical properties of metal complexes of meso-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 96, n. 1-3, p. 93-97, 1996.

- [22] LAPES, M.; PETERA, J.; JIRSA, M. Photodynamic therapy of cutaneous metastases of breast cancer after local application of meso-tetra-(para-sulphophenyl)-porphin (TPPS4). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, n. 2, p. 205-207, 1996.
- [23] SANTORO, O. et al. Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfonate tetrasodium salt administration in superficial basal - cell carcinomas. **Cancer Research**, v. 50, n. 15, p. 4501-4503, Aug 1990. Aug.
- [24] RICCHELLI, F. Photophysical properties of porphyrins in biological-membranes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 29, n. 2-3, p. 109-118, Aug 1995. Aug.
- [25] ROTOMSKIS, R. et al. Phototransformation of Sensitisers: 3. Implications for Clinical Dosimetry. **Lasers in Medical Science**, v. 13, n. 4, p. 271-278, 1998.
- [26] BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, n. 47, p. 9513-9547, Nov 2001. Nov.
- [27] ERICSON, M. B. et al. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 1, p. 56-62, 2003.
- [28] KONIG, K. et al. In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 18, n. 2-3, p. 287-290, May 1993. May.
- [29] DYSART, J. S.; PATTERSON, M. S. Photobleaching kinetics, photoproduct formation, and dose estimation during ALA induced PpIX PDT of MLL cells under well oxygenated and hypoxic conditions. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 73-81, 2006.
- [30] BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Effects of photoproducts on the binding properties of Protoporphyrin IX to proteins. **Biophysical Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 77-87, Apr 2002. Apr.
- [31] SPIKE, R. C. et al. Porphyrin syntesis in the Harderian-gland and other tissues of the Golden-hamster during pregnancy and lactation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 11, n. 1-2, p. 151-152, 1990.
- [32] REIS, E. R., NICOLA, E. M. D., NICOLA, J. H. Harderian gland of a wistar rats revised as a protoporphyrin IX producer. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 43-51, 2005 2005. 2005.

- [33] HSI, R. A.; ROSENTHAL, D. I.; GLATSTEIN, E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer - Current state of the art. **Drugs**, v. 57, n. 5, p. 725-734, May 1999. May.
- [34] DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, Jun 17 1998. Jun 17.
- [35] ROTOMSKIS, R.; VAICAITIS, V.; PISKARSKAS, A. Time-resolved absorption spectroscopy of hematoporphyrin and its photoproducts. **Chemical Physics Letters**, v. 202, n. 3-4, p. 233-236, 1993.
- [36] EMILIANI, C.; DELMELLE, M. The lipid solubility of porphyrins modulates their phototoxicity in membrane models. **Photochemistry and Photobiology**, v. 37, n. 5, p. 487-490, 1983.
- [37] OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.
- [38] The Science Creative Quarterly. **Disponível em:** <<http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>> **Acesso em: 28 out. 2010.**
- [39] COOPER, G. M. The cell - A molecular approach. Washington: ASM Press, 1997.
- [40] RYAN, J. A. **Introduction to animal cell culture**: Cornig Incorporated 2003.
- [41] CAMPBELL, L. D.; DWEK, R. A. **Biological Spectroscopy**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1984.
- [42] LAKOWIKZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Plenum Press, 1983.
- [43] REIS, E. R. **Glândula harderiana de ratos wistar como modelo para o estudo de efeitos fotodinâmicos**. 2004.100 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- [44] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

- [45] DAGHASTANLI, N. A. et al. Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 75, n. 1-2, p. 27-32, Jul 2004. Jul.
- [46] Wikipedia. Disponível em:<[http://en.wikipedia.org/wiki/MTT assay](http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay) Acesso em: 5 out. 2010
- [47] AGGARWAL, L. P. F. **Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS4 e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos do pH e da força iônica.** 2005.158 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.