UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

LUCIANA SAYURI MURAKAMI

"Estudo da fotocitotoxicidade dos corantes ciânicos com dois cromóforos em culturas de células neoplásicas"

> Ribeirão Preto - SP 2009

LUCIANA SAYURI MURAKAMI

"Estudo da fotocitotoxicidade dos corantes ciânicos com dois cromóforos em culturas de células neoplásicas"

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientação: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

Ribeirão Preto - SP 2009 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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Murakami, Luciana Sayuti Estudo da fotocitotoxicidade dos corantes ciânicos com dois cromóforos em culturas de células neoplásicas. Ribeirão Preto, 2009.

154 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e

Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à

Medicina e Biologia.

Orientador: Borissevitch, Iouri.

1. Corantes ciânicos com dois cromóforos. 2. Fotocitotoxicidade. 3. Localização intracelular. 4. Mecanismos de morte celular. 5. Permeação Cutânea.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Sayuri Murakami

"Estudo da fotocitotoxicidade dos corantes ciânicos com dois cromóforos em culturas de células neoplásicas"

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia

Banca Examinadora

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Banca Examinadora em _/_/2009.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Yoshio e Dirce; irmãs Fabiana e Valéria por estarem sempre ao meu lado apoiando todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Juliano por sua compreensão, companheirismo e apoio durante esses anos.

Agradecimentos

Ao meu orientador Iouri Borissevitch pelo apoio, carinho, amizade e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Prof Auro Nomizo pela amizade, por me ensinar a trabalhar com células e disponibilizar o seu laboratório para a realização deste trabalho.

À Stephânia pela grande ajuda nos experimentos de cultura de células mas especialmente nos experimentos de permeação; além da amizade.

À todos do laboratório de Fotobiofísica pelo auxílio e pela amizade todos esses anos, em especial aos coleguinhas, Cássia, Marina B e Gustavo (Pudimm).

Ao técnico do laboratório de fotobiofísica Leonardo pela amizade e ajuda sempre que precisei.

À todos do laboratório LIIP, em especial ao Carlos pela ajuda nos experimentos de fluorescência e leitura das placas de MTT e a Fabiana pela ajuda na obtenção e análise dos dados de citometria de fluxo.

À todos do laboratório de P&D – Sistemas de Liberação da professora Renata pela ajuda nos experimentos de permeação.

À Marina Ness por todas as nossas conversas noturnas, programas inúteis, almoços no bandex, voltas de circular da USP, caminhadas na esteira, mas principalmente pela amizade e apoio nestes anos.

Às meninas da Rep Tcheca (Marina, "Jamanta", Renata, Tatiani, Lilian, Juliana e Ana) e ao último morador Jorge pela convivência e amizade.

Aos colegas de graduação e pós graduação do Departamento de Física e Matemática da FFCLRP.

A todos os amigos de Ribeirão Preto pela convivência todos esses anos: Tenysson, Michela, Marina Pires, Pablo, Bruno, Q, Silvio, Tânia, Carô, Juliane, Fabiana, Ana Paula, Wagner, André, Khallil, Rabo, Moisés, Liliane, Lygia, Luciano, ... À secretária da pós Nilza.

Ao Departamento de Física e Matemática por oferer o programa de pós em Física Aplicada em Medicina e Biologia.

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

Resumo

MURAKAMI, L.S. Estudo da fotocitotoxicidade dos corantes ciânicos com dois cromóforos em culturas de células neoplásicas. 2009. 154 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009

Os corantes ciânicos com dois cromóforos possuem características espectrais e energéticas vantajosas para aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD) do câncer. Entretanto, sua fotoatividade contra neoplasias não foi ainda estudada nem *in vivo* nem *in vitro*.

Nesta tese apresentamos os resultados dos estudos *in vitro* dos mecanismos da fotocitotoxicidade dos corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD_{α}) com ângulos entre os cromóforos $\alpha = 180^{\circ}$, 150° e 90° contra células neoplásicas, com a finalidade de avaliar a potencialidade da aplicação dos BCD_{α} como fotossensibilizadores (FS) em TFD. Os estudos foram realizados em comparação com o fotossensibilizador Photogem®,que já está sendo aplicado em TFD. Foram estudados o efeito fototóxico, a distribuição intracelular do BCD_{α} e a contribuição de apoptose e necrose na morte celular induzida por ele. Além disso, foi realizada a busca da formulação farmacêutica adequada para aplicação tópica do BCD₁₈₀.

Nos estudos da fotocitotoxicidade foram utilizadas as células neoplásicas de melanoma murino B16F10, melanoma humano C8161, adenocarcinoma de colo retal humano HT29, leucemia T humano (Jurkat) e leucemia mielóde aguda humana HI-60. A citotoxicidade foi estudada em função da dose da irradiação, da concentração do FS e do tempo de incubação das células com FS. Todos os compostos testados apresentaram baixa citotoxicidade no escuro, quando sob irradiação com luz visível ($\lambda > 600$ nm) sua citotoxicidade aumentou consideravelmente. Observamos que para todos os tipos de células neoplásicas a fotocitotoxicidade dos BCD_{α}, depois de atingir seu máximo na variação do tempo de incubação, é igual ou ultrapassa a fotocitotoxicidade do Photogem® nas mesmas condições experimentais. O estudo comparativo do BCD₁₈₀ e dos BCD₁₅₀ e BCD₉₀ mostrou que nas mesmas condições experimentais os dois últimos possuem fotocitotoxicidade maior do que o BCD₁₈₀. O conjunto dos resultados obtidos mostra que os BCD_{α} podem ser considerados promissores FS para TFD do câncer.

Os estudos através de microscopia de fluorescência da distribuição intracelular do BCD₁₈₀ e dos marcadores fluorescentes das mitocôndrias Mitotracker GreenTM e Rodamina 123 e do núcleo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) mostraram que o BCD₁₈₀ se localiza preferencialmente na região das mitocôndrias.

Os mecanismos da morte celular induzida pelo BCD_{180} foram analisados através do estudo da morfologia das células Jurkat, liberação da fosfatidilserina, liberação do citocromo c, ativação da caspase-3 e do efeito na citotoxicidade do BCD_{180} da proteína Bcl-2 (inibidor do citocromo c). A análise mostrou que a apoptose é a principal responsável pela morte celular induzida pelo BCD_{180} no escuro, enquanto que, sob irradiação luminosa, tanto a apoptose quando a necrose contribuem para a morte celular, e a contribuição da necrose aumenta com o aumento da concentração do BCD_{180} e do tempo de pós-irradiação. A apoptose ocorre, provavelmente, pela via intrínseca ou mitocondrial.

Além disso, foram realizados os testes de permeação cutânea do BCD_{180} utilizando várias formulações farmacológicas e foi determinado que a mistura de 10% de monoleína em propilenoglicol possui melhores características entre todas as formulações testadas.

Palavras-chave: corantes ciânicos com dois cromóforos, fotocitotoxicidade, localização intracelular, mecanismos de morte celular, permeação cutânea.

Abstract

MURAKAMI, L.S. Photocytotoxicity study of cyanine dyes with two chromophores toward neoplasic cell cultures . 2009. 154 f. Doctorate thesis – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009

Cyanine dyes with two chromophores possess vantage spectral and energetic characteristics for application in Photodynamic Therapy (PDT) of cancer. At the same time, their photoactivity against neoplasias was not yet studied nether *in vivo*, nor *in vitro*.

In this thesis, we present the results of *in vitro* studies of photocytotoxicity mechanisms of cyanine dyes with two chromophores (BCD_{α}) with angles $\alpha = 180^{\circ}$, 150° and 90° between chromophores against neoplasic cells, with the objective to evaluate BCD_{α} potentiality to be applied as photosensitizers (PS) to Photodynamic Therapy (PDT). The studies were realized in comparison with photosensitizer Photogem®, which is already applied to PDT. The BCD_{α} phototoxic effect, their intracellular distribution and contribution of the apoptosis and necrosis in the cell death induced by BCD_{α} were studied. Besides, the search of adequate pharmaceutical formulation for BCD₁₈₀ topic application was realized.

The neoplasic cell lines of melanoma B16F10 in mice, human melanoma C8161, human colon adenocarcinoma HT29, human T-cell leukemia (Jurkat) and human leukemia HI-60, were used in the study of photocytotoxicity, which was studied as a function of irradiation dose, PS concentration and incubation time of cells with PS. All tested compounds demonstrated low cytotoxicity in the darkness, while under irradiation by visible light ($\lambda > 600$ nm) their cytotoxicity considerably increased. It was observed that for all types of neoplasic cells BCD_{α} photocytotoxicity under the same experimental conditions is equal or exceeds that of Photogem® when reaches the maximum with the incubation time variation. The comparative study of BCD₁₈₀ with BCD₁₅₀ and BCD₉₀ demonstrated that under the same experimental conditions two latter compounds possess photocytotoxicity exceeding that of BCD₁₈₀. A set of the results obtained demonstrates that BCD_{α} can be considered as promising PS for PDT of cancer.

The study of intracellular distribution of BCD_{180} , and of mitochondria and nucleus fluorescence selective probes Mitotracker GreenTM, Rhodamine 123 and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) show that BCD_{180} is mostly localized in the region of mitochondria.

The mechanisms of the cell death induced by BCD_{180} were analyzed in the study of Jurkat cells morphology, phosphatidyl serine and cytochrome c liberation, caspase-3 activation, and by protein Bcl-2 (cytochrome c inhibitor) effect on BCD_{180} cytotoxicity. The analysis demonstrated that apoptosis is the main responsible for the cell death induced by BCD_{180} in darkness, while under light irradiation both apoptosis and necrosis contribute to the cell death, and necrosis contribution increases with BCD_{180} concentration and post-irradiation time. The apoptosis is probably realized by an intrinsic or mitochondrial way.

Besides, the tests of BCD_{180} cutaneum permeation were realized using various pharmacological formulations. It was determined that among all formulations tested, the mixture of 10% of monoleine in propylene glycol possesses the best characteristics.

Keywords: cyanine dyes with two chromophores, photocytotoxicity, intracellular localization, cell death mechanisms, cutaneum permeation.

Lista de Figuras

Figura 2.1	- Esquema principal do tratamento através da Terapia Fotodinâmica6
Figura 2.2	Diagrama energético das reações do tipo I e II em TFD [20]7
Figura 2.3	- a) Porfirina desprotonada; b) porfirina monoprotonada; c) porfirina biprotonada10
Figura 2.4	- Estrutura geral dos CC10
Figura 2.5	- Estrutura geral dos BCD12
Figura 2.6	- Espectros normalizados de absorção de BCD com diferentes ângulos a entre os cromóforos em etanol13
Figura 2.7	- Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose versus necrose [63]
Figura 2.8	- Esquema da morte induzida por apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial [67]
Figura 2.9	Esquema da estrutura da pele [70]20
Figura 2.1() - Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: (A) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) e (B) através dos apêndices cutâneos [78]
Figura 5.1	 Estrutura molecular dos corantes ciânicos com dois cromóforos com ângulos de a) 180°, b) 150° e c) 90° entre os cromóforos.
Figura 5.2	 Espectros de absorção dos corantes ciânicos com dois cromóforos com ângulos de a) 180°, b) 150° e c) 90° entre os cromóforos em etanol
Figura 5.3	- Estrutura molecular do Photogem®29
Figura 5.4	- Espectro de absorção do Photogem® em água (pH 6,4)30
Figura 6.1 ·	Diagrama de Jablonski
Figura 6.2	- Esquema do alinhamento da suspensão líquida para análise
Figura 7.1	– Foto do irradiador utilizado nos experimentos deste trabalho com suporte em L para fixação do irradiador40
Figura 7.2	- Esquema da placa de cultura tipo "Eliza" utilizada nos experimentos41

Figura 7.3 -	Espectros normalizados da emissão da fonte e do filtro de transmissão utilizados e os espectros de absorção do BCD ₁₈₀ e Photogem®41
Figura 7.4 -	Redução do sal de tetrasol em azul de formazan [90]42
Figura 7.5 ·	- Esquema demonstrando a técnica de "tape-stripping" para retirada do estrato córneo (adaptado de [77])53
Figura 7.6 -	Célula de difusão vertical tipo "Franz"54
Figura 7.7	- (A) Célula de difusão iontoforética, (B) Vista superior do compartimento doador
Figura 7.8 -	Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (A) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido. Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (B) o eletrodo foi encapado com plástico isolante (C)
Figura 7.9	- Representação esquemática do circuito elétrico em série para o preparo do eletrodo positivo (ânodo) através da passagem de uma corrente elétrica de 0,6mA por 8h
Figura 8.1 -	Espectros de absorção normalizados do BCD ₁₈₀ em água e etanol61
Figura 8.2 -	Espectros de absorção de BCD ₁₈₀ em meio de cultura RPMI-S com variação da concentração de 1-20 µ M62
Figura 8.3	- Espectros de absorção de BCD ₁₈₀ nas células A)B16F10 e B) C8161 com variação da concentração de 1-20 µ M e tempo de incubação de 2h64
Figura 8.4	- Citotoxicidade do etanol sobre as células de B16F10, C8161 e HT29 após incubação de duas horas e dose de irradiação de 40J/cm ² A) Escuro e B) Irradiado
Figura 8.5	 %ECT das diferentes concentrações "na base 10" de BCD₁₈₀ e Photogem® sobre culturas de células de melanoma B16F10 com tempo de incubação de 2h A) escuro, B) irradiado com 40J/cm²
Figura 8.6	 Efeito da variação da dose de irradiação sobre o efeito fotocitotóxico do A) BCD₁₈₀ e B) Photogem® sobre o melanoma B16F10 em função da concentração dos compostos com tempo de incubação de 2h68
Figura 8.7 -	Efeito da variação da dose de irradiação sobre o efeito fotocitotóxico do BCD ₁₈₀ sobre HT29 (A) e sobre C8161 (B) e Photogem® sobre HT29 (C) e sobre C8161 (D) em função da concentração dos FS, com tempo de incubação de 2h69
Figura 8.8 -	Variação da temperatura da placa de cultura em função do tempo de irradiação (dose de irradiação) nas mesmas condições que nos experimentos com as culturas de célula70

Figura	8.9	- Efei	ito citotóxic	o da varia	ıção da co	ncentraç	ão do A) BCD ₁₈₀	e B) F	Photoger	т®
		nas	linhagens	celulares	<i>B16F10</i> ,	<i>C</i> 8161,	HT29	e PBMC	com	tempo	de
		incu	bação de 24	4h sem irra	ıdiação						.71

- Figura 8.14 Internalização do BCD₁₈₀ nas células B16F10 com variação do tempo de incubação de A) 5min, B) 15min, C) 30min e D) 120min utilizando-se um microscópio de fluorescência (Leica Microsystem DM6000B com o filtro N2.1).
- Figura 8.16 Células B16F10 depois da incubação com: A, D e G) BCD₁₈₀ (120min); B) Rodamina 123 (30min), C) sopreposição de A e B, E) Mitotracker GreenTM (30min, F) sobreposição de D e E; H)DAPI (30min) e I) sobreposição de G e H. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência com o microscópio de fluorescência (Leica Microsystem DM6000B). Com os filtros N2.1 para o BCD₁₈₀, L5 para o Mitotracker GreenTM e a Rodamina 123 e A para o DAPI.80
- **Figura 8.17** Fotocitotoxicidade do BCD₁₈₀ em função da concentração nas células Jurkat para o tempo de incubação de 2h com dose de irradiação de 40J/cm²......81
- **Figura 8.19 -** *Quantidade de células Jurkat marcadas com Anexina V FITC depois de incubadas com 1 e 10μM de BCD*₁₈₀ por 2h, irradiadas com 40J/cm² e analisadas por citometria de fluxo 4, 12 e 24h depois da irradiação......83

- **Figura 8.24** Curva de Calibração do BCD_{180} em tampão fosfato pH 7,4 na faixa de concentração de 0,77 5,36 μ M em λ =632nm. Equação da reta: $y=(1,83\pm0,05)10^5 * x$ e coeficiente de correlação linear de 0,9988......90
- Figura 8.25 Espectros de absorção do BCD₁₈₀, fita adesiva e da pele (derme+epiderme)..92
- **Figura 8.26** *Curva de calibração da concentração do BCD*₁₈₀ *em etanol. Equação da reta:* $y=(1,46\pm0,02)10^5 * x \ e \ coeficiente \ de \ correlação linear \ de \ 0,9988......93$
- **Figura 8.27** *Quantidade de BCD*₁₈₀ permeada para a solução receptora para cada uma das formulações testadas......95

Lista de Tabelas

Tabela 7.1 - Compostos utilizados nos experimentos de localização do sítio celular d	o BCD,
suas respectivas concentrações e tempo de incubação	44

Tabela 7.2 - Protocolo dos tampões de transferência e de lavagem utilizados no experimentode Western Blottinng.47

Tabela 7.4 - Valores tabelados das massas moleculares do padrão SDS-PAGE StandardsBroad Range utilizado na eletroforese.49

Tabela 8.1 - Razão $\eta = \frac{I_{S_{00} \to S_{10}}}{I_{S_{00} \to S_{11}}}$ entre as intensidades de absorção dos picos de transições

Tabela 8.2 - LC_{50} do BCD_{180} e do Photogem[®] em células de melanoma murino (B16F10) variando-se o tempo de incubação e fixando-se a dose de irradiação em 40,13J/cm²......75

Tabela 8.3 - LC_{50} do BCD_{180} e do Photogem[®] em células de melanoma humano (C8161) variando-se o tempo de incubação e fixando-se a dose de irradiação em 40,13J/cm²......75

Tabela 8.6 - Análise da precisão e exatidão intra-dia para o BCD₁₈₀ em tampão fosfato pH 7,4 por espectroscopia de absorção ótica em 632nm.91

Tabela 8.7 - Análise da precisão e exatidão inter-dia para o BCD₁₈₀ por espectroscopia de absorção ótica em 632nm......91

 Tabela 8.12 - Percentagem de emulsão contida nos poços de cultura para a concentração estudada.
 97

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALA	Ácido aminolevulínico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BCD	Corante Ciânico com dois Cromóforos
CC	Corante Ciânico
CV%	Coeficiente de Variação
E%	Erro percentual
%ECT	Efeito Citotóxico
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fotossensibilizador
HpD	Hematoporfirina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDH	Desidrogenase láctica (do inglês Lactate dehydrogenase)
LQ	Limite de Quantificação
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Tampão fosfato (do inglês Phosphate buffered saline)
PpIX	Protoporfirina IX

SBF Soro Bovino Fetal

- **SDS** Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*)
- **TFD** Terapia Fotodinâmica
- TPPS₄ Porfirina Meso-tetra sulfonatofenil

SUMÁRIO

1	IN	TRODUÇÃO1
2	2 FU	UNDAMENTOS TEÓRICOS5
	2.1	Terapia Fotodinâmica (TFD)
	2.2	Fotossensibilizadores (FS)
	2.2.1	Porfirinas9
	2.2.2	Corantes ciânicos10
	2.2.3	Corantes Ciânicos com dois Cromóforos (BCD)11
	2.3	Cultura de Células
	2.4	Distribuição intracelular dos fotossensibilizadores e dano aos alvos celulares16
	2.5	Morte celular
	2.6	Estrutura da pele e absorção percutânea20
3	6	BJETIVOS23
	3.1	Objetivo Geral
	3.2	Objetivos Específicos
4	l Jt	JSTIFICATIVA25
5	5 0	BJETOS DE ESTUDO27
	5.1	Corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD)28
	5.2	Photogem®
6	6 M	ÉTODOS EXPERIMENTAIS31
	6.1	Espectroscopia de absorção ótica
	6.2	Microscopia de Fluorescência
	6.3	Citometria de Fluxo
	6.4	Western Blotting
	6.5	Padronização da metodologia para quantificação da concentração de BCD por
	absorç	ão ótica para experimentos de permeação cutânea (Validação Analítica)35

7]	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	38
-----	---------------------------	----

	7.1	Preparação das células tumorais	.39
	7.2	Tratamento com fotosensibilizadores e irradiação das células	.40
	7.3	Avaliação da Fotocitotoxicidade	.42
	7.4	Localização Celular do BCD	.43
	7.5	Estudo dos mecanismos de morte induzidos pelo BCD ₁₈₀	.44
	7.5.1	Estudos morfológicos	.45
	7.5.2	Citometria de fluxo	.45
	7.5.3	Atividade da Caspase 3	.46
	7.5.4	Análise do Citocromo c por Western Blotting	.47
	7.5.5	Determinação da Atividade da Desidrogenase Láctica (LDH)	.50
	7.6	Estudo da Permeação Cutânea do BCD ₁₈₀	.51
	7.6.1	Validação do Método Analítico	.51
	7.6.2	Preparação das amostras de pele	.53
	7.6.3	Estudo da recuperação do BCD na pele	.54
	7.6.4	Estudo da permeação cutânea passiva do BCD ₁₈₀	.54
	7.6.5	Estudo de retenção de BCD ₁₈₀ na pele	.55
	7.6.6	Estudo de estabilidade do BCD ₁₈₀ frente à corrente elétrica	.55
	7.6.7	Estudo da permeação iontoforética do BCD ₁₈₀	.55
	7.6.8	Formulações testadas na permeação	.58
8	R	ESULTADOS E DISCUSSÃO	.59
	8.1	Características espectroscópicas do BCD ₁₈₀	.60
	8.2	Efeito Citotóxico	.65
	8.3	Mecanismos de Morte celular	.78
	8.3.1	Localização celular do BCD ₁₈₀	.78
	8.3.2	Mecanismos de morte celular	.81
	8.4	Desenvolvimento de uma formulação farmacológica para uso do BCD ₁₈₀	.90
	8.4.1	Validação Analítica	.90
	8.4.2	Estudo in vitro de permeação cutânea passiva e iontoforética do BCD ₁₈	₃₀ a
	partir d	as formulações farmacológicas desenvolvidas	.95
	8.4.3	Teste da emulsão de 10% de monoleína em propilenoglicol em cultura	de
	células	tumorais B16F10	.97
	8.4.4	Teste de agregação do BCD ₁₈₀ em propilenoglicol e na emulsão de monole	eína
	em proj	pilenoglicol	.98

9	CONCLUSÕES	
10	REFERÊNCIAS	
ANE	XO A – Artigo Publicado	
ANE	XO B – Artigo Submetido	

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada por uma população de células de organismos que crescem e se dividem sem respeitar os limites normais, invadem e destróem tecidos adjacentes, além de poderem se espalhar para lugares distantes do corpo, através de metástases [1]. Estas propriedades malignas do câncer o diferenciam dos tumores benignos, que são auto-limitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes (embora alguns tumores benignos sejam capazes de se tornar malignos). O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o aumento da idade [1, 2]. O câncer é reposonsável por cerca de 13% de todas as mortes no mundo, sendo os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama os responsáveis pelo maior número das mortes [3].

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer[1]. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo [3].

Uma vez diagnosticado, o câncer geralmente é tratado com uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Atualmente a cirurgia é considerada o tratamento mais eficaz do câncer de tumores localizados, mas é ineficaz contra metástases, tumores disseminados ou inoperáveis devido à sua localização e evolução, além de geralmente mutilar o paciente [1, 2]. A radioterapia é considerada uma forma de tratamento do câncer, principalmente contra células que se dividem rapidamente e cânceres não amplamente disseminados, porém apresenta severos efeitos colaterais, como a debilitação do estado geral do paciente [1, 2]. A quimioterapia utiliza-se de fármacos, sendo útil principalmente para cânceres disseminados e sua efetividade depende do estágio do tumor; possui pequena efetividade contra metástases ou tumores de crescimento lento, induzindo uma grande toxicidade às células normais, e, além disto, o câncer pode desenvolver resistência aos medicamentos, diminuindo a efetividade do tratamento [1, 2]. Outro método de tratamento é a imunoterapia, que se utiliza de vacinas contra certos tipos de cânceres e sua efetividade tem aumentado quando combinada com técnicas de biologia molecular, mas atualmente somente é efetiva contra um pequeno número de células tumorais [2].

Os tratamentos de pacientes com quimioterapia ou radioterapia são agressivos. Pela ausência de citotoxicidade seletiva, induzem profunda imunodeficiência reduzindo assim a resistência do organismo do paciente [4]. Além disso, causam diversos efeitos colaterais indesejáveis. A quimioterapia, por exemplo, pode induzir alopecia (perda do cabelo), emese

(vômitos), fragilidade de superfícies mucosas, lesões em válvulas cardíacas e ainda causar resistência nas células tumorais. A radioterapia pode induzir novas neoplasias devido a exposição às radiações ionizantes.

Diante deste quadro, nas últimas décadas tem-se procurado terapias alternativas capazes de promover a morte celular seletiva das células tumorais, sem causar danos significativos ao organismo quando comparadas com os métodos convencionais. A Terapia Fotodinâmica (TFD) vem de encontro a essa proposta. A TFD está em desenvolvimento em diversos países, inclusive no Brasil, onde sua aplicação clínica já apresenta sucessos no tratamento de vários tipos de câncer [5]. Além de câncer, a terapia fotodinâmica é eficiente contra diversas enfermidades principalmente da pele, tais como psoríases, vitiligo, etc. Os métodos de fotoquimioterapia, TFD em particular, tornam-se eficientes e proveitosos para uso na área de oncologia, pois (1) a ação da luz visível não causa danos aos tecidos sadios, ao contrário de métodos que utilizam radiação ionizante e (2) as drogas fotossensíveis apresentam um índice de toxicidade desprezível ao organismo quando comparadas aos agentes quimioterápicos [6]. Além disso, a aplicação da TFD pode também potencializar a resposta imunológica (produzir o estímulo do sistema imunológico) antitumoral nos pacientes [7].

Os compostos fotoativos (fotossensibilizadores, FS) utilizados em Terapia Fotodinâmica são geralmente corantes e pigmentos orgânicos que se ativam através de luz visível. Os primeiros compostos utilizados com sucesso no tratamento dos vários tipos de câncer através da TFD foram derivados de porfirinas [8, 9]. Apesar das porfirinas se mostrarem eficientes em TFD, o fato delas possuírem algumas desvantagens estimula a busca e desenvolvimento de novos tipos de FS, mais eficientes e úteis [8, 9].

Um exemplo de FS que possuem características espectroscópicas promissoras para aplicação em TFD são os corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD). Estudos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que, além de caracteríssticas espectrais desejáveis, os BCD possuem energia, rendimento quântico e tempos de vida dos estados excitados adequados para serem utilizados como FS em TFD [10]; possuem ainda alta afinidade por biomacromoléculas e membranas celulares [11]. Tais características estimularam nosso interesse em estudar sua potencialidade na aplicação em TFD. Recentemente foi mostrada sua alta fotocitotoxicidade contra células cancerígenas de adenocarcinoma de colo retal humano - HT29 [12].

Neste trabalho mostramos os resultados do estudo da fotocitotoxicidade do BCD com ângulo de 180° entre os cromóforos (BCD₁₈₀) em comparação com o composto comercial Photogem® (já utilizado na clínica) contra as células de melanoma murino B16F10, melanoma humano C8161 e adenocarcinoma de colo retal humano HT29. Para comparar a toxicidade destes compostos nas células sob ação de luz visível foram analisados os efeitos da concentração do composto, tempo de incubação e dose de irradiação. Para esclarecer os efeitos da estrutura do BCD na sua atividade fotocitotóxica foram realizados alguns experimentos prévios com os corantes ciânicos com ângulos de 90° (BCD₉₀) e 150° (BCD₁₅₀) entre os cromóforos.

Para esclarecer os mecanismos de ação do BCD foi realizado também o estudo da distribuição intracelular do BCD₁₈₀, assim como das vias de morte desencadeadas por este corante.

Pensando numa aplicação tópica dos BCD foram realizados experimentos preliminares da permeação cutânea do BCD₁₈₀ para determinar uma melhor formulação farmacêutica para possível aplicação.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os BCD possuem características vantajosas para aplicação em TFD mostrando melhores resultados do que o composto comercial Photogem® nas mesmas condições.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

O procedimento do tratamento de câncer por TFD (Figura 2.1) baseia-se na administração intravenosa ou tópica de um FS (não ativo na ausência de luz) e, após um tempo que para um FS aplicado atualmente varia entre 24 e 72 horas, ilumina-se a região a ser tratada com luz de comprimento de onda entre 600-800 nm (janela terapêutica), onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes [13-19] para ativação do FS.



Figura 2.1 – Esquema principal do tratamento através da Terapia Fotodinâmica.

Após a absorção da luz pelo FS, inicia-se o efeito fotodinâmico. Esse efeito se dá por dois caminhos: transferência de elétron entre o FS (nos seus estados excitados singleto, S₁ ou tripleto, T₁) e o substrato, formando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio molecular, resultando em produtos de oxidação (reações Tipo I); ou transferência de energia dos estados excitados S₁ ou T₁ do FS para o oxigênio molecular, formando o seu estado excitado ativo chamado de oxigênio singleto ($^{1}O_{2}$) (reações Tipo II) (Figura 2.2). O $^{1}O_{2}$ pode induzir reações com vários componentes celulares, tais como: DNA, proteínas, fosfolipídios das membranas, etc., tendo como resultado a morte da célula e de um modo geral a destruição do tumor. A eficiência relativa dos processos para um FS que já está sendo utilizado é de (Tipo I)/(Tipo II) \cong 1:9 [13, 14, 20-23].



Figura 2.2 - Diagrama energético das reações do tipo I e II em TFD [20].

A dose de irradiação utilizada em TFD depende do FS e do tipo de tumor a ser tratado [24]. Como foi mostrado por Morton *et al.*, 2002 [25], valores de irradiância acima de 150 mW/cm² podem causar queimaduras nos tecidos biológicos. O valor típico da irradiância aplicada em fotoquimioterapia é de aproximadamente 50 mW/cm² [25, 26].

2.2 Fotossensibilizadores (FS)

As características de um fotossensibilizador ideal para utilização em TFD são [8, 13, 19, 24, 27, 28]:

- 1. Estabilidade durante o armazenamento e no organismo;
- 2. Baixa toxicidade no escuro;
- 3. Fotossensibilidade não prolongada e rápida eliminação do corpo;
- 4. Acúmulo preferencial nos tecidos tumorais em relação aos tecidos sadios;
- Alto rendimento quântico do estado tripleto com energia ≥ 94 kJ/mol para uma efetiva formação de oxigênio singleto;
- 6. Alta absorção ótica na região espectral entre 600 e 800 nm;
- Simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado (tempo mínimo de 2 anos) que, geralmente, é mantido seco, bastando ao médico adicionar água ou soro fisiológico e agitar;
- Facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis;

- 9. Facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade;
- 10. Facilidade de análise total dos componentes da fórmula, inclusive com fornecimento de roteiros de validação.

É importante frisar que o medicamento deve atender a esse conjunto de propriedades gerais para ser considerado uma droga comercialmente viável e eficaz na sua ação terapêutica. Daí advém a importância da formulação farmacêutica empregada [24].

Vários tipos de tumores, tais como linfomas cutâneos, câncer esofageal, testicular, gástrico, laringeal, colo-retal, pulmonar, de bexiga e de mama, já são tratados com TFD utilizando os derivados de hematoporfirina, comercialmente conhecidos como Photofrin®, Photogem® e Photosan® [14, 18], apresentando resultados muito satisfatórios.

Entretanto, apesar desses compostos reduzirem os efeitos colaterais em relação às terapias convencionais, eles apresentam algumas desvantagens para sua utilização em TFD [13]:

- 1. São retidos pela pele por período prolongado, induzindo a fotossensibilidade cutânea por um período prolongado (podendo variar de semanas a meses).
- 2. Possuem um baixo coeficiente de absorção molar na janela terapêutica ($\varepsilon_{620nm} \approx 3000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), tornando necessária a administração de uma elevada quantidade da droga, o que poderia induzir sua agregação. Este processo é altamente indesejável, pois modifica as características energéticas e espectrais do FS, resultando na diminuição do rendimento quântico de produção dos seus estados excitados, diminuindo a efetividade do processo fotodinâmico.
- São misturas complexas de monômeros e oligômeros, não sendo possível isolar os constituintes ativos desta mistura.

Tais pontos estimulam a procura por novos compostos e caminhos mais eficazes para TFD.

Um dos caminhos promissores de desenvolvimento da TFD é a utilização de precursores endógenos de FS. Neste caso, a estratégia que vem sendo utilizada é o uso do ácido aminolevulínico – ALA, precursor metabólico da Protoporfirina IX (PpIX). As células tumorais têm um metabolismo acelerado quando comparadas às células sadias. Assim sendo, quando se administra o ALA ao paciente a produção de PpIX nas células tumorais é maior do que nas sadias [13, 29].

Uma outra estratégia que vem sendo desenvolvida é a vetorização do FS, visando melhorar a seletividade e a acumulação destes compostos pelos tecidos tumorais. Diversos

métodos de vetorização estão em desenvolvimento, sendo a maioria deles baseada em microesferas e nanopartículas, associadas a proteínas específicas ou anticorpos monoclonais [19, 30]. Os FS vetorizados representam a terceira geração de FS para TFD.

Paralelamente, continuam a busca por novos tipos de FS mais eficientes [31, 32]. Diversos corantes estão sob investigação para aplicação em TFD. Derivados de clorinas, ftalocianinas e benzoporfirinas, chamados de segunda geração de FS, têm sido desenvolvidos e alguns deles já estão sendo utilizados em TFD [33-35]. Eles apresentam uma atividade fotodinâmica favorável em comparação com os FS já utilizados, com uma diminuição dos efeitos colaterais.

Entretanto, até o momento, nenhum fármaco disponível possui todas as características de um FS ideal [8, 13, 27] e a procura por novos FS continua.

Visto que na grande parte dos casos a administração do FS no organismo é feita sistemicamente (injeção intravenosa) e que o sangue possui como maior constituinte a água, FS aquo-solúveis seriam bons candidatos. Entretanto, o FS deve possuir afinidade com os meios hidrofóbicos, a fim de ser capaz de entrar nas células após atravessar a membrana celular. Portanto, moléculas anfifílicas, cuja polaridade possa ser alterada pela adição de cadeias laterais, são bons candidatos para aplicação em TFD.

2.2.1 Porfirinas

Os derivados de porfirinas foram os primeiros a serem aplicados como FS em TFD [14, 16, 19]. As porfirinas são moléculas orgânicas com forte absorção de luz na região visível devido à presença em sua estrutura de um cromóforo tetrapirrólico cíclico com sistema desenvolvido de conjugação π . Essa estrutura cíclica faz com que as porfirinas sejam rígidas, caracterizando-se com alto rendimento quântico e longo tempo de vida do estado tripleto T₁, aumentando a probabilidade da produção de oxigênio singleto. Além disso, as porfirinas possuem afinidade com várias estruturas biológicas tais como proteínas, DNA e membranas, bem como estabilidade química e fotoquímica [13, 36, 37]. A estrutura do anel porfirínico contém quatro átomos de nitrogênio. Entre eles, dois podem ser facilmente protonados, desprotonados ou ainda ligados com átomos de metais. Para porfirinas sem metais ligados ao anel porfirínico (forma base livre), os termos porfirina desprotonada, monoprotonada e biprotonada são usados como referência às cargas 0, +1 e +2, respectivamente, e podem ser representadas como H₂P, H₃⁺P e H₄²⁺P (Figura 2.3). Esta propriedade torna a eficiência das porfirinas dependente do pH do meio. As cargas dos grupos colaterais ligados ao anel

porfirínico influenciam na sua estrutura espacial sem comprometer a estabilidade do anel central e suas propriedades espectroscópicas, podendo também influenciar na afinidade e interação com estruturas biológicas [8, 9, 38].



Figura 2.3 - a) Porfirina desprotonada; b) porfirina monoprotonada; c) porfirina biprotonada.

2.2.2 Corantes ciânicos

Várias publicações têm reportado sobre o interesse em corantes ciânicos (cianinas) para a utilização em TFD [39, 40]. Os corantes ciânicos (CC) possuem uma cadeia polimetínea com conjugações- π entre seus átomos de carbono, com heterociclos ligados às suas extremidades (Figura 2.4).



Figura 2.4 - Estrutura geral dos CC.

Este tipo de estrutura possibilita aos elétrons se movimentarem com certa liberdade dentro da cadeia. A absorção ótica destes corantes é determinada pelas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ com intensa absorção na região visível e infravermelho próximo ($\epsilon \approx 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-}$) [41]. As características espectrais dos CC podem ser calculadas com boa aproximação utilizando-se o modelo chamado "elétron livre dentro de uma caixa de potencial". Em concordância com este modelo, a energia de transição entre dois níveis energéticos da molécula de CC, que determina a posição de máximo da banda de absorção, é definida pela equação:

$$\Delta E = \frac{h^2 (N+1)}{8mL^2}$$
(2.2.1)

e o comprimento de onda de transição é:

$$\lambda = \frac{8mcL^2}{h(N+1)} \tag{2.2.2}$$

em que ΔE = diferença de energia entre dois níveis subsequentes; *m* = massa do elétron; *N* = nível de energia; *h* = constante de Planck; *c* = velocidade da luz; *L* = comprimento da caixa potencial [41].

Aumentando o comprimento da cadeia de conjugação- π é possível deslocar facilmente a posição do máximo do espectro de absorção ótica do corante para comprimentos de onda maiores. Estas propriedades possibilitam sintetizar os CC que absorvem com alta efetividade a luz na região de comprimentos de onda maiores que 600 nm, as quais são adequadas para utilização dos CC em TFD. Os CC são aquo-solúveis e não-citotóxicos [42].

Outra característica favorável dos CC é sua alta afinidade por microestruturas biológicas, tais como DNA, proteínas e membranas biológicas [43]. Por isso eles são amplamente utilizados como agentes de contraste em biologia celular. Esta afinidade, determinada pela presença de carga positiva na estrutura dos CC e pela flexibilidade da cadeia de conjugação- π , facilita a ligação dos CC com estruturas biológicas de diferentes geometrias. Outra característica dos CC que favorece essa interação é a presença em sua estrutura da cadeia de conjugação- π , que possui afinidade com as partes hidrofóbicas das estruturas biológicas.

No entanto, com o aumento do comprimento da cadeia de conjugação- π para deslocar o espectro de absorção na região desejável, aumenta-se a flexibilidade da estrutura do corante, diminuindo os tempos de vida dos estados excitados e sua estabilidade química. Outro fator negativo dos CC é o processo de fotoisomerização da sua cadeia de conjugação- π , que também diminui os tempos de vida e rendimento quântico dos seus estados excitados, reduzindo assim sua fotoatividade.

2.2.3 Corantes Ciânicos com dois Cromóforos (BCD)

Os BCD possuem em sua estrutura duas cadeias de conjugação- π (cromóforos) separadas por um heterociclo central.



Figura 2.5 - Estrutura geral dos BCD.

Os BCD são livres das desvantagens características do CC, pois o deslocamento do pico de absorção ótica nestes corantes não é devido ao aumento do comprimento da cadeia de conjugação- π , mas devido a um *spliting* dos níveis de energia, que produz dois picos distintos no espectro de absorção [10]. Este *spliting* é determinado por dois efeitos: tunelamento do elétron pela barreira (heterociclo central) e interação dipolo-dipolo entre dois cromóforos isolados [11, 36]. A posição e a intensidade relativa dos dois picos de absorção dos BCD dependem do ângulo entre os cromóforos (θ) segundo a equação:

$$\cos\theta = \frac{r-1}{r+1} \tag{2.2.3}$$

em que $r = \frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2}$, $\lambda_1 \in \lambda_2$ são os máximos das bandas de absorção e $\varepsilon_1 \in \varepsilon_2$ são os respectivos

coeficientes de absorção molar [10].

Os corantes com ângulo de 180° entre os cromóforos apresentam somente uma banda de absorção, localizada em comprimentos de onda maiores do que a banda de absorção do corante com um cromóforo. Já para o ângulo de 0° entre os cromóforos, a banda de absorção será em comprimentos de onda menores do que a absorção do corante com um cromóforo. Para 90° as duas bandas de absorção aparecem com a mesma intensidade: uma deslocada para comprimentos de onda menores e outra para maiores em relação ao corante com um único cromóforo.



Figura 2.6 – Espectros normalizados de absorção de BCD com diferentes ângulos α entre os cromóforos em etanol.

Os BCD possuem absorção muito intensa ($\varepsilon \approx 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na região λ >580 nm e rendimento quântico do estado tripleto relativamente alto (> 40%) em soluções homogêneas [10, 36], além de possuir alta afinidade por moléculas de DNA [11] e tensoativos. Foi mostrada a alta fotocitotoxicidade desses corantes contra o bacteriófago PM2 [44]. Estes resultados indicam a viabilidade para se estudar os efeitos destes corantes em cultura de células, a fim de avaliar sua efetividade no tratamento de câncer através de TFD.

A presença de nitrogênio em sua estrutura confere a estes corantes uma carga efetiva positiva que pode variar com o pH, de acordo com a protonação. Por outro lado, os átomos de nitrogênio podem formar ligações de hidrogênio com outras moléculas, por exemplo, de água ou alcoóis. Vários tipos destes corantes podem ser sintetizados variando-se os comprimentos de suas cadeias laterais e os heterociclos centrais. Esta variabilidade possibilita sintetizar corantes com características desejáveis.

2.3 Cultura de Células

Cultivo de células *in vitro* é um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células normais isoladas de tecidos (culturas primárias) ou tumorais (linhagens tumorais) fora do organismo, mantendo suas características inalteradas. É possível fazer culturas a partir de tecidos humanos, animais e vegetais. A cultura de tecidos implica na prévia desagregação

(mecânica ou enzimática) do tecido original e deve ser mantida numa camada aderente, num substrato sólido ou em suspensão em meio de cultura [45, 46].

Os primeiros experimentos com cultura de células animais foram realizados em 1907 por Ross Harrison, mas foi somente em 1940 que se conseguiu o crescimento de linhagens celulares a partir de células isoladas que aderiam à superfície de frascos de cultura, permitindo a difusão dessa técnica e tornando-a uma importante ferramenta para o estudo em diversas áreas de investigação [46, 47].

Nos estudos iniciais, as células eram cultivadas em meios indefinidos, como combinação de soro e extratos embrionários. Em 1952 as células começaram a ser cultivadas num meio contendo plasma de galinha, extrato de embrião bovino e soro de cordão umbilical. Mas o meio era complexo, tornando impossível analisar as necessidades específicas para o crescimento de células animais [48].

Em 1959, Harry Eagle realizou uma análise sistemática dos nutrientes necessários ao crescimento de células animais em cultura; estudou o crescimento de duas linhagens celulares: células HeLa (cervix adenocarcinoma) e células L (intestino humano). O meio em que cultivou estas células continha uma mistura de sais, carboidratos, aminoácidos e vitaminas suplementadas com proteínas (soro bovino fetal - SBF). Variando estes compostos, Eagle concluiu que para o crescimento celular seriam necessários sais, glicose, 13 aminoácidos, vitaminas e 1-20% de soro bovino fetal (SBF) [48]. Atualmente ainda é usado o meio desenvolvido por Eagle como meio básico para cultura de células animais. O seu uso permitiu aos cientistas cultivarem uma ampla variedade de células sob condições experimentais definidas.

O cultivo de células é um bom modelo para se estudar a biologia e bioquímica celular, as interações entre células e agentes causadores de doenças, o efeito de drogas nas células, o processo de envelhecimento e os estudos nutricionais, além de realizar experimentos sob as mesmas condições e minimizar a utilização de animais para vários testes [46, 49].

Há dois tipos de cultura celular:

- <u>Cultura primária</u>: cultura preparada diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem passo inicial de fracionamento das células [46];

- <u>Cultura secundária</u>: as células cultivadas são retiradas de uma cultura primária e podem ser repetidamente subcultivadas desta forma, por semanas ou meses [46].

As células podem proliferar indefinidamente e poderão ser propagadas como uma linhagem celular. Tanto as linhagens de células transformadas quanto as de células nãotransformadas são extremamente úteis na pesquisa celular, como fonte de grandes quantidades
de células de um tipo uniforme. As linhagens de células transformadas podem frequentemente causar tumores, se injetadas num animal susceptível; porém, células de um mesmo tecido podem diferir entre si. Assim, a uniformidade genética de uma linhagem celular pode ser melhorada pela clonagem celular, em que uma única célula é isolada e prolifera-se para formar posteriormente uma colônia [50].

Células de linhagens normais ou neoplásicas são também modelos convenientes e mais realistas utilizadas nos estudos biológicos. Cada linhagem possui características próprias e assim exige um protocolo específico de manuseio e cultivo. As células normais se multiplicam, no máximo, até 50 gerações e crescem em placas até que toda a superfície da placa esteja recoberta com uma única camada celular. As células tumorais, por sua vez, não possuem este controle do crescimento, se proliferando indefinidamente formando os aglomerados celulares [48, 51].

As células utilizadas neste trabalho foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) e estão listadas abaixo:

- ✓ **B16F10:** Melanoma de camundongos C57BL/6;
- ✓ **C8161:** Melanoma humano;
- ✓ HT29: Adenocarcinoma colo-retal humano;
- ✓ **JURKAT:** Leucemia T humana;
- ✓ **HI-60:** Leucemia mielóde aguda humana;
- ✓ HL-60/Bcl2: Leucemia mielóde aguda humana com proteína Bcl-2 superexpressa.
 Estas linhagens foram escolhidas pelos seguintes motivos:

A) <u>Melanoma</u> - É um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) e tem predominância em adultos brancos. O melanoma de pele é menos freqüente do que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas), no entanto, sua letalidade é mais elevada. A Organização Mundial de Saúde – World Health Organization (WHO) – estima que, anualmente, ocorram cerca de 132 mil casos novos desse câncer no mundo, e, no que se refere à prevalência, seja cerca de 2,5%. No Brasil foram estimados, para 2008, um total de 2.950 casos novos em homens, e 2.970 casos novos em mulheres. Embora só represente 1,2% dos tipos de câncer de pele no Brasil, o melanoma é o mais grave devido à sua alta agressividade, possibilidade de produzir metástase e alta resistência [1].

B) <u>Colo-Retal</u> – O câncer de colo-retal abrange tumores que atingem o cólon (intestino grosso) e o reto. Tanto homens como mulheres são igualmente afetados, sendo uma doença tratável e frequentemente curável quando localizada no intestino (sem extensão para outros órgãos). As Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para 2008, publicadas pelo INCA, apontam o câncer de cólon e reto como a terceira causa mais comum de câncer no mundo, em ambos os sexos, e a segunda causa em países desenvolvidos. Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres, porém, a incidência de câncer de reto é cerca de 20% a 50% maior em homens na maioria das populações. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil, no ano de 2008, é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. A sobrevida para este tipo de neoplasia é considerada boa, se a doença for diagnosticada em estágio inicial. Quando a doença está disseminada, com metástases para o fígado, pulmão ou outros órgãos, as chances de cura diminuem [1].

C) <u>Leucemia</u> - A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), na maioria das vezes de origem não conhecida. Ela tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blásticas) anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. Segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para 2008, publicadas pelo INCA, as leucemias atingiram 5.520 homens e 4.320 mulheres [1].

2.4 Distribuição intracelular dos fotossensibilizadores e dano aos alvos celulares

A localização do FS é um parâmetro extremamente importante na compreensão do mecanismo de fotocitotoxicidade 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) [16]. 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 [52, 53]. FS

localizados na membrana plasmática possuem uma maior probabilidade de causar necrose durante exposição à luz. Isso ocorre porque o ${}^{1}O_{2}$, devido ao seu curto tempo de vida, tem curta distância de propagação, agindo mais próximo da membrana e aumentando a probabilidade de danos a esta [54]. 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/hidrofilicidade, o tipo e número de cargas, etc) e as características bioquímicas e fisiológicas do tumor [55]. *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 consequentemente sua penetração nas células será determinada não somente pelas suas propriedades, mas também pelas propriedades dos componentes sanguíneos que o carregam [17].

2.5 Morte celular

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Como conseqüência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o seu volume e perde as suas funções metabólicas [56]. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares [57].

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, necrose, autofagia, mitose catastrófica e senescência [58-60], sendo os dois primeiros os mais estudados.

<u>Necrose</u>: também chamada de morte celular patológica ou acidental, ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas. Morfologicamente, a necrose é caracterizada por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular [61]. Ela é considerada uma resposta passiva à injúria celular; entretanto, estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente [62].

<u>Apoptose</u>: é um tipo de "autodestruição celular" que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução (diferentemente da necrose). Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pelo estrangulamento da membrana sem perda de integridade, agregação da cromatina à membrana celular, condensação celular (encolhimento celular) e formação de vesículas com membrana (corpos apoptóticos) e sem desintegração das organelas [61].



Figura 2.7 - *Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose* versus *necrose* [63].

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são conseqüência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados [64]. A apoptose é a forma melhor caracterizada de morte celular programada, na qual as células mostram características como formação de vesículas membranosas, troca de lado da fosfatidilserina da membrana plasmática, fragmentação nuclear e ativação de uma família de proteases chamada de caspases [65]. A ativação bioquímica da apoptose pode ocorrer por duas vias: intrínseca e extrínseca. A via intrínseca ou mitocondrial ocorre na retirada de fatores de crescimento ou de hormônios, ou quando acontece lesão ao DNA por radiação, toxinas ou radicais livres. Ela é regulada por proteínas membros da família Bcl-2, ativando moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo c [66]

(Figura 2.8). Além disso, há a participação do gene supressor p53. Tudo isso culmina na ativação de caspases iniciadoras e efetoras, levando a alterações celulares e a morte da célula [65] (Figura 2.8). A via extrínseca acontece por meio da interação receptor-ligante, como por exemplo, o *Faz* e o receptor de TNF. Isso ativará uma cascata de proteínas adaptadoras, o que também culminará na ativação das caspases [65, 66].



Figura 2.8 - Esquema da morte induzida por apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial [67].

A morte celular por necrose foi estudada neste trabalho através da técnica de citometria de fluxo e pela morfologia das células e liberação da desidrogenase láctica pelas células depois de incubadas com BCD e irradiadas. Já a morte celular por apoptose foi detectada por citometria de fluxo, pela liberação de caspase-3 e citocromo c após a incubação com BCD e irradiação com luz visível. Foi verificada a apoptose também comparando os resultados de citotoxicidade de duas linhagens celulares: uma com a proteína Bcl-2 superexpressa e outra não.

2.6 Estrutura da pele e absorção percutânea

A pele recobre toda a superfície corporal, protegendo os órgãos internos e controlando a passagem de produtos químicos para dentro e para fora do corpo. Sendo assim, ela tem função protetora contra as adversidades do ambiente, como formas de poluição, temperatura, irradiação ultra-violeta (UV) e umidade [68]. Também tem como função primordial proteger o organismo contra a perda de substâncias endógenas [69]. A pele é composta por três camadas: a epiderme, a derme, e a mais profunda, hipoderme (subcutis) (Figura 2.9).



Figura 2.9 - Esquema da estrutura da pele [70].

A epiderme é subdividida em cinco camadas ou estratos, que são denominados, de dentro para fora da pele, de: estrato germinativo ou basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo. A maior parte da epiderme é formada por um epitélio escamoso, que consiste principalmente de queratinócitos. Estas células se diferenciam em cada estrato, até que chegam ao estrato córneo, que é a camada mais externa da pele [71]. A camada celular basal também possui melanócitos, que produzem e distribuem os grânulos de melanina para os queratinócitos [68]. As células de Langerhans são proeminentes na epiderme, e têm um papel importante na defesa imune desta camada [71].

O estrato córneo é a principal barreira contra a penetração de substâncias na pele, medindo cerca de 15-20 µm de espessura [72]. Ele é constituído por um sistema de dois compartimentos heterogêneos, compostos por queratinócitos (também chamados de

corneócitos) cheios de queratina embebidos em uma matriz lipídica intracelular. A matriz lipídica é organizada em bicamadas lamelares. As principais classes de lipídios encontradas no estrato córneo são: ceramidas, ácidos graxos livres, esteróis e triacilgliceróis. A dificuldade em se permear o estrato córneo provém destas bicamadas lipídicas e dos queratinócitos [73].

A derme consiste em uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5 mm de espessura entremeada de proteínas fibrosas (colágeno, elastina e reticulina) que são embebidas em uma substância de fundo amorfa composta por mucopolissacarídeos [68]. O suprimento vascular da derme regula a temperatura, a pressão e a nutrição do tecido [74].

O tecido subcutâneo é uma camada adiposa situada abaixo da derme, que funciona como uma barreira protetora e isolante e juntamente com a derme e a epiderme, forma o tegumento [75].

O estrato córneo é a barreira que limita a velocidade e restringe os movimentos de entrada e saída de substâncias no organismo [76]. Um fármaco pode atravessar o estrato córneo através de três diferentes vias (Figura 2.10). Elas são:

- Via intercelular: o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica;
- Via transcelular: o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária;
- Via apêndices (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, poros, imperfeições): rota paralela na qual os fármacos polares e de baixo peso molecular podem ser absorvidos [77].



Figura 2.10 - Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: (A) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) e (B) através dos apêndices cutâneos [78].

A via específica que uma substância pode tomar e a importância relativa de uma em contraste com outra dependem quase exclusivamente das propriedades físico-químicas do fármaco, das condições da pele e da formulação farmacêutica ou sistema de liberação. Em condições apropriadas, cada uma das vias de permeação pode mudar e ser a dominante. Em particular, a difusão passageira que ocorre pouco após a aplicação de uma substância na superfície da pele parece ser maior através dos apêndices do que através da matriz lipídica do estrato córneo. Uma vez que a substância atravessa o estrato córneo, aparentemente não há nenhum impedimento adicional à penetração nas demais camadas, principalmente para fármacos hidrofílicos [76].

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho engloba o estudo da interação entre corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD) e células de linhagens neoplásicas a fim de avaliar a fotocitotoxicidade desses compostos e esclarecer os mecanismos de sua ação.

Este projeto constitui a base necessária para avaliação do potencial desses compostos em sua aplicação no tratamento de câncer através da Terapia Fotodinâmica (TFD).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a fotocitoxicidade dos BCD contra linhagens celulares tumorais escolhidas;
- Comparar as eficiências dos BCD com o composto comercial Photogem®, que já é utilizado no fototratamento do câncer;
- Determinar a distribuição dos BCD nas células e os mecanismos de morte induzidos por eles;
- Determinar uma formulação farmacêutica adequada para uso tópico do BCD.

4 JUSTIFICATIVA

O estudo realizado faz parte do plano de expansão do Grupo de Fotobiofísica, do Departamento de Física e Matemática, FFCLRP, USP-Ribeirão Preto.

Durante vários anos, estudamos a interação de compostos biofotoativos tais como porfirinas, corantes ciânicos com dois cromóforos e derivados de nitrofurano com sistemas microheterogêneos naturais e sintéticos, tais como BSA (albumina do soro bovino), DNA, micelas e eritrócitos *ghosts* (membrana natural), a fim de entender como a interação dos compostos químicos com sistemas organizados pode alterar as características espectrais e energéticas desses compostos devido às mudanças na sua configuração eletrônica.

O objetivo destes estudos foi estabelecer os mecanismos de interação de tais compostos com esses sistemas naturais e sintéticos, a fim de propor a sua utilização nas aplicações em Medicina e Biologia.

No estágio atual, buscamos estudar a eficácia desses compostos fotoativos contra diferentes linhagens de células tumorais, a fim de confirmar sua capacidade de serem utilizados no tratamento de câncer através de fotoquimioterapia, em particular na Terapia Fotodinâmica de câncer. Neste trabalho focalizamos sua atenção nos corantes ciânicos com dois cromóforos.

5 OBJETOS DE ESTUDO

5.1 Corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD_α)

Os corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD_a) com ângulos entre os cromóforos 180^{0} , 150^{0} e 90^{0} (Figura 5.1) foram sintetizados pelo Dr. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciências da Ucrânia. O grau de pureza foi controlado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), espectroscopias de absorção ótica e de fluorescência. Em soluções aquosas os BCD_a possuem as seguintes características de absorção $\lambda_{180} = 632$ nm, $\varepsilon_{180} = 1,33 \times 10^{5}$ M⁻¹cm⁻¹, $\lambda_{150} = 623$ nm, $\varepsilon_{150} = 0,72 \times 10^{5}$ M⁻¹cm⁻¹, $\lambda_{90} = 617$ nm, $\varepsilon_{90} = 0,88 \times 10^{5}$ M⁻¹cm⁻¹, respectivamente (veja Figura 5.2). Os BCD_a possuem fluorescência em água caracterizada pelos máximos $\lambda_{f1180} = 640$ nm, $\lambda_{f1150} = 638$ nm e $\lambda_{f190} = 637$ nm. Na região de pH 3,0 – 10,0 estes BCD_a possuem uma carga líquida +2.



Figura 5.1 - *Estrutura molecular dos corantes ciânicos com dois cromóforos com ângulos de a) 180°, b) 150° e c) 90° entre os cromóforos.*

b)



Figura 5.2 - Espectros de absorção dos corantes ciânicos com dois cromóforos com ângulos de a) 180°, b) 150° e c) 90° entre os cromóforos em etanol.

5.2 Photogem®

O Photogem® é um derivado de Hematoporfirina (HpD) e sua fração ativa. Constitui a primeira geração de agentes fototerápicos utilizados em aplicações clínicas no tratamento de tumores. O Photogem® (LLC<<PHOTOGEM>>, Moscou, Rússia) é uma porfirina deprotonada, ou seja, tem carga zero e é solúvel em água. Em solução aquosa possui λ = 630 nm e ε = 3200 M⁻¹cm⁻¹. No Brasil, foi aprovado pela ANVISA em 2003 (08/04/03, processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4).



Figura 5.3 - Estrutura molecular do Photogem®.



Figura 5.4 - Espectro de absorção do Photogem® em água (pH 6,4).

6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

6.1 Espectroscopia de absorção ótica

Os compostos químicos podem ser caracterizados pelo seu espectro de absorção ótica, que depende da sua estrutura eletrônica. A banda de absorção aparece pela transição do nível de energia do estado fundamental para o nível do estado excitado. A dependência da probabilidade de absorção de energia da luz pode ser dada como função do comprimento de onda (λ) da luz incidente ($E = hv = h\frac{c}{\lambda}$), onde podemos determinar as bandas com máximos de absorção em determinados comprimentos de onda. A probabilidade de absorção é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar (ε (λ)), que depende do comprimento de onda λ . A distribuição espectral do ε (λ) é uma característica intrínseca de cada composto e está relacionada com sua estrutura eletrônica e interação com ambiente [79]. Esta interação permite analisar os efeitos do ambiente nos compostos sob estudo através dos espectros de absorção.

Pela lei de Lambert-Beer, a característica chamada "absorbância" (*A*) é determinada por [79]:

$$A = \log (I_0/I)$$
 (6.1.1)

em que I_0 e I são as intensidades da luz incidente e transmitida, respectivamente.

A relação onde temos a dependência da absorbância com o coeficiente de absorção molar é dada pela equação:

$$A = \mathcal{E}(\lambda) C L \tag{6.1.2}$$

em que C é a concentração do composto e L o caminho ótico (espessura da cubeta).

A espectroscopia de absorção ótica foi utilizada neste trabalho:

- para determinar o efeito citotóxico (%ECT) através do método colorimétrico 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) (veja sessão 7.3),
- para o estudo das amostras obtidas na permeação cutânea do BCD (veja sessão 7.6) e
- para o estudo dos mecanismos de morte induzida por necrose através da liberação da desidrogenase láctica (LDH) (veja sessão 7.5.5).

6.2 Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência é uma técnica que utiliza o fenômeno de fluorescência para criação das imagens da estrutura de microobjetos.

Quando uma molécula (fluoróforo) absorve um fóton de luz, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado de mesma multiplicidade de spin. O retorno do estado excitado para o estado eletrônico fundamental pode acontecer com emissão de luz, processo chamado de fluorescência (Figura 6.1).



Figura 6.1 - Diagrama de Jablonski.

Porém, como mostra a Figura 6.1, existem vários outros processos que contribuem para o estado excitado perder energia, competindo com a fluorescência, cuja probabilidade depende da estrutura do fluoróforo e de seu ambiente. Isto torna a intensidade da fluorescência também dependente da estrutura do fluoróforo e da sua interação com o ambiente e permite analisar a localização do fluoróforo dentro do microobjeto.

Neste trabalho, a microscopia de fluorescência foi utilizada para determinar a localização do BCD na estrutura da célula com o auxilio de marcadores fluorescentes específicos das organelas celulares, como descrito na seção 7.4.

6.3 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise do espalhamento e da fluorescência de partículas que fluem numa suspensão líquida. Esta suspensão, que contém as partículas a analisar, é introduzida no centro da câmara de fluxo e as partículas são alinhadas uma a uma no tubo de análise (Figura 6.2) [80].



Figura 6.2 - Esquema do alinhamento da suspensão líquida para análise.

Depois de alinhadas, estas partículas são iluminadas com uma fonte de luz, ocorrendo processos de espalhamento ou de emissão de fluorescência, cujas intensidades dependem das características das partículas [81]. Neste trabalho, analisamos somente a fluorescência das partículas. A fluorescência pode ser emitida pelos fluoróforos intrínsecos da partícula ou por marcadores fluorescentes, ligados a ela. Os fótons emitidos em direção ortogonal ao feixe da luz de excitação são recebidos por uma série de filtros óticos e são analisados em tubos fotomultiplicadores [81]. Os diferentes tipos de filtros óticos ("long-pass", "short-pass", passagem de banda e espelhos dicróicos) dividem a emissão fluorescente em diferentes comprimentos de onda, permitindo a medição simultânea de vários corantes fluorescentes [80]. Cada partícula gera uma intensidade de fluorescência que é analisada, formando um histograma de contagem de partículas por intensidade de fluorescência.

A citometria de fluxo foi utilizada neste trabalho para o estudo dos mecanismos de morte celular induzidos pelo BCD (veja sessão 7.5.2).

6.4 Western Blotting

Western Blotting é um método em biologia molecular/bioquímica para detectar proteínas em um homogenato (células bem trituradas) ou em um extrato de tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose). Como a membrana possui habilidade de se ligar a proteínas, deve-se fazer o bloqueio desta para impedir as interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. Depois de bloqueada a membrana, é utilizado um anticorpo específico (anticorpo primário) que se liga à proteína alvo e em seguida um segundo anticorpo, marcado com uma sonda, específica para anticorpo primário. Um filme fotográfico é colocado contra a membrana e é criada a imagem dos anticorpos ligados a ela. Com o resultado, os pesquisadores podem examinar a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre diversos grupos de proteínas [82].

Neste trabalho o Western Blotting foi utilizado para a detecção do citocromo c e verificação do mecanismo de morte induzido por apoptose pelo BCD [83]. O procedimento experimental está descrito na seção 7.5.4.

6.5 Padronização da metodologia para quantificação da concentração de BCD por absorção ótica para experimentos de permeação cutânea (Validação Analítica)

A razão para validar um procedimento analítico da determinação de concentração do composto é demonstrar o desempenho e confiabilidade de um método para esta determinação como, por exemplo, quantificar drogas retidas na pele em experimentos de permeação cutânea. Shah indicou que qualquer método analítico deve ser validado se os resultados forem ser usados para o registro de uma droga nova ou a reformulação de uma já existente [84]. Deve ser observado que a validação inicial é somente o começo, o método deve ser monitorado continuamente durante sua aplicação para assegurar que os resultados correspondem à validação feita [85].

Os parâmetros fundamentais na validação do método, seguindo as normas cobradas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e FDA (*Food and Drug Administration*) para avaliação de um novo composto [86, 87] são: sensibilidade, precisão, exatidão, seletividade, reprodutibilidade e estabilidade. No desenvolvimento de um método típico, além dos parâmetros citados, determina-se também a solubilidade e estabilidade do analito.

6.5.1 - SENSIBILIDADE: determinação da quantidade mínima de analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão apropriadas (limite de quantificação, LQ). Para se determinar o limite de quantificação, deve-se realizar no mímino cinco medidas da amostra que devem ser discretas, reprodutíveis, com precisão de 20% e exatidão < 20%.

6.5.2 - PRECISÃO (REPETIBILIDADE): se determina pelo coeficiente de variação (CV) dado pela equação

$$CV\% = \frac{DesvPad}{ConcMédia} x100$$
(6.5.1)

em que *DesvPad* corresponde ao desvio padrão das medidas da concentração média (*ConcMédia*) em várias repetições para cada concentração.

É recomendado usar no mínimo três concentrações diferentes e realizar no mínimo cinco determinações para cada concentração. O valor encontrado de CV não pode exceder 15%, com exceção do limite de quantificação cuja diferença não pode ultrapassar 20%.

6.5.3 – EXATIDÃO: é analisada através do erro relativo (E%) que está dado pela equação

$$E\% = \frac{Valor_{obtido} - Valor_{calculado}}{Valor_{calculado}} x100$$
(6.5.2)

em que $Valor_{obtido}$ corresponde ao valor da concentração medida e $Valor_{calculado}$ corresponde ao valor calculado (concentração = massa/volume).

E% descreve o desvio do resultado obtido da concentração medida em relação ao valor calculado. E% deve ser determinado usando no mínimo cinco determinações por concentração para no mínimo três concentrações diferentes. O valor do E% não pode ultrapassar 15%, com exceção do limite de quantificação cuja diferença não pode ultrapassar 20%.

6.5.4 - SELETIVIDADE: habilidade de um método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes na amostra. Para ser considerado seletivo, devem-

se analisar seis amostras de diferentes fontes testando para cada amostra os interferentes, assegurando o limite de quantificação.

6.5.5 - **SOLUBILIDADE**: solubilidade de um analito em uma amostra é a resposta do detector obtida de uma quantidade de analito adicionado e extraído da matriz biológica, comparada com a resposta do detector obtida da concentração real (nominal). A solubilidade não precisa ser 100%, mas consistente, precisa e reprodutível.

6.5.6 - ESTABILIDADE: estabilidade de um analito em um fluido biológico é a mudança da sua concentração em função do tempo. A estabilidade depende das condições de armazenamento, propriedades químicas do analito, da matriz e do recipiente. A determinação da estabilidade deve ser realizada na temperatura de armazenamento, temperatura ambiente e depois de ser gelada e usada no processo analítico.

As características citadas são determinadas através da **Curva de Calibração** [87, 88], que relaciona a resposta do instrumento de medida e a concetração conhecida do analito. A curva de calibração deve ser gerada para cada analito na amostra e na mesma matriz biológica. Na Curva de Calibração deve constar o limite de quantificação e os outros pontos da curva de calibração não podem ter desvios maiores do que 15% do valor nominal.

7 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7.1 Preparação das células tumorais

Neste trabalho utilizamos as linhagens celulares tumorais de melanoma de camundongo (B16F10), melanoma humano (C8161), células T de leucemia humana (Jurkat) e adenocarcinoma de colo-retal humano (HT29), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) e duas linhagens de leucemia mielóde aguda humana (HL-60 e HL-60/Bcl-2) fornecidas pelo Dr. Gustavo Amarantes Mendes (ICB-USP, São Paulo, Brasil). Para o cultivo das células tumorais B16F10, C8161, Jurkat, HL-60 e HL-60/Bcl-2 foi utilizado o meio de cultivo celular RPMI 1640 com vermelho de fenol suplementado (RPMI-S) com 10% de soro bovino fetal, 20mM de L-glutamina, 2g/l de bicarbonato de sódio, 2,38g/l de HEPES, 100 U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) e para a linhagem HT29 o meio de cultivo celular Dulbecco's com vermelho de fenol suplementado (Dulbecco's-S) com 10% de soro bovino fetal, 20 mM de L-glutamina, 3,7g/l de bicarbonato de sódio, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco-Ivitrogen, Carlsbad, CA). Para realizar os ensaios as células aderentes (B16F10, C8161 e HT29) foram removidas dos frascos de cultivo celular pela adição de 0,2ml de solução de tripsina-EDTA (2,5 g/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), lavadas 3 vezes em meio RPMI-S a 1000rpm/15'. Após as lavagens, as células foram contadas em um hemocitômetro, ressuspendidas em meio RPMI-S na concentração de 5×10^4 células tumorais/0,2ml de meio RPMI-S e colocadas em poços de placas de fundo chato "ELIZA" (96 poços, TPP, Trasadingen, Switzerland). As células aderentes foram incubadas por 24h em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C antes da adição dos compostos e ao final da cultura, o meio de cultura foi removido e meio fresco adicionado aos poços. Para ensaios com células não aderentes (Jurkat, HL-60 e HL-60/Bcl-2), as células foram lavadas em meio RPMI-S a 1000rpm/15', contadas em hemocitômetro e suspendidas em meio RPMI-S na concentração de 10⁵ células tumorais/0,2ml de meio RPMI-S e foram colocadas nos pocos de placas "Eliza".

7.2 Tratamento com fotosensibilizadores e irradiação das células

As células foram cultivadas com meio ou tratadas com BCD (0,01µM-100µM) ou Photogem® (0,01µM-100µM) e incubadas em estufa por tempos de 30min até 9h.

A irradiação com ou sem FS foi realizada diretamente nas placas "Eliza". A absorção do vermelho de fenol, tipicamente presente no meio RPMI, coincide com a do BCD. Por este motivo nestes experimentos foi utilizado meio sem vermelho de fenol.

Ao final do período de incubação, foram utilizadas doses de irradiação de 10 até $70J/cm^2$ na região espectral de 540 – 750nm, utilizando como fonte um irradiador com uma lâmpada halógena "Osram" de 250W, acoplada a um filtro colorido 3-69 KOPP (região da transmitância $\lambda > 500$ nm). A fonte foi fixada num suporte na distância de 25cm entre a lâmpada e a placa de cultura, assim que a irradiação foi realizada na direção vertical (Figura 7.1). A intensidade de irradiação na posição da placa de cultura era de 11mW/cm², determinada pelo radiômetro Spectra-Physics 407A.



Figura 7.1 – Foto do irradiador utilizado nos experimentos deste trabalho com suporte em L para fixação do irradiador.

Apenas os poços de colunas 3-10 e de linha C-H das placas (Figura 7.2) foram irradiados, pois era a região na qual a dose de irradiação era mais homogênea, variando apenas 23%.



Figura 7.2 - Esquema da placa de cultura tipo "Eliza" utilizada nos experimentos.

Em todos os experimentos foram realizados três tipos de controle:

- 1. Células sem FS no escuro.
- 2. Células sem FS irradiadas.
- 3. Células mantidas no escuro tratadas com os FS.

Ao final da irradiação as células tumorais foram incubadas por mais 24h em estufa úmida contendo 95% de ar e 5% de CO_2 a 37°C.



Figura 7.3 - Espectros normalizados da emissão da fonte e do filtro de transmissão utilizados e os espectros de absorção do BCD₁₈₀ e Photogem®.

7.3 Avaliação da Fotocitotoxicidade

Depois da incubação das células, foi determinado o efeito citotóxico do BCD com e sem a irradiação.

O efeito citotóxico (ECT) foi calculado como:

$$ECT = \frac{[DC]}{[C\acute{e}lulas]_{controle}}$$
(7.4.1)

em que $[Células]_{controle}$ corresponde à concentração de células vivas, nos poços controles (células com mesmo tempo de incubação sem FS) e [DC] corresponde à concentração de células mortas. [DC] foi calculada como sendo $[Células]_{controle} - [Células]_{final}$, em que $[Células]_{final}$ corresponde à concentração final de células vivas incubadas com FS [89]. Então,

$$ECT = 1 - \frac{[C\acute{e}lulas]_{final}}{[C\acute{e}lulas]_{controle}}$$
(7.4.2)

A concentração de células vivas foi determinada pelo método colorimétrico do 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT). Neste método o MTT é reduzido nas células vivas a um produto azul, que absorve em 570nm.



Figura 7.4 - Redução do sal de tetrasol em azul de formazan [90].

A absorbância da amostra (*Abs*) é proporcional à concentração de células vivas [91]. Finalmente o ECT em percentagem é calculado como:

$$\% ECT = \left(1 - \frac{Abs \ amostras}{Abs \ controle}\right) * 100 \tag{7.4.3}$$

em que *Abs amostras* e *Abs controle* são as absorbâncias em 570nm das amostras nos poços contendo células com FS e sem FS, respectivamente.

Os resultados estão apresentados como os valores médios do $\% ECT \pm$ desvio padrão (DP) de 6 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com o teste t Student com nível de significância de 5%. Para a realização do teste foi utilizado o software Prism 4.0 Version.

Para a obtenção da redução do MTT, foram adicionados 10µL de solução de MTT em PBS (5mg/mL) aos poços de cultivo celular e incubado por mais 4h para as linhagens tumorais em estufa úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, foram acrescentados aos poços 50µL de solução a 20% de dodecil sulfato de sódio/HCL 0,01N para a solubilização do produto azul formado. Para isto, as placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A avaliação da atividade citotóxica foi medida no espectrofotômetro μ Quant Bio-tek Instruments, utilizando filtro de interferência de λ_{max} =570nm [91, 92].

As concentrações letais de 50% (LC_{50}) do BCD e do Photogem® foram determinadas a partir da dependência do %ECT da concentração do FS.

7.4 Localização Celular do BCD

A determinação da localização do BCD no interior das células foi realizada através das observações da distribuição da sua fluorescência dentro da célula, em comparação com os marcadores-padrões de mitocôndrias Rodamina 123 (Sigma) e MitoTracker greenTM (Molecular Probe) e de núcleo DAPI (Molecular Probe). As medidas foram realizadas utilizando o microscópio de fluorescência Leica DM 5000 B. Para a observação da fluorescência do BCD, foi utilizado o filtro N2.1 (Filtro de excitação BP 515-560nm, Espelho dicromático 580nm e filtro de supressão LP 590nm); para a Rodamina 123 e

MitoTracker greenTM o filtro L5 (Filtro de excitação BP 480/40nm, Espelho dicromático 505nm e Filtro de supressão BP 527/30nm); e para o DAPI o filtro A (Filtro de excitação BP 340-380nm, Espelho dicromático 400nm e Filtro de supressão LP 425nm).

Nos experimentos utilizamos as células B16F10, que foram plaqueadas na concentração de $5x10^4$ células/poço em lâminas com 8 poços (CultureSlide, 8-well, BD FalconTM). As concentrações e tempos de incubação dos compostos estão apresentados na tabela 7.1:

Composto	Concentração	Tempo incubação (min)
BCD	5 µM	120
Rodamina 123	5 µM	30
MitoTracker green TM	5 µM	30
*DAPI	1mg/ml	30

 Tabela 7.1 - Compostos utilizados nos experimentos de localização do sítio celular do BCD, suas respectivas concentrações e tempo de incubação.

*Antes de colocar o DAPI, as células foram tratadas com formaldeído 4% por 30 min.

7.5 Estudo dos mecanismos de morte induzidos pelo BCD₁₈₀

Neste trabalho foi estudada a existência de dois mecanismos de morte celular induzidos pelo BCD_{180} : necrose e apoptose. Para verificar a existência destes mecanismos:

- Foi estudada a morfologia das células na presença do BCD₁₈₀ antes e depois da irradiação;
- Foi utilizado o método de citometria de fluxo;
- Foi determinada a atividade da desidrogenase lática (LDH);
- Foi realizado o teste de Western Blotting para verificar a liberação de citocromo c;
- Foi determinada a atividade das caspases 3.

Todos os métodos citados estão descritos abaixo.

Para os estudos dos mecanismos de morte das células foram escolhidas as células T de leucemia (Jurkat), que crescem em suspensão, o que facilitou o manuseio e diminuiu os efeitos de interferentes indesejáveis. Células que crescem em adesão, para serem utilizadas nestes experimentos, teriam que ser desaderidas das superfícies de adesão por meio de métodos mecânicos ou químicos. Estes métodos podem causar danos em algumas células e até provocar a morte destas, levando a conclusões errôneas sobre os mecanismos de morte causados pelo FS.

7.5.1 Estudos morfológicos

Depois do tratamento com o BCD, 2×10^5 células foram lavadas com tampão fosfato PBS (pH=7,3) e ressuspendidas no mesmo meio. A suspensão das células foi passada pela centrífuga Cytospin para que as células fossem fixadas e coradas com o corante Romanowisky (Panotic, Laborclin, Pinhais, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A morfologia celular foi determinada usando um microscópio com magnificação x400.

O kit utilizado para corar as lâminas, era composto por três corantes: Panótico rápido nº 1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0,1%. Panótico rápido nº 2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1% Panótico rápido nº 3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%

Para corar, as lâminas foram colacadas em cada corante por 5 segundos, seguindo a ordem corante 1 – corante 2 – corante 3.

7.5.2 Citometria de fluxo

Para estudos do mecanismo da morte celular através da técnica de citometria de fluxo foram utilizados os marcadores Anexina-V FITC e iodeto de propídeo (PI).

O anticoagulante Anexina V é uma proteína com propriedades de ligação aos fosfolipídios como a fosfatidilserina, que em células normais se localiza na região interna da membrana plasmática [65]. Com a morte celular, a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta à Anexina-V, que na forma ligada com a fosfatidilserina possui a fluorescência com o máximo localizado em $\lambda = 518$ nm [65]. Como a translocação da fosfatidilserina apresenta-se tanto em processo de necrose quando em apoptose, para diferenciar estes dois processos pode ser utilizado o marcador PI, que tinge as células necrosadas. Quando a membrana celular se rompe pela necrose, o PI, que não é permeável à membrana celular, se intercala entre as bases do DNA, emitindo neste caso a fluorescência com máximo localizado em $\lambda = 617$ nm [93, 94].

Nestes experimentos 5×10^5 células Jurkat foram incubadas em placas de cultivo celular de 24 poços com diferentes concentrações de BCD₁₈₀ com 2h de incubação e dose de irradiação 40J/cm². Após a irradiação, variou-se o tempo de análise das amostras (imediata, 1h ou 2h). No período pós-irradiação, as amostras ficaram em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e estéril (1000rpm, 10min, 10°C) e ressuspendidas em 100µl no tampão de ligamento (10mM Hepes pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂) e 1µl de Annexin-V FITC e incubadas por 15min no escuro. Passados os 15min, foi adicionado 1µl de PI e 100µl de tampão de ligamento.

Dez mil células da amostra foram analisadas pelo Citometômetro de fluxo FACSCanto (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando o software Diva, próprio do aparelho.

7.5.3 Atividade da Caspase 3

Como já foi dito na seção 2.5, uma característica das células que sofreram apoptose pela via mitocondrial é a ativação das proteases caspase-3, que pode ser usada como teste para definir a existência deste tipo de apoptose.

Para medir a atividade da caspase-3, as células Jurkat depois do tratamento com BCD na concentração de 3×10^6 células/poço foram lavadas com PBS gelado (1000rpm, 10°C por 15') e ressuspendidas em 100µl do tampão de coleta (Hepes/NaOH 20mmol/L pH 7,5, Sacarose 250mmol/L, KCl 10mmol/L, MgCl₂ 2mmol/L, EDTA 1mmol/L, DTT 2mmol/L e CIP). Para lisar as células, a suspenssão de células foi colocada no gelo por 15' e depois por 3 vezes 30'' no gelo seco e descongelada no banho a 37°C. Feito isso, foi utilizado o sonicador 3 vezes por 10'' em cada amostra. As células foram centrifugadas a 15.000*g* por 30 minutos e ao sobrenadante adicionado igual volume (100µL) de tampão de reação (HEPES 25 mmol/L pH 7,5, Sacarose 10%, CHAPS 0,1%; DTT 10mM). As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford [95, 96] (158µL de água + 2µL de amostra).

Dosadas as proteínas, as amostras foram colocadas em placas de 96 poços de tal forma que a quantidade de proteína em cada poço fosse 50µg. Depois de adicionadas as amostras, foi adicionado o tampão de reação de modo que o volume final da solução tampão+amostra fosse 195µL. Para completar os 200µL do poço, foi adicionado 5µL do substrato caspase 3 Colorimetric Substrate I - Calbiochem (estoque 4mM). Após 2h de incubação, foi feita a leitura das amostras em 405nm no espectrofotômetro µ Quant Bio-tek Instruments.

7.5.4 Análise do Citocromo c por Western Blotting

O método de Western Blotting foi usado para analisar a liberação do citocromo c, que também é uma característica de apoptose pela via intrínseca.

A análise da liberação de citocromo c foi realizada utilizando 4×10⁶ células Jurkat por amostra, que, depois do tratamento com BCD, foram lavadas com PBS gelado e ressuspendidas em 200µL do tampão gelado (Hepes/KOH 10mM; pH 7,9; MgCl₂ 1,5mM; KCl 10mM; DTT 0,5mM, CIP e Digitonina 100µg/mL). Feito isso, as amostras foram incubadas em gelo por 30min, homogeneizadas usando um agitador vortex por 10seg e centrifugadas com 15000g por 10min. O sobrenadante foi guardado e o pellet foi ressuspendido em 100µL do tampão acima contendo triton X 100 a 1%, passado no gelo seco e banho a 37°C por três vezes para lisar as células e homegeneizado com agitador vortex. Utilizando o método de Bradford, foram dosadas as proteínas contidas no sobrenadante e no lisado de células. Para a análise da liberação do citocromo c, foram utilizadas 70µg de proteína de cada amostra, que foram secas no speed vácuo, ressuspendidas com uma mistura para SDS PAGE (eletroforese de poro de poli acrilamida) e fervidas por 5min em banho maria para então começar o processo de obtenção do citocromo c por Western Blotting. Western Blotting: O processo de Western Blotting é dividido em dois dias.

1° dia: foram feitos os tampões de transferência e de lavagem que foram utilizados nos dois dias de experimento. A receita dos tampões encontra-se abaixo.

Tampão de transferência (1 litro)	Tampão de lavagem: TBS-T (2 litros)	
Tris 25 mM3,027g	NaCl16g	
Glicina 192mM14,41g	Tris/HCl 1mol/L40ml	
H2O qsp700ml	H2O qsp1600ml	
Acertar pH para 8,3	Acertar pH para 7,6	
Adicionar:	Tween 202ml	
Metanol 20%200ml/l	H2O qsp2000ml	
SDS 0,05%0,5g/l	(tris 1mol/l = 121, 1g/l)	
H2O qsp1000ml		

Tabela 7.2 - Protocolo dos tampões de transferência e de lavagem utilizados no experimento de WesternBlottinng.

Foi feita a caracterização eletroforética da proteína com gel de poliacrilamida em sistema para eletroforese Sigma (St. Louis, MO, USA), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970) [97]. O gel de corrida apresentando 12% de acrilamida e o gel de empilhamento com 5% de acrilamida foram preparados de acordo com protocolo descrito abaixo:

Tabela 7.3 - Protocolo do gel de empilhamento e do gel de corrida utilizados na eletroforese.			
	Gel de	Gel de	
Soluções	empilhamento (5%)	corrida (10%)	
	(µl)	(µl)	
Acrilamida 30% / bis-acrilamida 0,8%	340	3200	
Tampão tris-HCl 1,5 mol/l pH 8,8		3000	
Tampão tris-HCl 0,5 mol/l pH 6,8	500		
Água deionizada	1100	1560	
SDS 10%	40	160	
TEMED 10%	10	40	
Persulfato de amônio 10%	10	40	

A amostra foi aplicada diretamente no gel de poliacrilamida e a eletroforese foi desenvolvida sob corrente de 20mA a 4°C por duas horas utilizando-se o tampão de tranferência. Como padrão de massa molecular foi utilizado o "SDS-PAGE Standards Broad Range" (Bio-Rad Laboratories, Catalog 161-0318) cujas bandas e respectivas massas moleculares estão descritas a seguir (Tabela 7.4):

Proteína	Massa Molecular Calibrada (Daltons)	
	em gel de Tris-HCl	
Miosina	207,345	
β-galactosidase	114,363	
Albumina de Soro Bovino	78,444	
Ovalbumina	53,086	
Anidrase Carbônica	35,719	
Inibidor de Tripsina de soja	28,329	
Lisozima	19,325	
Aprotinina	6,973	

 Tabela 7.4 - Valores tabelados das massas moleculares do padrão SDS-PAGE Standards Broad Range utilizado na eletroforese.

As proteínas foram tranferidas para a membrana de acetato de celulose segundo Towbin *et al.* (1979) [98], através de um sistema de Mini Trans-Blot (Bio-Rad). A tranferência das proteínas para a membrana nitrocelulose foi realizada montando-se o gel de SDS-PAGE (eletroforese de poro de poliacrilamida) e a membrana em um sistema "sanduíche" entre filtros protetores. Este sistema foi colocado em uma cuba eletroforética, contendo tampão de transferência a 4°C, posicionada sobre um agitador magnético para homogeneização do tampão sob corrente de 350mA por 1h.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose contendo as proteínas aderidas foram incubadas com tampão de lavagem contendo 5% de leite desnatado por 12h a 4°C. As membranas foram lavadas rapidamente com tampão de lavagem e incubadas com o anticorpo monoclonal primário anti-citocromo c de camundongo (BD PharmingenTM), na diluição de 1:2000, por duas horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após este período, as membranas foram lavadas rapidamente por quatro vezes, uma vez por 15min e 3 vezes pro 5min com o mesmo tampão a uma razão de 4ml por cm² de membrana. O anticorpo secundário marcado com HPR Goat anti-mouse (BD PharmingenTM), na diluição de 1:2000, foi incubado com a membrana por uma hora à temperatura ambiente sob agitação constante e um novo processo de lavagem foi realizado como anteriormente. Após as lavagens, volumes iguais das soluções de revelação contidas no kit "GE de quimioluminescência" foram misturadas. A membrana foi colocada em um cassete de autoradiografia com um filme de raios-X para exposição por 3min. A visualização foi em filme raios-X após revelação [99, 100].

7.5.5 Determinação da Atividade da Desidrogenase Láctica (LDH)

Como já foi dito na sessão 2.5, a ruptura da membrana plasmática é característica de necrose, que está acompanhada da liberação da desidrogenase láctica (do inglês *Lactate Dehydrogenase*, LDH). A liberação da LDH pode ser indicada pela sua atividade na conversão do piruvato a lactato na presença de NADH, transformando-o em NAD:

$$Piruvato + NADH + H \xleftarrow{LDH} Lactato + NAD$$

A atividade da LDH foi indicada pelo decréscimo da absorbância em 340nm, catracterística do NADH.

Para a determinação da atividade de LDH foram utilizados os sobrenadantes das células Jurkat incubadas com BCD_{180} por duas horas e irradiadas com dose $40J/cm^2$ ou mantidas no escuro e o Kit LDH Liquiform Labtest. A absorção foi medida pelo espectrômetro ABBOTT VP®, catálogo número 86-2/30.

No kit utilizado, vieram dois reagentes:

Reagente 1: NADH 360µmol/l e azida sódica 0,095%.

Reagente 2: tampão 250mmol/l; pH 7,5; piruvato de sódio 6 mmol/l e azida sódica 0,095%.

Para a realização do experimento, foi utilizado 1ml do reagente de trabalho composto pelos reagentes 1 e 2 na proporção de 4:1, respectivamente, e 0,02ml de amostra numa cubeta de caminho ótico 1cm termostatizada a 37°C. Após 1' foi feita a primeira medida e após 2' da primeira medida, foi realizada a segunda medida.

A atividade da desidrogenase láctica foi obtida através da seguinte relação:

atividade da desidrogenase lática =
$$\frac{A_1 - A_2}{2} * \frac{VT * 1000}{\varepsilon * VA * d}$$
 (7.5.1)

em que:

 A_1 - absorbância medida após 1 minuto,

A2 - absorbância após 3 minutos,

VT - volume total do ensaio

VA - volume da amostra

1000 - conversão de U/ml para U/l

d - caminho ótico
\mathcal{E} - absortividade milimolar do NADH (6,30)

Todo o procedimento e cálculo da atividade da desidrogenase láctica foram realizados de acordo com o manual do fabricante do kit utilizado.

7.6 Estudo da Permeação Cutânea do BCD₁₈₀

Nos estudos de permeação cutânea do BCD_{180} foram realizados os seguintes experimentos: permeação passiva e permeação iontoforética. Para a realização destes experimentos, foram preparadas várias amostras contendo os compostos que facilitam a penetração cutânea do BCD_{180} (formulações) e foi realizado o teste de estabilidade do BCD_{180} frente à corrente elétrica nos mesmos parâmetros do experimento.

7.6.1 Validação do Método Analítico

Para análise de permeação cutânea do BCD_{180} , foi escolhido o método de espectroscopia de absorção ótica UV/Vis. Escolhido o método, foi realizada sua validação segundo os parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, solubilidade e seletividade, seguindo as normas do FDA e da ANVISA. Para obtenção destas características, foi preparada uma curva de calibração de absorção em função da concentração de BCD₁₈₀. Esta curva foi sempre repetida depois da realização do experimento para que não houvesse interferências como, por exemplo, temperatura do dia do experimento, preparação da solução estoque, etc.

Para estas medidas, a solução padrão de BCD foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4 e C = 0,1M) na concentração de 8μ M a partir da qual foram obtidas as demais soluções através de diluições. Todas as soluções foram analisadas por espectroscopia de absorção ótica utilizando o espectrofotômetro Beckman Counter DU 640.

7.6.1.1 Curva de Calibração

Foi medida a absorbância em λ = 632nm das soluções do BCD₁₈₀ em função da concentação do corante. Foi analizada a linearidade desta dependência usando a análise estatística pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados de primeira ordem, sendo

que o critério mínimo de aceitação do coeficiente de determinação (r) foi de 0,99. As concentrações utilizadas foram: 0,77; 2,30; 3,83; 4,59 e 5,36 μ M em duplicata.

7.6.1.2 Precisão (Repetibilidade)

Em três dias diferentes foram realizadas as medidas de absorbância das soluções de BCD_{180} em concentrações de 0,77; 3,83 e 5,36µM. Para cada concentração as medidas foram repetidas 5 vezes e calculado o CV% para obtenção da repetibilidade do método de espectroscopia de absorção ótica.

7.6.1.3 Exatidão

Nos experimentos de exatidão do método de espectroscopia de absorção ótica, também foram realizadas cinco medidas da absorbância das soluções do BCD_{180} em concentrações de 0,77; 3,83 e 5,36µM em três dias diferentes e determinado o E%.

7.6.1.4 Sensibilidade

O limite de quantificação (sensibilidade) foi obtido através do monitoramento espectroscópico das soluções com concentrações decrescentes de BCD até o menor nível determinável.

7.6.1.5 Seletividade

Como nos experimentos de permeação cutânea, foi utilizada a pele dorsal da orelha de porco, e para a separação das camadas da pele foram utilizadas fitas adesivas. Foi estudada a interferência do homogeneizado de pele e fita adesiva nas absorbâncias das amostras a fim de verificar se existe uma sobreposição dos espectros obtidos do BCD_{180} e do material. Para isto, as amostras passaram pelo mesmo procedimento de *tape striping* e recuperação do BCD_{180} descritos nas seções 7.6.2 e 7.6.3, respectivamente.

7.6.1.6 Solubilidade

Para determinar a solubilidade do BCD₁₈₀, foi preparada uma solução supersaturada. Esta solução foi mantida por 24h num banho térmico a 37°C sob agitação. Passadas as 24h, a solução foi centrifugada (3000rpm, 25°C, 30min) e filtrada com filtro de papel. A solução filtrada foi analisada por espectroscopia de absorção ótica.

7.6.2 Preparação das amostras de pele

A permeação cutânea foi estudada utilizando-se pele da região dorsal de orelha de porco. A pele foi dermatomizada (corte superficial feito na pele contendo a epiderme inteira e uma parte da derme com espessura determinada) obtendo a espessura da amostra próxima de 500µm. Foi usado o material obtido no máximo 2h após o animal ter sido abatido. A pele foi dermatomizada e congelada por até 30 dias antes de ser usada. Para dermatomizar a pele, foi usado o Dermatômetro o TCM 3000 – Nouvag. Para análise da quantidade de BCD₁₈₀ que ficava retido na pele e que se difundia por esta, o estrato córneo foi retirado da área de 1,3cm² da pele de orelha de porco com o uso de 15 fitas adesivas (*tape stripping* – Figura 7.5). As fitas contendo o estrato córneo foram colocadas num tubo falcon de 50ml. O restante da pele (derme+epiderme) foi picotado e colocado em tubos falcons de 50ml. Para retirar o BCD₁₈₀ que ficou retido na epiderme e derme e o que passou pela pele, foi feito um estudo de recuperação do BCD₁₈₀, que está descrito na seção 7.6.3.



Figura 7.5 - *Esquema demonstrando a técnica de "tape-stripping" para retirada do estrato córneo (adaptado de* [77]).

7.6.3 Estudo da recuperação do BCD na pele

A solução estoque de BCD em álcool foi colocada nos tubos falcons de pele e fita adesiva nas concentrações 0,92; 4,59 e 9,19µM em triplicata para cada concentração. Após ser adicionado o BCD₁₈₀, os tubos falcons foram deixados abertos para evaporar o álcool. Após evaporar o álcool, foram adicionados 5ml de etanol em cada tubo. Os tubos contendo fita adesiva foram agitados no agitador vortex por 1min cada e os com pele passaram pelo triturador de tecidos por 1min e deixados no banho de ultrassom por 30min. O triturador de tecidos utilizado foi o Microtriturador - TURRATEC - Tecnal Modelo TE -102. As soluções foram filtradas e quantificadas por espectroscopia de absorção ótica [27, 101-105].

7.6.4 Estudo da permeação cutânea passiva do BCD₁₈₀

O estudo de permeação passiva foi realizado utilizando-se células de difusão vertical tipo "Franz". A pele foi colocada horizontalmente entre o compartimento doador e o receptor da célula (área de 1,3cm²). A solução receptora presente no compartimento inferior da célula foi uma solução tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) com 10% de etanol. No compartimento doador foi adicionado 300µl da solução de BCD₁₈₀ em tampão fosfato com concentração supersaturada obtida pelo teste de solubilidade. As portas para perfusão permaneceram fechadas, fazendo com que o experimento tivesse fluxo estático, e as amostras foram coletadas após 24h de experimento e analisadas por espectroscopia de absorção ótica.



Figura 7.6 - Célula de difusão vertical tipo "Franz".

7.6.5 Estudo de retenção de BCD₁₈₀ na pele

Terminado o experimento de permeação cutânea, a pele foi retirada da célula de difusão e lavada com água destilada para tirar o excesso de BCD₁₈₀. O estrato córneo foi retirado através da técnica de *"Tape Stripping"* (15 fitas adesivas). As fitas adesivas foram colocadas num tubo *"Falcon"*, ao qual foram adicionados 5ml de etanol sob agitação em um mixer por 1min. A pele foi picotada, colocada num tubo *"Falcon"*, ao qual foram adicionados 5ml de etanol, e homogeneizada com o auxílio de um triturador de tecidos por 1min. Depois, para romper a membrana das células, foi utilizado um banho de ultrassom por 30min. A solução foi filtrada. Todas as amostras foram analisadas por espectroscopia de absorção ótica.

7.6.6 Estudo de estabilidade do BCD₁₈₀ frente à corrente elétrica

Antes de se realizarem os experimentos de iontoforese, foi verificado se não haveria algum tipo de degradação ou reação do BCD_{180} na presença de corrente elétrica. Para isso, a solução do BCD_{180} em tampão fosfato foi analisada em seis repetições antes e depois de ser passada uma corrente elétrica de 0,4mA por 6h. As amostras foram analisadas por espectroscopia de absorção ótica.

7.6.7 Estudo da permeação iontoforética do BCD₁₈₀

Estes estudos foram realizados *in vitro* utilizando-se células de difusão descritas por Glikfield *et al.* (1988) [106]. Estas células (Figura 7.7) diferem das células utilizadas nos estudos de permeação passiva (item 7.6.4) no seu compartimento superior, o qual é dividido em dois compartimentos, separados por um pequeno espaço entre eles (terceiro compartimento). O terceiro compartimento faz com que os outros dois em contato com os eletrodos fiquem física e eletricamente isolados entre si.



Figura 7.7 - (A) Célula de difusão iontoforética, (B) Vista superior do compartimento doador.

Os eletrodos utilizados nos experimentos com aplicação de corrente elétrica foram os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl), obtidos segundo Lopez (2000) [101]. Para obtenção do eletrodo negativo, utilizou-se um bico de Bunsen, e um cadinho de porcelana onde foi fundida uma quantidade de cloreto de prata (AgCl) suficiente para mergulhar um pequeno fio de prata com a extremidade dobrada. Após a imersão do fio de prata (99,9% de pureza), este foi retirado com a extremidade dobrada completamente recoberta com cloreto de prata solidificado e uma parte de sua haste foi encapada com um plástico isolante (Figura 7.8).



Figura 7.8 - Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (A) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido. Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (B) o eletrodo foi encapado com plástico isolante (C).

Para a confecção do eletrodo positivo (ânodo), foi preparado um circuito elétrico em série com os eletrodos de AgCl e fios de platina imersos em uma solução salina de NaCl. O terminal positivo do gerador foi conectado ao pedaço de fio de platina e o terminal negativo foi conectado ao eletrodo de AgCl (Figura 7.9), o qual foi reduzido a Ag através da passagem de uma corrente elétrica de 0,6mA por 8h.



Figura 7.9 - Representação esquemática do circuito elétrico em série para o preparo do eletrodo positivo (ânodo) através da passagem de uma corrente elétrica de 0,6mA por 8h.

A célula de difusão foi montada com a pele da orelha de porco dermatomizada, separando os compartimentos doadores (dos eletrodos) do compartimento receptor. Este último foi perfundido com a solução receptora (tampão fosfato, pH 7,4) por um período de equilíbrio de 1h. Nos compartimentos dos eletrodos na parte superior da célula foram adicionados 1ml de BCD₁₈₀ em tampão fosfato no ânodo (eletrodo positivo) e 1ml de tampão fosfato sem BCD no cátodo (eletrodo negativo). Sobre as câmaras doadoras (ânodo e cátodo) foi colocada uma tampa de plástico para minimizar a evaporação das soluções que banham os eletrodos. Nesta tampa foram feitos dois pequenos orifícios para permitir a inserção dos eletrodos e facilitar a reprodutibilidade da posição destes a uma distância fixa da superfície da pele (~ 3mm). Os eletrodos foram ligados a uma fonte de energia e uma corrente elétrica de 0,4mA que estava passando pela amostra por 6h. A densidade da corrente, em função da área exposta, foi de 0,5mA/cm². A variação de potencial (voltagem) necessária para manter a corrente constante em resposta à resistência da pele de porco foi monitorada com o auxílio de um multímetro.

A solução receptora, mantida a 37°C, foi agitada a 300rpm por 6h. Após este período, a quantidade de BCD_{180} que permeou a pele, presente na solução receptora, foi quantificada por espectroscopia de absorção ótica.

7.6.8 Formulações testadas na permeação

Para permeação passiva do BCD₁₈₀ foram testadas três formulações.

- Primeiro, foi testada a solução do BCD₁₈₀ em propilenoglicol, que é tipicamente utilizado em formulações farmacêuticas de uso tópico. Ele tem uma ação promotora de absorção reconhecida por penetrar na pele e alterar seu coeficiente de partilha, facilitando a entrada de diversos fármacos [107].
- O segundo teste foi realizado utilizando uma emulsão composta de 8% de paramul (tensoativo não-iônico), 5% de propilenoglicol e 87% de água destilada. Num bécquer foram colocados a água destilada e o propilenoglicol (solução 1) e em outro bécquer o paramul (solução 2). Ambos foram aquecidos a 60°C sob agitação constante. Depois que a solução 2 estava homogênea, a solução 1 foi adicionada na solução 2 e a emulsão resultante foi resfriada até a temperatura ambiente para endurecer. O BCD₁₈₀ foi adicionado à emulsão pronta e a mistura passou pelo processo de solubilidade.
- A terceira emulsão testada foi composta por 10% de monoleína em propilenoglicol. A monoleína e o propilenoglicol foram pesados e aquecidos até que a monoleína derretesse por completo. Esta foi a emulsão com melhor resultado na permeação e por esta razão foi a emulsão testada nas culturas de células. Para minimizar a toxicidade da emulsão nas células, depois de pronta, foi preparada uma segunda emulsão composta da anterior e água destilada na proporção 1:1.

Para permeação iontoforética foram testadas duas formulações:

- A solução do BCD₁₈₀ em tampão HEPES (25mM) com NaCl (133mM)
- A solução do BCD₁₈₀ em tampão fosfato (0,1M)

Em todos os testes, o BCD_{180} foi adicionado à emulsão pronta e a mistura foi deixada por 24h sob agitação em um banho térmico a 37 °C para melhor solubilização do BCD_{180} . Em seguida, a emulsão foi dividida em duas amostras. Uma que seria utilizada para o experimento de permeação e outra para a determinação da concentração.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Características espectroscópicas do BCD₁₈₀

Antes de determinar o efeito fotocitotóxico foram caracterizados os espectros de absorção do BCD_{180} no meio de cultura RPMI-S com e sem células comparando com os espectros obtidos em diversos solventes.

Os espectros de absorção do BCD₁₈₀ em água (preto) e em etanol (vermelho) são apresentados na Figura 8.1. O espectro de absorção dos monômeros do BCD₁₈₀ é caracterizado por dois máximos de absorção relacionados com as transições eletrônicas vibracionais $S_{00} \rightarrow S_{10}$ ($\lambda_{max1} \approx 630 - 640$ nm) e $S_{00} \rightarrow S_{11}$ ($\lambda_{max2} \approx 590 - 595$ nm) [36]. O monitoramento dos espectros de absorção em vários solventes mostrou que para os monômeros de BCD₁₈₀ a razão entre as intensidades dos picos de absorção é:

$$\eta = \frac{I_{S_{00} \to S_{10}}}{I_{S_{00} \to S_{11}}} \approx 3$$
(8.1)

A razão $\eta < 3$ indica a presença dos agregados H do corante que possuem o pico de absorção próximo do pico S₀₀ \rightarrow S₁₁ do monômero [108]. Em soluções aquosas, a intensidade relativa do pico 2 aumenta com aumento da concentração do corante, indicando a formação dos agregados H do corante (Figura 8.1) [11, 109]. O aumento da agregação do corante na água dificulta a definição precisa da sua concentração através dos espectros de absorção. Por este motivo as soluções stock do BCD₁₈₀ foram preparadas em etanol, ao qual o corante não se agrega. Estas soluções stock com as concentrações 0,5-1mM foram adicionadas às amostras, de modo que o conteúdo final de etanol nas amostras não ultrapassou 2% para não prejudicar as células.



Figura 8.1 - Espectros de absorção normalizados do BCD₁₈₀ em água e etanol.

Os espectros de absorção do BCD_{180} no meio de cultura RPMI-S com e sem células foram obtidos variando-se as concentrações de BCD_{180} entre 1 e 20µM.

Foram analisados os espectros do BCD_{180} na presença das células B16F10 e C8161 (Figura 8.3). Neste caso o BCD_{180} foi incubado durante 2h nos poços com cultura de células e, antes de medir a absorção da amostra, o meio de cultura foi trocado por meio fresco. Neste caso somente o BCD_{180} localizado nas células estava presente nas amostras.

Para excluir a sobreposição dos espectros de absorção do BCD_{180} e do vermelho de fenol em todos os casos foi utilizado o meio sem vermelho de fenol.



Figura 8.2 - Espectros de absorção de BCD_{180} em meio de cultura RPMI-S com variação da concentração de 1- $20\mu M$.

O perfil do espectro de absorção do BCD_{180} no meio de cultura na ausência das células (Figura 8.2) é diferente daquele da sua forma monomérica (Figura 8.1):

1. A razão η diminui com o aumento da concentração do BCD₁₈₀ (Tabela 8.1), indicando o aumento de conteúdo dos agregados H;

Tabela 8.1 - Razão $\eta = \frac{I_{S_{00} \to S_{10}}}{I_{S_{00} \to S_{11}}}$ entre as intensidades de absorção dos picos de transições $S_{00} \to S_{10} e S_{00} \to S_{11}$ do BCD_{180} em função da sua concentração.

[BCD ₁₈₀], µM	η
1	2,67
2	2,46
5	2,08
10	1,71
15	1,60
20	1,55

2. Aparece uma nova banda de absorção com $\lambda_{max} = 685$ nm, cuja intensidade relativa cresce quando aumenta a concentração do corante. Efeito semelhante foi observado na

presença do NaCl em soluções aquosas do BCD_{180} , sendo associado com a formação dos agregados J do corante [11]. Assim podemos considerar que no meio RPMI-S o BCD_{180} forma tanto agregados H quanto J.

Na presença das células B16F10 e C8161 os espectros de absorção do BCD₁₈₀ mostraram que em contato com as células o pico com $\lambda_{max} = 685$ nm desaparece e a razão η aumenta, mostrando que o corante se desagrega devido à interação com as células (Figura 8.3). Efeito semelhante foi observado na interação do BCD₁₈₀ com DNA [11] e com micelas [110]. Entretanto, analisando-se os espectros de absorção na presença das células, é possível verificar que houve a sobreposição das duas formas do BCD₁₈₀: uma com pico principal em λ = 630nm e outra em λ = 645nm. O efeito é mais acentuado nas células B16F10. Estas duas formas foram associadas com os monômeros de BCD₁₈₀ ligados em dois diferentes sítios de ligação nas células, possivelmente extra e intracelular.



Figura 8.3 - Espectros de absorção de BCD₁₈₀ nas células A)B16F10 e B) C8161 com variação da concentração de 1-20μM e tempo de incubação de 2h.

Assim sendo, podemos concluir que a ligação do BCD₁₈₀ com estruturas celulares estimula sua desagregação. Este resultado pode ser importante pelos seguintes motivos:

- 1. Geralmente a agregação diminui os tempos de vida e rendimentos quânticos dos estados excitados do FS [111, 112], diminuindo assim sua eficácia no tratamento;
- 2. A auto-agregação pode levar a uma subseqüente precipitação do FS, ocasionando dificuldade na administração do composto no paciente [24].

8.2 Efeito Citotóxico

Todos os experimentos para determinar o efeito citotóxico (%ECT) dos BCD com e sem ação da luz foram realizados utilizando em paralelo, como droga padrão, o composto Photogem® que já é utilizado em clínica em vários países e já está aprovado pela ANVISA no Brasil. Para todos os experimentos de %ECT foram preparadas duas placas idênticas sendo que uma era irradiada e a outra mantida no escuro como referência.

As soluções estoque dos BCD foram preparadas em etanol, que é tóxico às células, e por esta razão foi determinada a toxicidade do etanol nas culturas de células para que a concentração de etanol utilizado não influenciasse na toxicidade dos BCD. Para isto, foram colocadas diferentes percentagens de etanol e adicionado meio RPMI-S para completar o volume de 200µl nos poços de tal forma que se obtivesse as percentagens desejadas. Foram usados a dose de irradiação de 40J/cm² e o tempo de incubação de 2h.



Figura 8.4 - Citotoxicidade do etanol sobre as células de B16F10, C8161 e HT29 após incubação de duas horas e dose de irradiação de 40J/cm² A) Escuro e B) Irradiado.

Analisando-se a Figura 8.4B, é possível verificar que a percentagem máxima de etanol que não possui citotoxicidade significativa sobre as células é menor do que 2% do volume total em cada poço para as linhagens B16F10 e C8161 e menor do que 1% para a linhagem HT29. Por garantia, a solução estoque do BCD₁₈₀ foi preparada em concentrações altas para que antes de ser colocada nas células fossem diluídas em RPMI-S diminuindo ainda mais o volume de etanol sobre as células e fazendo com que a percentagem de etanol nas células não ultrapassasse 1% para todas as linhagens. Comparando-se as Figuras 8.4A e 8.4B verifica-se que a toxicidade do etanol irradiado é menor que a da placa mantida no escuro (não irradiada). Isto é provável, pois durante a irradiação a placa de cultura teve que ficar aberta por 1h, possibilitando a evaporação do etanol, enquanto a placa mantida no escuro ficou tampada.

Depois do teste com o etanol, foram feitos experimentos com concentrações "na base 10" para determinar o intervalo de trabalho que seria utilizado. Foram testadas as concentrações de $0,01-100\mu$ M do BCD₁₈₀. Os testes foram feitos com as células B16F10 que foram as primeiras células a serem estudadas. Nestes experimentos foi usada a dose de irradiação de 40J/cm² e tempo de incubação de 2h.



Figura 8.5 - %*ECT das diferentes concentrações "na base 10" de BCD*₁₈₀ e Photogem® sobre culturas de células de melanoma B16F10 com tempo de incubação de 2h A) escuro, B) irradiado com 40J/cm².

Baseando-se na análise dos resultados obtidos (Figura 8.5), decidiu-se utilizar o intervalo de concentração de 1-20 μ M, região na qual a %ECT do BCD₁₈₀ se saturou e não houve a influência da absorção ótica do BCD₁₈₀, o que poderia interferir na leitura da toxicidade das células que foi realizada pelo método MTT, já descrito na sessão 7.3. Para diminuir mais a influência da absorção dos BCD tanto nas leituras do MTT como na penetração da luz até as células, antes da irradiação das placas de cultura ou adição do MTT, o meio de toda a placa era trocado por meio RPMI-S sem BCD₁₈₀ e sem vermelho de fenol, deixando apenas o BCD₁₈₀ que se localizou nas células.

Finalmente, as concentrações escolhidas para os experimentos foram 1, 2, 5, 10, 15 e 20µM.

Depois da escolha da escala de concentrações dos fotossensibilizadores, foram testadas as doses de irradiação que seriam utilizadas. A variação da dose de irradiação foi realizada variando o tempo de exposição. Por exemplo, para se obter a dose de irradiação de $40J/cm^2$, as placas eram irradiadas durante 1h. O tempo de incubação foi de 2h. Inicialmente, neste teste, foram também utilizadas as células B16F10. Observou-se (Figura 8.6) que o BCD₁₈₀ apresentou %ECT significativa pela exposição em intensidades de irradiação de 10 até 70J/cm², diferentemente do Photogem®, que mostrou %ECT significativo somente quando a dose de irradiações era $\geq 40J/cm^2$. Além disso, o BCD₁₈₀ apresentou maior %ECT quando comparado ao Photogem® em todas as concentrações.



Figura 8.6 - *Efeito da variação da dose de irradiação sobre o efeito fotocitotóxico do A) BCD*₁₈₀ *e B) Photogem*® *sobre o melanoma B16F10 em função da concentração dos compostos com tempo de incubação de 2h.*

É possível verificar (Figura 8.6) que para a dose de irradiação de 40J/cm² o %ECT de ambos os FS se satura e não é necessário usar doses maiores.

Depois da escolha das concentrações e da dose de irradiação utilizando as células B16F10 estes parâmetros foram testados usando as linhagens C8161 e HT29.

A Figura 8.7 mostra que o %ECT para as linhagens C8161 e HT29, assim como ocorreu para as B16F10, também se satura em doses ≤ 40 J/cm².



Figura 8.7 – Efeito da variação da dose de irradiação sobre o efeito fotocitotóxico do BCD₁₈₀ sobre HT29 (A) e sobre C8161 (B) e Photogem® sobre HT29 (C) e sobre C8161 (D) em função da concentração dos FS, com tempo de incubação de 2h.

Por esta razão escolheu-se a dose de irradiação de 40J/cm² como padrão e todos os resultados que serão mostrados a seguir foram realizados utilizando esta dose.

Para mostrar que o %ECT obtido não era simplesmente o resultado do aquecimento das células pela irradiação, controlamos a temperatura da placa durante a irradiação no intervalo de tempo de 0 – 100min. A temperatura foi medida utilizando-se um termômetro digital (Checktemp 2 Hanna Instruments) que foi colocado dentro da placa de cultura. Pode-se ver na Figura 8.8 que não há aquecimento das placas com a variação da dose de irradiação. Além disso, com o aumento da dose de irradiação, a temperatura nos poços das placas de cultura diminuiu. A diminuição da temperatura foi atribuída à circulação do ar dentro do fluxo laminar e ao ar condicionado ligado.



Figura 8.8 – Variação da temperatura da placa de cultura em função do tempo de irradiação (dose de irradiação) nas mesmas condições que nos experimentos com as culturas de célula.

Primeiro, será mostrado o resultado obtido sem irradiação para as três linhagens: B16F10, C8161 e HT29 com tempo de incubação de 24h para o BCD₁₈₀. O %ECT tanto do BCD₁₈₀ quanto do Photogem® não ultrapassa 20% (Figura 8.9).



Figura 8.9 - Efeito citotóxico da variação da concentração do A) BCD₁₈₀ e B) Photogem® nas linhagens celulares B16F10, C8161, HT29 e PBMC com tempo de incubação de 24h sem irradiação.

O próximo passo foi otimizar o tempo de incubação para cada par (linhagem das células+FS). Os resultados serão mostrados por linhagem estudada comparando-se os resultados do BCD₁₈₀ com os do Photogem®.



Figura 8.10 - *Efeito do tempo de incubação sobre a %ECT do A) BCD*₁₈₀ e B) Photogem® em células tumorais B16F10 em função da concentração dos compostos com dose de irradiação de 40J/cm².

Foi observado (Figura 8.10), que o %ECT do BCD₁₈₀ nas células B16F10 se satura para todas as concentrações estudadas quando o tempo de incubação supera 5h. Para o Photogem® nas concentrações $\geq 2\mu$ M este tempo também é \approx 5h, enquanto que para concentrações $< 2\mu$ M o %ECT foi desprezível. Além disso, para as células B16F10 observase que o BCD₁₈₀ em concentrações $< 5\mu$ M incubado por um período de 1 - 3h, é mais fotocitotóxico que o Photogem® nas mesmas condições experimentais. Ainda, nossos dados demonstram que quando as células são incubadas com BCD₁₈₀ com tempo 5 - 6h o BCD₁₈₀ atinge o %ECT máximo (> 90%) para todas as concentrações testadas ($\geq 1\mu M$), enquanto que, nessas condições, o Photogem® atingiu este %ECT somente nas concentrações > 2 μM .



Figura 8.11 - *Efeito do tempo de incubação sobre a %ECT do A) BCD*₁₈₀ *e B) Photogem*® *em células tumorais C8161 em função da concentração dos compostos com dose de irradiação de 40J/cm*².

Para as células C8161, foi observado (Figura 8.11) que o BCD₁₈₀ atinge o %ECT máximo para as concentrações $\geq 5\mu$ M quando o tempo de incubação supera 2h, enquanto que para o Photogem® neste tempo o %ECT máximo foi atingido só para concentrações $\geq 10\mu$ M.

Para as concentrações 1μ M e 2μ M o %ECT do BCD₁₈₀ supera o %ECT do Photogem® em todos os tempos de incubação testados.



Figura 8.12 - *Efeito do tempo de incubação sobre a %ECT do A) BCD*₁₈₀ *e B) Photogem*® *em células tumorais HT29 em função da concentração dos compostos com dose de irradiação de 40J/cm*².

Para as células HT29, foi observado (Figura 8.12) que o BCD₁₈₀ atinge o patamar do %ECT para todas as concentrações estudadas quando o tempo de incubação é de 4 até 6 h, enquanto que para o Photogem® este tempo varia de 1 até 9 h. Para as concentrações 1 μ M, 2 μ M e 5 μ M o BCD₁₈₀ é mais fotocitotóxico que o Photogem® em todos os tempos de incubação testados. Para as concentrações > 10 μ M o Photogem® atinge o máximo do %ECT mais rápido que BCD₁₈₀.

Com os dados das Figuras 8.10 - 8.12 foram estimadas as concentrações que atingem 50% da mortalidade das células (LC₅₀, do inglês *Lethal Concentration of 50%*) nos vários tempos de incubação (tabelas 8.2 - 8.4).

Tabela 8.2 - *LC*₅₀ *do BCD*₁₈₀ *e do Photogem*® *em células de melanoma murino (B16F10) variando-se o tempo de incubação e fixando-se a dose de irradiação em 40,13J/cm*².

Tempo de incubação (h)	[BCD] (µM)	[Photogem] (µM)
1,0	7,84	3,51
2,0	1,58	3,65
3,0	1,78	2,92
5,0	<1	1,46
6,0	<1	1,67

Tabela 8.3 - *LC*₅₀ do *BCD*₁₈₀ e do Photogem® em células de melanoma humano (C8161) variando-se o tempo de incubação e fixando-se a dose de irradiação em 40,13J/cm²

Tempo de incubação (h)	[BCD] (µM)	[Photogem] (µM)
1,0	4,94	9,44
2,0	1,61	3,80
3,0	1,12	3,25
4,0	<1	1,74
5,0	<1	1,61

Tempo de incubação (h)	[BCD] (µM)	[Photogem] (µM)
1,0	>20	9,13
2,0	>20	8,80
3,0	4,45	6,56
5,0	1,75	3,72
6,0	1,00	3,41
7,0	<1	1,88
8,0	<1	1,62
9,0	<1	1,48

Tabela 8.4 - LC_{50} do BCD_{180} e Photogem[®] em células de adenocarcinoma de colo-retal humano (HT29) variando-se o tempo de incubação e fixando-se a dose de irradiação em 40,13J/cm²

Analisando os dados das tabelas 8.2 - 8.4 conclui-se que, fora dos tempos de incubação 1 e 2h para células HT29, as LC₅₀ do BCD₁₈₀ são menores do que as do Photogem®, indicando que na maioria dos casos o BCD₁₈₀ é mais fototóxico contra as células malignas do que o Photogem®.

Foram também realizados experimentos preliminares com os BCD_{90} e BCD_{150} nas células B16F10 variando-se suas concentrações e tempos de incubação para a dose de irradiação de 40J/cm² (Figura 8.13).



Figura 8.13 - Efeito do tempo de incubação sobre a %ECT do A) BCD₉₀ e B) BCD₁₅₀ em função da concentração dos compostos nas células B16F10 com dose de irradiação de 40J/cm².

A tabela 8.5 mostra o %ECT dos três BCD irradiados depois de 1h de incubação com dose $40J/cm^2$. Os resultados da tabela 8.5 mostram que entre os três BCD, o BCD₁₅₀ é mais fototóxico em baixas concentrações (1, 2 e 5µM) e em concentrações maiores (10, 15 e 20μ M) o BCD₉₀ atinge mesmo valor de %ECT. O BCD₁₈₀ é menos fototóxico do que outros dois corantes. Como o %ECT do BCD₁₈₀ é comparável ou ultrapassa o do Photogem®, podemos considerar todos os BCD como promissores para aplicação em TFD. Esta conclusão tem caráter preliminar. Para afirmá-la é necessário realizar o estudo mais detalhado dos BCD₉₀ e BCD₁₅₀.

		%ECT		
[BCD]	(μM)	BCD ₉₀	BCD ₁₅₀	BCD ₁₈₀
1		-0,06±7	13±17	6±13
2		32±3	68±21	45±12
5		52±1	67±10	44±16
10		83±9	63±21	56±6
15		90±2	92,2±0,4	51±9
20		92,0±0,4	91,7±0,3	62±3

Tabela 8.5 – Comparação da %ECT dos BCD₉₀, BCD₁₅₀ e BCD₁₈₀ nas células B16F10 variando-se a concentração com tempo de incubação de 1h para a dose de irradiação de 40J/cm².

Os resultados da seção 8.2 mostram que o BCD_{180} possui boas características para ser utilizado em TFD. No escuro o BCD_{180} não apresentou citotoxicidade significativa para nenhuma linhagem estudada, assim como o composto comercial Photogem®. Nas linhagens tumorais estudadas (B16F10, C8161 e HT29) o BCD_{180} mostrou maior %ECT para concentrações mais baixas do que o Photogem®. Estes resultados mostram que o BCD_{180} pode ser utilizado em concentrações menores que o Photogem®, mesmo que às vezes necessite de tempo de incubação maior. O uso de baixas concentrações de FS é desejável para diminuir a probabilidade de agregação e precipitação, que diminuem a eficiência da TFD como dito anteriormente.

8.3 Mecanismos de Morte celular

Os estudos dos mecanismos de morte celular induzidos pelo corante BCD₁₈₀ começaram com o estudo da sua distribuição celular.

8.3.1 LOCALIZAÇÃO CELULAR DO BCD₁₈₀

Para o estudo da distribuição intracelular do BCD_{180} foi utilizada a cultura de células B16F10. Antes de estudar a localização intracelular do BCD_{180} , foi verificado se ele internaliza na célula. Para isto, as células foram incubadas com o BCD_{180} nos tempos de incubação de 5, 15, 30 e 120min. A análise da internalização foi realizada por microscopia de fluorescência (Figura 8.14).



Figura 8.14 - Internalização do BCD₁₈₀ nas células B16F10 com variação do tempo de incubação de A) 5min, B) 15min, C) 30min e D) 120min utilizando-se um microscópio de fluorescência (Leica Microsystem DM6000B com o filtro N2.1).

Anteriormente foi observado [11] que o rendimento quântico da fluorescência do BCD_{180} em água é muito baixo ($\varphi_{fl} = 0,02$), mas na interação com moléculas de DNA ou micelas ele aumenta mais de 20 vezes e atinge o valor $\varphi_{fl} = 0,44$. Por isto associamos a fluorescência do BCD_{180} na cultura de células com as moléculas do BCD_{180} ligadas com estruturas celulares. Esta consideração está em concordância com o perfil do espectro da fluorescência do BCD_{180} em cultura de células, que é semelhante àquele observado na sua interação com micelas de SDS (Figura 8.15).



Figura 8.15 - Espectros de fluorescência do BCD₁₈₀ em SDS e em contato com as células B16F10.

Como se pode observar pela distribuição da fluorescência do BCD_{180} , depois de 5min de incubação (Figura 8.16A) o BCD_{180} se liga na superfície da célula e começa a entrar no seu interior. Depois de 15min (Figura 8.16B) pode-se observar que a quantidade de pontos de fluorescência no interior da célula aumenta e eles se distribuem no citoplasma. Depois de 30min de incubação o número dos pontos fluorescentes no interior da célula continua a aumentar (Figura 8.16C) até que depois de duas horas de incubação todo o BCD_{180} se internaliza na célula, localizando-se principalmente no espaço pré-nuclear.

Para determinar os sítios onde o BCD_{180} se localiza no interior da célula, foi utilizada a microscopia de fluorescência, comparando a distribuição da fluorescência do BCD_{180} com a de marcadores–padrões de organelas intracelulares. Foram utilizados três marcadores fluorescentes: Mitotracker GreenTM e Rodamina 123 de mitocôndrias e 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) como marcador do núcleo. Dois marcadores de mitocôndria foram

escolhidos, pois segundo Hilf (2007) as mitocôndrias são os principais alvos dos FS em TFD [113]. A Figura 8.17 mostra as imagens obtidas por microscopia de fluorescência da marcação de cada um dos marcadores utilizados.



Figura 8.16 - Células B16F10 depois da incubação com: A, D e G) BCD₁₈₀ (120min); B) Rodamina 123 (30min), C) sopreposição de A e B, E) Mitotracker GreenTM (30min, F) sobreposição de D e E; H)DAPI (30min) e I) sobreposição de G e H. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência com o microscópio de fluorescência (Leica Microsystem DM6000B). Com os filtros N2.1 para o BCD₁₈₀, L5 para o Mitotracker GreenTM e a Rodamina 123 e A para o DAPI.

A coincidência das imagens do BCD_{180} com as de marcadores de mitocôndrias (Figuras 8.17 A-F) mostra que o BCD_{180} se localiza preferencialmente na região próxima das mitocôndrias. Este não ocorreu com o marcador de núcleo (Figuras 8.17 G-I), mostrando que a localização do BCD_{180} no núcleo é pouco provável. A localização do BCD_{180} na região das mitocôndrias pode explicar seu alto %ECT já que os dois principais processos de morte celular, apoptose e necrose, estão associados às mitocôndrias [114-121].

8.3.2 Mecanismos de morte celular

Como já foi dito na sessão 7.5.2 o estudo dos mecanismos de morte celular induzidos pelo BCD_{180} foi realizado por citometria de fluxo, utilizando as células T de leucemia (Jurkat).

Antes de estudar os mecanismos de morte foi realizado o estudo do %ECT do BCD_{180} sobre a linhagem de células Jurkat com tempo de incubação de 2h e dose de irradiação de $40J/cm^2$. Nestes experimentos foram usadas duas concentrações de BCD_{180} : 1 e $10\mu M$. Foi observado (Figura 8.17) que o BCD_{180} é fotocitotóxico contra a linhagem de células Jurkat, podendo estas ser usadas como células modelo para estudar os mecanismos de morte.



Figura 8.17 – Efeito Citotóxico do BCD₁₈₀ em função da concentração nas células Jurkat para o tempo de incubação de 2h com dose de irradiação de 40J/cm².

Como primeiro passo do estudo dos mecanismos da morte celular, foram estudadas as mudanças da morfologia das células Jurkat depois da irradiação na presença do BCD₁₈₀. Para isso, as células Jurkat foram incubadas por 2h e irradiadas com 40J/cm². Após 12h da irradiação, foi analisada a morfologia das células com um microscópio com magnificação x400 através da coloração das células com o corante Romanowisky (Panotic, Laborclin, Pinhais, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante como descrito na seção 7.5.1. A

irradiação das células na presença de 1 μ M de BCD₁₈₀ resultou em mudanças na morfologia da maioria das células, que foram caracterizadas pela condensação nuclear e citoplasmática e pela fragmentação celular (Figura 8.18 C e D).



Figura 8.18 – Imagem da morfologia das células Jurkat. As células foram incubadas com BCD₁₈₀ por 2h e irradiadas com 40J/cm². Depois de irradiadas as células foram mantidas na estufa por 12h antes de analisadas. Para a análise, as células foram coradas com o corante Romanowisky e analisadas com um microcópio ótico (Leica Microsystem DM6000B) A) células controle sem BCD₁₈₀ (40x) B) células controle sem BCD₁₈₀ (100x), C) 1µM BCD₁₈₀ (40x) D) 1µM BCD₁₈₀ (100x), E) 10µM BCD₁₈₀ (40x), e F) 10µM BCD₁₈₀ (100x).

Essa mudança na morfologia é típica para células que sofrem apoptose. Em contraste, quando incubadas com 10μ M de BCD₁₈₀, as células Jurkat apresentaram uma diminuição em sua viabilidade e uma significante quantidade das células apresentou dano na integridade da membrana celular (Figura 8.18 E e F), típico para células necróticas. Assim, é possível considerar a contribuição de ambos os mecanismos de morte celular induzida pelo BCD_{180} sob a irradiação luminosa. A participação dos mecanismos depende da concentração do BCD_{180} .

Para confirmar este resultado foi utilizada a citometria de fluxo com Anexina V FITC para detecção da liberação da fosfatidilserina, que pode ser associada tanto com a apoptose quando com a necrose. As células Jurkat foram incubadas com BCD_{180} (concentrações 1 e 10µM) por duas horas, irradiadas com 40J/cm² e analisadas após 4, 12 e 24h da irradiação.

Na Figura 8.19 estão representados os resultados obtidos para a Anexina V FITC, que mostram que menos de 10% das células controle foram marcadas com Anexina V FITC em todos os tempos de pós-irradiação (Figura 8.19 1^a linha). Para a concentração de 1 μ M, não houve diferença entre o controle de 4h pós-irradiação, mas para tempos de 12 e 24h pós-irradiação a quantidade de células marcadas com Anexina V FITC aumentou de 3 a 4 vezes comparado com o controle (Figura 8.19 2^a linha). Para a concentração de 10 μ M, já com 4h pós-irradiação a quantidade de células marcadas aumentou 4 vezes chegando até >90% de células marcadas com Anexina V FITC (Figura 8.19 3^a linha).



Figura 8.19 – Quantidade de células Jurkat marcadas com Anexina V FITC depois de incubadas com 1 e 10μM de BCD₁₈₀ por 2h, irradiadas com 40J/cm² e analisadas por citometria de fluxo 4, 12 e 24h depois da irradiação.

Os resultados apresentados na Figura 8.19 mostram que a morte celular, induzida pelo BCD_{180} , depende de sua concentração e do tempo de espera após a irradiação. Entretanto, não foi possível, baseando-se nestes resultados, distinguir se a morte foi induzida por apoptose ou necrose. Para excluir a parte da necrose dos resultados, obtidos com Anexina V FITC, foi necessário realizar o experimento de citometria de fluxo com o iodeto de propídeo, que se associa somente com necrose. Infelizmente não foi possível obter resultados satisfatórios com o iodeto de propídeo juntamente com o BCD_{180} , pois as bandas de fluorescência destes compostos, 617nm e 640nm, respectivamente, se sobrepõem.

A participação da necrose na morte celular foi avaliada pela detecção da liberação da desidrogenase láctica (LDH) no sobrenadante das células Jurkat, causada pelo dano na membrana plasmática.

A liberação da LDH foi avaliada pelo teste colorimétrico originalmente descrito por Korzeniewski and Callewaert (1983) or Decker and Lohmann-Matthes (1988) e mostrado na seção 7.5.5. A liberação da LDH indica que a membrana celular está rompida e isto é uma característica típica de células necróticas. Na Figura 8.20 pode-se ver que houve aumento na liberação da LDH com o tratamento com BCD₁₈₀. Este aumento foi observado tanto com o aumento da concentração do BCD₁₈₀ quanto com o aumento do tempo de análise pósirradiação, mostrando que a membrana celular foi danificada, dando indícios de morte por necrose.



Figura 8.20 – Liberação da LDH no sobrenadante de células Jurkat incubadas com BCD₁₈₀ por 2h, irradiadas com 40J/cm² analisadas depois de 4, 12 e 24h da irradiação pelo ensaio colorimétrico.

Previamente foi mostrado que o BCD₁₈₀ se localiza preferencialmente na região de mitocôndrias. Por isto decidiu-se realizar um experimento para mostrar que a morte induzida pelo BCD₁₈₀ estava relacionada com o dano nas mitocôndrias. Para isto, as células Jurkat foram incubadas com BCD₁₈₀ por duas horas, irradiadas com 40J/cm² e analisadas por método de Western Blotting 4h após a irradiação. As concentrações utilizadas foram: 1, 5 e 10 μ M. Foram analisados os pellets e a fração citosólica liberada, que indica dano na membrana da mitocôndria. Na Figura 8.21, pode-se observar que houve a detecção de citocromo c tanto no pellet quanto no sobrenadante das células Jurkat tratadas com BCD₁₈₀. Ainda na Figura 8.22, é possível verificar que a liberação do citocromo c é dependente da concentração do BCD₁₈₀ tanto nas células irradiadas quanto nas células que foram mantidas no escuro, sendo a liberação de citocromo c nas últimas muito menor do que nas irradiadas. Como foi visto na seção 8.2, o BCD₁₈₀ possui toxicidade no escuro, que não ultrapassa 20%. Assim foi associada a liberação do citocromo c no escuro com o %ECT do BCD₁₈₀ no escuro.



BCD₁₈₀ (μM)

Figura 8.21 – A liberação do citocromo c indicado por imunoblotting a partir do sobrenadante e pellet obtidos das células Jurkat incubadas por 2h com BCD₁₈₀ nas concentrações de 1, 5 e 10μM, irradiadas com 40J/cm² e analisadas 4h após a irradiação.

O citocromo c liberado para o citosol se liga com a dATP(deoxi-ATP), caspase-9 e Apaf-1 (*apoptosis-protease activating factor 1*) formando o complexo apoptossomo [66]. Uma vez ativa, a caspase-9 ativa a caspase-3 e leva a apoptose [66, 122]. Como a liberação de citocromo c foi observada, foi verificada a ativação da pro-capase-3 nas células Jurkat incubadas com BCD₁₈₀ por 2h nas concentrações de 1 e 5μ M e irradiadas com $40J/cm^2$ ou mantidas no escuro. A análise das amostras foi realizada 4, 8 e 12h após a irradiação. A Figura 8.22 mostra o aumento na ativação da caspase-3 para a concentração de 5μ M de BCD₁₈₀ em relação às células controle, tanto no escuro quanto nas irradiadas. A ativação da caspase-3 no escuro deve ser consequência da liberação do citocromo c observada na Figura 8.21. Já nas células irradiadas, foram encontradas ativações altas das caspase-3 em relação às células controle para as duas concentrações testadas. Esta detecção da ativação da caspase-3 reforça a idéia de que a morte celular por apoptose induzida pelo BCD₁₈₀ se realiza pela via mitocondrial ou intrínseca. Entretanto, não podemos excluir a existência também da via extrínseca.


Figura 8.22 – Detecção da ativação da caspase-3 em células Jurkat incubadas por 2h com BCD₁₈₀ nas concentrações de 1, 5 e 10μM, irradiadas com 40J/cm² e analisadas após 4, 8 e 12h da irradiação.

Da Figura 8.22, pode-se observar que para a concentração de 1µM não houve a ativação da caspase-3 nas células mantidas no escuro e houve um aumento da ativação da caspase-3 nas células irradiadas com 40J/cm² nos tempos de pós-irradiação estudados. Já para a concentração de 5µM, houve uma pequena ativação da caspase-3 no escuro e houve o aumento na ativação da caspase-3 quando irradiadas. Além disso, com o aumento do tempo pós-irradiação, houve uma diminuição na ativação da caspase-3. Os resultados da Figura 8.22 estão de acordo com os resultados obtidos anteriormente, em que para altas concentrações observa-se uma baixa toxicidade do BCD no escuro e quando irradiado aumenta-se a toxicidade. Então, para as concentrações baixas irradiadas, observa-se a morte celular por apoptose, demonstrada pelo aumento da ativação da caspase-3 nos tempos pós-irradiação. Já para as concentrações altas irradiadas houve diminuição da ativação da caspase-3 com o aumento do tempo pós-irradiação. Isto pode ser explicado com os resultados observados nos

experimentos de morfologia das células Jurkat, em que se observou a morte celular por apoptose para baixas concentrações e por necrose para altas concentrações.

Finalmente, foi analisado o efeito da proteína anti-apoptótica Bcl-2 super expressa na célula HL-60 (HL-60/Bcl-2) mantidas no escuro e irradiadas com 40J/cm² no %ECT do BCD₁₈₀. A expressão da proteína Bcl-2 conhecida como reguladora anti-apoptótica previne a liberação do citocromo c. Na Figura 8.23 observa-se um alto %ECT do BCD₁₈₀ contra a linhagem HL-60 irradiada na presença de 1 e 5 μ M de BCD₁₈₀. No escuro, foi observado um %ECT significativo somente para a concentração de 5 μ M de BCD₁₈₀. Para as células HL-60/Bcl-2 em comparação com HL-60 foi observada a diminuição significativa do %ECT nas células mantidas no escuro e para a concentração de 1 μ M de BCD₁₈₀ para as irradiadas. Este resultado está em concordância com a idéia de que a morte celular, induzida pelas baixas concentrações de BCD₁₈₀, se realiza pela via mitocondrial de apoptose, associada com a liberação do citocromo c. Já na morte celular induzida pelas altas concentrações, além da apoptose, também está presente a morte por necrose, como mostrado nos experimentos de morfologia das células Jurkat e ativação das caspase-3. Por isso, não houve uma diminuição no %ECT para a concentração de 5 μ M, como o observado para a concentração de 1 μ M.



Figura 8.23 – Fotocitotoxicidade do BCD₁₈₀ contra as linhagens HL-60 e HL-60/Bcl-2 com tempo de incubação de 2h, dose de irradiação de 40J/cm² e concentrações de 1 e 5µM de BCD₁₈₀.

Os resultados apresentados nesta seção mostram que o BCD_{180} induz morte nas células tanto por apoptose quanto por necrose e a contribuição relativa da necrose aumenta com o aumento da concentração do BCD_{180} e do tempo pós-irradiação. Foi mostrada a necrose pela liberação da LDH e pela morfologia das células Jurkat (para concentrações >10µM). A apoptose foi detectada pela morfologia das células Jurkat e comprovada pela liberação do citocromo c, ativação das caspases-3 e diminuição do %ECT na presença da proteína Bcl-2.

8.4 Desenvolvimento de uma formulação farmacológica para uso do BCD₁₈₀

8.4.1 Validação Analítica

Os resultados da validação analítica da espectroscopia de absorção ótica para BCD_{180} em tampão fosfato, que estão mostrados a seguir, encontraram-se todos dentro das normas do FDA e da ANVISA para validação de métodos analíticos, cujo objetivo é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos [86, 87].

A linearidade de um método analítico representa a capacidade de produzir resultados que são diretamente (ou através de transformação matemática bem definida) proporcionais à concentração da substância em análise das amostras, dentro de uma determinada faixa [88].

A dependência da absorbância ($\lambda = 632$ nm) do BCD₁₈₀ com a sua concentração na região das concentrações 0,77 – 5,36µM (curva de calibração), obtida em tampão fosfato em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1cm, é linear (Figura 8.7), mostrando que os efeitos não lineares, tais como a agregação do corante, nesta região de concentrações, são desprezíveis.



Figura 8.24 - *Curva de Calibração do BCD*₁₈₀ *em tampão fosfato pH 7,4 na faixa de concentração* de 0,77 – 5,36 μ M *em \lambda=632nm. Equação da reta: y=(1,83±0,05)10⁵*x e coeficiente de correlação linear de 0,9988.*

As tabelas 8.6 e 8.7 mostram os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intra e inter-dia, respectivamente.

Concentração Calculada (µM)	Concentração Obtida (µM)	Exatidão ^a	Precisão ^b
0,77	0,86±0,01	11,68	11,05
3,83	3,92±0,01	2,35	1,70
5,36	5,48±0,01	2,24	1,69

Tabela 8.6 - Análise da precisão e exatidão intra-dia para o BCD₁₈₀ em tampão fosfato pH 7,4 por espectroscopia de absorcão ótica em 632nm

Os desvios-padrões referem-se a 3 determinações.

^a expressa como erro relativo ($E\% = []_{obtida} - []_{calculada}/[]_{calculada} \times 100$).

^b expressa como coeficiente de variação (CV% = desv pad/ []_{média} × 100).

632nm.				
Concentração Calculada (µM)	Concentração Obtida (µM)	Exatidão ^a	Precisão ^b	
0,77	$0,86 \pm 0,006$	12,77	6,83	
3,83	$3,88 \pm 0,158$	3,45	2,07	
5,36	5.70 ± 0.283	6 33	0.89	

6,33

0.89

 5.70 ± 0.283

Tabela 8.7 - Análise da precisão e exatidão inter-dia para o BCD₁₈₀ por espectroscopia de absorcão ótica em

Os desvios-padrões referem-se a 3 determinações.

^a expressa como erro relativo ($E\% = []_{obtida} - []_{calculada} / []_{calculada} \times 100$).

^b expressa como coeficiente de variação (CV% = desv pad/ []_{média} × 100).

Como pode ser observado os CV% e os E% foram inferiores a 15%, tanto nos ensaios intra como nos ensaios inter-dia, estando de acordo com o recomendado pelo FDA, 2001.

Os resultados da determinação da concentração mínima quantificável do BCD₁₈₀ estão apresentados na tabela 8.8. Podem-se observar os valores de precisão e exatidão obtidos da análise de soluções contendo concentrações crescentes de BCD₁₈₀.

052/1/11.				
ConcentraçãoConcentraçãoCalculada (µM)Obtida (µM)		Exatidão ^a	Precisão ^b	
0,61	0,73	30,0	1,77	
0,77	0,84	9,1	3,54	
0,92	0,99	7,6	3,74	

Tabela 8.8 - Análise da precisão e exatidão intra-dia para o BCD180 por espectroscopia de absorção ótica em632nm.

Os desvios padrões referem-se a 3 determinações.

^a expressa como erro relativo ($E\% = []_{obtida} - []_{calculada}/ []_{calculada} \times 100$).

^b expressa como coeficiente de variação (CV% = desv pad/ []_{média} × 100).

Segundo a tabela 8.8, a concentração mínima quantificável do analito com precisão e exatidão dentro dos requisitos estabelecidos pelo FDA, que requer o E% e CV% menores que 15%, foi de 0,77µM, que ao ser colocada na curva de calibração proporcionou o coeficiente de correlação linear de 0,99, sendo, portanto, esta a concentração considerada como limite de quantificação do método.

No estudo de produtos com a absorção interferente foram analisadas as amostras de pele e de fita adesiva, que passaram pelo mesmo procedimento que foi utilizado nos experimentos de permeação cutânea. Pode-se observar que nenhum dos interferentes possui a absorção significativa na mesma região de absorção do BCD₁₈₀ mostrando que o método de absorção ótica é específico e seletivo para o estudo em questão (Figura 8.25).



Figura 8.25 - Espectros de absorção do BCD₁₈₀, fita adesiva e da pele (derme+epiderme).

8.4.1.1 Estudo de Recuperação do BCD₁₈₀ na pele

O estudo de recuperação do BCD_{180} que estava no estrato córneo e na epiderme+derme foi realizado a fim de verificar a percentagem de BCD_{180} que poderia ser recuperado da pele para poder determinar a quantidade de BCD_{180} que ficou retido na pele no experimento de permeação. O solvente extrator escolhido foi o etanol, pois experimentos prévios mostraram que o BCD_{180} se solubiliza muito bem neste solvente. Para determinar as concentrações, foi feita uma curva de calibração do BCD_{180} em etanol. A leitura das absorbâncias foi realizada em 638nm (comprimento de onda máximo do BCD_{180} em etanol). A Figura 8.26, mostra a Curva de Calibração do BCD_{180} em etanol que foi utilizada nesta seção.



Figura 8.26 - *Curva de calibração da concentração do BCD*₁₈₀ *em etanol. Equação da reta:* $y=(1,46\pm0,02)10^5 * x$ e coeficiente de correlação linear de 0,9988.

A tabela 8.9 mostra a percentagem de BCD_{180} recuperado da pele. Pela tabela 8.9 pode-se ver que praticamente 100% do BCD_{180} foi recuperado, mostrando que o etanol é adequado para avaliação da retenção de BCD_{180} na pele.

Epiderme viável					
[BCD] _{calculada} (µM)	$[BCD]_{obtida}$ (μM)	% recuperada	Exatidão ^a	Precisão ^b	
1,53	1,52±0,01	99,3	4,92	0,65	
4,59	4,78±0,07	100,1	10,56	4,14	
9,19	8,55±0,05	93,0	3,83	6,96	
Estrato córneo					
	Estrat	o córneo			
[BCD] _{calculada} (µM)	Estrat [BCD] _{obtida} (µM)	o córneo % recuperada	Exatidão ^a	Precisão ^b	
[BCD] _{calculada} (µM) 1,53	Estrat [BCD] _{obtida} (µM) 1,38±0,01	o córneo % recuperada 90,2	Exatidão^a 7,68	Precisão ^b 9,80	
[BCD] _{calculada} (µM) 1,53 4,59	Estrat [BCD] _{obtida} (μM) 1,38±0,01 4,20±0,05	o córneo % recuperada 90,2 91,5	Exatidão^a 7,68 8,27	Precisão^b 9,80 8,50	

Tabela 8.9 - Comparação da concentração nominal e da recuperada da epiderme viável e do estrato córneo.

Os desvios padrões referem-se a 3 determinações.

^a expressa como erro relativo ($E\% = []_{obtida} - []_{calculada} / []_{calculada} \times 100$).

^b expressa como coeficiente de variação (CV% = desv pad/ []_{média} × 100).

8.4.1.2 Determinação do coeficiente de solubilidade

A determinação da solubilidade do fármaco no sistema utilizado é importante do ponto de vista farmacotécnico, pois a solubilidade determina o limite de concentrações do fármaco que pode ser usado com este sistema [68].

Foi determinada a solubilidade do BCD_{180} em todas as formulações usadas para que nos experimentos de permeação fosse utilizada uma concentração de BCD_{180} saturada. Esta condição é obrigatória para padronizar as condições experimentais. Isto porque a concentração do compartimento doador deve ser muito maior que a concentração do compartimento receptor para garantir a difusão da amostra apenas numa direção. Os dados obtidos encontram-se na tabela 8.10:

	Concentração após	
Solvente e /ou formulação	$24 \ h \ (\mu M)^a$	
Tampão Fosfato	15,10	
Propilenoglicol	992,34	
Emulsão água/oleo	-	
Monoleína em	1014.06	
propilenoglicol	1914,90	

 Tabela 8.10
 - Coeficiente de solubilidade do BCD em diferentes solventes e formulações à 37 °C

^aConcentração determinada por espectroscopia de absorção ótica UV/Vis (632nm).

Para a emulsão água/óleo a solubilidade não foi determinada, pois a emulsão obtida era opaca, o que não permitiu a leitura da amostra obtida.

8.4.2 Estudo *in vitro* de permeação cutânea passiva e iontoforética do BCD₁₈₀ a partir das formulações farmacológicas desenvolvidas

Nos estudos de permeação do BCD_{180} na pele a partir de soluções supersaturadas em diferentes formulações farmacológicas foi determinada a quantidade do BCD_{180} na solução receptora após 24h da sua colocação na solução doadora na permeação passiva [88] e 6h de experimento no caso da iontoforese. Os resultados são demonstrados na Figura 8.27.



Figura 8.27 – *Quantidade de BCD*₁₈₀ permeada para a solução receptora para cada uma das formulações testadas.

Observamos que a emulsão água/óleo, a emulsão monoleína+propilenoglicol e o próprio propilenoglicol favoreceram a penetração do BCD₁₈₀ para as camadas mais profundas da pele.

Na tabela 8.11 estão os parâmetros analíticos obtidos do estudo de retenção do BCD₁₈₀.

Formulação	BCD ₁₈₀ retido (µM/cm ²)*		
Formulação	Estrato córneo	Epiderme viável	
Tampão Fosfato	$1,90 \pm 0,17$	$0,22 \pm 0,05$	
Emulsão água/óleo	2,13 ±0,21	$0,63 \pm 0,08$	
Propilenoglicol	2,30 ±0,18	$1,74 \pm 0,19$	
MO/propilenoglicol	$1,25 \pm 0,11$	$2,91 \pm 0,29$	
Iontoforese (tampão fosfato)	$1,46 \pm 0,20$	$0,60 \pm 0,09$	

Tabela 8.11 – *Quantidade de BCD*₁₈₀ retida no estrato córneo e epiderme viável para cada uma das formulações testadas.

*Os valores dos desvios-padrões referem-se a 6 determinações.

Podemos também observar grande quantidade de fármaco retido na pele (epiderme viável e estrato córneo), principalmente para a formulação com monoleína e propilenoglicol.

Isso significa que o fármaco forma um sistema de depósito da pele. Este efeito é positivo para o caso em que o fármaco possui a atividade contínua, pois permitirá a sua liberação gradual para as camadas mais profundas da pele, para promover o tratamento. No caso da TFD, quando o FS se torna ativo somente sob a irradiação luminosa, o ideal é que o FS se acumule apenas na região de tratamento. Isto aumenta o tempo de espera entre a aplicação e a irradiação. Verifica-se que a formulação de monoleína e propilenoglicol aumenta mais do que duas vezes a permeação do fármaco em relação o controle (BCD em solução tampão).

Baseando-se neste fato realizamos o estudo do efeito da formulação monoleína+propilenoglicol na fotocitotoxicidade do BCD_{180} em cultura de células B16F10, a fim de verificar se a formulação não só aumenta a permeação do fármaco através da pele, como também aumenta a permeabilidade da membrana celular das células tumorais.

8.4.3 Teste da emulsão de 10% de monoleína em propilenoglicol em cultura de células tumorais B16F10

Nestes experimentos usamos faixa de concentrações do BCD_{180} de 1 até 20µM, a mesma que foi usada nos experimentos anteriores (seção 8.2). Para obter essas concentrações, preparamos as soluções do estoque de alta concentração do BCD_{180} na emulsão monoleína+propilenoglicol, e diluímos esta solução em meio de cultura RPMI-S de tal forma que a percentagem de emulsão nos poços de cultura fosse inferior a 2,5%, como mostra a tabela 8.12 abaixo:

C (µM)	% de emulsão no estoque	% de emulsão no poço
1	2,4	0,11
2	4,8	0,23
5	12	0,57
10	24	1,14
15	36	1,71
20	48	2,29

 Tabela 8.12 – Percentagem de emulsão contida nos poços de cultura para a concentração estudada.

A amostra ficou incubando por duas horas no escuro e depois foi irradiada com a dose de irradiação 40J/cm². Depois da irradiação, a placa foi guardada na estufa por 24h e então a toxicidade foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados de fotocitotoxicidade estão na figura abaixo.



Figura 8.28 – Efeito citotóxico das diferentes concentrações de BCD₁₈₀ sobre cultura de células de melanoma B16F10 com tempo de incubação de 2h A) no escuro (sem irradiação) para a emulsão de monoleína+propilenoglicol, B) irradiado com 40J/cm² para a emulsão de monoleína+propilenoglicol e C) irradiado com 40J/cm² em etanol.

Observamos (Figura 8.28, curva A) que a presença da emulsão monoleína+propilenoglicol não aumenta significantemente a citotoxicidade do BCD_{180} no escuro (não ultrapassa 20%).

A comparação do %ECT na presença do etanol e da emulsão (Figura 8.28, curvas B e C) mostrou que a emulsão não produz o efeito significativo na %ECT, demonstrando que a emulsão, mesmo aumentando a permeação cutânea, não afeta à permeabilidade da membrana celular. Entretanto, este resultado pode ser importante, pois mostra que o etanol, que não é uma formulação adequada para ser ministrada topicamente, pois provoca desidratação da pele e danos no estrato córneo, pode ser substituído por esta emulsão, que não provoca danos na pele.

Com base nos estudos realizados de permeação cutânea pode-se concluir que a formulação monoleína em propilenoglicol promove a permeação e a retenção cutânea de aproximadamente $5\mu M$ de fármaco em todas as camadas da pele, garantindo então que concentrações suficientes do fármaco atinjam as células tumorais cutâneas para realização do tratamento.

8.4.4 Teste de agregação do BCD₁₈₀ em propilenoglicol e na emulsão de monoleína em propilenoglicol

Como foi dito nas seções anteriores, a agregação do FS em solução não é desejável, pois diminui a eficiência do tratamento. Por esta razão, as emulsões de propilenoglicol e de monoleína em propilenoglicol foram testadas nas concentrações de BCD₁₈₀ obtidas depois do teste de solubilidade. A Figura 8.29 mostra o espectro de absorção do BCD₁₈₀ nessas amostras.



Figura 8.29 – *Espectro de absorção do BCD*₁₈₀ nas emulsões:etanol, propilenoglicol e monoleína em propilenoglicol.

Podemos ver que, em concordância com as decisões da seção 8.1, a agregação nestas

amostras não é observada, pois a razão $\eta = \frac{I_{S_{00} \to S_{10}}}{I_{S_{00} \to S_{11}}}$ ficou próxima de 3 (tabela 8.13).

Emulsão	$\lambda_{max} \left(nm \right)$	Abs _{pico1}	Abs _{pico2}	Razão
Propilenoglicol	641	1,00	0,31	3,2
Etanol	638	1,00	0,31	3,2
Monoleína em Propilenoglicol	642	1,00	0,33	3,0

Tabela 8.13 – Comprimento de onda máximo (λ_{max}), absorbância dos dois principais picos dos espectros e razão entre os picos para as emulsões propilenoglicol, monoleína em propilenoglicol e etanol.



Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

1. Sobre a citotoxicidade dos BCD_{α}

- BCD_α no escuro possuem efeito citotóxico (%ECT) contra as células neoplásicas que não ultrapassa 20%.
- Sob irradiação luminosa, na região λ > 600nm, nas mesmas condições experimentais, o BCD₁₈₀ possui %ECT comparável ou maior do que Photogem®, fotossensibilizador já aplicado na clínica em TFD.
- Os BCD₉₀ e BCD₁₅₀ possuem %ECT maior do que o BCD₁₈₀.
- Baseando-se nesses resultados, pode-se considerar os corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD_α) como fotossensibilizadores promissores para aplicação em TFD do câncer.

2. Sobre os mecanismos da morte celular induzida pela BCD_{α}

- O BCD₁₈₀ penetra na interior das células localizando-se preferencialmente na região de mitocôndrias.
- A apoptose é responsável pela morte das células, induzida pelo BCD₁₈₀ no escuro.
- Sob a irradiação luminosa, ambos os mecanismos, necrose e apoptose, contribuem na morte celular induzida pelo BCD₁₈₀.
- A contribuição da necrose aumenta quando aumentam a concentração do BCD₁₈₀ e o tempo de pós-irradiação.
- O BCD₁₈₀ induz morte celular por apoptose principalmente pela via intrínseca.

3. Sobre a permeação cutânea do BCD₁₈₀

Nos experimentos de permeação cutânea foi mostrado que, entre todas as formulações testadas, a mistura de 10% de monoleína em propilenoglicol possui melhores características para permeação do BCD₁₈₀ em todas as camadas da pele, garantindo que concentrações suficientes do fármaco atinjam as células tumorais cutâneas para realização do tratamento.

Planos futuros.

- Estudar mais detalhadamente o efeito do ângulo entre os cromóforos na citotoxicidade dos BCD_{α} , na distribuição intracelular e nos mecanismos da morte celular induzida por eles.
- Avaliar a fotoatividade dos BCD_{α} *in vivo*, usando animais experimentais.

10 REFERÊNCIAS

- 1. <u>http://www.inca.gov.br</u>. acessado em 06 de abril de 2009.
- 2. Franks, L.M.a.T., Natalie; , *Introducao a biologia celular e molecular do cancer* Vol. v1. 1990, São Paulo ed. Roca. D/422.
- 3. Câncer., B.M.d.S.S.d.A.à.S.I.N.d.C.C.d.P.e.V.d., *Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA*, 2007. 2008.
- 4. Rubin, P., *Manual de clinica oncologica : aspectos multidisciplinares* 4^a Edição ed. 1977, São Paulo: Ed. Sarvier.
- 5. Bagnato, V.S., et al., *TFD experience in Brazil: A regional profile*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2005. **2**: p. 107—118.
- 6. Gandhi, O.P., *Biological effects and medical applications of eletromagnetic energy* 1991, New York: Prentice Hall.
- 7. Castano, A.P., P. Mroz, and M.R. Hamblin, *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 535-45.
- 8. Detty, M.R., S.L. Gibson, and S.J. Wagner, *Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(16): p. 3897-3915.
- 9. Nyman, E.S. and P.H. Hynninen, *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2004. **73**(1-2): p. 1-28.
- 10. Kuzmin, V.A., et al., *Effect of Cleavage of Biscyanine Dye Triplet Levels*. Doklady Akademii Nauk Sssr, 1976. **229**(1): p. 131-134.
- 11. Schaberle, F.A., V.A. Kuz'min, and I.E. Borissevitch, *Spectroscopic studies of the interaction of bichrornophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength.* Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2003. **1621**(2): p. 183-191.
- 12. Aggarwal, L.P.F., Interação das porfirinas aquo-solúveis TPPS4 e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos do pH e da força iônica., in tese apresentada ao programa de Pós graduação do Departamento de Física e Matemática da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. 2005, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p. 158.
- 13. Bonnett, R., *Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy*. Chemical Society Reviews, 1995. **24**(1): p. 19-33.
- 14. Brown, S.B., E.A. Brown, and I. Walker, *The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment*. Lancet Oncol, 2004. **5**(8): p. 497-508.

- 15. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation Therapy Clinical and Drug Advances*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1983. **160**: p. 3-13.
- 16. Hsi, R.A., D.I. Rosenthal, and E. Glatstein, *Photodynamic therapy in the treatment of cancer Current state of the art.* Drugs, 1999. **57**(5): p. 725-734.
- Ochsner, M., Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1997. 39(1): p. 1-18.
- Schuitmaker, J.J., et al., *Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1996. 34(1): p. 3-12.
- 19. Sharman, W.M., C.M. Allen, and J.E. van Lier, *Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications*. Drug Discovery Today, 1999. **4**(11): p. 507-517.
- 20. Foote, C.S., *Definition of Type-I and Type-Ii Photosensitized Oxidation*. Photochemistry and Photobiology, 1991. **54**(5): p. 659-659.
- 21. Lam, M., N.L. Oleinick, and A.L. Nieminen, *Photodynamic therapy-induced* apoptosis in epidermoid carcinoma cells Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(50): p. 47379-47386.
- 22. Byrne, C.J., et al., *The photodynamic therapy (TFD) anticancer activity of a range of porphyrin dimers and related compounds derived from hematoporphyrin.* Australian Journal of Chemistry, 2004. **57**(11): p. 1091-1102.
- 23. Trivedi, N.S., et al., *Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma* (*LY-R*) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. Photochemistry and Photobiology, 2000. **71**(5): p. 634-639.
- 24. Simplicio, F.I.M., F. e Hioka, N., *TERAPIA FOTODINÂMICA: ASPECTOS FARMACOLÓGICOS, APLICAÇÕES E AVANÇOS RECENTES NO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.* Química Nova, 2001. **25**(5): p. 801-807.
- 25. Morton, C.A., et al., *Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group.* British Journal of Dermatology, 2002. **146**(4): p. 552-567.
- 26. Grossweiner, L.I., *TFD light dosimetry revisited*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1997. **38**(2-3): p. 258-268.
- 27. De Rosa, F.S.L., R.F.; Thomazine, J.A.; Tedesco, A.C.; Lange, N.; Bentley, M.V., *In vitro metabolism of 5-ALA esters derivatives mice skin homogenate and in vivo PpIX accumulation studies.* Pharm Res, 2004. **21**(12): p. 2247-2252.

- 28. Colussi, V.C., E.M. Nicola, and J.H. Nicola, [Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers]. Rev Assoc Med Bras, 1996. **42**(4): p. 229-36.
- 29. Kennedy, J.C. and R.H. Pottier, *Endogenous Protoporphyrin-Ix, a Clinically Useful Photosensitizer for Photodynamic Therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1992. **14**(4): p. 275-292.
- 30. Reddi, E., *Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours.* J Photochem Photobiol B, 1997. **37**(3): p. 189-95.
- 31. Awan, M.A. and S.A. Tarin, *Review of photodynamic therapy*. Surgeon, 2006. **4**(4): p. 231-6.
- 32. Blume, J.E. and A.R. Oseroff, *Aminolevulinic acid photodynamic therapy for skin cancers*. Dermatol Clin, 2007. **25**(1): p. 5-14.
- 33. Cunderlikova, B., L. Gangeskar, and J. Moan, *Acid-base properties of chlorin e(6): relation to cellular uptake.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1999. **53**(1-3): p. 81-90.
- 34. Hammer-Wilson, M.J., et al., *Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1999. **53**(1-3): p. 44-52.
- 35. Zheng, G., et al., *Photosensitizers related to purpurin-18-N-alkylimides: a comparative in vivo tumoricidal ability of ester versus amide functionalities.* Bioorg Med Chem Lett, 2000. **10**(2): p. 123-7.
- 36. Borissevitch, Y.E., *Influence of resonance interaction on absorption spectra of dyes with two chromophores.* Doklady Physics and Chemistry, 1978. **241**: p. 743-746.
- 37. Borissevitch, I.E., et al., *Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation.* Journal of Luminescence, 1996. **69**(2): p. 65-76.
- 38. Bottari, G. and T. Torres, *Synthesis and characterization of a benzene-centered, phthalocyanine hexamer.* Chemical Communications, 2004(23): p. 2668-2669.
- 39. Diwu, Z.J. and J.W. Lown, *Phototherapeutic Potential of Alternative Photosensitizers* to Porphyrins. Pharmacology & Therapeutics, 1994. **63**(1): p. 1-35.
- 40. Delaey, E., et al., *A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2000. **55**(1): p. 27-36.

- 41. Shalhoub, G.M., Visible spectra of conjugated dyes: Integrating quantum chemical concepts with experimental data. Journal of Chemical Education, 1997. **74**(11): p. 1317-1319.
- 42. Armitage, B.A., *Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation.* DNA Binders and Related Subjects, 2005. **253**: p. 55-76.
- 43. Ogul'chansky, T., et al., *Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XVII. Towards an aggregation of cyanine dyes in solutions as a factor facilitating nucleic acid detection.* Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2000. **56**(4): p. 805-14.
- 44. Gonikberg, E.M. and N.V. Kuznetsova, *Photoinactivation of bacteriophage PM2 by cyanine dyes*. Biofizika, 2001. **46**(3): p. 486-493.
- 45. Cooper, G.M., *The cell- A molecular approach*. 2000. p. 2-32.
- 46. Ryan, J.A., Introduction to animal cell culture. 2003, Corning Incorporated.
- 47. Peres, C.M.C., R., *Como cultivar células*. 2005, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 48. Freshney, R.I., *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4th edition ed. 2000, New York: Wiley.
- 49. Pizzoferrato, A., et al., *Cell culture methods for testing biocompatibility*. Clin Mater, 1994. **15**(3): p. 173-90.
- 50. Debergh, P.C.R., P.E., *Micropropagantion: Technology and Application*, ed. P.C. Debergh, Zimmerman, R. H. 1991: Kluwer Acad. Publishers.
- 51. <u>www.atcc.org</u>.
- 52. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy*. Journal of the National Cancer Institute, 1998. **90**(12): p. 889-905.
- 53. Rotomskis, R., V. Vaicaitis, and A. Piskarskas, *Time-Resolved Absorption-Spectroscopy of Hematoporphyrin and Its Photoproducts*. Chemical Physics Letters, 1993. **202**(3-4): p. 233-236.
- 54. Emiliani, C. and M. Delmelle, *The Lipid Solubility of Porphyrins Modulates Their Photo-Toxicity in Membrane Models.* Photochemistry and Photobiology, 1983. **37**(5): p. 487-490.
- 55. Ricchelli, F., *Photophysical Properties of Porphyrins in Biological-Membranes*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1995. **29**(2-3): p. 109-118.

- 56. Yu, S.P. and D.W. Choi, *Ions, cell volume, and apoptosis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(17): p. 9360-9362.
- 57. Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis. Nature, 2000. 407(6805): p. 770-6.
- 58. Okada, H. and T.W. Mak, *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 592-603.
- 59. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 505-12.
- 60. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
- 61. Ziegler, U. and P. Groscurth, *Morphological features of cell death*. News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 124-8.
- 62. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006. **20**(1): p. 1-15.
- 63. <u>http://www.metrocamp.edu.br/pesquisa/artigo.php?artigo=2</u>. acessado dia 02/04/09.
- 64. Saraste, A. and K. Pulkki, *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(3): p. 528-37.
- 65. <u>www.bioagency.com.br</u>, Apoptose e Inflamação.
- 66. Grivicich, I.R., A.; da Rocha, A.B., *Morte Celular por Apoptose*. Revista Brasileira de Cancerologia, 2007. **53**(3): p. 335-343.
- 67. <u>http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/mitochondria-in-apoptosis.html</u>, acessado em 2 de Julho 2009.
- 68. Aulton, M.E., *Delineamento de formas farmacêuticas*. segunda edição ed. Vol. 1. 2005, Porto Alegre: Ed. Artmed.
- 69. Bouwstra, J.A. and P.L. Honeywell-Nguyen, *Skin structure and mode of action of vesicles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**: p. S41-S55.
- 70. <u>http://www.scf-online.com/english/27_e/frontpage27_e.htm</u>. acessado 13/04/09.
- 71. Welss, T., D.A. Basketter, and K.R. Schroder, *In vitro skin irritation: facts and future*. *State of the art review of mechanisms and models*. Toxicology in Vitro, 2004. **18**(3): p. 231-243.

- 72. Hadgraft, J., *Skin, the final frontier*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **224**(1-2): p. 1-18.
- 73. Van den Bergh, B.A., et al., Development of an optimal protocol for the ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. J Microsc, 1997. **187**(Pt 2): p. 125-33.
- 74. Chin, C.M., O PROCESSO DE LATENCIAÇÃO NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS. QUÍMICA NOVA, 1999. **22**(1): p. 75-84.
- 75. Abraham, M.H., H.S. Chadha, and R.C. Mitchell, *The Factors That Influence Skin Penetration of Solutes*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1995. **47**(1): p. 8-16.
- 76. LIEBERMAN, H.L., L.; KANIG, J., *TEORIA E PRÁTICA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA*. Vol. 1. 2001, Lisboa: PharmaBooks.
- 77. Moser, K., et al., *Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro*. Eur J Pharm Biopharm, 2001. **52**(2): p. 103-12.
- 78. Campos, L.M.P., Microemulsões como sistemas de liberação tópica para a veiculação do 5-ALA, H-ALA e do O-ALA para uso na terapia fotodinâmica do câncer de pele: obtenção, caracterização e estudos in vitro e in vivo de permeação cutânea., in Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2006, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p. 194.
- 79. Human, M.D., A.T., *Basic UV/Visible Spectrophotometry*. second edition ed. Vol. 1. 1997, England: Pharmacia Biotech Limited. 35.
- 80. Doležel, J., *Applications of flow cytometry for the study of plant genomes*. Journal of Applied Genetics, 1997. **38**(3): p. 285-302.
- 81. Côrte-Real, M., et al., *Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras*. Boletim de Biotecnologia 2002. **71**: p. 19-33.
- 82. Li, C.H., et al., *Chloramphenicol-induced mitochondrial stress increases p21* expression and prevents cell apoptosis through a p21-dependent pathway. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26193-9.
- 83. Tonomura, N., et al., *Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity.* J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2469-78.
- 84. Shah, V.P., Analytical Methods used in Bioavailability Studies: A regulators viewpoint. Vol. 5. 1987: Clin. Res. Prac. Drug Reg. Affairs.

- 85. Buick, A.R., et al., *Method Validation in the Bioanalytical Laboratory*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1990. **8**(8-12): p. 629-637.
- 86. <u>http://www.anvisa.gov.br/</u>.
- 87. <u>http://www.fda.gov/</u>.
- 88. Causon, R., Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. Journal of Chromatography B, 1997. **689**(1): p. 175-180.
- 89. 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, 2004. **75**(1-2): p. 27-32.
- 90. <u>http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay</u>. acessado dia 14/05/09.
- 91. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
- 92. Roberto, P.G., et al., *Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from Bothrops jararacussu venom.* Protein J, 2004. **23**(4): p. 273-85.
- 93. Moore A, et al., *Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death.* . Second ed. Vol. 57. 1998. 265-78.
- 94. Givan, A.L., Flow Cytometry: First Principles. Second ed. 2001: Wiley-Liss, Inc.
- 95. Zaia, D.A.M., C.T.B.V. Zaia, and J. Lichtig, *Determination of total protein by spectrophotometry: Advantages and disadvantages of proposed methods*. Quimica Nova, 1998. **21**(6): p. 787-793.
- 96. Bradford, M.M., *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
- 97. Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-&.
- 98. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets Procedure and Some Applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.

- 99. Andrews, N.C. and D.V. Faller, A Rapid Micropreparation Technique for Extraction of DNA-Binding Proteins from Limiting Numbers of Mammalian-Cells. Nucleic Acids Research, 1991. **19**(9): p. 2499-2499.
- 100. Tonomura, N., et al., *Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: Requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity*. Journal of Immunology, 2003. 170(5): p. 2469-2478.
- 101. Lopez, R.F.V., *Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de pele*, in *tese de doutorado. FCFRP_USP*. 2000, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p. 108.
- 102. Lopez, R.F., et al., *Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis*. Journal of Controlled Release, 2003. **88**(1): p. 65-70.
- 103. Lopez, R.F.V., et al., *Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis in vitro*. Photochemistry and Photobiology, 2003. **77**(3): p. 304-308.
- 104. Merclin, N., et al., *Transdermal delivery from a lipid sponge phase-iontophoretic and passive transport in vitro of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester*. Journal of Controlled Release, 2004. **100**(2): p. 191-198.
- 105. Merclin, N., T. Bramer, and K. Edsman, *Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle*. Journal of Controlled Release, 2004. **98**(1): p. 57-65.
- 106. Glikfeld, P., et al., A new system for in vitro studies of iontophoresis. Pharm Res, 1988. **5**(7): p. 443-6.
- 107. Williams, A.C. and B.W. Barry, *Penetration enhancers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(5): p. 603-618.
- 108. Murakami, L.S., *Efeitos dos solventes nas características espectroscópicas dos corantes cianicos com dois cromóforos.* 2004, Trabalhao de Iniciação Científica USP_FFCLRP_USP.
- 109. Borissevitch, I.E., Fotónica de moléculas de corantes carbociânicos com dois cromóforos, in Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Física Química. 1980, Academia de Ciências da Rússia: Moscou.
- 110. Botelho, M.H.M., Estudo através de espectroscopia da absorção ótica, da interação dos corantes ciânicos com dois cromóforos com sistemas biomiméticos. Efeitos da força iônica., in Trabalhao de Iniciação Científica USP_FFCLRP_USP. 2002, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p. 38.
- 111. Borissevitch, I.E., T.T. Tominaga, and C.C. Schmitt, *Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon*

the porphyrin triplet state characteristics. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 1998. **114**(3): p. 201-207.

- 112. Borissevitch, I.E. and S.C.M. Gandini, *Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1998. **43**(2): p. 112-120.
- 113. Hilf, R., *Mitochondria are targets of photodynamic therapy*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**: p. 85–89.
- 114. Garrido, C., et al., *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*. Cell Death and Differentiation, 2006. **13**(9): p. 1423-1433.
- 115. Gogvadze, V. and S. Orrenius, *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death*. Chemico-Biological Interactions, 2006. **163**(1-2): p. 4-14.
- 116. Gogvadze, V., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Multiple pathways of cytochrome c* release from mitochondria in apoptosis. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2006. **1757**(5-6): p. 639-647.
- 117. Martin, D.A. and K.B. Elkon, *Mechanisms of apoptosis*. Rheumatic Disease Clinics of North America, 2004. **30**(3): p. 441-+.
- 118. Han SI, Kim YS, and K. TH., *Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions*. BMB Rep., 2008. **31**(41(1)): p. 1-10.
- Movassagh M and F. S., *Simplified apoptotic cascades*. Heart Fail Rev., 2008. 13(2): p. 111-9.
- 120. Scatena R, et al., *The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic.* Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(1): p. C12-21.
- 121. N.L. Oleinick and R.L. Morris, *The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how I. Belichenko,*. Photochem. Photobiol. Sci., 2002.
 1: p. 1-21.
- 122. Hallstrom, A.P., et al., *Public-access defibrillation and survival after out-of-hospital cardiac arrest*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(7): p. 637-646.

ANEXO A

Applied Spectroscopy Reviews, 44: 438–455, 2009 Copyright © Taylor & Francis Group, LLC ISSN: 0570-4928 print / 1520-569X online DOI: 10.1080/05704920903042098



Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Skin Cancer Cells and Tissues

Leila Büttner Mostaço-Guidolin,¹ Luciana Sayuri Murakami,¹ Auro Nomizo,² and Luciano Bachmann¹

 ¹Departamento de Física e Matemática, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
 ²Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract: The aim of this review is to combine all the information related to the characterization of skin tissues and cells, focusing on the identification of the specific biochemical characteristics of skin cancer. We have characterized two types of melanoma by FTIR spectroscopy: a murine melanoma (B16F10 cell line) and a human melanoma (C8161 cell line). The cells were deposited on IR transparent CaF₂ windows, the spectral range used lay between 900-4000 cm⁻¹, transmission mode with 2 cm⁻¹ resolution, and 32 scans. A biochemical association is presented for all the absorption bands identified in this study. Besides the characterization of both cell lines above, a collection of works done in the area of skin cancer was also carried out, in this review; some interesting results obtained by different authors with respect to the characterization of different samples (melanomas, follicle sheath, basal cell carcinoma, epidermis tissues, dermis tissue, and human stratum corneum) are presented and compared to the chemical and biological associations performed in each case. The identification of biochemical injuries provides important information that, associated with clinical examination, can assist the diagnosis of diseases. Several FTIR techniques can be used in the diagnosis of biochemical changes in biological tissues, by identifying molecular markers associated with malignant and benign changes or variations in the composition of amino acids in tissues and cells. In the near future, a further study to compare histopatological analysis and biochemical characterization by FTIR spectroscopy would be interesting, in order

Address correspondence to Luciano Bachmann, FFCLRP/USP DFM, Av Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, Brazil 14040-901. E-mail: bachmann@fflcrp.usp.br

FTIR Spectroscopy of Skin Cancer

to verify the accuracy and validate the applicability of this technique in the diagnosis of skin lesions from a statistical viewpoint.

Keywords: Melanoma, carcinoma, microspectroscopy, ATR, FTIR

INTRODUCTION

Skin cancer is the commonest cancer among those affecting the human body. In fact, it corresponds to 18% of all cancers (1). The vast majority of skin cancers are composed of basocell carcinoma and spinocell carcinoma; however, the most dangerous type is the melanoma (2). Melanomas are pigmented lesions in the skin that usually appear in areas exposed to sun radiation.

Currently, the detection of skin lesions (including skin cancer) is mainly accomplished through clinical examination. There are also some diagnosis techniques, such as digital dermoscopy and biopsy (3, 4). Digital dermoscopy is an optical instrument with a magnifying lens attached to a light, which allows for analysis of the deeper layers of the skin. The main benefit of dermoscopy is the initial diagnosis of melanoma, which may not be noticed in the clinical examination because in some cases, such as melanoma *in situ* (limited to the most superficial skin layer), it presents a regular and homogeneous color. (3, 5, 6).

Both clinical examination and digital dermoscopy are not able to provide accurate information regarding the disease malignancy (3), so the use of biopsy is common, so that more reliable histopatological information can be obtained and, thus, treatment to be employed in each case can be defined.

Biopsy consists in two basic approaches: excision, which is the withdrawal of the entire suspicious lesion; and incisional biopsy, in which only part of the suspicion region is withdrawal, this last approach is usually performed in places with difficult access or in elder patients (4).

These methods may aid the early diagnosis of melanoma, but biopsies are surgical procedures that entails a lot of stress and discomfort to patients.

FTIR spectroscopy as well as other optical techniques can promptly provide useful biochemical information about some lesions or tissue disorders. The rapid response coupled with the specificity of the biochemical information, obtained by vibrational spectroscopy (Raman and FTIR spectroscopy) indicate that these techniques are promising tools in the diagnosis *in vivo* (7–9).

Nevertheless, FTIR spectroscopy presents a disadvantage with respect to the Raman spectroscopy: the tissue penetration of the infrared radiation is not high enough. Thus, biochemical analysis is restricted only to a few tens of microns (7, 8); and this penetration is lower when the ATR probe is applied (7).

On the other hand, Raman spectroscopy does not present this limitation, since the signal/noise ratio, is more delimitated for this technique. Examination of low intensity bands, such as those located in the fingerprint region, which are generally linked to important biological structures of the samples and disorders, reveal changes in band shape that are more difficult to detect through Raman spectroscopy (8).

Epidemiological studies have suggested that exposure to ultraviolet radiation (UVA and UVB) is one of the major contributors to the development of melanoma (10). UV radiation causes damage to the cell DNA, typically thymine dimerization, which creates mutations in the cell's genes. Unless these mutations are repaired when the cell divides, they are propagated to new generations. If the mutations occur in oncogenes or tumor suppressor genes, the mitosis rate in the mutation-bearing cells can become uncontrolled, leading to the formation of a tumor (10).

The most common symptom of tumor is the change in the characteristics of the nevus. Several studies seeking a way to diagnose and effectively combat these injuries have been conducted worldwide on seeking a way to diagnose and effectively combat these injuries (9, 11, 12).

Vibrational spectroscopy has attracted a lot of attention in medicine because it can serve as an auxiliary method in the diagnosis of certain diseases, because it is a noninvasive technique. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is a vibrational technique that gives information about the chemical composition of a given sample (13–20). This technique has several advantages, such as sensitivity, velocity, and no requirement for staining or reagents. It is able to detect changes in the chemical composition of intact cells, which is usefull to spot in cell populations; e.g., to tell the difference between normal and tumoral cells (15, 16).

The absorption spectrum in the infrared spectral range provides information regarding the identification of the covalent bonds of a molecule; however, additional information about molecular conformation and intermolecular interactions can be extracted from the spectrum.

Several papers on the diagnostic importance of different spectroscopic techniques in the area of cancer detection. However, the majority of these works differentiates and characterizes cells and tissues looking at a group of bands and not looking at each band individually. In this work, we have characterized cells of the murine melanoma (B16F10) and the human melanoma (C8161) by infrared spectroscopy in detail, looking for spectroscopic changes assigned to biochemical markers that help differentiate between cell lines of the same group (skin).

By observing changes in each absorption band and comparing results with those from some works available in the literature, we have designed this review, which will be a useful and detailed database for studies related to skin diseases.

FTIR SPECTROSCOPY OF THE SKIN

Countless FTIR spectroscopy studies have been performed in order to find differences between healthy tissue and certain types of cancer. Several diseases

FTIR Spectroscopy of Skin Cancer

have already been addressed, but in most cases a detailed analysis of the significance of each absorption band has not been carried out. This part of the present review presents a brief summary of experimental procedures that have been applied by different authors in research related to skin and skin cancers. These studies were conducted by different techniques such as optical fibers, FTIR microspectroscopy, ATR (Attenuated Total Reflectance), and regular infrared spectrometers. Each type of instrumentation provides different and complementary results, because the use of each technique enables data acquisition to be accomplished in a different way thus, allowing for different approaches to the studied disease.

Differences between diverse skin components have been studied by various authors using FTIR. Epidermis, tumor (basal cell carcinoma), dermis, and follicle sheaths were studied by McIntosh et al. (12). Dermal spectra were significantly different from the other skin components mainly due to absorptions from collagen in dermis. The spectra of normal epidermis and basal cell carcinoma were significantly different due to protein structure and nucleic acid content. A series of absorption bands assigned to collagen (1035, 1080, 1240, 1280, and 1330 cm⁻¹) were observed in the spectra of dermis, but not in the spectra of basal cell carcinoma (BCC). Absorption bands at 1080 cm⁻¹ and 1240 cm⁻¹ (phosphate groups of nucleic acids) were most intense in the BCC spectra; also, the absorption band at 980 cm⁻¹ (ribose group of nucleic acids) was increased in BCC tumor spectra.

The distinction between BCC and epidermis was based upon more subtle spectroscopic differences, which revealed a larger nucleic acid content in BCC cells. The authors suggested that the classification of basal cell carcinomas subtypes is more difficult, but still holds promise.

In vivo investigations using the ATR technique to detect differences in the molecular components of the human stratum corneum were conducted by Brancaleon et al. (17) and Barry et al. (21). These authors observed that biophysical parameters of the stratum corneum (such as hydration, lipid composition, and conformation of the aliphatic chains) are indeed dependent on the anatomic site. Because in ATR experiments the penetration depth of the evanescent field into the stratum corneum is comparable with the thickness of a layer of corneccytes, this technique can be used to follow the distribution of lipids, water, and proteins as a function of the depth into the tissue.

Another in vivo study was conducted by Sukuta and Bruch (22) using Fourier transform infrared fiber optic evanescent wave (FTIR-FEW) spectra in the middle infrared (MIR) region to isolate pure biochemical compounds. Their spectra were recorded and then used to classify skin cancer tumors by chemical factor analysis. The chemical factor is a new tool for differentiation proposed by Sukuta and Bruch (22); in this case, melanoma, basaloma, and normal tissue. The spectra of biochemical species were isolated and, most importantly, this study demonstrated that the combination of the FTIR-FEW technique with chemical factor analysis has potential application as a clinical diagnostic tool. In this way, concerning the differentiation and detection of malignancy at early stages, Mordechai et al. (23) focused their studies on cancer prevention and management. They conducted studies with formalin-fixed biopsies of melanoma and cervical cancer by FTIR microspectroscopy (FTIR-MSP) to detect common biomarkers (24). Such biomarkers occurred in both types of cancer, distinguishing them from the respective nonmalignant tissues. The spectra were analyzed for changes in levels of biomolecules such as RNA, DNA, phosphates, and carbohydrate (glycogen). Whereas carbohydrate levels showed a good diagnostic potential for detection of cervical cancer, this was not the case for melanoma.

The epidermis absorbance intensity was slightly higher compared with the nevus in some regions (800–1200 cm⁻¹), and lower in the other regions (1200–1600 cm⁻¹); an increase in the absorbance in the anti-symmetric phosphate region (1185–1300 cm⁻¹) was observed when compared with non-malignant tissue. Therefore, RNA/DNA ratios based on the intensity of the 1121/1020 cm⁻¹ absorption bands were calculated. The RNA/DNA was higher in malignant areas than in the normal tissue, possibly indicating higher transcription during carcinogenesis.

Besides the diversification of systems employed to acquire infrared spectra, many statistical tools are currently being developed by working with infrared microspectroscopy to examine the differences in the IR spectra of melanoma tissues and the surrounding epidermis in skin biopsies. Hammody et al. (25) developed suitable computational/statistical methods of analysis, identifying diagnostic parameters related to melanoma and epidermis as a model system to classify skin regions in vivo.

In this study (25), the authors used the following 8 variants as biomarkers: (1) amide I/ amide II; (2) RNA/DNA (1244/1230 cm⁻¹); (3) phosphate level; (4) cytosine (1536 cm⁻¹) + guanine (1633 cm⁻¹) / total; (5) thymine (1576 cm⁻¹)/amide II; (6) tyrosine/amide II; (7) DNA level (1230 cm⁻¹); and (8) thymine level. Based on the absorbance of the above components, they successfully differentiated malignant melanoma from normal skin (epidermis). These parameters were evaluated using three different statistical methods: (i) two population t-test; (ii) an in-house statistical model developed on the basis of Gaussian distribution and Poisson probabilities; and (iii) discriminant classification function (DCF) analysis for their diagnostic potential. The authors concluded that these biomarkers are sensitive and can be used in computational models in future automated systems for diagnosis and demarcation of melanoma on skin surfaces.

Another widespread method for the analysis of spectral differences is called *cluster analysis*. Wong et al. (9) worked with cluster analysis in 1992; by combining infrared spectroscopy with high pressure (pressure-tuning infrared spectroscopy) and applying it to the study of paired sections of basal cell carcinomas (BCC) and normal skin from 10 patients. Atmospheric pressure IR spectra of BCC were dramatically different from those of the corresponding

normal skin. Some of these changes are shared by all human epithelial malignancies studied to date, whereas some others appear as yet unique to basal cell carcinoma. The diagnostic value of infrared spectroscopy in BCC remains to be determined.

CHARACTERIZATION OF HUMAN AND MURINE MELANOMA

In this work we have characterized cells of the murine melanoma (B16F10) and the human melanoma (C8161) by infrared spectroscopy, looking for spectroscopic changes assigned to biochemical markers. In other words, these experimental data studied different kinds of cell lines seeking to achieve more precise information about the differences and similarities between different melanoma cells.

Methodology

For this experiment, B16F10 cells belonging to the murine melanoma cell line were grown and extracted from C57BL/6J mice (ATCC, Manassas, VA). The same was done for C8161 cells, which is a human melanoma cell line (ATCC, Manassas, VA). The latter cells were grown in 75 cm² cell culture bottles at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were maintained in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-Ivitrogen, BRL, New York, USA), 20 mM L-glutamine, 7.5% sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco-Ivitrogen, Carlsbad, CA). To carry out the experiments, the cells were removed from the bottles of the cell culture by using 0.2 mL trypsin-EDTA solution (2.5 g/L; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). They were washed at 1000 rpm/15 minutes with a 0.9% NaCl solution, to remove the growth medium.

The spectra were acquired on a Nicollet 380 (Thermo Scientific NicoletTM, Waltham, MA) spectrophotometer at a 2 cm⁻¹ resolution, 32 scans, in the 4000–900 cm⁻¹ spectral range. For the FTIR measurements, cells were deposited on IR transparent CaF₂ windows (approximately 10 μ L with 10⁷–10⁸ cells). The samples were dried with N₂ for about 10 min.

The spectral data sets were analyzed in two ways. First, the spectral shifts in the absorption peaks were evaluated through analysis of the second derivatives of the absorbance spectrum. Secondly, the spectra were analyzed by integrating each absorption band using the program Microcal Origin 6 (Origin Lab, Northampton, MA, USA). All spectra were normalized to the band area positioned at 1240 cm⁻¹ (PO₂ asymmetric stretching). Following normalization, the average area of each band was calculated for all the replicated spectra, thus allowing for identification of the differences and similarities between the cell

lines. Both analyses, namely band area and peak displacement, were conducted by student's t-test using p < 0.05.

Results and Discussion

A typical infrared spectrum of the analyzed cells (human melanoma (C8161) and murine melanoma (B16F10)) is presented in Figure 1. The results are presented in absorbance values and wavenumber between 4000 and 900 cm⁻¹. The absorption bands corresponding to lipids (between 3100 and 2800 cm⁻¹), proteins (between 1700 and 1400 cm⁻¹), and DNA (between 1300 and 900 cm⁻¹) can be observed. The presence of these macromolecules is observed in both cells with good signal-to-noise ratio, and the spectral features are similar in both spectra.

Both spectra, those of the human and the murine melanomas, are dominated by two bands, assigned to the absorption modes of proteins. The most intense is the amide I band, centered near 1640 cm⁻¹, which corresponds to the C=O stretching coupled with the N-H bending and the C-N stretching modes of peptidic bonds (26, 27). The second band, centered around 1540 cm⁻¹, corresponds to the stretching of amide II (26–29). Based on the literature, the



Figure 1. Average infrared spectra of C8161 cell (human melanoma, dark line) and B16F10 cell (murine melanoma, light line) and spectral division containing basic cellular structures.

positions of the amide I and II bands are indicative of protein structure (18–30), as shown in Figure 1.

There is a shift of the peak in $1646-1655 \text{ cm}^{-1}$, due to amide I, because the absorption in this region is associated with the conformation of the alpha helix structure (~ 1646 cm^{-1}) and the beta sheet (~ 1652 cm^{-1}) of proteins (3, 4, 22). This conformation might have suffered some degradation when the cells were dried. At 1309 cm^{-1} , the band corresponding to amide III, another component of proteins can be detected. In the region between $1300 \text{ and } 1000 \text{ cm}^{-1}$, the main spectral features are the vibrations of the nucleic acid PO₂ stretching mode and the C–O stretching vibrations from the carbohydrate residues in the glycogen (18, 19, 31), as depicted in Figure 1.

In the spectral region assigned to lipids, the band centered at 2851 cm^{-1} corresponds to the symmetric stretching of CH bonds, present in the CH₂ components of fatty acid molecules. The asymmetric stretching of these molecules is evidenced by the band at 2921 cm⁻¹. The region between 3060 and 3185 cm⁻¹ is associated with the stretching of C=C-H bonds, as presented in Figure 1.

In the first column of Table 1, the band position is shown by taking the average position of the C8161 cell line as reference. The band area and its respective standard deviation are presented in the second and third columns, respectively. Finally, the last column shows the p value, thus indicating the differences between the bands.

The band located at 1237 cm^{-1} is assigned to the asymmetric PO₂ stretching from phosphodiester bonds (26, 32, 33). This band was used as the basis for spectral normalization, compensating for any effects from difference in the number of cells in the films deposited on the CaF₂ windows. This band was chosen because the phosphate moiety is only found within phosphodiester connections and phospholipids (in the membrane), and its intensity is generally unaffected by changes in the environment (washing, dry film creation, etc.).

Approvimate peak	Band	l area		
value (cm^{-1})	C8161	B16F10	p Value	
1308	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.005	
1543	2.22 ± 0.18	2.77 ± 0.22	0.020	
1646	5.24 ± 0.69	5.57 ± 0.30	0.009	
1652	9.61 ± 0.44	6.47 ± 0.52	0.003	
2851	0.10 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.027	
2922	0.26 ± 0.03	0.46 ± 0.01	0.001	
3062	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.001	
3184	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.026	

Table 1. Bands with different areas determined through variance analysis considering p value less than 0.05

The amide I band is often used for normalization, but this absorption profile is very sensitive to conformation and hydrogen bonding. Because we observed significant shifts in the amide I absorption maximum, as well as additional changes that indicate modifications in the ration of secondary of secondary structures, we believe that amide I is not the best possible reference for normalizations.

One additional point regarding normalization is related to the information retrieval carried by the phosphodiester asymmetric PO₂ stretching mode (1237 cm⁻¹) (32, 33); this band carries information concerning the DNA, which is important in studies involving diseases such as cancer, for example. To assess changes in this absorption only, the band located at 1237 cm⁻¹ was characterized using spectra normalized to the 1651 cm⁻¹ band (amide I) (32, 33).

The average area of the absorption band located at 1237 cm⁻¹ (phosphodiester asymmetric PO₂ stretching) is 0.10 ± 0.04 for the murine melanoma, and 0.19 ± 0.03 fort the human melanoma. To compare these values, a student-t test was used. Considering p < 0.05, such bands can be considered significantly different.

Finally, we verified the presence of peak displacement through calculation of the spectrum's second derivative for each sample. There were differences with respect to band displacement in the regions of 1086, 1395, and 1740 cm⁻¹ (p < 0.05). To specifically analyze the observed differences in band position, Figure 2 shows the second derivative of all the spectra for both cells, and the three bands with statistical differences are indicated in this same figure. The bands with different positions correspond to DNA sugar, CH₂ and CH₃ bending, and the stretching of ester C=O bonds (32, 33).

Looking at the areas of the bands located in the $2850-2930 \text{ cm}^{-1}$ region, possibly corresponding to the cell membrane lipids (12, 33), it can be noticed that the murine melanoma cells have a larger amount of chemical bonds than the human cells. The differences in the lipid content observed between the two cells can be assigned to cell membrane fluidity. Some membrane transport processes and enzymatic activities, for example, cease when the lipid's viscosity is experimentally increased beyond a borderline level. Membrane fluidity is related to composition and body temperature (34). In general, mice have an average body temperature of around 36° C (35), and the human temperature is around 37° C. To keep the fluidity of the membrane stable with decreasing body temperature, fatty acids are synthesized with more *cis* double bonds (36).

We suppose that the "extra" double bonds necessary for maintaining the fluidity of the mouse cell membrane could explain the increase in the areas of the bands due to lipids at 2851 cm⁻¹ and 2922 cm⁻¹, as observed in Table 1 and Figure 1. Another interesting point is the increase in the amide I (beta sheet) band located near 1652 cm⁻¹. This band is related to the proteins present in the cell (32, 33). Most of the human epithelial cancers are characterized by


Figure 2. Comparison according to peak displacements in the second derivative spectra of murine and human melanoma samples.

an abnormal karyotype with several translocations, which is not as common in mice (37).

The murine cells have higher "stability" because murine tumors are generated from disturbances in two "signaling pathways": one involving p53 and the other involving Raf-MAPK. Human tumors are caused by disturbances in six or more signaling pathways: p53, RB, telomerase, PP2A, RAL-GEF, etc. (35–37). So it can be assumed that the production of proteins and other substances is directly affected by problems in the signaling pathways. Because more pathways are related to tumor development in human cells, it can be expected that the amide I band in humans (related to the quantity of protein) is larger than the same band in the case of murine cells, which have only two affected signaling pathways.

Most of the differences between the murine and human cells can be found in telomeres. Human cells have about 10K pairs of bases, whereas murine cells have ca. 40–60K pairs. Telomeres present the same chemical bonds as the DNA molecule, because they are a key sequence for signaling the beginning and the end of genetic information during replication. It is envisaged (Refs) that the difference in the size of telomeres may be responsible for the displacement in the DNA band regions. As the DNA molecule is present in a larger amount, more histones are necessary for the DNA folding to be performed satisfactorily (36). The histones are composed primarily of lysine and arginine, two types of aminoacids. They are closely associated with inactive genes. Thus, increasing the concentration of these proteins (due to the larger size of the molecule) could be result in a displacement of the DNA absorption band.

BIOCHEMICAL ASSIGNMENT

FTIR spectroscopy has become a well-accepted and widely used method to characterize biological tissues. The FTIR spectroscopy technique has become the method of choice for scientists interested in finding the chemical structural properties of natural and synthetic tissues. In biological studies, for instance, where a wide range of chemical bands and functional groups can be attributed to every single peak, finding appropriate meanings, which can demonstrate the clinical importance of the technique and achieved results, can be one of the most important steps in finalizing a spectroscopic research work. As a result, and with the aim of putting these shortages aside, a wide range of the most frequent peaks in FTIR studies related to skin are presented in Table 2.

The individual bonds could originate from different macromolecules and, for this reason, a single band may give information about two or more macromolecules. This problem has been minimized using literature information on biochemical assignment, building this review as described in Table 2. In this table, we have characterized two different cell lines (B16F10 and C8161) and reviewed nine other main samples. Other works will be discussed in this review but are not presented in Table 2.

The band positions of our experimental data (related to murine and human melanoma cell lines) are presented with more detail including a more precise value and standard deviation. This measurement is not so common in the literature. In our review, we observed this approach only with respect to melanoma and epidermis tissue (25). The reason for the nonprecision in band position will be associated with the objective of the analyzed experimental works, which looking into identifying differences between different tissues (healthy and cancerous or simply different skin regions). Another point is about our approach as well as that of Hammody et al. (25), which differ from those of the other authors because our work aims at studying each band more accurately, seeking the meaning of each individual band and not considering a band set.

Considering Table 2, the analyzed bands can be categorized as shown in Figure 1: lipids between 1700 and 3200 cm^{-1} , proteins between 1150 and 1650 cm⁻¹, and DNA about 900–1120 cm⁻¹. This division is only a simplified way to analyze the absorption spectra, because it is possible to observe bands related to the DNA molecule in the region where lipid and protein bands are more predominant. This situation is easily illustrated considering the C–H bond: a higher concentration of this bond is found in lipids, but it is also observed in DNA and proteins. So, observation of the absorption spectrum of a pure DNA or a specific protein will show absorption bands in the region near 3100–2800 cm⁻¹. Therefore, we could consider that this region is not completely related

0
0
\sim
• •
+
U)
2
D
3
7
F4
CN
-
m
~
4
••
œ
-
بـ
14
_
0
U.
н.
7
2
~
щ
0
m
rŏ
01
A \
ø
Å
De
e De
de De
ade De
lade De
dade De
idade De
sidade De
rsidade De
rsidade De
ersidade De
versidade De
iversidade De
niversidade De
Iniversidade De
Universidade De
[Universidade De
[Universidade De
: [Universidade De
∕: [Universidade De
3y: [Universidade De
By: [Universidade De
. By: [Universidade De
d By: [Universidade De
ed By: [Universidade De
led By: [Universidade De
ded By: [Universidade De
aded By: [Universidade De
oaded By: [Universidade De
loaded By: [Universidade De
loaded By: [Universidade De
mloaded By: [Universidade De
wnloaded By: [Universidade De
ownloaded By: [Universidade De

					Peak	position (cm ⁻¹						
This a	rticle	2	4cInto:	sh et al	. (12)	Hammody	et al. (25)	Wong et al. (9)	Brancaleon et al. (17)	Barry et al. (21)	As	signment
C8161	B16F10	FS	BCC	ET	DT	MT	ET	BCC and NS	HSC	HSC	Chemical	Biological
916.1 ± 0.7	917.0 ± 1.2	- 080	- 080	- 080	- 080	070 4 ± 0.4		- 020	I	I	C—0 str.	Ribose DNA hockhone
C.1 ± C.800		002	000	000	1035 (*)	+:0 + +:0/6		1031			str. Svm. C—O str. and	(*) Collagen/carbohvdrates
											bend.	0
$0.0 \pm c.0c01$	1049.8 ± 0.7		1055	1055	I			1055	I	I	Sym. C 10 str.	Polysaccharide
$\frac{-}{1085.6 \pm 0.6}$	$\frac{-}{-}$	1080	1087	1087	1080 (*)	$\frac{-}{1081}$ $^{-}$ $^{-}$ 0 3	-10818 ± 0.3	1087			Sym PO, str	*Collageaccitations
1122.0 ± 0.6	1120.7 ± 0.8										Sym. C—N str. and	RNA
											sym. C-C str.	
1169.1 ± 0.7	1169.4 ± 0.5	I	1162	1162	Ι		Ι	1162	I	I	Asym. C-O str.	Serine. thereonine. and
												tyrosine of cell proteins
												and carbohydrates
		I	I	I	1204					I	C-0-C str.	Collagen
1237.3 ± 1.5	1238.1 ± 0.7	1240	1241	1241	1240 (*)	1238.6 ± 0.3	1240.2 ± 0.3	1241	I	1247	Asym. PO ₂ str.	(*) Collagen/DNA
					1280(*)					1298	Deformation N-H	(*) Collagen/ cytosine
1308.1 ± 1.5	1308.2 ± 1.1	I	I	I						I		Amide III
		I			1330(*)					I	*C-0/CH ₂ wag.	Collagen
1396.4 ± 1.2	1393.6 ± 0.5	I	I	I	Ι	I		I	Ι	1360-1500	Sym. CH ₃ bend. and	Proteins and lipids
											scis.	
1452.8 ± 1.0	1452.6 ± 1.1	I	1456	1456				1456			Asym. CH ₃ bend.,	Proteins and lipids
											scis.	

 Table 2. The spectral assignments of C8161, human melanoma cells; B16F10, murine melanoma cells.

(Continued on next page)

					Peak posi	tion (cm ⁻¹)						
This	article	Mc	Intosh	et al.	(12)	Hammody	et al. (25)	Wong et al. (9)	Brancaleon et al. (17)	Barry et al. (21)	1	Assignment
C8161	B16F10	FS	BCC	ET	DT	MT	ET	BCC and NS	HSC	HSC	Chemical	Biological
1543.0 ± 1.1	1543.0 ± 0.5	1500-1600			1500-1600	1544.7 ± 0.9	1545.4 ± 0.4		1500-1700	1550	N—H bend. and	Amide II
	I	1600-1700	I		1634 (*)	I	l	I			sym. C—N str. C=C str. and	(*) Collagen/uracyl
1646.9 ± 1.5	1641.2 ± 2.3		I	I	1600-1700						C=0 str. C=0 str.	B-sheet structure—amide I
1652.6 ± 3.3	1653.6 ± 0.8					1648.7 ± 0.7	1650.9 ± 0.2			1650	C=O str.	α-Helix structure— amide I
		I							1710	Ι	C=O str.	Lipids (sebum)
1739.5 ± 0.7	1740.7 ± 0.2	1740	I	I	1740				1740	1743	C=0 str.	Lipids (sebum)
2851.9 ± 0.7	2851.3 ± 0.4	2800-3000	2851	2851	(2800-3000			2851	2850	2700-3100	Sym. CH ₂ str.	Fatty acid lipids
2922.7 ± 0.7	2922.2 ± 0.6								2920		Asym. CH ₂ str.	Fatty acid lipids
2962.0 ± 0.8	2960.8 ± 0.3		2958	2958	~			2958			Asym. CH3 str.	Acyl chains (lipids)
3062.1 ± 1.6	3061.5 ± 0.4								I		Sym. CH ₃ str.	Acyl chains (lipids)
3184.2 ± 2.7	3186.5 ± 0.2	I	I	I	I				I	Ι	Sym. N-H str.	cis-Ordered substructures
			I	I			I			3200	Sym. O—H str.	Water
		I	I		I				3300 (*)	3300	Sym. N-H str.	(*) Water/amide A
I	I	I		I	I	I	l	ļ	I	3400	O—H str.	(keratinized proteins) Lipid polar head
FS: Foll	icle sheath;	BCC: b	asal c	sell c	carcinoma;	ET: epider	mis tissues;	; DT: dermi	s tissue;	MT: mela	moma tissue; N	IS: normal skin; HSC:

Table 2. The spectral assignments of C8161, human melanoma cells; B16F10, murine melanoma cells. (*Continued*)

each band more accurately, seeking the meaning of each individual band and not a band set. The bands highlighted with the symbol (*) have a Human stratum corneum. Our approach and that of Hammody differ from those of the other authors, because the aim of this work was to study distinct assignment from that indicated by most of the other authors.

Vibrational mode: str. (stretching), bend. (bending), wag (wagging), scis. (scissoring), sym. (symmetric), asymmetric (asym).

FTIR Spectroscopy of Skin Cancer

to the vibrational modes of lipids; the intensity of the absorption bands of this region contains information related to lipids, but it is associated with proteins components, too.

As described in the last two columns of Table 2, we report the band assignment in two groups: the first comprises the assignments considering the chemical bond and vibrational mode characteristics; i.e., C–H, C=O, C–O, symmetric, asymmetric, stretching, bending, etc.; the second assignment group is related to the biological compounds, which could be associated with lipids, DNA backbone, carbohydrates, and collagen, thus allowing for a complete overview of each sample component.

Because vibrational modes are defined, the chemical association of the absorption bands is more established than the biological assignment, although they may undergo peak displacement. For example, considering that a C— H stretching presents an absorption peak near 3000 cm⁻¹, it is possible to distinguish this band even with a small displacement. However, studying the biological assignment is more complicated because the same chemical bond is associated with various biological compounds; e.g., C=O bond is present in lipids, proteins, and DNA. Thus, the band assignment presented in Table 2, which is related to the biological compounds, is somewhat coarse, where the biological compounds more likely to vibrate in that particular region are presented by considering the chemical composition of each biological macromolecule.

A clear example concerns the bands related to collagen. According to McIntosh et al. (12), the use of infrared spectroscopy should enable identification of collagen bands (1035, 1080, 1204, 1240, 1280, 1330, and 1634 cm⁻¹) present in the spectrum of dermis; on the other hand, the bands located at 1080 and 1240 cm⁻¹ are very commonly associated with phosphodiester groups of nucleic acids (38–42).

In the region located around $3000-3400 \text{ cm}^{-1}$ there is a large absorption band usually associated with water molecules, but Brancaleon (17) defines this band as a vibration related to amide A (e.g., keratinized proteins). The imprecise biological assignment of the absorption bands is easily noted in the work conducted by Movasaghi (43). In that review, different meanings are ascribed to each band, and there are changes according to the type of disease studied, sample (cell and/or tissues), etc. The chemical assignment is well defined for all authors who work with infrared spectroscopy, although works concerned with biological applications face more difficulties with regard to the establishment of the band assignment. More attention should be given to the better definition of biological association with such bands, so that samples of cells, tissues, and living organisms can be more accurately characterized.

This review contains important data sets related to spectroscopic studies with respect to skin characterization, through analysis of different cancers and normal samples. We have characterized two types of melanomas (murine and human melanoma), by analyzing the absorption band areas and peak displacement (considering the second derivatives of the absorption spectra). The aim of this work was to characterize distinct cell lines by FTIR spectroscopy, focusing on the biochemical association for each absorption band identified.

Various works concerning skin cancer were presented in this review, and some interesting results provided by different samples (melanomas, follicle sheath, basal cell carcinoma, epidermis tissues, dermis tissue, and human stratum corneum) have been presented. The identification of biochemical injuries provides important information that, associated with clinical examination, can assist the diagnosis of diseases.

Advances related to the detection of biochemical alterations in cells and tissues will occur with the employment of new mathematical procedures for data analysis and the development of new technologies that will enable detection of weak and broad absorption bands with better accuracy. Peak displacement, alterations related to band width, and variations in the relative ratios of the main biological compounds, may carry important information about biomarkers involved in different types of disease. These biomarkers will be used to differentiate and classify neoplastic and healthy cells as well as lead to advances related to the development of clinical protocols.

To finally apply the vibrational spectroscopy in the clinic, it is necessary to do a work through which it will be possible to compare reports issued by pathologists with the results of spectroscopic studies, and check the reliability of information provided by optical techniques and how it helps in determining the disease level or the differentiation between tumor and healthy regions.

Advances related to the detection of biochemical alterations in cells and tissues will occur with the employment of new mathematical procedures for data analysis and the development of new technologies that will enable detection of weak and broad absorption bands with better accuracy. Peak displacement, alterations related to band width, and variations in the relative ratios of the main biological compounds may carry important information with respect to biomarkers involved with different disease types. These biomarkers will be used to differentiate and classify neoplastic and healthy cells as well as lead to advances related to the development of clinical protocols.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

REFERENCES

 Ahmedin, J., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Murray, T. (2008) Cancer statistics, 2008. CA *Cancer J. Clin.*, 58: 71–96.

FTIR Spectroscopy of Skin Cancer

- Holland, Frei, Bast, Kufe, Pollock, Weichselbaum, (2000) Cancer Medicine, American Cancer Society, 1850–1851.
- 3. Goodson, A.G. and Grossman, D. (2009) Strategies for early melanoma detection: Approaches to the patient with nevi. *J. Am. Acad. Dermatol.* 60(5): 719–735.
- Moore, P., Hundley, J., Hundley, J., Levine, E.A., Williford, P., Sangueza, O., McCoy, T., and Shen, P. (2009) Does shave biopsy accurately predict the final breslow depth of primary cutaneous melanoma? *Am. Surg.*, 75(5): 369–373.
- Dobrosavljevic, D., Brasanac, D., Apostolovic, M., and Medenica, L. (2009) Changes in common melanocytic naevi after intense sun exposure: digital dermoscopic study with a 1-year follow-up. *Clin. Exp. Dermatol.*, doi:10.1111/j.1365-2230.2008.03064.x
- Rajpara, S.M., Botello, A.P., Townend, J., and Ormerod, A.D. (2009) Systematic review of dermoscopy and digital dermoscopy/ artificial intelligence for the diagnosis of melanoma. *Br. J. Dermatol.*, DOI 10.1111/j.1365-2133.2009.09093.x
- Kendix, E.L., Prati, S., Joseph, E., Sciutto, G., and Mazzeo, R. (2009) ATR and transmission analysis of pigments by means of far infrared spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (4): 1023–1032.
- Meier, R.J. (2005) Vibrational spectroscopy: a 'vanishing' discipline? *Chem. Soc. Rev.*, 34 (9): 743–752.
- Wong, P.T.T., Goldstein, S.M., Grekin, R.C., Godwin, T.A., Pivik, C., and Rigas, B. (1993) Distinct infrared spectroscopic patterns of human basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Res.*, 53: 762–765.
- Wang, S., Setlow, R., Berwick, M., Polsky, D., Marghoob, A., Kopf, A., and Bart, R. (2001) Ultraviolet A and melanoma: A review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 44 (5): 837–846.
- Giacomini, P., Frajoli, R., Nistico, P., Tecce, R., Nicotra, M.R., Di Filippo, F., Fisher, P.B., and Natali, P.G. (1990) Modulation of the antigenic phenotype of early-passage human melanoma cells derived from multiple autologous metastases by recombinant human leukocyte, fibroblast and immune interferon. *Int. J. Cancer*, 46: 539–545.
- McIntosh, L.M., Jackson, M., Mantsch, H.H., Stranc, M.F., Pilavdzic, D., and Crowson, A.N. (1999) Infrared spectra of basal cell carcinomas are distinct from non-tumor-bearing skin components. *J. Investig. Dermatol.*, 112: 951–956.
- Griffiths, P.R. and de Haseth, J.A. (1986) Fourier Transform Infrared Spectrometry. John Wiley & Sons: New York.
- Choo, L.P., Jackson, M., Halliday, W.C., and Mantsch, H.H. (1993) Infrared spectroscopic characterization of multiple sclerosis plaques in the human central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1182: 333–337.
- Rigas, B., Morgello, S., Goldman, I.S., and Wong, P.T. (1990) Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 87: 8140–8144.
- Schultz, C.P., Liu, K.Z., Kerr, P.D., and Mantsch, H.H. (1998) *In situ* infrared histopathology of keratinization in human oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncol. Res.*, 10: 277–286.
- Brancaleon, L., Bamberg, M.P., Sakamaki, T., and Kollias, N. (2001) Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum *in vivo. Journal of Investigative Dermatology*, 116, 3.

L.B. Mostaço-Guidolin et al.

- Olsen, O.H., Samuelsen, M.R., Petersen, S.B., and Noerskov, L. (1989) Feasibility study for diagnosis of stomach adenoma and cancer using IR spectroscopy. *Phys. Rev.* A 39, 3130–3134.
- Cohenford, M.A., Godwin, T.A., Cahn, F., Bhandare, P., Caputo, T.A., and Rigas, B. (1997) Infrared spectroscopy of normal and abnormal cervical smears: evaluation by principal component analysis. *Gynecol. Oncol.*, 66: 59–65.
- Wood, B.R., Quinn, M.A., Tait, B., Ashdown, M., Hislop, T., Romeo, M., and McNaughton, D. (1998) FTIR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies. *Biospectroscopy*, 4: 75–91.
- Barry, B.W., Edwards, H.G.M., and Williams, A.C. (1992) Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: Assignment of spectral bands. *J. Raman Spectros.*, 23: 641–645.
- Sukuta, S. and Bruch, R. (1999) Factor analysis of cancer Fourier transform infrared evanescent wave fiberoptical (FTIR-FEW) spectra. *Laser. Surg. Med.*, 24: 382–388.
- Mordechai, S., Sahu, R.K., Hammody, Z., Mark, S., Kantarovich, K., Guterman, H., Podshyvalov, A., Goldstein, J., and Argov, S. (2004) Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *J. Microsc.*, 215 (1): 86–91.
- Tfaylia, A., Piota, O., Durlachb, A., Bernardc, P., and Manfaita, M. (2005) Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1724: 262–269.
- Hammody, Z., Argov, S., Sahu, R.K., Cagnano, E., Moreh, R., and Mordechai, S. (2008) Distinction of malignant melanoma and epidermis using IR microspectroscopy and statistical methods. *The Analyst*, 133(33): 372–378.
- Gremlich, H.U. and Yan, B. (2001) Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials, Marcel Dekker: New York, pp. 259–265.
- Mantsch, H.H. and Chapman, D. (1996) *Infrared of Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss: New York, pp. 131–134, 159–162,311.
- Benedetti, E., Bramanti, E., Papineschi, F., and Rossi, I. (1997) Determination of the relative amount of nucleic acids and proteins in leukemic and normal lymphocytes by means of Fourier transform infrared microspectroscopy. *Appl. Spectros.*, 51: 792–797.
- Boydston-White, S., Gopen, T., Houser, S., Bargonetti, J., and Diem, M. (1999) Infrared spectroscopy of human tissue. Infrared spectroscopic studies of myeloid leukemia (ML-1) cells at different phases of the cell cycle. *Biospectroscopy*, 5: 219–227.
- Barth, A. and Zscherp, C. (2002) What vibrations tell us about proteins. Q. Rev. Biophys., 35: 369–430.
- Andrus, P.G.L. and Strickland, R.D. (1998) Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biospectroscopy*, 4: 37–46.
- Mantsch, H.H. and Chapman, D. (1996) *Infrared of Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss: New York, pp. 131–134, 159–162,311.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., and Rehman I. (2008) Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43 (2): 134–179.
- Weiner, D. and Waterhouse, J. (1998) Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in laboratory mice. *Physiol. Behav.*, 63 (5): 837–843.

FTIR Spectroscopy of Skin Cancer

- 35. Green, E.H. (1966) The Biology of Laboratory Mouse. McGraw-Hill: New York.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science: New York.
- Rangarajan, A. and Weinberg, R.A. (2003) Comparative biology of mouse versus human cells: Modeling human cancer in mice. *Nat. Rev. Canc.*, 3: 952–959.
- Wood, B.R., Quinn, M.A., Tait, B., Ashdown, M., Hislop, T., Romeo, M., and McNaughton, D. (1998) FTIR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies. *Biospectroscopy*, 4: 75–91.
- Yang, Y., Sule-Suso, J., Sockalingum, G.D., Kegelaer, G., Manfait, M., and El Haj, A.J. (2005) Study of tumor cell invasion by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*, 78: 311–317.
- Richter, T., Steiner, G., Abu-Id, M.H., Salzer, R., Gergmann, R., Rodig, H., and Johannsen, B. (2002) Identification of tumor tissue by FTIR spectroscopy in combination with positron emission tomography. *Vib. Spectros.*, 28: 103–110.
- Gazi, E., Dwyer, J., Gardner, P., Ghanbari-Siakhani, A., Wde, A.P., Lockyer, N.P., Vickerman, J.C., Clarke, N.W., Shanks, J.H., Scott, L.J., Hart, C.A., and Brown, M. (2003) Applications of Fourier transform infrared microspectroscopy in studies of benign prostate and prostate cancer. A pilot study. *J. Pathol.*, 201: 99–108.
- Wang, H.P., Wang, H.-C., and Huang, Y.-J. (1997) Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid. *Sci. Total Environ.*, 204: 283–287.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., and Rehman, I. (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectros. Rev.*, 43 (2): 134–179.

ANEXO B

----- Original Message ----- From: "J. of Photochem. & Photobiol. B: Biology" <<u>esubmissionsupport@elsevier.com</u>>

To: <<u>iouribor@usp.br</u>>

Sent: Wednesday, August 12, 2009 4:15 PM

Subject: Confirmation of Submission

Dear Iouri,

Your submission, entitled "Photocytotoxicity of a Cyanine Dye with two interacting chromophores toward melanoma and normal cells", has been received by the online submission system of the Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.

In due course, your manuscript will be given a reference by the Editor and you will be notified by e-mail.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology