

Milene Nóbrega de Oliveira Moritz

**Potencial apoptótico de uma nova clorina anfifílica
como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos,

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

N854p Nóbrega de Oliveira Moritz, Milene
Potencial apoptótico de uma nova clorina anfifílica
como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica /
Milene Nóbrega de Oliveira Moritz; orientadora Janice
Perussi Rodrigues. São Carlos, 2014.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Apoptose. 2. Terapia fotodinâmica. 3.
Fotossensibilizadores. 4. Clorinas. I. Título.



Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

Milene Nóbrega de Oliveira Moritz

Título: "Potencial apoptótico de uma nova clorina anfifílica como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 20 / 05 / 2014

Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi (Orientadora) Universidade de São Paulo - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: 

Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

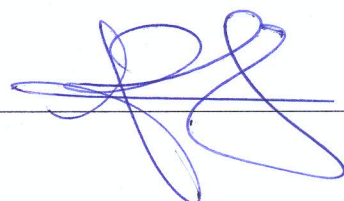
Resultado: APROVADO

Assinatura: 

Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Resultado: APROVADO

Assinatura: 

Homologado em: / /

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre estiveram presentes em minha vida dando todo o apoio necessário para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Janice R. Perussi pela oportunidade de realizar este projeto e por sua confiança em minha capacidade de desenvolvê-lo. Também pelos seus inúmeros incentivos ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP/FOAR) que colaborou para a realização dos experimentos de citometria e Western blot em seu laboratório e por suas valiosas discussões e sugestões que tanto acrescentaram a este estudo.

Ao Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira da Universidade Federal de São Carlos pela síntese das clorinas e ao Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC pela síntese da hipericina.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório que sempre estavam dispostos a ajudar e por sua amizade: Joyce, Yara, Wanessa, Adriel, Marília, Malu, Lucas, Ana Cecília, Alex e Larissa.

Aos colegas de Araraquara que me ensinaram as técnicas realizadas e por suas discussões e apoio durante meus experimentos: Lígia, Sabrina, Morgana e Marcell.

Aos técnicos: Claudia Bernal (Grupo de Fotossensibilizadores), Claudinha e Leandro (UNESP/FOAR) pela constante disposição em prestar auxílio.

À FAPESP pela bolsa e suporte financeiro para realização dos experimentos e à CAPES-CNPq por parte da bolsa recebida durante o mestrado.

À minha família em especial aos meus pais Olavo e Edenise e irmão Vitor por todo carinho e dedicação. Em memória à minha avó materna Ivette que orava para que tudo desse certo em minha vida.

Ao meu amigo, namorado, noivo (ao longo desse mestrado) e agora marido que sempre esteve de perto me ajudando a terminar meus experimentos. Por sua companhia de noite e em finais de semana no laboratório. Por sua ajuda com os equipamentos e com a parte de formatação dessa dissertação.

E finalmente agradeço a Deus por seus cuidados em minha vida e a quem eu dedico tudo o que sou, pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

RESUMO

MORITZ, M.N.O. **Potencial Apoptótico de uma Nova Clorina Anfifílica como Fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica.** 2014. 77 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma técnica utilizada para tratar vários tipos de tumores em que a luz estimula um fotossensibilizador (FS) a gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) que levam à morte celular por apoptose ou necrose. A partir de uma clorina (CHL), cuja nomenclatura é metilfeoforbídio, visando torná-la mais anfifílica foi adicionado o grupo TRISMA (CHL-T). Os vários parâmetros usados na PDT (tipo de FS, concentração do FS, tempo de incubação do FS e dose de luz) podem desencadear diferentes vias para apoptose. Poucos estudos sobre o tipo de morte celular induzido com clorinas têm sido realizados. Diante disso, o objetivo deste estudo foi determinar a citotoxicidade dessa nova clorina, assim como identificar o tipo de morte celular envolvido na PDT e elucidar a participação da proteína apoptótica p53 nesse processo comparando-se com CHL e HY. A hipótese principal deste trabalho é que esta nova clorina modificada tem maior eficiência na indução de apoptose. Para testar esta hipótese, foi avaliada a indução de apoptose por microscopia de fluorescência e por citometria e a citotoxicidade pelo ensaio do MTT de três FSs: uma clorina (CHL), a clorina modificada (CHL-T) e a hipericina (HY). As clorinas apresentaram maior acumulação para as duas linhagens celulares quando comparada com a hipericina. A fototoxicidade apresentada pela nova clorina foi cerca de 10 a 20 vezes maior que a clorina de origem (CHL) nas duas linhagens celulares como demonstrado pelos resultados do ensaio com MTT. Os testes realizados por microscopia de fluorescência resultaram numa porcentagem de morte celular crescente com o aumento das concentrações diferenciando maior apoptose causada por PDT com CHL-T nas células HEp-2 e maior necrose nas células HeLa. A análise da apoptose por citometria também apresentou um efeito muito superior da CHL-T em relação aos demais FSs estudados para apoptose inicial (80,35 %) para a concentração de 0,52 μM , tempo de incubação de 2h e dose de luz 6 J cm^{-2} . Já a detecção de ROS por citometria não apresentou diferenças estatisticamente significativas para PDT nessas condições. Um discreto aumento na ativação de p53 com CHL-T e irradiação foi observado, porém não estatisticamente significativo. Os resultados sugerem que a indução da morte celular na PDT não depende dessa proteína e que a CHL-T tem excelente desempenho como FS em PDT.

Palavras-chave: Apoptose, Terapia Fotodinâmica, Fotossensibilizadores, Clorinas.

ABSTRACT

MORITZ, M.N.O. **Apoptotic Potential of a New Amphiphilic Chlorine as Photosensitizer for Photodynamic Therapy.** 2014. 77 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2014.

Photodynamic therapy (PDT) is a technique used in the treatment of various types of tumors in that light stimulates a photosensitizer (PS) to generate reactive oxygen species (ROS) that lead to cell death by apoptosis or necrosis. From a chlorine (CHL), whose nomenclature is methylferoforbido, hoping to make it over the amphiphilic the TRISMA group (CHL-T) has been added. Several parameters (type of PS, concentration of PS, incubation time and light dose) can trigger different apoptotic pathways. Few studies aiming the type of cell death induced by chlorines as a PS have been done. Thus, the objective of this project was to determine the cytotoxicity of this new chlorine, as well as identify the type of cell death involved in PDT as well as to elucidate the involvement of apoptotic protein p53 in this process comparing with CHL and HY. The main hypothesis of this study is that the modified chlorine has greater efficiency in the induction of apoptosis. To test this hypothesis, it was evaluated the induction of apoptosis by fluorescence microscopy and cytometry and the cytotoxicity by the MTT assay of three PSs: chlorine (CHL), the modified chlorine (CHL-T) and hypericin (HY). The chlorins accumulation was higher for the two cell lines compared with hypericin. Phototoxicity presented by the chlorin was about 10 to 20 times greater than by the chlorine source (CHL) for the two cell lines as demonstrated by the MTT assay. Tests conducted by fluorescence microscopy showed the percentage of cell death increased with increasing concentrations distinguishing higher apoptosis caused by PDT with CHL-T in HEp-2 cells and higher necrosis in HeLa cells. Analysis of apoptosis by flow cytometry also showed a superior response of CHL-T comparing to the others two studied PSs for initial apoptosis (80.35%) for concentration of 0.52 mM, incubation time of 2h and light dose 6 J cm^{-2} . However the detection of ROS by flow cytometry showed no statistically significant values for PDT in these conditions. A slight increase in the activation of p53 for CHL-T and irradiation was observed, but without being statistically significant. Thus, the results suggest that the induction of cell death in PDT does not depend on this protein and that CHL-T has excellent performance as a PS in PDT.

Key words: Apoptosis, Photodynamic Therapy, Photosensitizers, Chlorines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos estágios envolvidos na Terapia Fotodinâmica: a) aplicação local ou sistêmica; b) acumulação; c) foto-ativação; d) morte celular.	17
Figura 2 - Estrutura da CHL (A) e CHL-T (B).	21
Figura 3 – Vias de sinalização celular que desencadeiam apoptose depois da PDT.	23
Figura 4 - Ação da proteína p53 frente a um sinal de <i>stress</i>	24
Figura 5 – Linhagens celulares utilizadas como modelo de estudo	30
Figura 6- Espectros de absorção dos fotossensibilizadores na concentração de 2×10^{-5} M. A: CHL, B: CHL-T e C: HY.	31
Figura 7- Sistema de LEDs vermelhos para irradiação celular em placas (630 ± 10 nm).	32
Figura 8 – Reação de redução do MTT pela enzima succinato desidrogenase.	34
Figura 9 – Curva de calibração para determinação do coeficiente de absorvidade molar. A: CHL, equação da reta: $y = -0,0037 2,29 \times 10^4 x$ e $r^2 = 0,998$; B: CHL-T, equação da reta: $y = -0,0016 + 5,53 \times 10^4 x$ e $r^2 = 0,992$	38
Figura 10 – Curva padrão de BSA em 750 nm. r^2 : 0,990.	40
Figura 11 – A: Espectros de emissão de soluções de CHL em diferentes concentrações em etanol. B: Curva analítica da CHL a partir das intensidades de fluorescência em 674 nm. I.F.= $8.6604 + 342.7445 x [CHL]$, r^2 : 0,996.	41
Figura 12 - A: Espectros de emissão de soluções de CHL-T em diferentes concentrações em etanol. B: Curva analítica da CHL-T a partir das intensidades de fluorescência em 674 nm. I.F. = $2.48511 + 1120.36 x [CHL-T]$, r^2 : 0,998.	41
Figura 13 – Acumulação intracelular (μg do FS / mg de proteína celular) após incubação dos fotossensibilizadores na concentração de $1,4 \times 10^{-6}$ M. A: para as células HEp-2. B: para as células HeLa.	43
Figura 14 - Sobrevivência das células HEp-2 tratadas por 2h e irradiada com 30 J cm^{-2} analisadas 48 h pós-irradiação. A: para CHL. B: para CHL-T.	44
Figura 15 - Sobrevivência das células em função da concentração do fotossensibilizador para dose de luz 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h. A: células HEp-2 e tempo de incubação de 2h. B: células HeLa e tempo de incubação de 2h. C: células HEp-2 e tempo de incubação de 16 h. D: células HeLa e tempo de incubação de 16h.	45

Figura 16 - Microscopia de Fluorescência para as células HEp-2 com 2h de incubação para a CHL-T. A: controle negativo= escuro, sem FS. B: Controle no escuro com 0,06 µM de CHL-T. C: 0,06 µM de CHL-T e dose 6 J cm ⁻² . D: 0,12µM de CHL-T e dose 6 J cm ⁻² . E: 0,92 µM de CHL-T e dose 6 J cm ⁻²	47
Figura 17 - Microscopia de Fluorescência as células HEp-2 com 16h de incubação para a CHL-T. A: Controle negativo= escuro, sem FS. B: Controle escuro com 0,12 µM de CHL-T. C: 0,12 µM de CHL-T e dose 6 J cm ⁻²	47
Figura 18 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEp-2 com CHL para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.....	49
Figura 19 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEp-2 com CHL-T para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.....	50
Figura 20 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEp-2 com HY para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.....	50
Figura 21 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa com CHL para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.....	52
Figura 22 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa com CHL-T para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.....	52
Figura 23 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa com HY para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.	53
Figura 24 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEp-2 para tempo de incubação de 16h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.	54
Figura 25 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa para tempo de incubação de 16h e dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h.	55
Figura 26 – Gráficos das análises das células HEp-2 com FSs sem marcação para anexina V.	56
A: controle sem FS. B: 8,49 µM de CHL. C: 0,92 µM de CHL-T. D: 12,69 µM de HY.....	56
Figura 27 – Controles para células HEp-2. A: <i>gate</i> do controle negativo. B: controle negativo não marcado. C: controle negativo marcado apenas com FITC. D: controle negativo marcado apenas com PI.....	58
Figura 28 - Citometria de fluxo das células HEp-2 para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm ⁻² e período de pós-irradiação de 24h. A: controle negativo. B: 0,52 µM de CHL. C: 0,52 µM de CHL-T. D: 0,52 µM de HY.	59

Figura 29 – Gráficos das porcentagens de apoptose da linhagem HEP-2 com concentração de 0,52 μM de FSs para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h. * valores significativos em relação ao controle não tratado.	60
Figura 30 – Ativação da proteína p53 na linhagem celular HEP-2 com concentração de 0,52 μM de FSs para tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.....	61
Figura 31 – Ativação da proteína p53 na linhagem celular HeLa com concentração de 0,52 μM de FSs para tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.....	62
Figura 33 - Citometria de fluxo das células HEP-2 para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} . A: controle negativo. B: 0,52 μM de CHL. C: 0,52 μM de CHL-T. D: 0,52 μM de HY.	76
Figura 34 - Citometria de fluxo das células HeLa para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} . A: controle negativo. B: 0,52 μM de CHL. C: 0,52 μM de CHL-T. D: 0,52 μM de HY.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coeficiente de extinção molar dos FSs estudados.	39
Tabela 2 - Valores de acumulação intracelular em células HEP-2 para os três fotossensibilizadores ($1,4 \times 10^{-6}$ M) estudados (μg do FS / mg de proteína celular).....	42
Tabela 3 - Valores de acumulação intracelular em células HeLa para os três fotossensibilizadores ($1,4 \times 10^{-6}$ M) estudados (μg do FS/ mg de proteína celular).....	42
Tabela 4 – Concentrações inibitórias médias (IC_{50}) para os FSs incubados por 2h e 16h e irradiados na dose de 6 J cm^{-2} e análise das células após 24h.....	44
Tabela 5 - Porcentagens de morte celular (apoptose e necrose) obtidas por microscopia de fluorescência das células HEP-2 marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.	48
Tabela 6 - Porcentagens de morte celular (apoptose e necrose) obtidas por microscopia de fluorescência das células HeLa marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.	51
Tabela 7 - Porcentagem de morte celular (apoptose e necrose) obtidos por microscopia de fluorescência nas células HEP-2 marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 16h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.	53
Tabela 8 - Porcentagem de morte celular (apoptose e necrose) obtidos por microscopia de fluorescência nas células HeLa marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 16h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.	54
Tabela 9 – Porcentagens de apoptose (inicial e final) obtidas por citometria de fluxo das células HEP-2 para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.....	57
Tabela 10 – Porcentagens de apoptose (inicial e final) obtidas por citometria de fluxo das células HeLa para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.....	75
Tabela 11 – Porcentagens de ROS obtidas por citometria de fluxo das células HEP-2 e HeLa incubadas com os três fotossensibilizadores por 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2}	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina trifosfato

Bak – do inglês, Bcl-2 Homologous Antagonist-Killer Protein

Bax – do inglês, Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 – do inglês, B-cell lymphoma-2

Bcl-xl – do inglês, B-cell lymphoma-extra large

BSA – Albumina Sérica Bovina

CHL – Clorina de origem (metilfeoforbídeo a)

CHL-T – Clorina com grupo TRISMA

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – do inglês, deoxyribonucleic acid

DTT – Dithiothreitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

Fas/CD95/APO-1 – Receptor ou proteína de membrana pró-apoptose

FITC – Fluoresceína-5-isotiocianato

GAPDH – Gliceraldeído- 3-fosfato-desidrogenase

HY - Hipericina

IC₅₀ – Concentração Inibitória média

IgG – Imunoglobulina G

LDL – do inglês, Low Density Lipoprotein

LEDs – do inglês, Light Emitting Diode

MAPKs – Cinases de proteínas ativadas por mitógenos

mTHPC – Meta-tetra(hidroxifenil)clorina

p53 – Proteína de 53 kDa

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PI – Iodeto de Propídio

ROS – do inglês, Reactive Oxygen Species

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TBS – Tampão Tris Salino

TBS-T – Tampão Tris Salino Tween

TNF - do inglês, Tumor Necrosis Factor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Aplicações e vantagens da Terapia Fotodinâmica no tratamento de neoplasias 17	
1.2 Clorinas como fotossensibilizadores indutores de morte celular pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)	20
1.3 PDT e mecanismos intracelulares na indução de apoptose em células neoplásicas	22
1.4 Linhagens celulares como modelo de estudo do câncer.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Cultura Celular.....	29
3.2 Fotossensibilização celular.....	30
3.3 Determinação do coeficiente de absorvidade molar	32
3.4 Determinação do Log P.....	32
3.5 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores	33
3.6 Avaliação da atividade mitocondrial	33
3.7 Determinação da morte celular.....	34
3.7.1 Detecção da morte celular por microscopia de fluorescência	35
3.7.2 Detecção da morte celular por citometria de fluxo	35
3.8 Avaliação por Western blot da expressão da proteína p53.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Determinações do coeficiente de absorvidade molar	38
4.2 Determinações do Log P	39
4.3 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores	40
4.4 Avaliação da atividade mitocondrial	44

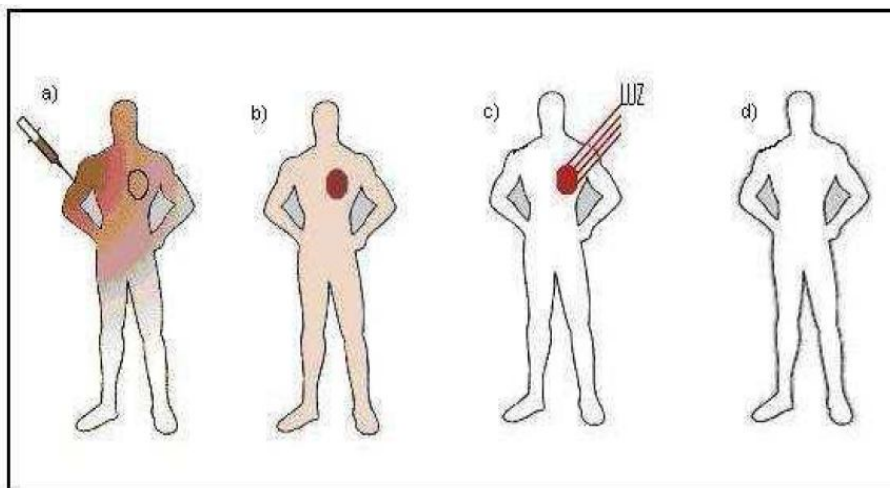
4.5	Determinação do tipo de morte celular após tratamento fotodinâmico com os fotossensibilizadores em estudo	46
4.5.1	Detecção da morte celular por microscopia de fluorescência	46
4.5.2	Detecção da morte celular por citometria de fluxo	56
4.6	Avaliação da expressão da proteína p53 por Western blot	60
5.	CONCLUSÕES	64
6.	REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aplicações e vantagens da Terapia Fotodinâmica no tratamento de neoplasias

A Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês, Photodynamic Therapy) tem sido estabelecida em diversos países como terapia alternativa ou coadjuvante para o tratamento de várias doenças malignas e não malignas. Essa terapia envolve a incorporação de um fotossensibilizador (FS) que é ativado pela luz e forma espécies reativas de oxigênio levando as células tumorais à morte por apoptose ou necrose¹. Para a incorporação do FS no paciente este pode ser administrado sistemicamente ou topicamente dependendo do tipo de tumor e sua localização. Os principais estágios da PDT são: aplicação (local ou sistêmica) do FS, acumulação do FS nas células-alvo, foto-ativação do FS e morte celular^{2; 3}, tais estágios estão representadas na figura 1.

Figura 1 - Esquema dos estágios envolvidos na Terapia Fotodinâmica: a) aplicação local ou sistêmica; b) acumulação; c) foto-ativação; d) morte celular.



Fonte: PASS, H., 1993.

A indução de morte celular representa o principal e ideal desfecho terapêutico almejado no tratamento de neoplasias uma vez que pode levar à erradicação do tumor. No entanto, os tratamentos indutores de apoptose não são seletivos para as células malignas e muitas vezes a efetividade e a aplicabilidade desses métodos são limitados pelos severos efeitos adversos resultantes em células não neoplásicas. Neste sentido a terapia fotodinâmica traz importantes vantagens, especialmente ao proporcionar maior controle tanto sobre a área tratada (ao permitir o direcionamento da luz sob o tecido a ser irradiado) quanto pela sua ação biológica (uma vez que seus efeitos somente ocorrem na presença da irradiação)^{4; 5}.

Outras características da Terapia Fotodinâmica a colocam em vantagem em relação aos tratamentos convencionais: o fato da acumulação do FS ser preferencial no tecido tumoral, a falta de resistência por acúmulo de mutações ocasionadas pela quimioterapia e radioterapia e a característica do fotossensibilizador de ser fluorescente, o que permite também uma distinção entre células malignas e não malignas, favorecendo o diagnóstico e o acompanhamento do tratamento. A acumulação preferencial dos fotossensibilizadores no tecido tumoral é devido à fisiologia anormal do tumor: drenagem linfática deficiente, vasculatura permeável, pH local baixo e aumento de receptores para lipoproteína de baixa densidade (alguns FSs porfirínicos possuem alta afinidade por LDL)^{6; 7}. A extensão do dano celular e da citotoxicidade causados pela PDT é multifatorial. Esse dano depende do tipo de FS, da localização do mesmo na célula, da dose total administrada, do tipo de irradiação utilizada, da disponibilidade de oxigênio na região e do tempo entre a administração do FS e a aplicação da irradiação⁸.

Apesar da PDT possuir várias vantagens em relação aos tratamentos convencionais, em alguns casos, o uso da PDT em conjunto com as terapias convencionais (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) têm sido empregados. Esses tratamentos combinados são geralmente indicados em casos de tumores profundos, uma vez que há uma limitação para a penetração da luz no tecido como um todo. Dessa forma, a PDT como adjuvante pode diminuir o crescimento tumoral, melhorar a qualidade de vida do paciente e até mesmo ajudar a erradicar o tumor⁹.

Outras estratégias também têm sido fornecidas para aumentar os efeitos da PDT como, por exemplo, a inserção de FS em micelas para aumentar sua

incorporação celular¹⁰, o uso combinado de dois FSs¹¹, a combinação de terapias (PDT com terapias convencionais ou com novas drogas inibidoras ou imunostimulantes), a conjugação de FSs com moléculas carreadoras, entre outros^{12; 13}.

No tecido biológico há vários componentes que podem interagir com a luz irradiada no local. Moléculas de água ou macromoléculas como proteínas e pigmentos podem absorver luz. Essa absorção ocorre a partir da interação de uma onda eletromagnética com uma partícula carregada, a qual então vibra na frequência da onda eletromagnética. Outro processo que pode ocorrer no tecido é o espalhamento da luz. Os tipos de interação da luz com os tecidos dependem do comprimento de onda de irradiação e das propriedades do meio irradiado. Para a PDT, apenas interações fotoquímicas e possivelmente interações térmicas são importantes. A principal proteína do sangue que absorve luz é a hemoglobina cujo sítio ativo, o grupo heme, é constituído de uma porfirina (absorção próxima a 425, 544 e 577 nm). Portanto, para a PDT é ideal FSs com absorção maiores que 600 nm (boa penetração nos tecidos). Em comprimentos de ondas maiores que 1200 nm a água tem uma absorção substancial e em comprimentos de onda maiores que 850 nm os fótons podem não ter energia suficiente para as reações fotoquímicas. Dessa forma, comprimentos de onda na faixa entre 600 a 800 nm são determinantes para a prática clínica da PDT, sendo tal faixa conhecida como janela terapêutica¹⁴.

As porfirinas constituem a primeira geração de fotossensibilizadores, sendo um exemplo comercial o derivado hidrossolúvel de hematoporfirina. O Photofrin[®] (oligômero de porfirina) foi aprovado em vários países da Europa, América (FDA - Food and Drug Administration), Ásia e Canadá para o tratamento de câncer esofágico e de pulmão¹⁵. O Photogem[®], produzido na Rússia, é a versão deste fotossensibilizador utilizada no Brasil. Entretanto, há alguns inconvenientes associados a esses fotossensibilizadores. A absorção de luz desses compostos é relativamente baixa na região onde há alta penetração de luz nos tecidos (vermelho). Há, também, um efeito prolongado de fotossensibilidade que persiste de 6 a 8 semanas após o tratamento clínico. Isso tem estimulado a pesquisa por novas substâncias fotossensíveis que absorvam em comprimentos de onda maiores e que possuam uma eliminação mais rápida do organismo¹⁶.

A segunda geração de fotossensibilizadores possui absorção em comprimentos de onda maiores, períodos de fotossensibilização mais curtos e taxas de produção de oxigênio singlete mais elevadas. Essa classe engloba as clorinas, ftalocianinas, benzoporfirinas, bacterioclorinas, hipericina, entre outros. A Hipericina é um dos mais notáveis agentes fotossensibilizadores que existe sendo um dos componentes da popular erva de São João (*Hypericum perforatum*). É também conhecida por sua atividade antidepressiva, antitumoral e antibiótica. Quando exposta à luz, a hipericina forma espécies reativas de oxigênio que causam danos na área que foi irradiada com luz. Por essa propriedade de ser fotoativada, tal substância torna-se útil para a Terapia Fotodinâmica¹. Estudos conduzidos em nosso laboratório caracterizaram a hipericina com um bom fotossensibilizador tanto em células como em microorganismos, além de ter um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e boa acumulação intracelular^{17; 18}.

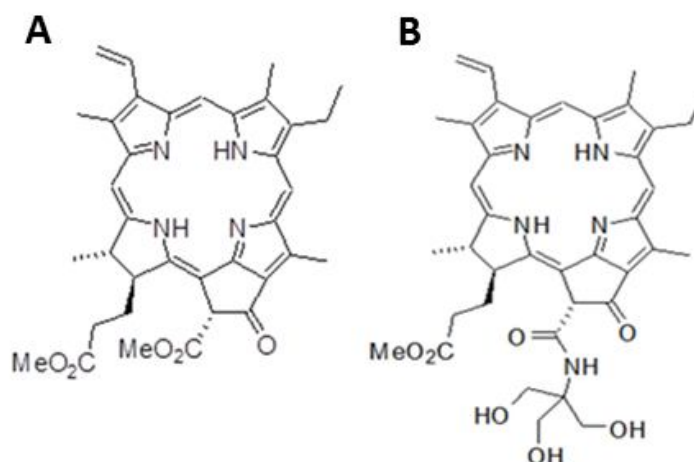
1.2 Clorinas como fotossensibilizadores indutores de morte celular pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Um fotossensibilizador comercial de segunda geração aprovado na Europa é o Foscan[®], uma clorina utilizada no tratamento paliativo em pacientes com recorrência de câncer de cabeça e pescoço¹⁹. Num caso clínico reportado numa paciente com carcinoma adenoide cístico de língua, a PDT com Foscan[®] melhorou significativamente a deglutição e a fala da paciente²⁰. Um estudo clínico com 21 pacientes com carcinoma basal de língua mostrou uma boa efetividade do Foscan[®] na melhora da respiração, fala e deglutição²¹. As clorinas também têm sido estudadas por nosso grupo e vem apresentando um excelente potencial na Terapia Fotodinâmica,^{22; 23} entretanto, há ainda esforços empreendidos para tornar tais moléculas mais anfifílicas^{24; 25}.

Clorinas são geralmente derivadas da clorofila α que por sua vez são derivadas das porfirinas. As clorinas possuem um de seus anéis pirrólicos na forma reduzida quando comparadas com às porfirinas o que resulta em maior absorvidade molar nas bandas Q (próximo a 650nm) devido a um decréscimo de simetria. Apesar de essa banda estar dentro da janela terapêutica para a Terapia

Fotodinâmica, essas clorinas não possuem uma boa solubilidade o que prejudica sua utilização em PDT²⁶. Devido a essa característica hidrofóbica, foi sintetizada uma clorina mais hidrosolúvel (CHL-T, figura 2) a partir de uma clorina (CHL), figura 2) com o grupo solubilizante TRISMA, a fim de se obter um fotossensibilizador mais adequado para a PDT, ou seja, anfifílico e o que deve levar a um melhor desempenho fotodinâmico. Essa síntese foi realizada pelo Prof. Kleber T. Oliveira do Grupo de Síntese Bioorgânica do Departamento de Química da UFSCar que tem larga experiência em síntese de fotossensibilizadores^{27; 28; 29; 30; 31}.

Figura 2 - Estrutura da CHL (A) e CHL-T (B).



Os fotossensibilizadores quando absorvem luz são excitados ao primeiro estado singlete. Este, por sua vez, pode desencadear um processo onde o spin do elétron excitado se inverte para formar o chamado estado excitado triplete com spins paralelos. O FS no estado triplete pode ocasionar dois tipos de reações: a reação tipo I na qual o FS no estado triplete pode reagir diretamente com o substrato (moléculas da membrana celular ou outras moléculas) e a reação tipo II em que o FS no estado triplete pode transferir energia diretamente para uma molécula de oxigênio, formando o oxigênio singlete (¹O₂). Tanto a reação tipo I quanto a tipo II resultam na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são tóxicas para várias estruturas celulares. Somente moléculas e estruturas próximas à área de produção de ROS são diretamente afetadas por PDT³².

Devido ao curto período de meia-vida do oxigênio singlete, essa molécula citotóxica pode difundir-se por apenas 20 nm nas células, portanto, a localização do FS nas células determina qual organela será primeiramente danificada. Considera-se frequentemente que FSs localizados nas mitocôndrias induzem apoptose e FSs localizados na membrana plasmática e outras organelas induzem primariamente necrose. Entretanto, na prática, tais mecanismos diferenciais de morte celular induzida por PDT podem ser observados definindo-se diferentes concentrações e intensidade luminosa *in vitro*³³.

1.3 PDT e mecanismos intracelulares na indução de apoptose em células neoplásicas

Há três principais mecanismos em que a PDT destrói as células neoplásicas: a morte direta das células tumorais pela produção de ROS, o dano à vasculatura relacionado com o tecido tumoral e a ativação do sistema imune contra as células cancerígenas. Cada um desses mecanismos pode influenciar uns aos outros, sendo em conjunto responsáveis pela erradicação do tumor. O dano causado nas células pode desencadear apoptose que é ativada por várias vias intracelulares^{8; 33; 34; 35}.

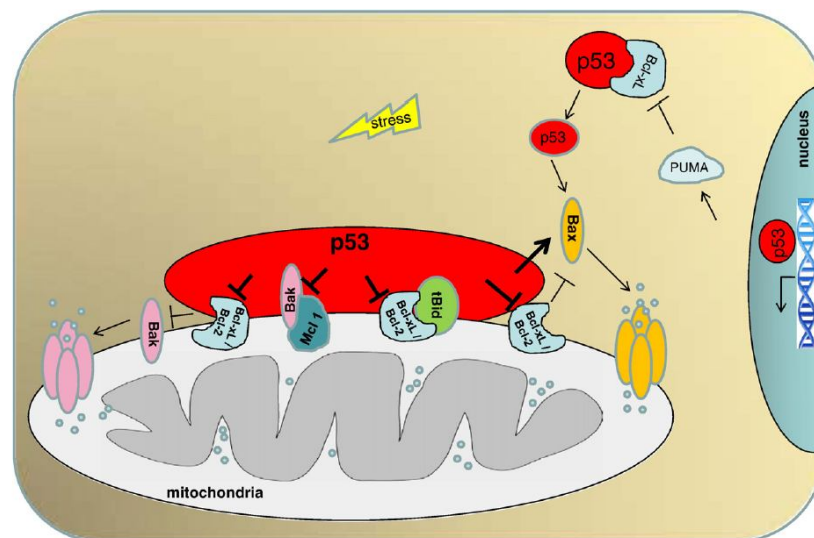
A transformação de células humanas normais em células malignas envolve um complexo processo de multi-etapas em que é alterado desde o genoma até as respostas das vias intracelulares³⁶. As células modificadas por esse processo tumoral desenvolvem resistência e um microambiente particular que lhes conferem vantagens para sobreviver. Para superar tais resistências, novos fármacos têm sido estudados. O entendimento de como a sinalização intracelular dessas células neoplásicas funciona tem auxiliado no descobrimento de novos compostos que possam driblar esse comportamento indestrutível do tumor³⁷.

Inúmeros estudos mostram a habilidade da PDT em iniciar o processo de apoptose dependendo da linhagem celular, do FS da localização celular do mesmo, da dose de luz, entre outras condições^{38; 39; 40}. A hipericina, por exemplo, é capaz de induzir cerca de 90% de apoptose em células malignas dependendo da dose de luz

As mitocôndrias possuem função como coordenadores cruciais em diferentes vias de apoptose desencadeadas por PDT. A natureza do FS, a sua distribuição intracelular, a dose de luz, o estado metabólico das células cancerosas, bem como o microambiente, em última instância, regulam a sinalização dos diferentes caminhos que são ativados pela PDT. Estas vias regulatórias controlam rigorosamente a decisão de vida ou morte celular e a identificação de quais vias estão envolvidas nesse processo podem ter implicações terapêuticas⁴⁸.

Dentro destas vias a proteína p53 exerce um importante papel na regulação da apoptose, ciclo, senescência celular e reparo do DNA. Quando a célula recebe um sinal de *stress*, a proteína p53 é translocada para a mitocôndria e interage com as proteínas da família Bcl-2 inibindo-as ou ativando-as. A ação direta da p53 permeabiliza a membrana mitocondrial, desencadeando a cascata de caspases e condensação da cromatina. A proteína p53 interage com Bcl-x1 e Bcl-2 (proteínas anti-apoptóticas) e neutraliza seus efeitos inibitórios sobre as proteínas Bax e Bak (proteínas pró-apoptóticas) que são capazes de formar poros na membrana mitocondrial (figura 4)⁴⁹.

Figura 4 - Ação da proteína p53 frente a um sinal de *stress*.



Fonte: VASEVA, A. V.; MOLL, U. M., 2009.

Os mecanismos de apoptose desencadeados pelas espécies reativas de oxigênio geradas pela PDT incluem ativação de receptores, ativação de caspases, proteínas da família Bcl-2 e disfunção mitocondrial^{47; 50}. Esse dano mitocondrial causado pela fotossensibilização tem sido associado com a via intrínseca da apoptose e muitos estudos tem focado nas proteínas da família Bcl-2⁵¹. Relata-se que algumas células tumorais que superexpressam a proteína Bcl-2 possui uma resistência à apoptose que pode ser superada na PDT com o aumento da dose de luz e da concentração do FS⁵². Também há estudos que indicam o citocromo c como desempenhando um importante papel na resposta apoptótica caspase-dependente⁵³. Células expostas a oxigênio singlete podem se adaptar à nova situação, regulando o reparo celular, o crescimento celular e a morte celular. Algumas vias, como as das MAPKs, têm sido estudadas em resposta ao estresse ambiental (exposição à $^1\text{O}_2$) por regularem fatores de transcrição e por fazerem o balanço entre a sobrevivência celular e a apoptose⁴⁵.

A necrose é outro tipo de morte desencadeada depois de um dano ou lesão celular que pode ser ocasionado pós disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, depleção de ATP ou proteólise⁵⁴. Ela é caracterizada por uma rápida e violenta degeneração generalizada que afeta a população celular, caracterizada *in vitro* por uma turgescência citoplasmática, rompimento antecipado de organelas e da membrana plasmática com liberação de componentes celulares e inflamatórios. Ao contrário da apoptose que caracteriza-se por encolhimento celular, aparecimento de corpos apoptóticos (fragmentos celulares em vesículas) e a permanência por mais tempo das estruturas das organelas e da membrana plasmática. Dependendo do estímulo, do tipo celular e do estágio de desenvolvimento do tecido pode-se desencadear um determinado tipo de morte celular. Algumas vias transducionais podem ser áreas de interesse para a avaliação de apoptose como: níveis de expressão de cálcio, efeitos no metabolismo de lipídeos, expressão de tirosinas-quinases, fatores de transcrição, moléculas de adesão celular e citocinas. Assim, a ativação destas vias de sinalização pode levar às diferentes respostas celulares^{34; 55; 56}.

Dependendo da dose de luz e da concentração do FS utilizada na PDT, as células podem responder ao dano de forma a desencadear necrose, apoptose ou evasão à apoptose (capacidade de sobrevivência das células tumorais). Para tanto,

o entendimento das vias celulares envolvidas no foto-dano é imprescindível para uma relação funcional entre a apoptose e a resposta de evasão. Estudos recentes têm evidenciado a importância de se identificar os elementos moleculares dentro da resposta à PDT para permitir a utilização de estratégias (como por exemplo, o uso concomitante de inibidores de proteínas específicas) que melhorem a eficiência da PDT⁵⁷. Todas essas moléculas sinalizadoras que induzem às diferentes vias de morte celular podem ser importantes alvos para induzir ou aumentar o foto-dano em células cancerígenas⁵⁸.

1.4 Linhagens celulares como modelo de estudo do câncer

Em 1907, Harrison desenvolveu a técnica do cultivo celular. Logo após, em 1910, Burrows e Carrel cultivaram células embrionárias de aves. Tais técnicas utilizadas por esses pesquisadores só possibilitavam a permanência destas células por poucas semanas fora do tecido vivo⁵⁹. Em 1940, Earle e George Gey conseguiram cultivar continuamente células de roedores e, em 1951, George, Margharet Gey e Mary Kubicek desenvolveram a primeira célula tumoral humana em cultivo contínuo, a HeLa. Muito do conhecimento sobre os processos fundamentais que ocorrem nas células humanas deve-se ao uso extensivo da HeLa e de outras linhagens celulares, sendo que o suprimento de estudos com as mesmas continuará contribuindo para novas descobertas. Dados de levantamentos mostram que três quartos das publicações em pesquisas com câncer usam linhagens celulares, totalizando mais de 112 em uso⁶⁰.

Nos estudos com PDT também são amplamente utilizadas as linhagens celulares para se demonstrar a ação fotodinâmica na morte celular^{61; 62; 63}. A apoptose foi primeiramente descrita em 1972⁶⁴ e somente em 1991 Agarwal *et al* demonstraram a apoptose como resposta à PDT⁶⁵. A descoberta de que a PDT pode desencadear morte celular em células malignas foi um ponto crucial para a disseminação de novos estudos nesta área tanto *in vitro* como *in vivo*⁶⁶.

A partir do estabelecimento da cultura de células de um câncer cervical (HeLa) outras linhagens também foram desenvolvidas a partir de outros tecidos

tumorais. O uso de células em culturas tem sido disseminado, nos últimos anos, em estudos para os mais diversos tipos de cânceres. Dessa forma, o estabelecimento dessas linhagens tem contribuído para o surgimento de novas drogas e terapias contra tais neoplasias⁶⁰. Nesse estudo optou-se por duas linhagens celulares: HeLa (câncer de cervical), por ser uma cultura celular bem estabelecida e estudada na PDT e HEP-2, por ser uma linhagem com origem no câncer de laringe (tipo de câncer de cabeça e pescoço para o qual já é indicado o uso da PDT com a clorina Foscan[®]).

Considerando-se que grandes avanços têm sido alcançados com os estudos da PDT, que existe uma baixa toxicidade nessa terapia a longo termo e que o primeiro tratamento foi realizado a mais de cem anos, era de se esperar que essa terapia já estivesse estabelecida na clínica, sendo, entretanto, oferecida somente em centros seletos. Nos últimos anos, porém, observa-se uma maior aceitação da PDT como terapia alternativa para o tratamento de câncer e espera-se que novos estudos continuem contribuindo para essa aceitação⁶⁷.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar os efeitos citotóxicos e moleculares de um derivado de clorina sintetizado no Brasil pelo Prof. Dr. Kleber T. de Oliveira visando tornar esse fotossensibilizador mais anfifílico (CHL-T) e, portanto menos propenso à agregação. Os objetivos específicos foram: i) delinear as condições da PDT (dose de luz, concentração e tempo de incubação dos fotossensibilizadores) nas quais hipericina (HY), clorina de origem (CHL) e clorina modificada (CHL-T) induzem apoptose nas linhagens celulares (HEp-2 e HeLa), ii) Identificar a citotoxicidade e o tipo de morte celular (apoptose ou necrose) que é induzida por cada um desses fotossensibilizadores, iii) analisar a expressão da proteína p53 (pró-apoptótica) relacionada com o aumento da apoptose ou com a senescência celular bem como da proteína constitutiva GAPDH nas células submetidas ao tratamento fotodinâmico na presença de cada um desses fotossensibilizadores a fim de identificar o mecanismo de morte celular induzido por cada um deles.

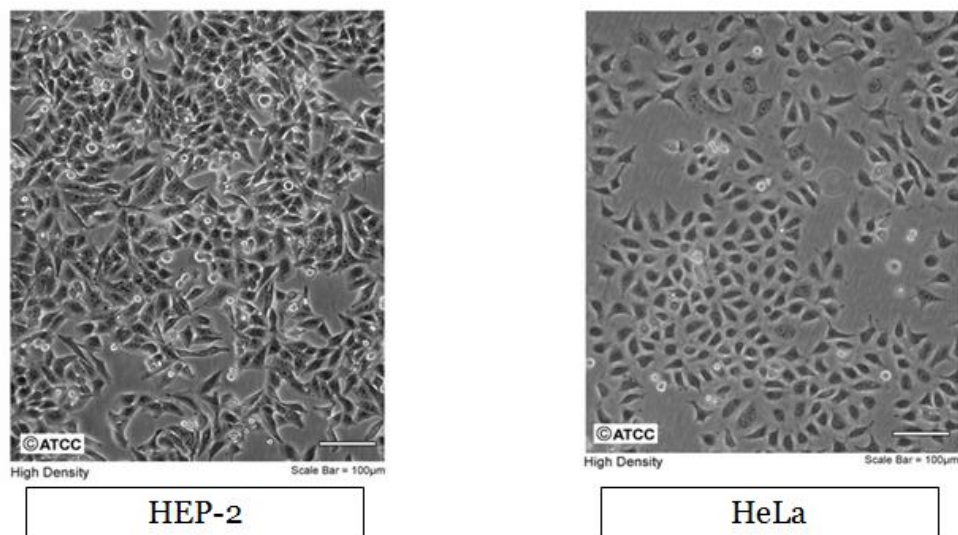
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

Foram utilizadas nos experimentos células de carcinoma cervical humano (HeLa ATCC[®] CCL-2[™]) cedidas gentilmente pela prof. Dra. Ilce Mara S. Cólus da Universidade Estadual de Londrina e de carcinoma de laringe humano (HEp-2 ATCC[®] CCL-23[™]) adquiridas do Instituto Adolfo Lutz. As células (figura 5) foram cultivadas em meio de cultura Iscove's suplementadas com 10% de soro fetal bovino e com 0,01% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) em frascos de cultura de polipropileno e mantidas em estufa a 37⁰C e 5% CO₂. As passagens foram realizados em capela de fluxo laminar (ambiente estéril) e apenas materiais esterilizados foram utilizados⁶⁸.

Para a passagem celular, removeu-se primeiramente o meio antigo e as células foram lavadas com PBS para retirar o excesso deste meio. Para desagregar as células aderidas ao material de polipropileno, adicionou-se 1 mL da enzima proteolítica tripsina deixando agir por no máximo 5 minutos. Em seguida, adicionou-se meio de cultura com soro para a inativação da tripsina. As células foram então transferidas para um tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 1000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de meio novo. Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi retirada para contagem celular em hemocítômetro. Para determinação da viabilidade celular, foi utilizado o corante azul de tripan que é incorporado seletivamente pelas células não viáveis⁶⁹. Para todos os experimentos a viabilidade celular mínima considerada para o plaqueamento foi de 90%.

Figura 5 – Linhagens celulares utilizadas como modelo de estudo

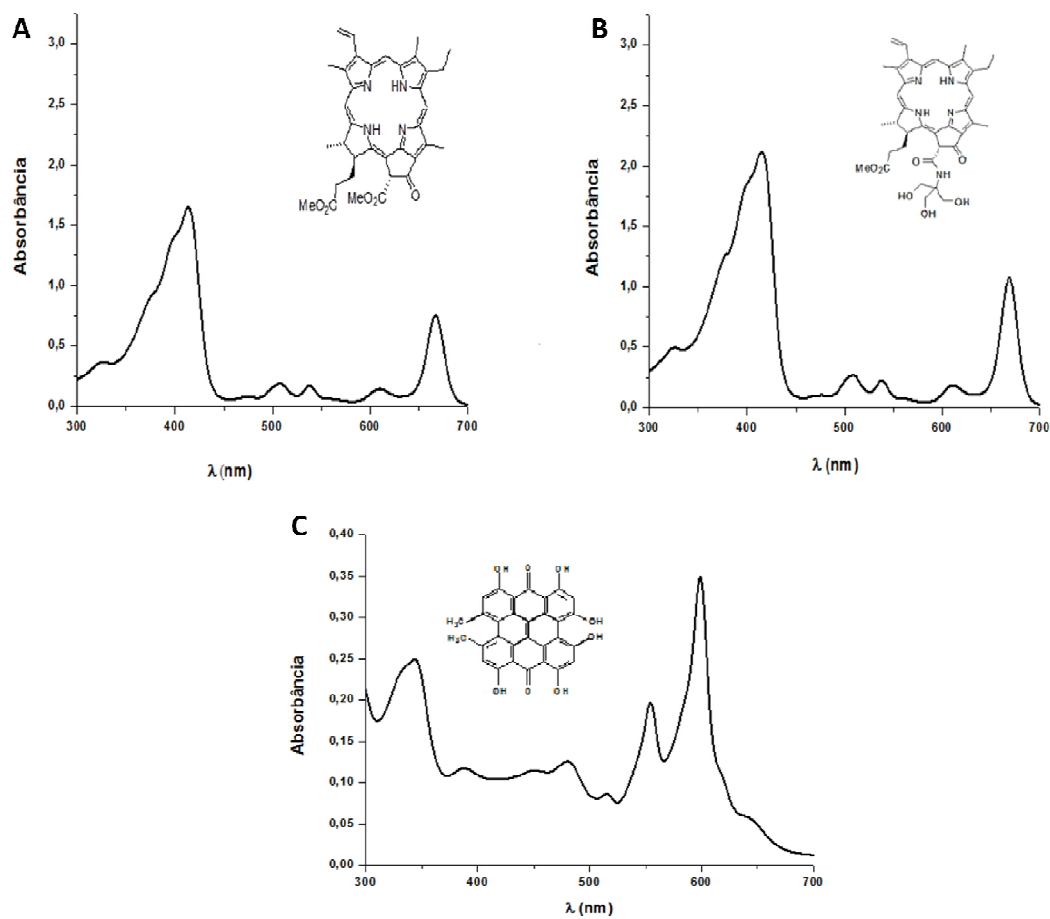


Fonte: ATCC

3.2 Fotossensibilização celular

Os FSs utilizados nos experimentos foram: hipericina (HY), clorina (CHL) e a clorina-TRISMA (CHL-T). A hipericina foi sintetizada pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC. As clorinas foram sintetizadas pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira da Universidade Federal de São Carlos. As soluções-estoque foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os espectros de absorção dos FSs estão apresentados na figura 6 e as medidas de absorção óptica foram obtidas utilizando-se o espectrofotômetro HITACHI 2800 e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Figura 6- Espectros de absorção dos fotossensibilizadores na concentração de 2×10^{-5} M. A: CHL, B: CHL-T e C: HY.



Para os ensaios fotodinâmicos, as células foram pré-incubadas com diferentes concentrações de CHL, CHL-T ou HY por um período previamente determinado por ensaios de acumulação celular em condições de pouca luminosidade e em seguida foram submetidas à irradiação em comprimento de onda de 630 ± 10 nm empregando-se mesa ótica denominada Biotable (figura 7) construída com 40 LEDs vermelhos desenvolvida pelo Grupo de Ótica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC).

Figura 7- Sistema de LEDs vermelhos para irradiação celular em placas (630 ± 10 nm).



3.3 Determinação do coeficiente de absorvidade molar

Através da lei de Lambert-Beer o coeficiente de extinção molar (ϵ) foi calculado para a CHL e CHL-T, com auxílio do software OriginPro 8, a partir dos valores de absorvância de uma solução estoque preparada em DMSO na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HITACHI U2800).

3.4 Determinação do Log P

O logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$) da CHL-T foi determinado pelo método proposto por POOLER E VALENZENO (1979) empregando a mistura octanol/PBS para avaliar a hidrofobicidade destes compostos⁷⁰. Foram utilizados os solventes imiscíveis PBS (solução salina tamponada com fosfato) e 1-octanol. Primeiramente, preparou-se uma solução de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do FS em octanol e obteve-se o espectro de absorvância. Em duplicata, adicionou-se 2 mL da solução de FS preparada mais 2 mL de PBS saturado e em agitação constante por 3h promoveu-se a partição entre a fase orgânica e a aquosa. Após este período, transferiu-se a mistura agitada para tubos cônicos e a mesma foi centrifugada por 10 min a 1000 rpm. Em seguida, a concentração do FS no sobrenadante (fase orgânica) foi obtida espectroscopicamente no comprimento de onda do máximo da banda de absorção (670 nm). O cálculo do logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$) foi realizado através da equação abaixo:

$$\log P = \left[\frac{(\text{Abs}_A)}{(\text{Abs}_D)} - 1 \right] \frac{V_{\text{PBS}}}{V_{\text{OCT}}}$$

Sendo:

Log P: logaritmo do coeficiente de partição

Abs_A: absorção ótica da solução antes da partição

Abs_D: absorção ótica da solução após a partição

V_{PBS}: volume de PBS em mL

V_{OCT}: volume do 1-octanol em mL

É conhecido que se $\log P < 0$, o composto tem caráter hidrofílico; se $\log P > 1,5$, o composto tem caráter lipofílico e se $0 \leq \log P \leq 1,5$, o composto tem caráter anfifílico⁷¹.

3.5 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores

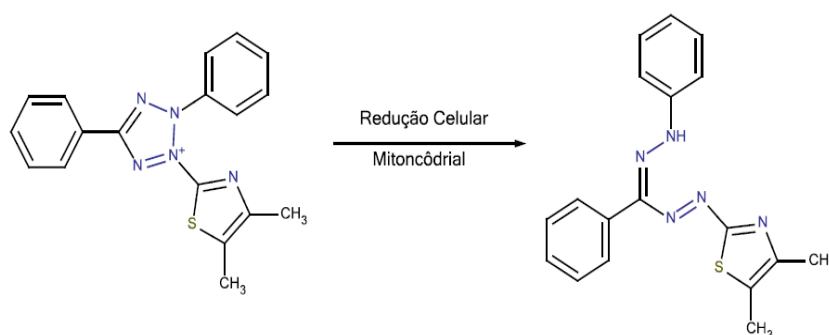
Após 1; 2; 4; 8; 16 e 24 h de incubação com cada FS nas duas linhagens celulares (HEp-2 e HeLa), as células foram lisadas e a fluorescência determinada em fluorímetro para análise da quantidade de FS incorporada pelas células em função do tempo de incubação^{17; 72}. As fluorescências obtidas nos testes de acumulação dos FSs foram normalizadas pela concentração de proteína nas amostras determinadas através do Método de Lowry que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu que se liga a aminoácidos aromáticos resultando em uma coloração azul⁷³. Os dados foram analisados no programa OriginPro 8.

3.6 Avaliação da atividade mitocondrial

A atividade enzimática mitocondrial (comumente interpretada como diretamente proporcional e representativa da viabilidade e proliferação celular) foi estimada pelo ensaio com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT)⁷⁴. Para esses ensaios, foram plaqueadas 2×10^4 células por poço com meio

de cultura em placas de 96 poços. Após 24h na estufa de CO₂ a 37⁰C, incubou-se as diferentes concentrações dos FSs nos tempos de 2 h e 16 h (pré-determinados nos ensaios de acumulação). Após o período de incubação com os FSs, as células foram lavadas com PBS e irradiadas. Esperou-se 24 h ou 48 h pós-irradiação para incubá-las com o MTT por 4 h e em seguida solubilizou-se os cristais de formazan formados em 50 µL de etanol absoluto mais 150 µL de álcool isopropílico. Por meio de medidas de absorvância em 570 nm foram determinadas as concentrações inibitória média (IC₅₀) dos FSs nas linhagens celulares, calculadas pelo programa CalcuSyn⁷⁵. Controles não tratados e tratados apenas com os FSs sem irradiação também foram realizados paralelamente, assim como controles apenas com irradiação. Esta metodologia é amplamente utilizada na literatura e seu princípio é que em células viáveis, enzimas mitocondriais reduzem o substrato (MTT) formando um subproduto azul insolúvel em água que quando dissolvido em solvente orgânico absorve em 570 nm. A reação dessa redução está representada na figura 8. A leitura das amostras foi realizada por meio da absorvância determinada em leitor de microplacas (Versa Max, Molecular Devices).

Figura 8 – Reação de redução do MTT pela enzima succinato desidrogenase.



3.7 Determinação da morte celular

A morte celular (apoptose e necrose) induzida pelo processo fotodinâmico foi avaliada de duas formas: por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo.

3.7.1 Detecção da morte celular por microscopia de fluorescência

Nesta técnica foi utilizada a marcação das células com brometo de etídio e alaranjado de acridina. Sabe-se que as células que sofrem necrose ficam marcadas em vermelho pelo brometo de etídio, pois este composto só penetra nas células que perderam a integridade de membrana. Já as células que sofrem apoptose aparecem verdes com presença de corpos apoptóticos marcados pelo laranja de acridina ou aparecem alaranjadas se marcadas pelos dois fluorocromos. As células vivas são marcadas por laranja de acridina e aparecem verdes e com estruturas organizadas que podem ser observadas no microscópio de fluorescência⁷⁶.

Foram plaqueadas 1×10^6 células por poço em placas de 6 poços. Após 24 h, incubou-se os FSs com diferentes concentrações por 2 h e 16 h. A seguir, lavou-se as células com PBS para retirar o FS que não foi incorporado após estes períodos de incubação e em seguida as células foram irradiadas. Após 24 h da irradiação, as células foram removidas das placas com tripsina e transferidas para tubos de 15 mL, centrifugadas e o sobrenadante foi descartado, deixando-se aproximadamente 500 μL , onde o precipitado de células foi ressuscitado. Alíquotas de 20 μL de cada amostra foram transferidas para microtubos e estas foram marcadas com 1 μL de uma solução de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de laranja de acridina e brometo de etídio diluídos em PBS. Imediatamente após a marcação, as células marcadas foram colocadas em lâminas de vidro e sobrepostas com lamínulas para sua visualização em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) no aumento de 20x, filtro de excitação de 460/90 nm, espelho dicromático de 500nm e filtro de barreira de 520 nm. Imagens de cinco campos de cada lâmina (amostra) foram capturadas pela câmera Olympus DP72. Para a análise estatística dos dados utilizou-se o programa GraphPad Prism com o teste ANOVA seguido de Tukey.

3.7.2 Detecção da morte celular por citometria de fluxo

As células apoptóticas puderam ser detectadas por citometria de fluxo através da marcação da anexina V que atua como indicativo de apoptose inicial e

incorporação de iodeto de propídio (PI) como indicativo de apoptose avançada empregando-se kit comercial (FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD, Biosciences). A marcação com FITC- anexina V precede a perda da integridade de membrana, as células em apoptose inicial são PI negativas e FITC- anexina V positivas. Já a apoptose tardia é FITC- anexina V e PI positivas. As células viáveis apresentam-se com FITC- anexina V e PI negativas. O procedimento de marcação das células foi realizado segundo instruções do fornecedor do reagente, brevemente: ao final de cada período experimental (24 h pós-irradiação), todas as células foram coletadas (por centrifugação do meio de cultura contendo as células eventualmente em suspensão), resuspendidas em tampão de marcação (PBS com 2% de albumina de soro bovino-BSA), contadas em hemocitômetro e resuspendidas em tampão de ligação (*binding buffer*, fornecido junto com o kit) acrescido de Anexina V conjugada à Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e de iodeto de propídio (PI). Após 15 min de incubação (a temperatura ambiente e ao abrigo da luz), as células foram centrifugadas, resuspendidas em tampão de ligação e levadas ao citômetro de fluxo (FACS Verse, BD Biosciences) para aquisição dos dados. Como controles experimentais e também para ajuste das voltagens dos fotodetectores de *Forward* (tamanho) e *Side scatter* (granulosidade), bem como dos fotodetectores dos canais de detecção de emissão de FITC e PI, foram preparadas amostras não marcadas com anexina-FITC/PI, amostras marcadas apenas com Anexina-FITC e amostras marcadas apenas com PI. Estas análises foram realizadas considerando os dados de um mínimo de 10.000 eventos adquiridos em dois experimentos independentes. Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAR, UNESP em colaboração do Prof. Dr. Carlos Rossa Junior. Para a análise estatística dos dados utilizou-se o programa GraphPad Prism com o teste ANOVA seguido de Tukey.

3.8 Avaliação por Western blot da expressão da proteína p53

Para os ensaios de Western blot foram plaqueadas 1×10^6 células por poço em placas de 6 poços. Após 24 h, incubou-se os FSs na concentração de $0,52 \mu\text{M}$ por 2 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e irradiadas. A extração das

proteínas foi realizada 24 h após a irradiação. As amostras de proteínas foram coletadas utilizando o tampão de lise da Cell Signaling acrescido do coquetel de inibidores de proteases (*complete EDTA-free*, Santa Cruz).

A quantificação protéica foi realizada com o método de Bradford (Bio-Rad) e 40 µg de cada amostra foram preparadas em um tampão contendo glicerol, SDS, DTT e azul de bromofenol para a separação eletroforética. Essa mistura foi levada à fervura a 95 °C por 5 min e depois deixadas no gelo por 5 min. As amostras foram então carregadas nos poços de géis de poli(acrilamida) à 12% para resolução por eletroforese descontínua (SDS-PAGE) com voltagem constante de 100 V por 80 minutos. Logo em seguida, os géis foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose com poros de 0,2 µm pelo sistema da Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h em tampão Tris-NaCl (TBS) contendo 5% de leite desnatado. Terminando esse período de bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-T (Tris-NaCl Tween) e em seguida incubadas *overnight* com os anticorpos primários para a proteína pró-apoptótica p53 na diluição de 1:4000 e para a proteína constitutiva GAPDH na diluição 1:1000. No dia seguinte foram incubados os anticorpos secundários anti-rabbit IgG para GAPDH e anti-mouse para p53 (*Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, #7074 - Cell Signaling* e *Anti-biotin, HRP-linked Antibody, #7075 – Cell Signaling*).

A detecção das proteínas foi feita por um sistema de quimioluminescência (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate – Pierce Thermo Scientific*) e a quantificação relativa realizada por análise densiométrica das imagens digitalizadas com a ajuda do software Image J. Para a análise estatística usou-se o teste t de Student (IC 95%) no programa GraphPad Prims.

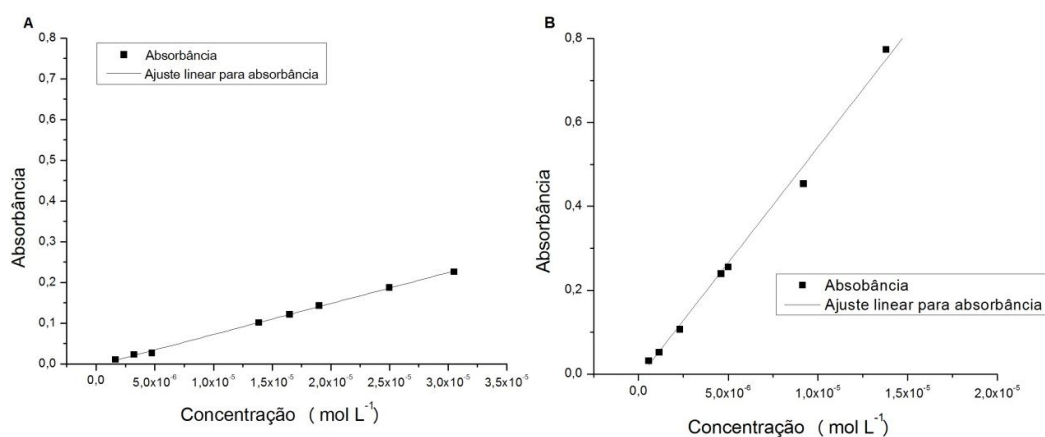
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinações do coeficiente de absorvidade molar

O coeficiente de absorvidade molar foi determinado no comprimento de onda 667 nm para a CHL dissolvida em DMSO obtendo-se o valor de $2,29 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ através da curva de calibração gerada no programa OriginPro 8 (figura 9A).

Para CHL-T foi determinado o valor de ϵ ($5,53 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) no comprimento de onda 670 nm, empregando-se DMSO como solvente (figura 9B). A substituição do grupo metoxila (função éster) pelo grupo TRISMA na carbonila proporciona aumento na polaridade da molécula aumentando, assim, a solubilidade em água e diminuindo a agregação. A absorvidade molecular é modificada quando as moléculas estão agregadas, pois seus orbitais interagem modificando uma serie de propriedades⁷⁷. Com o aumento da solubilidade da CHL-T, esta absorve mais fótons o que aumenta o seu valor do ϵ comparado com o valor do ϵ da CHL.

Figura 9 – Curva de calibração para determinação do coeficiente de absorvidade molar. A: CHL, equação da reta: $y = -0,0037 2,29 \times 10^4 x$ e $r^2 = 0,998$; B: CHL-T, equação da reta: $y = -0,0016 + 5,53 \times 10^4 x$ e $r^2 = 0,992$.



O valor do $\epsilon_{599\text{nm}}$ da hipericina em DMSO de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi obtido no Grupo de Fotossensibilizadores do IQSC anteriormente¹⁸. A partir destes valores de coeficiente de extinção molar, as concentrações das soluções estoque diluídas foram determinadas.

Tabela 1 - Coeficiente de extinção molar dos FSs estudados.

FS	Comprimento de onda (nm)	Coeficiente de absorvidade molar (ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
CHL	667	$2,29 \times 10^4$
CHL-T	670	$5,53 \times 10^4$
HY	599	$2,1 \times 10^4$

4.2 Determinações do Log P

Para ter informações sobre a lipofilicidade da CHL-T, foi calculado o Log P a partir do coeficiente de partição (octanol/PBS) dessa nova clorina, obtendo-se $-1,48 \pm 0,05$ o que sugere que esse FS tem um caráter hidrofílico. Deve-se mencionar que não foi possível obter o Log P para a CHL, pois a mesma não particiona no sistema (octanol/PBS) utilizado. Isso provavelmente se deve ao grande caráter lipofílico dessa molécula, sendo necessário outro tipo de caracterização para conhecer a lipofilicidade dessa clorina.

Em estudos anteriores do grupo, o Log P obtido para a hipericina foi de $1,20 \pm 0,02$ ¹⁷ o que confere a este FS um caráter anfifílico. Um valor menor para o log P da CHL-T sugere que esta clorina é mais hidrofílica que a hipericina, fato que corrobora com os valores de coeficiente de absorvidade molar obtidos.

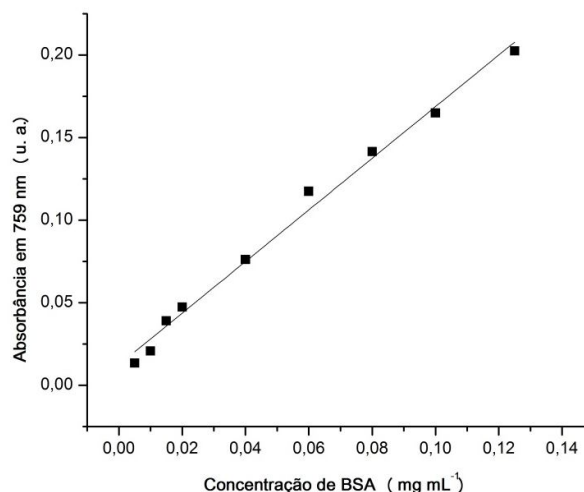
A PDT baseia-se na seletividade que o FS tem pelas células tumorais, na irradiação com luz de baixa intensidade e na luz de comprimento de onda apropriado para ativar o FS com alta penetração no tecido⁸. O tratamento de tumores com o uso de porfirinas como FS foi aprovado em vários países. Estratégias de síntese de novos derivados porfirínicos, principalmente de clorinas, tem sido também desenvolvidas com o objetivo de melhorar a eficiência destes FSs³⁰. Clorinas anfifílicas tem mostrado excelentes características fisico-químicas e demonstram potencial para atuar como FS em PDT³¹. O resultado obtido de Log P igual a $-1,48 \pm 0,05$ para a CHL-T, por indicar hidrofilicidade desta molécula, mostra uma característica favorável, pois sabe-se que substâncias mais hidrofílicas possuem a vantagem de serem melhor distribuída na corrente sanguínea, por exemplo e boa atividade biológica⁷⁸. Esse valor indica que houve um aumento da solubilidade da CHL após ter sido adicionado o grupamento TRISMA à clorina.

Estudos conduzidos com microorganismos demonstraram que o tampão TRIS (trishidroximetil aminometano) modifica a permeabilidade da membrana plasmática⁷⁹. Dessa forma, pode-se sugerir que além da solubilidade aumentada pelo grupo TRISMA, este também contribui na permeabilização através da membrana plasmática celular.

4.3 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores

O ensaio de acumulação consiste na incubação do FS em função do tempo e, em seguida, a lise das células para a determinação da fluorescência advinda da presença de diferentes quantidades do FS intracelular. Primeiramente, foi obtida uma curva padrão da absorbância da BSA em 750 nm (figura 10) que foi utilizada para estimar os valores das concentrações proteicas de cada amostra, para assim normalizar os valores de fluorescência obtidos.

Figura 10 – Curva padrão de BSA em 750 nm. r^2 : 0,990.



Para cada FS foram obtidas as curvas analíticas por fluorescência em diferentes concentrações em etanol. As figuras 11 e 12 apresentam os espectros de emissão da CHL e CHL-T e suas respectivas curvas analíticas.

Figura 11 – A: Espectros de emissão de soluções de CHL em diferentes concentrações em etanol. B: Curva analítica da CHL a partir das intensidades de fluorescência em 674 nm. I.F. = 8.6604 + 342.7445 x [CHL], r^2 : 0,996.

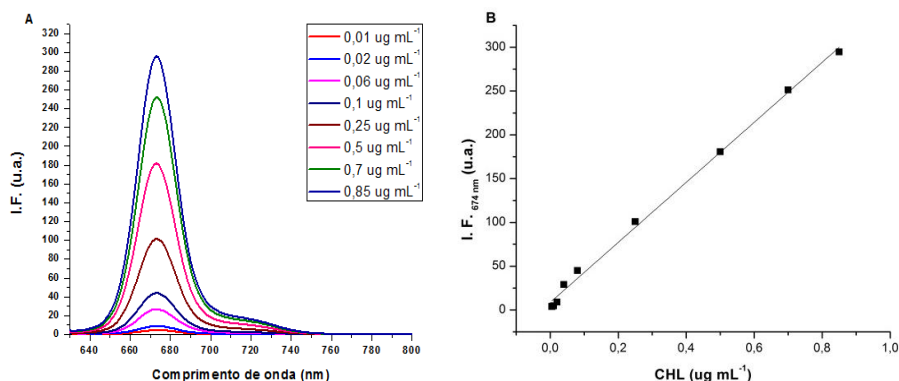
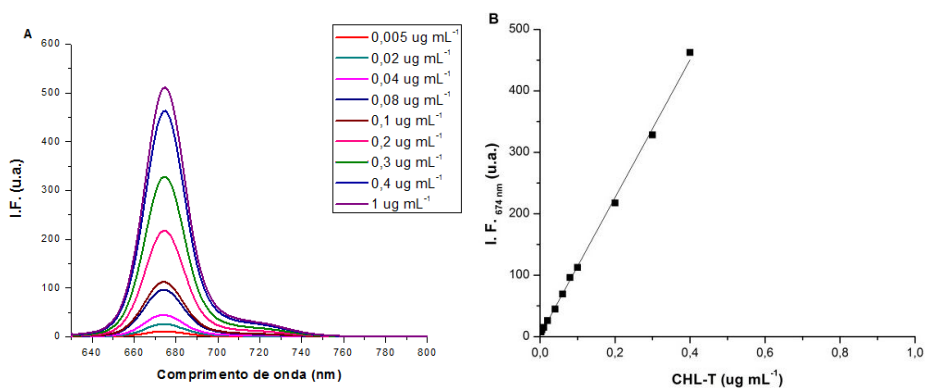


Figura 12 - A: Espectros de emissão de soluções de CHL-T em diferentes concentrações em etanol. B: Curva analítica da CHL-T a partir das intensidades de fluorescência em 674 nm. I.F. = 2.48511 + 1120.36 x [CHL-T], r^2 : 0,998.



Para a HY a curva analítica foi obtida por Lima, A. M.¹⁸, sendo $I.F._{597\text{ nm}} = 0,05 + 302,54 \times [HY]$. Por meio da equação da reta obtida pelas curvas analíticas, pode-se determinar a concentração de cada FS extraído das células com etanol. Os valores das concentrações foram normalizados pela concentração de proteína obtida pelo método de Lowry.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e dados discrepantes foram excluídos utilizando o teste Q. Os resultados estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Valores de acumulação intracelular em células HEp-2 para os três fotossensibilizadores ($1,4 \times 10^{-6}$ M) estudados (μg do FS / mg de proteína celular).

HEp-2						
Tempo de incubação	1h	2h	4h	8h	16h	24h
CHL	0,22 ± 0,05	0,73 ± 0,08	1,86 ± 0,17	1,92 ± 0,15	2,00 ± 0,07	2,46 ± 0,20
CHL-T	0,31 ± 0,03	0,66 ± 0,03	1,72 ± 0,19	2,32 ± 0,25	3,55 ± 0,12	4,25 ± 0,05
HY	0,18 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,04

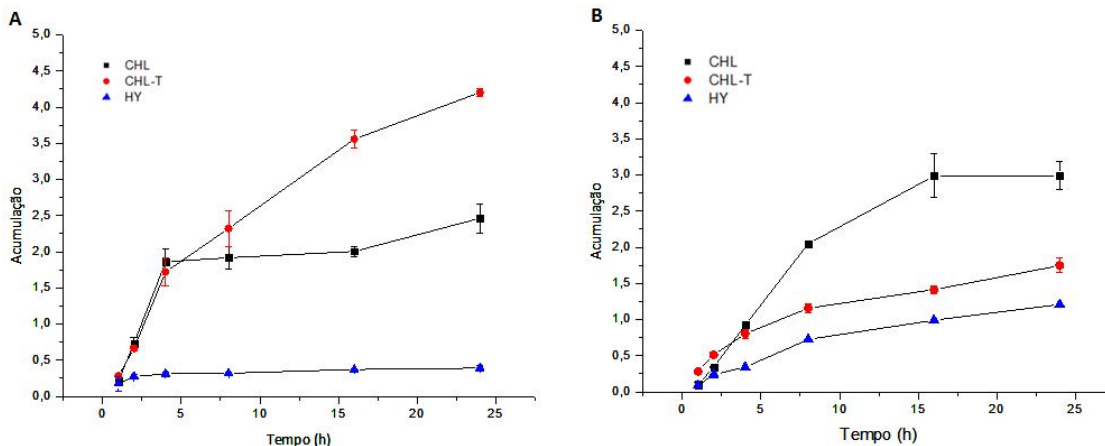
As Tabelas 2 e 3 mostram que até 4h de incubação ambas as clorinas apresentaram valores semelhantes de acumulação em ambos os tipos celulares, no entanto a CHL-T acumulou mais do que a CHL após 8 horas em HEp-2 e acumulou menos nas células HeLa.

Tabela 3 - Valores de acumulação intracelular em células HeLa para os três fotossensibilizadores ($1,4 \times 10^{-6}$ M) estudados (μg do FS/ mg de proteína celular).

HeLa						
Tempo de incubação	1h	2h	4h	8h	16h	24h
CHL	0,10 ± 0,03	0,34 ± 0,01	0,93 ± 0,02	2,05 ± 0,03	2,98 ± 0,30	2,99 ± 0,20
CHL-T	0,28 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,80 ± 0,06	1,16 ± 0,06	1,41 ± 0,06	1,75 ± 0,10
HY	0,09 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,21 ± 0,10

As clorinas apresentaram maior acumulação para as duas linhagens de células comparando-se com a hipericina. Os gráficos de acumulação em cada linhagem celular estão representados na figura 13.

Figura 13 – Acumulação intracelular (μg do FS / mg de proteína celular) após incubação dos fotossensibilizadores na concentração de $1,4 \times 10^{-6}$ M. A: para as células HEP-2. B: para as células HeLa.



Visto que os FSs apresentam uma boa seletividade às células tumorais devido a sua alta taxa metabólica, o conhecimento das concentrações intracelulares destes FSs nos diferentes tipos celulares pode contribuir com uma futura aplicação terapêutica⁶. A diferenciação da acumulação intracelular entre as duas clorinas só começou a ocorrer após 4h de incubação e após 8h o derivado já se acumula mais do que a clorina original nas células HEP-2, porém menos nas células HeLa.

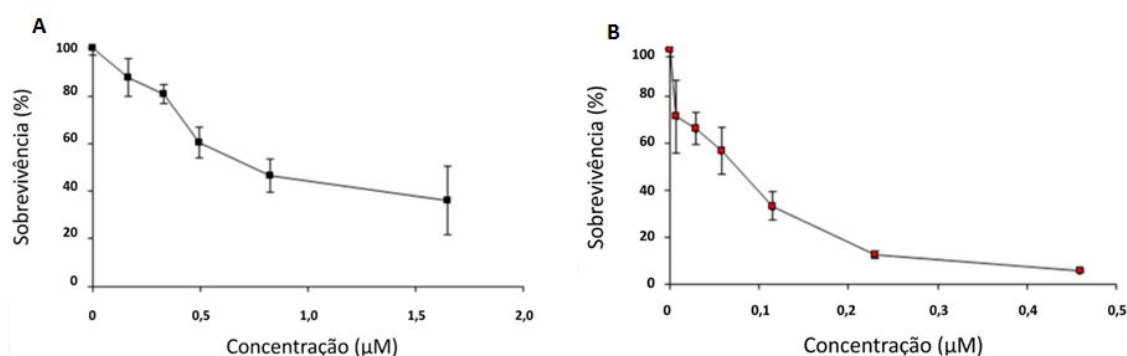
Esse resultado inesperado para HeLa sugere que a complexidade do tipo celular interfere na acumulação dos compostos. Outros estudos também observaram dados discrepantes quanto à acumulação e efeito citotóxico de uma clorina (mTHPC) em diferentes linhagens celulares. Sugere-se que esses resultados indicam que fatores adicionais determinam o dano celular, por exemplo, o nível endógeno da capacidade oxidativa que pode estar relacionado com algumas enzimas (glutationas e superóxido dismutases).⁸⁰

A acumulação intracelular inferior para CHL-T comparado a CHL na células HeLa em tempos longos não interferiu na melhor citotoxicidade desse novo composto, como comprovado nos resultados do ensaio do MTT descritos a seguir.

4.4 Avaliação da atividade mitocondrial

O ensaio com MTT foi empregado com os FSs (CHL e CHL-T) para determinação da concentração inibitória média (IC_{50}) nas células. O tempo de incubação dos FSs foi de 2 h e a irradiação com dose de $30 J cm^{-2}$ foi feita com LED de comprimento de onda 630 nm (vermelho). O IC_{50} de $0,04 \mu M$ para a CHL-T e de $0,76 \mu M$ para a clorina original nas células HEP-2, demonstra que a adição do grupo TRISMA aumentou o efeito citotóxico nas células tumorais em cerca de 20 vezes. As curvas de sobrevivência estão apresentadas nas figuras 14.

Figura 14 - Sobrevivência das células HEP-2 tratadas por 2h e irradiada com $30 J cm^{-2}$ analisadas 48 h pós-irradiação. A: para CHL. B: para CHL-T.



Para a determinação da concentração inibitória média da clorina modificada, da clorina de origem e da hipericina na dose de luz de $6 J cm^{-2}$, utilizou-se ambas as linhagens celulares com tempo de incubação de 2h e 16h e irradiação com LED vermelho ($630 nm \pm 10$). Os resultados estão apresentados na tabela 4.

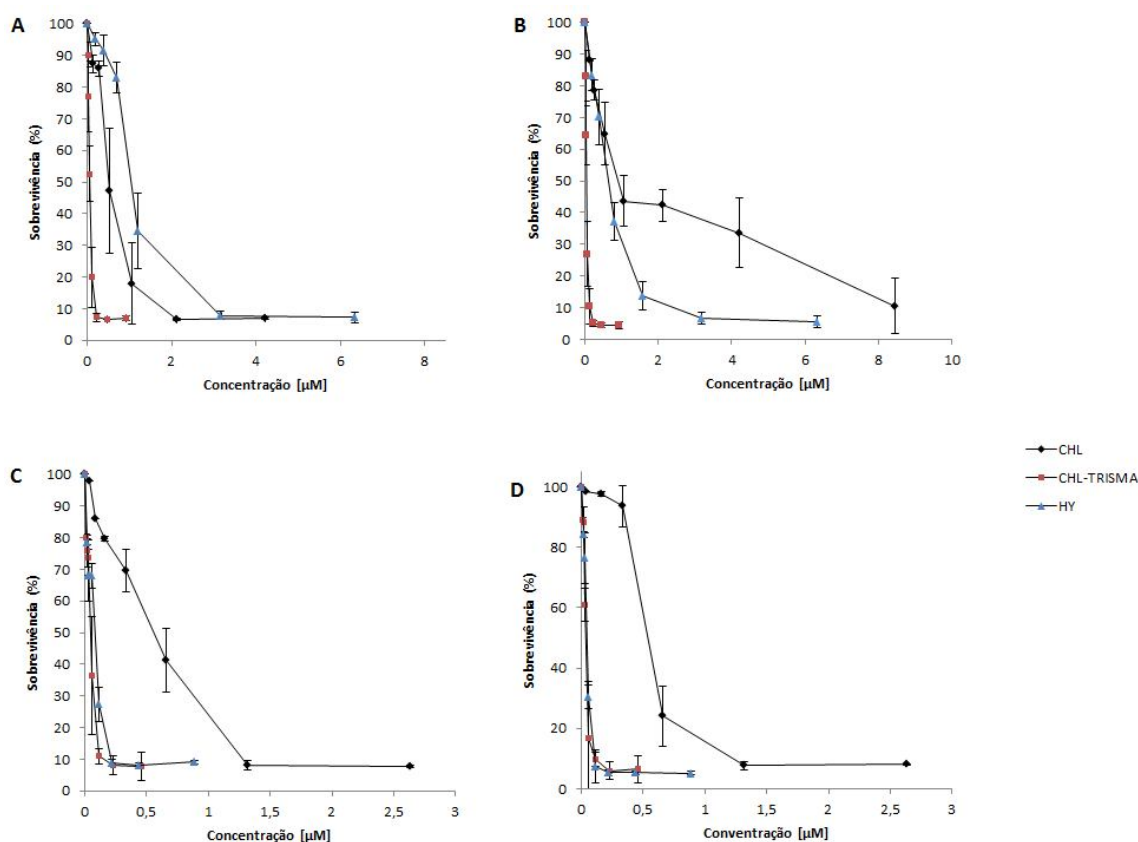
Tabela 4 – Concentrações inibitórias médias (IC_{50}) para os FSs incubados por 2h e 16h e irradiados na dose de $6 J cm^{-2}$ e análise das células após 24h.

Tempo de Incubação	IC_{50} (HEp-2) [μM]		IC_{50} (HeLa) [μM]	
	2h	16h	2h	16h
CHL	$0,52 \pm 0,14$	$0,34 \pm 0,08$	$0,43 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,05$
CHL-T	$0,06 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
HY	$0,72 \pm 0,16$	$0,05 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$

Os resultados apresentados nas tabelas sugerem que a modificação estrutural na clorina melhorou a sua eficiência em cerca de 10 vezes nas duas linhagens celulares e nos dois tempos de incubação. Comparando a citotoxicidade da HY com CHL-T observa-se que o IC₅₀ do novo FS é cerca de 15 vezes maior do que o valor obtido para a HY no tempo de incubação de 2h.

Para 16h de incubação, comparando HY com CHL-T, esta apresentou-se cerca de apenas duas vezes mais citotóxica que a HY na linhagem HEp-2 e teve praticamente a mesma eficiência na linhagem HeLa. As sobrevivências estão apresentadas na figura 15.

Figura 15 - Sobrevivência das células em função da concentração do fotossensibilizador para dose de luz 6 J cm⁻² e período de pós-irradiação de 24h. A: células HEp-2 e tempo de incubação de 2h. B: células HeLa e tempo de incubação de 2h. C: células HEp-2 e tempo de incubação de 16 h. D: células HeLa e tempo de incubação de 16h.



Comparando-se as duas doses usadas, observa-se que com a dose de luz de 30 J cm⁻² o efeito citotóxico para a CHL-T é maior 20 vezes em relação à CHL e na

dose de luz de 6 J cm^{-2} é maior 10 vezes para a CHL-T quando comparado com o efeito da CHL. Esse fato é esperado visto que uma dose maior de luz fornece uma quantidade de energia maior para potencializar a produção de radicais livres e consequentemente a citotoxicidade.

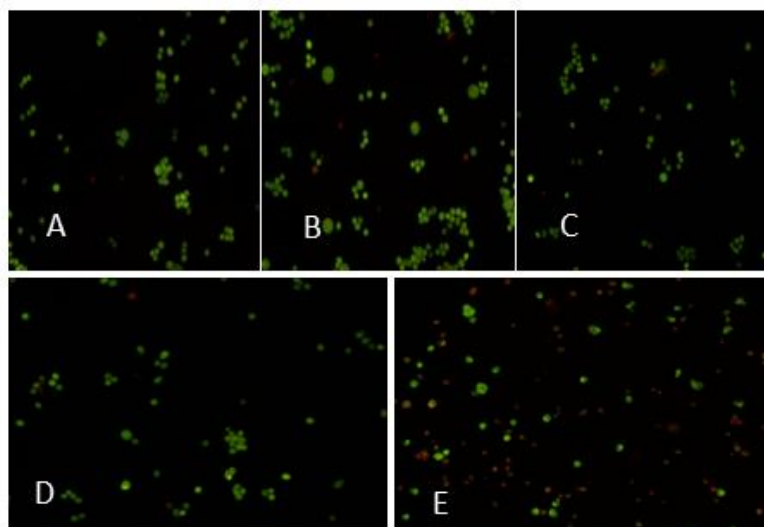
Nos ensaios do MTT empregou-se placas de cultura com 96 poços e cada concentração foi usada em sextuplicata. Todas as placas com uma ampla faixa de concentração foram repetidas no mínimo de duas vezes e o valor médio dos IC_{50} foi calculado. Os controles (escuro) consistiram de amostras nas mesmas concentrações e tempos de incubação testados, porém sem irradiação. Tais controles não apresentaram citotoxicidade no escuro nas concentrações utilizadas.

4.5 Determinação do tipo de morte celular após tratamento fotodinâmico com os fotossensibilizadores em estudo

4.5.1 Detecção da morte celular por microscopia de fluorescência

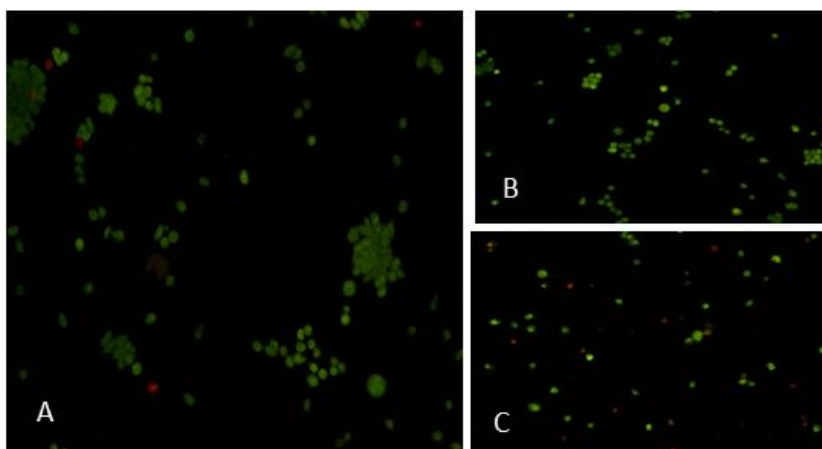
Após as células serem submetidas ao tratamento fotodinâmico, estas foram marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina e as imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência. As figuras 16 e 17 apresentam as imagens obtidas para os tratamentos com CHL-T. As amostras foram preparadas em duplicata e para cada uma delas cinco imagens foram registradas para que no total um mínimo de 200 células fossem contadas em cada lâmina (por amostra). A partir dessa contagem foram calculadas as porcentagens de apoptose e necrose. A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prims utilizando-se o teste ANOVA seguido do Tukey.

Figura 16 - Microscopia de Fluorescência para as células HEp-2 com 2h de incubação para a CHL-T. A: controle negativo= escuro, sem FS. B: Controle no escuro com 0,06 μM de CHL-T. C: 0,06 μM de CHL-T e dose 6 J cm^{-2} . D: 0,12 μM de CHL-T e dose 6 J cm^{-2} . E: 0,92 μM de CHL-T e dose 6 J cm^{-2} .



Pelas imagens obtidas, pode-se observar que apenas quando as células foram tratadas com 0,92 μM de CHL-T e luz (figura 16 E) é que obteve-se apoptose e necrose em um número mais expressivo em relação ao controle.

Figura 17 - Microscopia de Fluorescência as células HEp-2 com 16h de incubação para a CHL-T. A: Controle negativo= escuro, sem FS. B: Controle escuro com 0,12 μM de CHL-T. C: 0,12 μM de CHL-T e dose 6 J cm^{-2} .



Com 16 horas de incubação, as imagens obtidas por microscopia de fluorescência demonstraram que o tratamento com a concentração de 0,12 μM para a CHL-T e irradiação (C) apresentou um número maior de células em processo de morte celular em relação ao controle.

As porcentagens de morte celular por apoptose ou necrose estão indicadas nas tabelas 5 e 7. Para todos os tratamentos, foram feitos controles sem nenhum tratamento, controles tratados apenas com os FSs sem irradiação, e controle só irradiado sendo que tais controles apresentaram porcentagem de células vivas acima de 80%.

Tabela 5 - Porcentagens de morte celular (apoptose e necrose) obtidas por microscopia de fluorescência das células HEp-2 marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

HEp-2				
FS	[FS] (μM)	Apoptose (%)	Necrose (%)	Total (%)
CHL	0,52	1,63	0,94	2,57
CHL	1,04	8,17	5,73	13,90
CHL	2,08	37,51	5,78	43,29
CHL	8,49	22,18	69,30	91,48
CHL-T	0,06	1,13	0,72	1,85
CHL-T	0,12	5,08	5,5	10,58
CHL-T	0,24	9,67	87,03	96,70
CHL-T	0,52	20,32	75,88	96,20
CHL-T	0,92	50,14	41,73	91,87
HY	0,52	5,07	4,07	9,14
HY	0,72	5,30	4,41	9,71
HY	1,44	8,12	9,96	18,08
HY	2,88	6,08	85,81	91,89
HY	12,70	23,57	76,01	99,58

Para as concentrações utilizadas na avaliação da apoptose e necrose, partiu-se das concentração do IC_{50} determinado para cada FS para a linhagem HEp-2 com tempo de incubação de 2h. Como a porcentagem de morte avaliada não atingiu um valor alto, empregou-se concentrações mais elevadas ou maior tempo de incubação (de 2h para 16h). Observa-se que com o aumento das concentrações houve um aumento na porcentagem de morte celular como era esperado.

Vale salientar que as concentrações utilizadas para CHL-T foram cerca de 10 vezes menores que as concentrações para os outros dois FSs. Assim, pode-se afirmar que a eficiência do novo FS proposto é maior, visto que a concentração utilizada foi bem menor (10 x). Os gráficos das análises estatísticas para a linhagem HEp-2 no tempo de incubação de 2h utilizando-se ANOVA seguida de Tukey estão representados nas figuras 18, 19 e 20 para CHL, CHL-T e HY respectivamente.

Figura 18 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEp-2 com CHL para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.

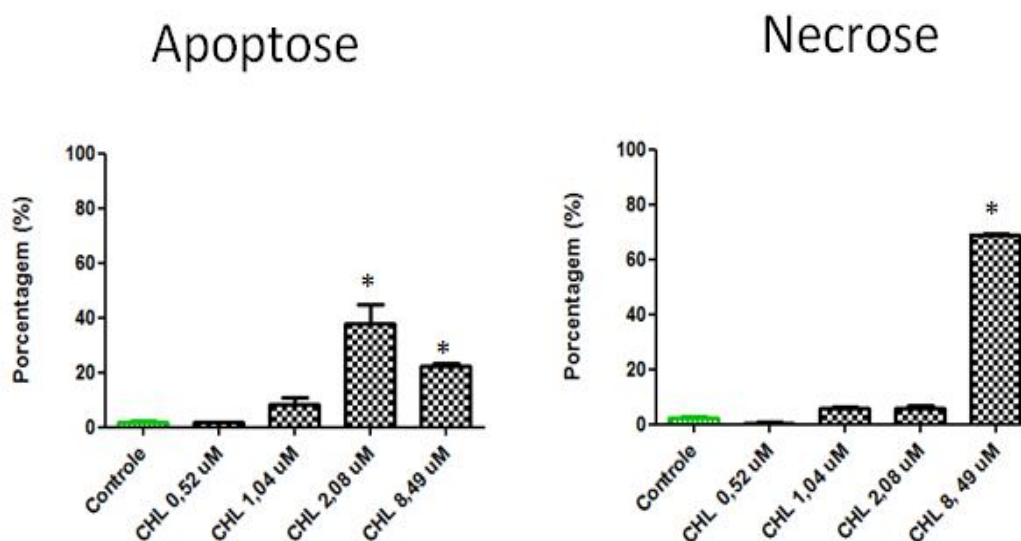


Figura 19 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEp-2 com CHL-T para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.

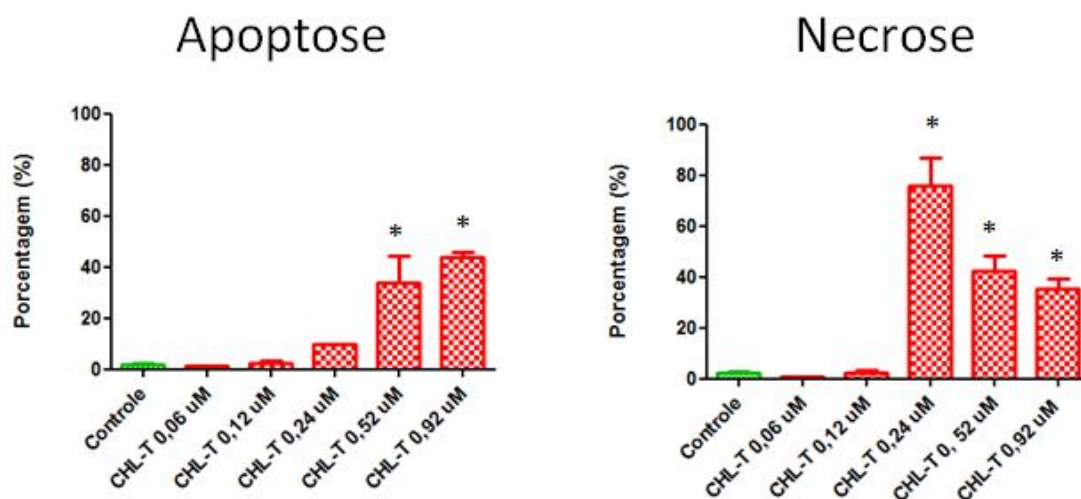
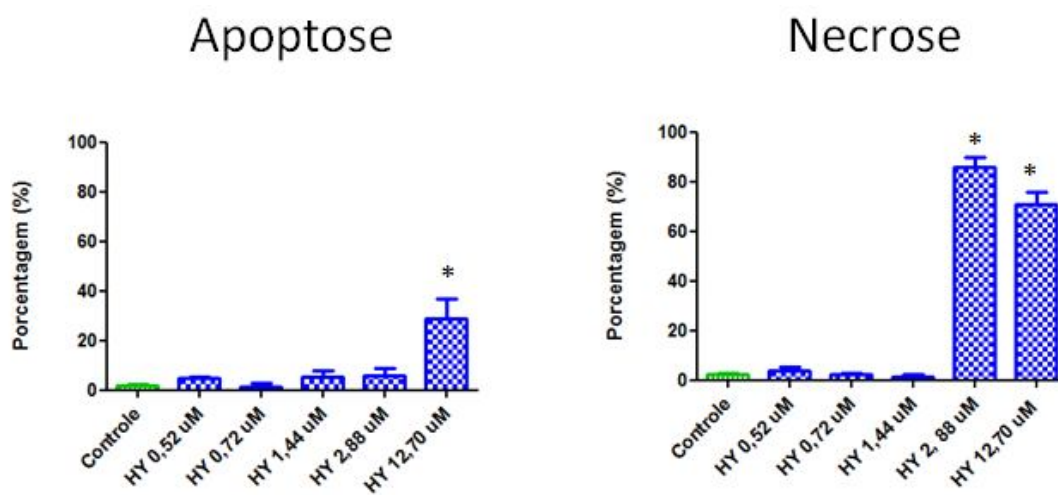


Figura 20 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEp-2 com HY para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.



Esses mesmos tratamentos foram feitos para a linhagem celular HeLa. Os valores de morte celular (apoptose e necrose) estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagens de morte celular (apoptose e necrose) obtidas por microscopia de fluorescência das células HeLa marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm⁻² e período de pós-irradiação de 24h.

HeLa				
FS	[FS] (µM)	Apoptose (%)	Necrose (%)	Total (%)
CHL	0,52	3,57	10,65	14,22
CHL	1,04	1,65	5,62	7,27
CHL	2,08	8,73	28,39	37,12
CHL	8,49	3,75	95,80	99,55
CHL-T	0,06	4,41	41,61	46,02
CHL-T	0,12	3,94	86,85	90,49
CHL-T	0,24	2,13	97,08	99,21
CHL-T	0,52	1,38	78,82	80,20
CHL-T	0,92	4,42	95,58	100
HY	0,52	1,53	6,26	7,79
HY	0,72	10,24	26,90	37,14
HY	1,44	2,93	62,42	65,35
HY	2,88	2,41	96,73	99,14
HY	12,70	2,27	97,73	100

Nossos dados para hipericina (um FS já estabelecido em estudos de PDT) corroboram com alguns estudos que também demonstraram que a partir de cerca de 1 µM de HY com dose de luz próxima à nossa ocorre uma maior indução de necrose em relação à apoptose.⁸¹

Os gráficos das análises estatísticas para HeLa utilizando-se ANOVA seguida de Tukey no tempo de incubação de 2h estão representados nas figuras 21, 22 e 23.

Figura 21 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa com CHL para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.

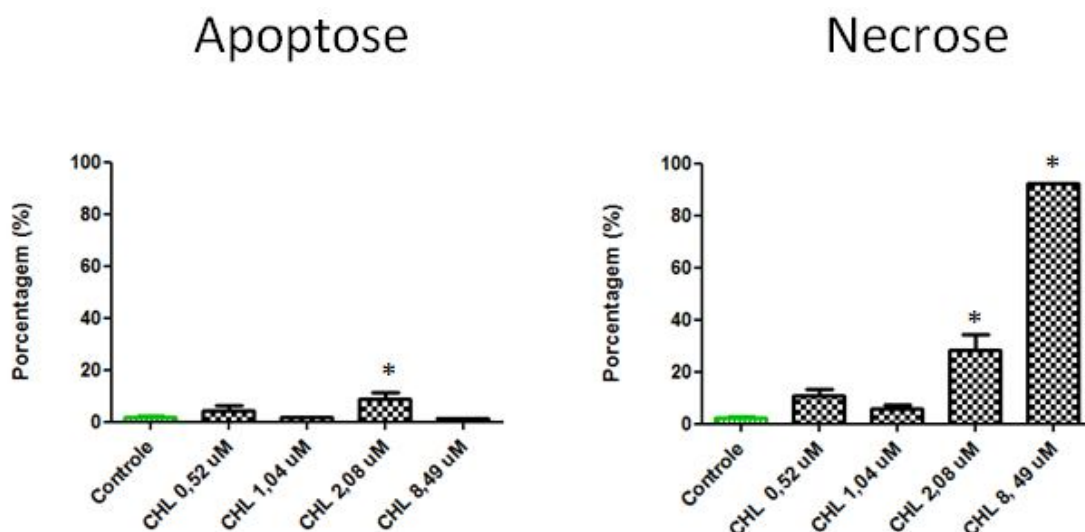


Figura 22 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa com CHL-T para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.

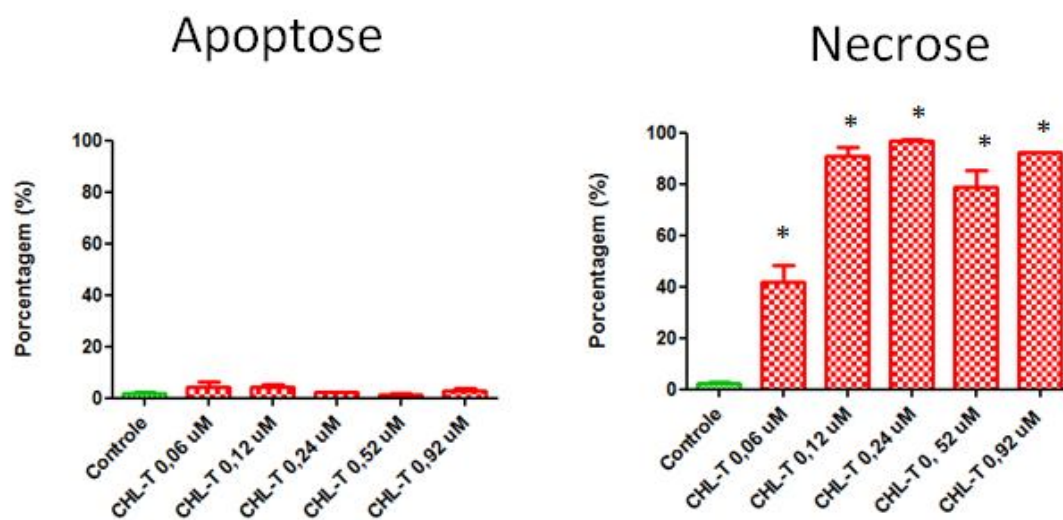
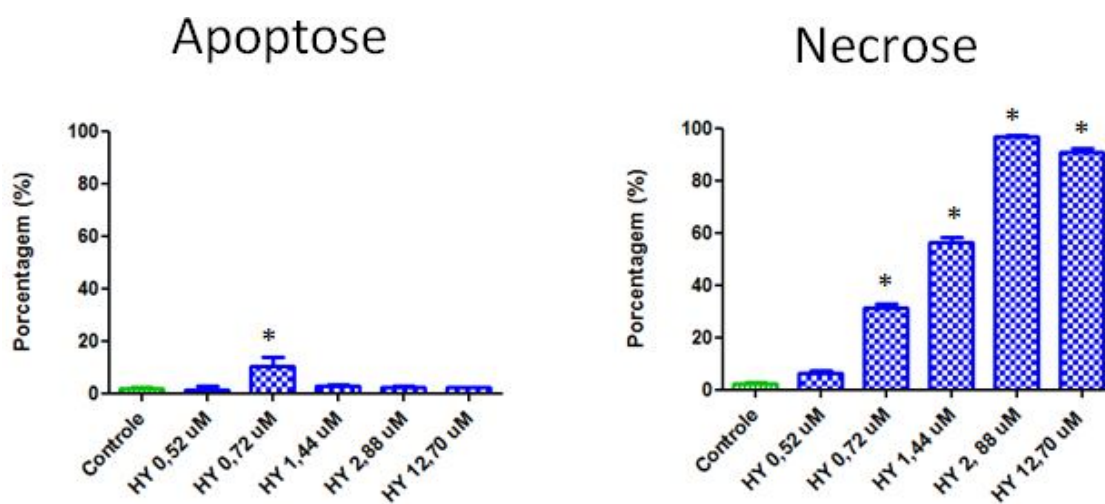


Figura 23 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa com HY para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.



Também foi avaliada morte celular (apoptose e necrose) no tempo de incubação de 16 h para o valor de concentração referente a $2 \times \text{IC}_{50}$ para os três FSs e para as duas linhagens celulares (HEp-2 e HeLa). Os valores das porcentagens de morte estão apresentados na tabela 7 e 8.

Tabela 7 - Porcentagem de morte celular (apoptose e necrose) obtidos por microscopia de fluorescência nas células HEp-2 marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 16h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

HEp-2				
FS	[FS] (µM)	Apoptose (%)	Necrose (%)	Total (%)
CHL	1,04	31,26	30,35	61,61
CHL-T	0,12	28,59	20,66	49,25
HY	1,44	16,90	21,06	37,96

Os gráficos das análises estatísticas para HEP-2 utilizando-se ANOVA seguida de Tukey no tempo de incubação de 16h estão representados na figura 24.

Figura 24 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HEP-2 para tempo de incubação de 16h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.

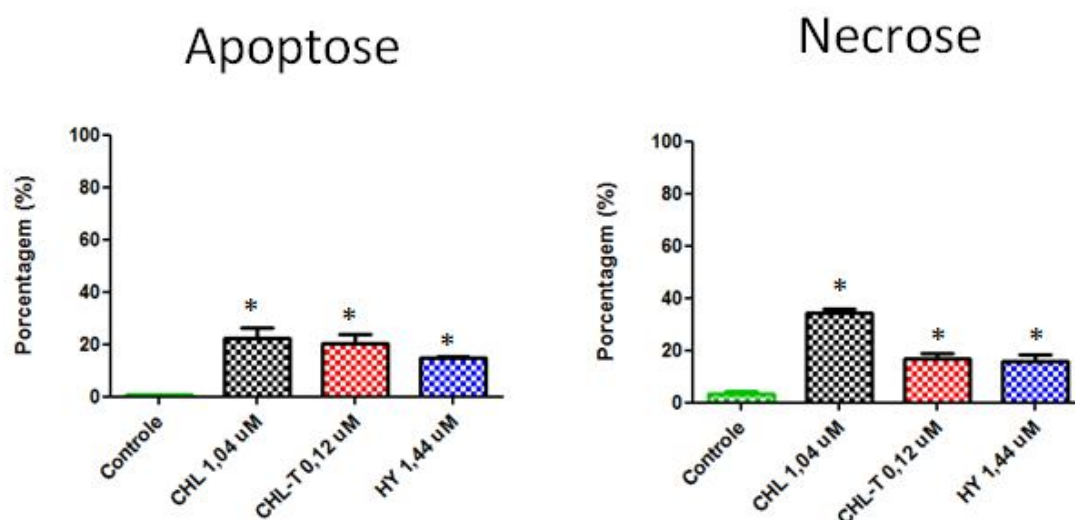


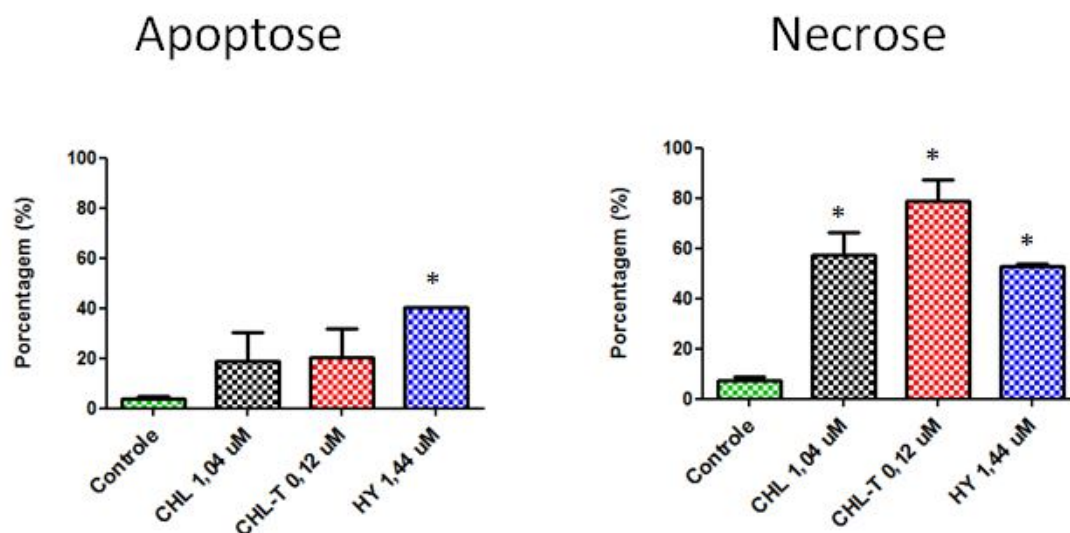
Tabela 8 - Porcentagem de morte celular (apoptose e necrose) obtidos por microscopia de fluorescência nas células HeLa marcadas com brometo de etídio e laranja de acridina após o tratamento fotodinâmico com os três fotossensibilizadores em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 16h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

HeLa				
FS	[FS] (μM)	Apoptose (%)	Necrose (%)	Total (%)
CHL	1,04	18,91	57,52	76,43
CHL-T	0,12	20,44	78,83	99,27
HY	1,44	40,16	53,06	93,22

Os gráficos das análises estatísticas para HeLa utilizando-se ANOVA seguida de Tukey no tempo de incubação de 16h estão representados na figura 25.

Figura 25 – Gráficos das porcentagens de apoptose e necrose da linhagem HeLa para tempo de incubação de 16h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

* valores significativos em relação ao controle não tratado.



Com 16h e 2h de incubação, pode-se observar que nas mesmas concentrações de FS a linhagem celular HeLa apresenta maior porcentagem de morte celular sendo esta deslocada para necrose, ou seja, nessa linhagem (HeLa) e condições, os ensaios fotodinâmicos tendem a induzir mais necrose que apoptose.

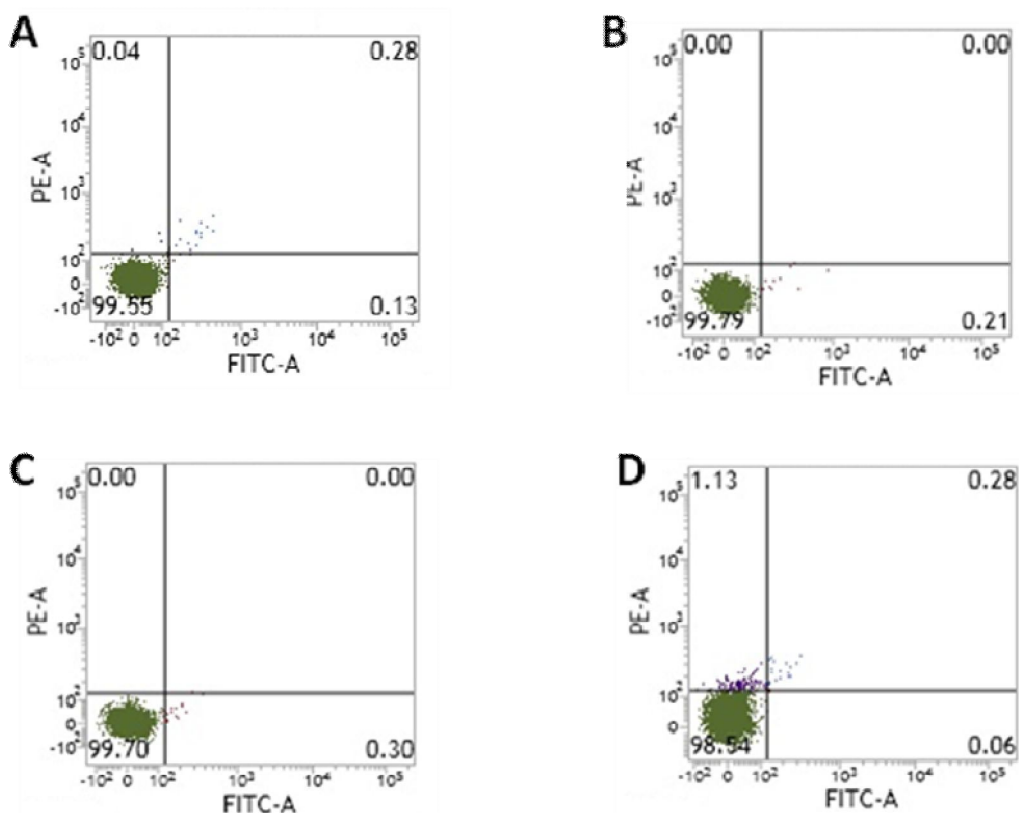
A quantificação da morte celular é crucial para determinar qual o potencial dos compostos em induzir morte celular. A ativação de necrose pode ser desejável nos casos em que existe resistência à apoptose em células cancerígenas⁸². Alguns estudos demonstraram que em HeLa há uma resistência à apoptose frente à PDT com hipericina^{83; 84; 85}. Diante disso, a maior porcentagem de necrose encontrada com clorinas nos tratamentos realizados nessa linhagem celular representa uma boa resposta de morte celular.

4.5.2 Detecção da morte celular por citometria de fluxo

As porcentagens de apoptose (inicial e tardia) foram obtidas por citometria para tratamentos com as seguintes concentrações de cada FS: 0,52 μM para CHL, 0,06 μM e 0,52 μM para CHL-T e 0,52 μM para HY com a linhagem celular HEP-2. Foram realizados controles sem nenhum tratamento, controles tratados apenas com os FSs sem irradiação e controles apenas com irradiação. Todos os controles apresentaram porcentagem de células vivas acima de 80%. Para certificar que não havia interferência da fluorescência dos FSs com os marcadores (FITC e PI) usados na metodologia foram analisadas amostras que receberam tratamentos apenas com os FSs sem a marcação para anexina V. O resultado da análise mostrou que mesmo em concentrações maiores que as usadas nos tratamentos não houve detecção de fluorescência pelo canal utilizado nos experimentos (figura 26).

Figura 26 – Gráficos das análises das células HEP-2 com FSs sem marcação para anexina V.

A: controle sem FS. B: 8,49 μM de CHL. C: 0,92 μM de CHL-T. D: 12,69 μM de HY.



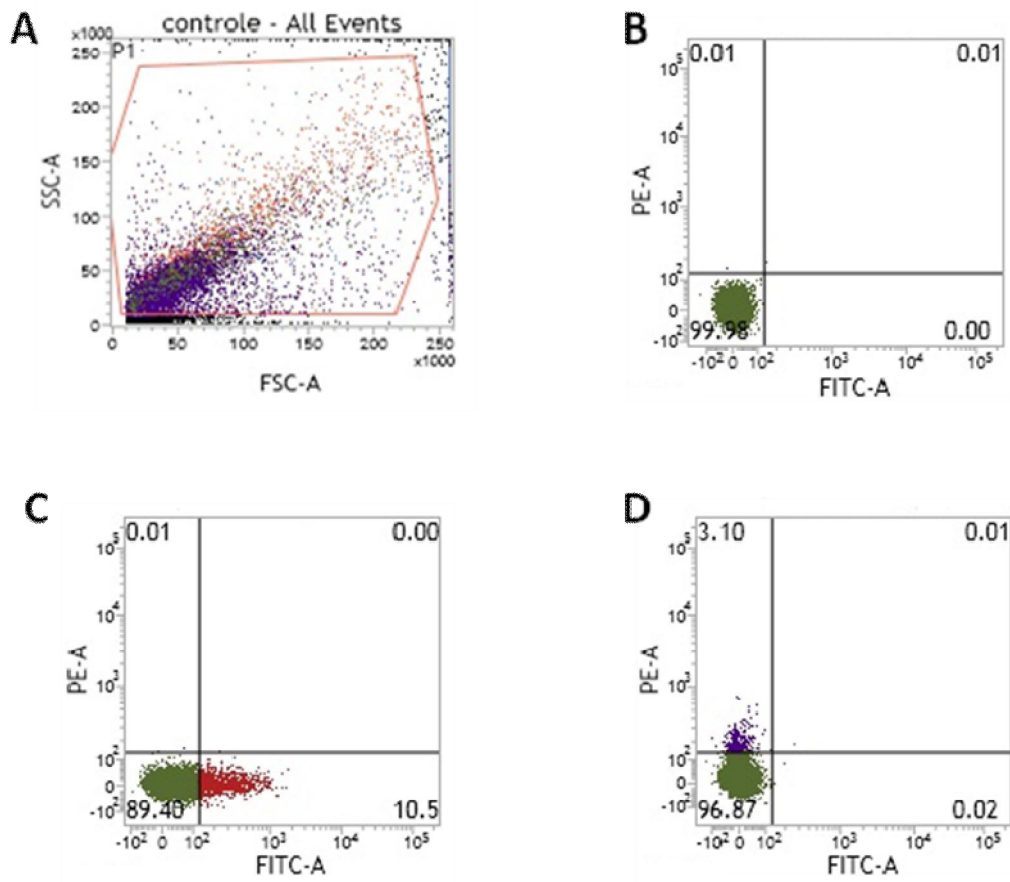
Na tabela 9 estão apresentados os valores médios das porcentagens obtidos para apoptose nos respectivos tratamentos com a linhagem celular HEp-2.

Tabela 9 – Porcentagens de apoptose (inicial e final) obtidas por citometria de fluxo das células HEp-2 para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

HEp-2				
FS	[FS] (μM)	Apoptose Inicial (%)	Apoptose Final (%)	Total (%)
CHL	0,52	15,46	6,10	21,56
CHL-T	0,06	8,74	1,13	10,47
CHL-T	0,52	80,35	7,86	88,21
HY	0,52	13,23	2,68	15,91

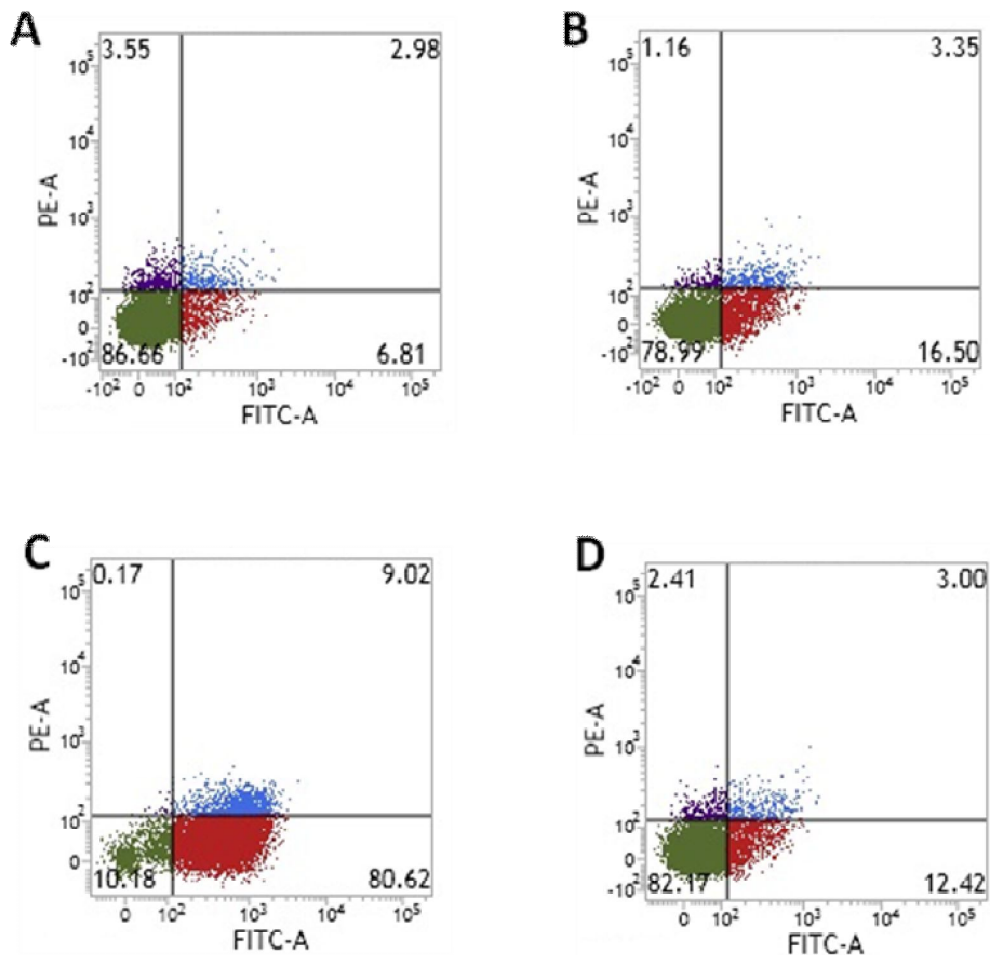
Pelos valores obtidos, pode-se observar que o tratamento com $0,52 \mu\text{M}$ CHL-T e dose de luz 6 J cm^{-2} apresentou uma alta porcentagem de apoptose (88,21 %) sendo em maior proporção para apoptose inicial. Nas figuras 27 e 28 estão apresentados os gráficos obtidos nos tratamentos.

Figura 27 – Controles para células HEp-2. A: *gate* do controle negativo. B: controle negativo não marcado. C: controle negativo marcado apenas com FITC. D: controle negativo marcado apenas com PE.



Esses controles são realizados para os ajustes dos parâmetros de voltagens que são fixados para cada experimento. Também é delimitado um *gate* (P1) para excluir das análises os restos celulares. Portanto, foi considerado para os valores de porcentagens (representados dentro dos quadrantes) apenas a população de células que se encontra delimitada em P1.

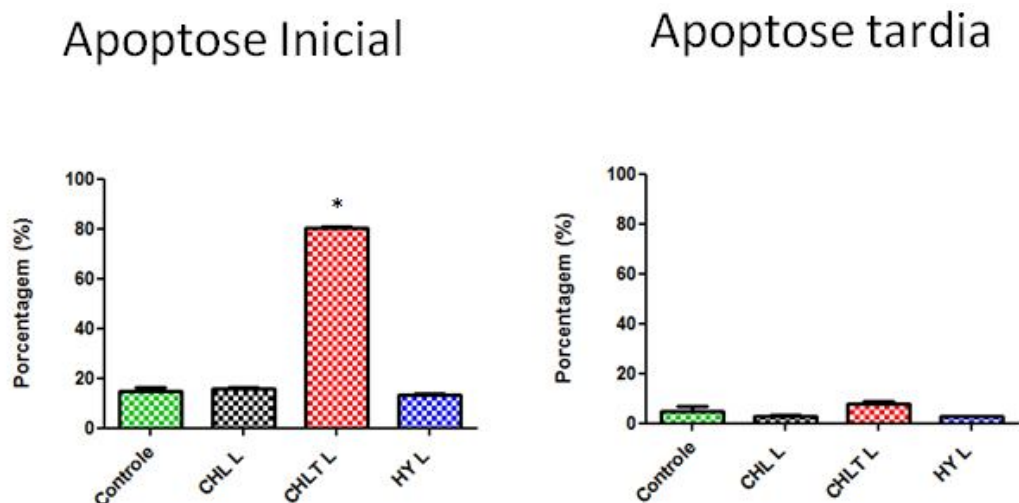
Figura 28 - Citometria de fluxo das células HEp-2 para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h. A: controle negativo. B: $0,52 \mu\text{M}$ de CHL. C: $0,52 \mu\text{M}$ de CHL-T. D: $0,52 \mu\text{M}$ de HY.



Através dos gráficos de dispersão pode-se observar também que o tratamento com $0,52 \mu\text{M}$ de CHL-T (figura 28 C) apresentou um alto percentual de apoptose, principalmente inicial.

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism com o teste ANOVA seguido de Tukey. Os gráficos dessas análises estão apresentados na figura 29.

Figura 29 – Gráficos das porcentagens de apoptose da linhagem HEP-2 com concentração de 0,52 μM de FSs para tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h. * valores significativos em relação ao controle não tratado.



A análise estatística apresentou como valor significativo em relação ao controle apenas a porcentagem de apoptose inicial para o tratamento das células com 0,52 μM de CHL-T incubadas por 2h e irradiadas com dose de luz 6 J cm^{-2} .

4.6 Avaliação da expressão da proteína p53 por Western blot

As linhagens celulares HEP-2 e HeLa tratadas com os FSs na concentração de 0,52 μM , dose de luz 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h tiveram a proteína p53 ativada. Apesar do tratamento com CHL-T e irradiação ter tido um valor da razão (p53/GAPDH) maior em relação aos outros tratamentos esse valor não foi significativo em relação ao controle para as duas linhagens. Os gráficos da análise estatística (teste t de Student) usando o programa Graph Pad Prism estão apresentados nas figuras 35 e 36. Abaixo de cada gráfico estão as imagens das bandas obtidas pela metodologia Western blot. Os gráficos correspondem a densitometria dessas imagens normalizada pela proteína constitutiva GAPDH.

Figura 30 – Ativação da proteína p53 na linhagem celular HEP-2 com concentração de 0,52 μM de FSs para tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.

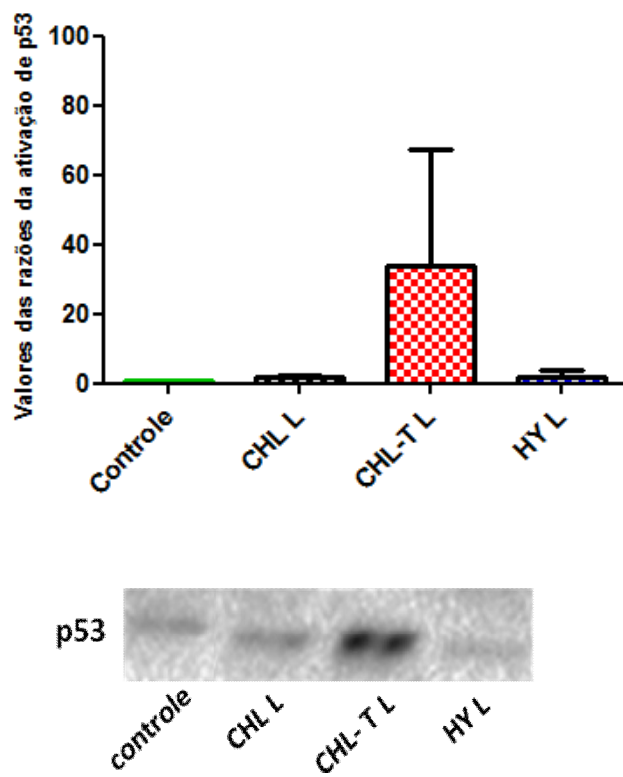
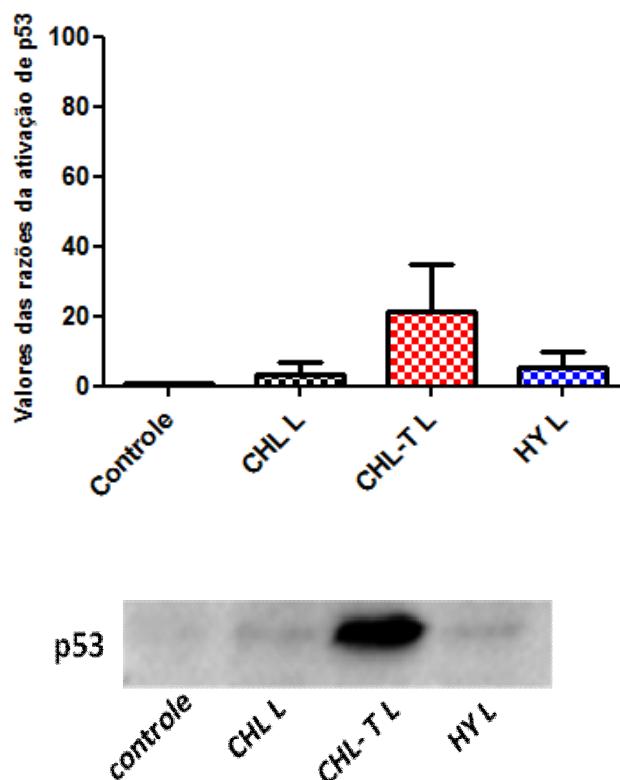


Figura 31 – Ativação da proteína p53 na linhagem celular HeLa com concentração de 0,52 μM de FSs para tempo de incubação de 2h, dose de luz de 6 J cm^{-2} e período de pós-irradiação de 24h.



A proteína p53 normalmente está presente em baixa quantidade em células saudáveis, sendo mais expressa em condições de estresse celular. Quando o dano celular é severo a ponto de não haver reparo, essa proteína induz a célula à apoptose. Células submetidas à PDT com vários FSs tem mostrado uma expressão maior da p53, entretanto a indução da morte celular ou apoptose não é significativamente dependente dessa proteína^{38; 50; 86}. As análises realizadas por Western blot corroboram com esses resultados, visto que há indícios biológicos de que a proteína p53 participe da apoptose na PDT (aumento na ativação de p53 com CHL-T e irradiação: condição em que foi detectada morte celular significativa). Porém como esses valores não foram significativos pode-se concluir que a indução da morte celular na PDT não depende dessa proteína.

Nos últimos anos, o entendimento da resposta ao fotodano e a sua relação funcional com a apoptose tem melhorado. Estudos recentes destacam a importância de se identificar elementos moleculares na apoptose. Sem dúvida a mitocôndria é um coordenador crucial na via da apoptose em resposta à PDT. Essas vias regulatórias controlam a decisão da sobrevivência e morte celular e sua identificação molecular possui implicações terapêuticas.⁴⁸

5. CONCLUSÕES

Neste estudo foram avaliados três FSs: uma clorina extraída da clorofila α (CHL), um derivado de clorina (CHL-T) e a hipericina (HY) uma antraquinona fotossensível, todos sintetizados no Brasil. Em todos os ensaios realizados a clorina modificada foi a que apresentou maior potencial como fotossensibilizador.

O valor negativo do Log P apresentado pela CHL-T (-1,48) indica um caráter entre o anfifílico e o hidrofílico adquirido por essa molécula ao ser adicionado na CHL o grupo TRISMA. Não se obteve o Log P para a CHL devido a sua alta lipofilicidade sendo necessário outro tipo de caracterização experimental.

A comparação da acumulação dos FSs nas células mostrou que as clorinas acumulam mais que a hipericina. Depois do período de 8h, a CHL-T acumulou mais para a linhagem celular HEp-2 e menos para a linhagem celular HeLa em relação a CHL. Entretanto, este fato não aumentou o IC_{50} ($0,05\mu M$) da CHL-T no tempo de incubação de 16h para a HeLa e dose de luz de $6 J cm^{-2}$ comparado com o IC_{50} da CHL ($0,61\mu M$) nas mesmas condições. O acúmulo intracelular dos FSs não necessariamente implica em maior efetividade de indução de morte celular, visto que outros aspectos (tipo celular, potencial enzimático endógeno oxidativo) podem influenciar na citotoxicidade desses compostos. A fototoxicidade apresentada pela nova clorina foi cerca de 10 a 20 vezes maior que pela clorina de origem, uma vez que os valores de IC_{50} obtidos foram menores (10-20 x).

Os testes realizados por microscopia de fluorescência apresentaram porcentagem de morte celular crescente com o aumento das concentrações de FSs. Nesses ensaios, pode-se comprovar também a alta citotoxicidade da CHL-T, pois as concentrações usadas nos tratamentos com este FS foram cerca de 10 a 20 vezes menores e o efeito igual ou melhor que os outros dois FSs.

A análise da apoptose por citometria apresentou valor significativo em relação ao controle a porcentagem de apoptose inicial (80,35 %) para o tratamento das células com $0,52 \mu M$ de CHL-T incubadas por 2h e irradiadas com dose de luz $6 J cm^{-2}$. Esse resultado também comprova a alta citotoxicidade da CHL-T em relação

aos outros FSs. Já a detecção de ROS por citometria não apresentou valores significativos para esse tratamento (0,52 μM de CHL-T incubado com as células por 2h e irradiação com dose de luz 6 J cm^{-2}), indicando que outras condições devam ser realizadas para melhor elucidação do mecanismo de ação dessa nova clorina. Outra explicação para a não observação de valores significativos de apoptose seria que a CHL-T atuasse principalmente pela produção de, por exemplo, oxigênio singlete. Para comprovar tal hipótese, em nosso grupo, está sendo realizada a caracterização físico-química das clorinas inclusive a quantificação do oxigênio singlete produzido nessas condições.

Para investigar a modulação exercida pela PDT com CHL, CHL-T e HY sob a proteína pró-apoptótica p53, foi empregada a metodologia Western blot. Os resultados mostraram um discreto aumento na ativação de p53 com CHL-T e irradiação. Porém como esses valores não foram significativos pode-se sugerir que a indução da morte celular na PDT não depende dessa proteína.

6. REFERÊNCIAS¹

- ¹ KARIOTI, A.; BILIA, A. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 562-594, 2010.
- ² CHATTERJEE, D.; FONG, L.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1627-1637, 2008.
- ³ PASS, H. PHOTODYNAMIC THERAPY IN ONCOLOGY - MECHANISMS AND CLINICAL USE. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 6, p. 443-456, 1993.
- ⁴ SCHUITMAKER, J. J.; BAAS, P.; LEENGOED, H. L. L. M.; Meulen, F. W.; STAR, W. M. Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 34, n. 1, p. 3-12, 1996.
- ⁵ O'CONNOR, A.; GALLAGHER, W.; BYRNE, A. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009.
- ⁶ KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 18, p. 2189-2204, 2006.
- ⁷ BROWN, S.; BROWN, E.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.
- ⁸ DOLMANS, D.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.
- ⁹ JUARRANZ, A.; JAÉN, P.; SANZ-RODRÍGUEZ, F.; CUEVAS, J. GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clinical & Translational Oncology**, v. 10, n. 3, p. 148-154, 2008.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- ¹⁰ COHEN, E.; Ding, H.; KESSINGERA, C. W.; KHEMTONG, C.; GAO, J.; SUMER, B. D. Polymeric micelle nanoparticles for photodynamic treatment of head and neck cancer cells. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 143, n. 1, p. 109-115, 2010.
- ¹¹ SCHNEIDER-YIN, X.; KURMANAVICIENE, A.; ROTH, M.; ROOS, M.; FEDIER, A.; MINDER, E. I.; WALT, H. Hypericin and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX induce enhanced phototoxicity in human endometrial cancer cells with non-coherent white light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2009.
- ¹² VERMA, S.; VERMA, S.; WATT, G. M.; MAI, Z.; HASAN, T. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 5, p. 996-1005, 2007.
- ¹³ BUGAJ, A. Targeted photodynamic therapy - a promising strategy of tumor treatment. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 1097-1109, 2011.
- ¹⁴ SIBATA, C.H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.
- ¹⁵ DOUGHERTY, T. An update on photodynamic therapy applications. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, n. 1, p. 3-7, 2002.
- ¹⁶ FERREIRA, J.; MENEZES, P. F. C.; KURACHI, C.; SIBATA, C.; ALLISON, R. R.; BAGNATO, V. S. Photostability of different chlorine photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 5, n. 2, p. 156-161, 2008.
- ¹⁷ BERNAL, C.; RODRIGUES, J. A. O.; GUIMARÃES, A. P. P.; RIBEIRO, A. O.; OLIVEIRA, K. T.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin. **Laser Physics**, v. 21, n. 1, p. 245-249, 2011.
- ¹⁸ LIMA, A. M.; PIZZOL, C. D.; MONTEIRO, F. B. F.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANDRADE, G. P.; RIBEIRO, A. O.; PERUSSI, J. R. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 125, p. 146-154, 2013.
- ¹⁹ GYENGE, E. B.; HIESTAND, S.; GRAEFE, S.; WALT, H.; MAAKE, C. Cellular and molecular effects of the liposomal mTHPC derivative Foslipos in prostate

carcinoma cells in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 2, p. 86-96, 2011.

²⁰ OSHER, J.; JERJES, W.; UPILE, T.; HAMDOON, Z.; MORLEY, S.; HOPPER, C. Adenoid cystic carcinoma of the tongue base treated with ultrasound-guided interstitial photodynamic therapy: A case study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p. 68-71, 2011.

²¹ JERJES, W.; UPILE, T.; HAMDOON, Z.; ABBAS, S.; AKRAM, S.; MOSSE, C. A.; MORLEY, S.; HOPPER, C. Photodynamic Therapy: The Minimally Invasive Surgical Intervention for Advanced and/or Recurrent Tongue Base Carcinoma. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 4, p. 283-292, 2011.

²² CORREA, J. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387-1394, 2012.

²³ CAVALCANTE, R. S.; IMASATO, H.; BAGNATO, V.S.; PERUSSI, J. R. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 6, n. 1, p. 64-70, 2009.

²⁴ PARK, H.; NA, K. Conjugation of the photosensitizer Chlorin e6 to pluronic F127 for enhanced cellular internalization for photodynamic therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6992-7000, 2013.

²⁵ MOJZISOVA, H.; BONNEAU, S.; MAILLARD, P.; BERG, K.; BRAULT, D. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 6, p. 778-787, 2009.

²⁶ MOREIRA, L. M.; RODRIGUES, M. R.; OLIVEIRA, H. P. M. Influence of different water-ethanol solvent systems on the spectroscopic and physicochemical properties of the macrocyclic compounds pheophytin and chlorophyll alpha. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 258-262, 2010.

²⁷ DE OLIVEIRA, K. T.; ASSIS, F. F.; RIBEIRO, A. O.; NERI, C. R.; FERNANDES, A. U.; BAPTISTA, M. S.; LOPES, N. P.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, H. Synthesis of Phthalocyanines-ALA Conjugates: Water-Soluble Compounds with Low Aggregation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 20, p. 7962-7965, 2009.

²⁸ MAESTRIN, A. P. J.; NERI, C. R.; OLIVEIRA, K. T.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Extraction and purification of chlorophyll a isolated from spirulina

maxima: an experiment for the chemistry courses. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.

²⁹ UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, K. T.; BAPTISTA, M. S.; BORTOLUZZI, A. J.; IAMAMOTO, Y.; SERRA, O. A. Chlorin Photosensitizers Sterically Designed To Prevent Self-Aggregation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 21, p. 8824-8832, 2011.

³⁰ DE ASSIS, F. F.; SOUZA, J. M.; ASSIS, B. H. K.; BROCKSON, T. J.; OLIVEIRA, K.T. Synthesis and photophysical studies of a chlorin sterically designed to prevent self-aggregation. **Dyes and Pigments**, v. 98, n. 1, p. 153-159, 2013.

³¹ DOS SANTOS, F. A. B.; UCHOA, A. F.; BAPTISTA, M. S.; IAMAMOTO, Y.; SERRA, O. A.; BROCKSON, T. J.; OLIVEIRA, K. T. Synthesis of functionalized chlorins sterically-prevented from self-aggregation. **Dyes and Pigments**, v. 99, n. 2, p. 402-411, 2013.

³² CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

³³ NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

³⁴ ROBERTSON, C.; EVANS, D.; ABRAHARNSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.

³⁵ CASTANO, A.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 535-545, 2006.

³⁶ HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

³⁷ INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 735-745, 2011.

- ³⁸ OLEINICK, N.; MORRIS, R.; BELICHENKO, T. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.
- ³⁹ VARNES, M. E.; CHIU, S. M.; XUE, L.; OLEINICK, N. L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: Translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, n. 3, p. 673-679, 1999.
- ⁴⁰ CHIU, S.; OLEINICK, N. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 8, p. 1099-1106, 2001.
- ⁴¹ FOX, F. E.; NIU, Z.; TOBIA, A.; ROOK, A. Photoactivated hypericin inhibits proliferation and induces a high rate of apoptotic death of normal and malignant T-lymphocytes from patients with CTCL. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 4, p. 693-693, 1998.
- ⁴² ALI, S.; OLIVO, M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 21, n. 3, p. 531-540, 2002.
- ⁴³ WANG, X.; GUO, Y.; YANG, S.; WANG, C.; FU, C.; WANG, J.; MAO, Y.; ZHANG, J.; LI, Y. Cellular and Molecular Mechanisms of Photodynamic Hypericin Therapy for Nasopharyngeal Carcinoma Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 3, p. 847-853, 2010.
- ⁴⁴ BUYTAERT, E.; MATROULE, J. Y.; DURINCK, S.; CLOSE, P.; KOCANOVA, S.; VANDENHEEDE, J.R.; WITTE, P. A.; PIETTE, J.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors and modulators of hypericin-mediated cell death in bladder cancer cells. **Oncogene**, v. 27, n. 13, p. 1916-1929, 2008.
- ⁴⁵ KLOTZ, L.; KRONCKE, K.; SIES, H. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, n. 2, p. 88-94, 2003.
- ⁴⁶ FULDA, S.; DEBATIN, K. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-4811, 2006.
- ⁴⁷ CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2005.

⁴⁸ AGOSTINIS, P.; BUYTAERT, E.; BREYSSSENS, H.; HENDRICKX, N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 8, p. 721-729, 2004.

⁴⁹ VASEVA, A.; MOLL, U. The mitochondrial p53 pathway. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1787, n. 5, p. 414-420, 2009.

⁵⁰ ALMEIDA, R. D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59-86, 2004.

⁵¹ RYTER, S. W.; KIM, O. P.; HOETZEL, A.; PARK, J. W.; NAKAHIRA, K.; WANG, X.; CHOI, A. M. K. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 1, p. 49-89, 2007.

⁵² USUDA, J.; AZIZUDDIN, K.; CHIU, S.; OLEINICK, N. L. Association between the photodynamic loss of Bcl-2 and the sensitivity to apoptosis caused by phthalocyanine photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2003.

⁵³ KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic therapy: A mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 1, p. 28-35, 1999.

⁵⁴ GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

⁵⁵ ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

⁵⁶ FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. **Oncogene**, v. 18, n. 54, p. 7719-7730, 1999.

⁵⁷ MOOR, A. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 57, n. 1, p. 1-13, 2000.

- ⁵⁸ BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.
- ⁵⁹ CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, n. 5, p. 516-U30, 1912.
- ⁶⁰ MASTERS, J. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 315-319, 2002.
- ⁶¹ AGARWAL, M. L.; LARKIN, H. E.; ZAIDI, S. I. A.; MUKHTAR, H.; OLEINICK, N. L. Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma-cells. **Cancer Research**, v. 53, n. 24, p. 5897-5902, 1993.
- ⁶² LUO, Y.; KESSEL, D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 66, n. 4, p. 479-483, 1997.
- ⁶³ SEPAROVIC, D.; MANN, K.; OLEINICK, N. Association of ceramide accumulation with photodynamic treatment-induced cell death. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 1, p. 101-109, 1998.
- ⁶⁴ KERR, J.; WYLLIE, A.; CURRIE, A. Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-&, 1972.
- ⁶⁵ AGARWAL, M. L.; CLAY, M. L.; HARVEY, E. J.; EVANS, H. H.; ANTUNEZ, A. R.; OLEINICK, N. L. Photodynamic therapy induces rapid cell-death by apoptosis in I5178y mouse lymphoma-cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 21, p. 5993-5996, 1991.
- ⁶⁶ DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- ⁶⁷ TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M.; STEWART, F. A. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034-1044, 2006.
- ⁶⁸ FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. **New York: Wiley-Liss**, 2000. 486 p

- ⁶⁹ HARRISON, M. A.; RAE, I. F. General technique of culture cells. **New York: Cambridge University Press**, 1997. 162 p
- ⁷⁰ POOLER, J.; VALENZENO, D. Physicochemical determinants of the sensitizing effectiveness for photo-oxidation of nerve membranes by fluorescein derivatives. **Photochemistry and Photobiology**, v. 30, n. 4, p. 491-498, 1979.
- ⁷¹ KEPCZYNSKI, M.; PANDIAN, R. P.; SMITH, K. M.; EHRENBERG, B. Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water? **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 2, p. 127-134, 2002.
- ⁷² VUONG, T. T. K.; VEVER-BIZET, C.; BONNEAU, S.; BOURG-HECKLY, G. Hypericin incorporation and localization in fixed HeLa cells for various conditions of fixation and incubation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 561-568, 2011.
- ⁷³ LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; S FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- ⁷⁴ MOSMANN, T. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL - APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTO-TOXICITY ASSAYS. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- ⁷⁵ CHOU, T. C.; HAYBALL, M. CalcuSyn: Windows software for dose effect analysis. **Cambridge: Biosoft**, 1996.
- ⁷⁶ RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **Bmc Biotechnology**, v. 5, 2005.
- ⁷⁷ HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. **Rio de Janeiro: LCT**, 2005. 876 p
- ⁷⁸ LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

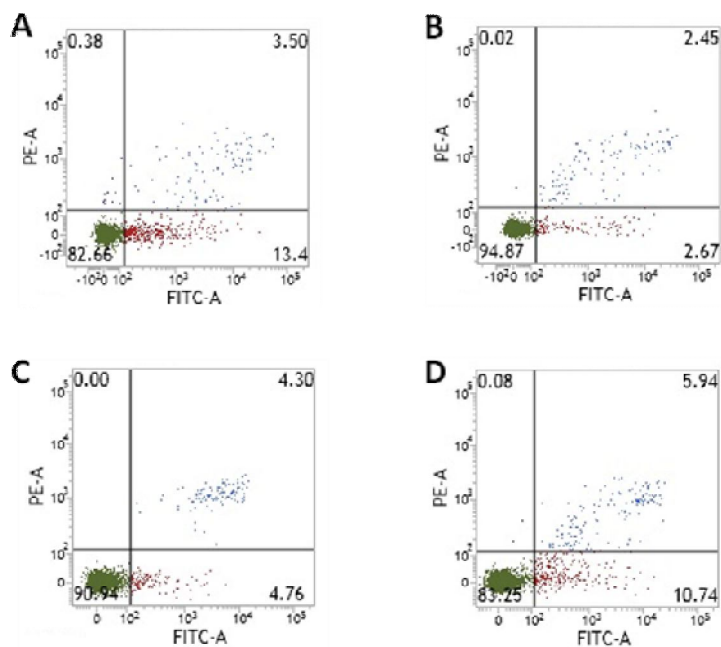
- ⁷⁹ IRVIN, R.; MACALISTER, T.; COSTERTON, J. TRIS(HYDROXYMETHYL)AMINOMETHANE BUFFER MODIFICATION OF ESCHERICHIA-COLI OUTER-MEMBRANE PERMEABILITY. **Journal of Bacteriology**, v. 145, n. 3, p. 1397-1403, 1981.
- ⁸⁰ KIESSLICH, T.; NEUREITER, D.; ALINGER, B.; JANSKY, G. L.; BERLANDA, J.; MKRTCHYAN, V.; OCKER, M.; PLAETZER, K.; BERR, F. Uptake and phototoxicity of meso-tetrahydroxyphenyl chlorine are highly variable in human biliary tract cancer cell lines and correlate with markers of differentiation and proliferation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 734-743, 2010.
- ⁸¹ KUBIN, A.; WIERRANI, F.; BURNER, U.; ALTH, G.; GRUNBERGER, W. Hypericin - The facts about a controversial agent. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 2, p. 233-253, 2005. ISSN 1381-6128.
- ⁸² KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSK, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 221-237, 2011. ISSN 1474-1776.
- ⁸³ ASSEFA, Z.; VANTIEGHEM, A.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P.; VANDENHEEDE, J. R.; MERLEVEDE, W.; WITTE, P.; AGOSTINIS, P. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 13, p. 8788-8796, 1999.
- ⁸⁴ KOCANOVA, S.; BUYTAERT, E.; MATROULE, J.; PIETTE, J.; GOLAB, J.; WITTE, P.; AGOSTINIS, P. Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38(MAPK) and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. **Apoptosis**, v. 12, n. 4, p. 731-741, 2007.
- ⁸⁵ HENDRICKX, N.; VOLANTI, C.; MOENS, U.; SETERNES, O. M.; WITTE, P.; VANDENHEEDE, J.R.; PIETTE, J.; AGOSTINIS, P. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 52231-52239, 2003.
- ⁸⁶ FISHER, A.; FERRARIO, A.; RUCKER, N.; ZHANG, S.; GOMER, C. J. Photodynamic therapy sensitivity is not altered in human tumor cells after abrogation of p53 function. **Cancer Research**, v. 59, n. 2, p. 331-335, 1999.

APÊNDICE A – Resultados da avaliação da porcentagem apoptose obtidos por citometria de fluxo a serem confirmados

Tabela 10 – Porcentagens de apoptose (inicial e final) obtidas por citometria de fluxo das células HeLa para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm⁻² e período de pós-irradiação de 24h.

HeLa				
FS	[FS] (μM)	Apoptose Inicial (%)	Apoptose Final (%)	Total (%)
CHL	0,52	3,03	2,10	5,13
CHL-TRISMA	0,06	4,44	1,90	6,34
CHL-TRISMA	0,52	5,98	5,22	11,2
HY	0,52	8,94	6,95	15,89

Figura 32 - Citometria de fluxo das células HeLa para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm⁻² e período de pós-irradiação de 24h. A: controle negativo. B: 0,52 μM de CHL. C: 0,52 μM de CHL-T. D: 0,52 μM de HY.



APÊNDICE B – Resultados da avaliação da porcentagem de ROS obtidos por citometria de fluxo a serem confirmados

Tabela 11 – Porcentagens de ROS obtidas por citometria de fluxo das células HEP-2 e HeLa incubadas com os três fotossensibilizadores por 2h e dose de luz de 6 J cm⁻².

	ROS (%)			
	HEp-2		HeLa	
	Escuro	Luz	Escuro	Luz
CHL 0,52 µM	7,90	12,63	3,53	1,83
CHL-T 0,52 µM	11,01	5,07	3,61	1,44
HY 0,52 µM	7,52	14,75	4,01	3,04

O controle (células com apenas o reagente) para HEP-2 teve porcentagem média de ROS de 10,56 e para HeLa de 2,83.

Figura 33 - Citometria de fluxo das células HEP-2 para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm⁻². A: controle negativo. B: 0,52 µM de CHL. C: 0,52 µM de CHL-T. D: 0,52 µM de HY.

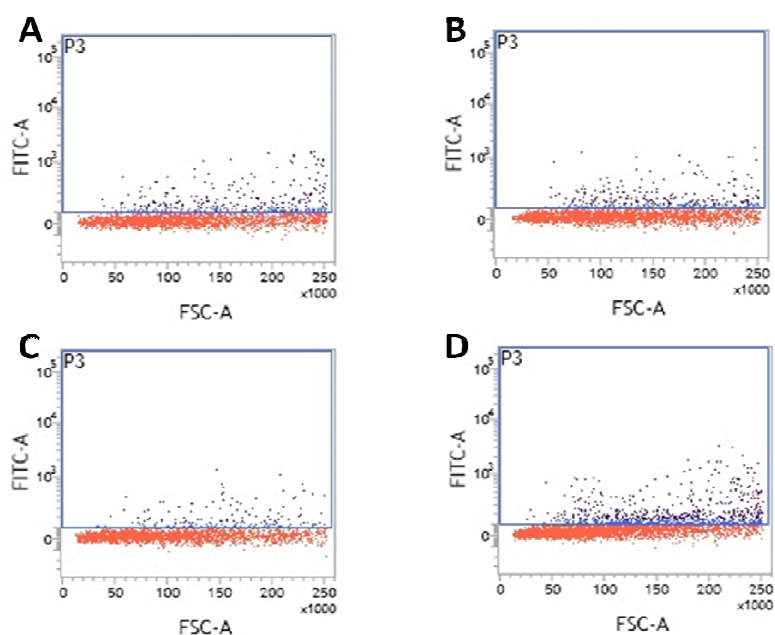


Figura 34 - Citometria de fluxo das células HeLa para os três fotossensibilizadores no tempo de incubação de 2h e dose de luz de 6 J cm^{-2} . A: controle negativo. B: $0,52 \mu\text{M}$ de CHL. C: $0,52 \mu\text{M}$ de CHL-T. D: $0,52 \mu\text{M}$ de HY.

