

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

Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS₄ e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos do pH e da força iônica.

Lucimara Perpetua Ferreira Aggarwal

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2005

Ao meu marido e à minha família

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iouri Borissevitch, pela confiança, pelo apoio, pela dedicação e pelo carinho que me foi dado durante todos os momentos de nossa convivência.

À Prof. Dra. Galina Borissevitch pelo carinhoso acolhimento e pela sua prestativa ajuda em todos as circunstâncias.

Ao Profs. Drs. Antonio C. Tedesco, Amando S. Ito e Mauricio S. Baptista por cederem gentilmente o uso de seus equipamentos e ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini pelo fornecimento das células *ghost*.

À Prof. Dra. Jocelyne Blais pela acolhida durante a minha estadia no *Laboratoire de Physicochimie Biomoléculaire et Cellular - LPBC* (Universidade Pierre e Marie Curie, Paris) e pela sua preciosa orientação nos estudos com cultura de células.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos do Grupo de Fotobiofísica: Cassia, Fabio, João Batista, Luciana, Marcelo, Marina, Mônica e Pablo pelo companheirismo ao longo desta jornada e pelas discussões oportunas.

Ao meu paciente Suraj, pela sua compreensão.

À minha família pelo apoio e por sua compreensão em várias ocasiões, quando não pude estar presente.

E a Deus, por tudo.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações	vii
Resumo	viii
Abstract	xi

Capítulo 1

Introdução.....	1
1.1 As porfirinas na Biologia e Medicina	1
Fundamentação Teórica	2
1.2 Terapia Fotodinâmica	2
1.2.1 Histórico	3
1.2.2 Mecanismos de Ação	4
1.3 Fotossensibilizadores	6
1.3.1 Porphirinas	8
1.3.2 Derivados de cianinas	9
1.4 Distribuição intracelular dos fotossensibilizadores	9
1.5 Agregados Moleculares	11
1.5.1 Interações responsáveis pela formação de agregados.....	12
1.5.2 Agregados J e H	15
1.5.3 Níveis de energia e espectros de absorção ótica dos agregados.....	16
1.6 Agregados de Porphirinas	18
1.7 Aplicação de sistemas biomiméticos nos estudos biofísicos	21
1.7.1 Membranas biológicas e seus modelos simplificados.....	22
1.7.1.1 Membrana biológica	22
1.7.1.2 Micelas	23
1.7.1.3 Células <i>Ghost</i> de eritrócitos	25
1.8 Cultura de células de adenocarcinoma coloretal humano	25

Capítulo 2

Materiais e Métodos	26
2.1 Objetos de estudo	
2.1.1 Porfirinas	26
2.1.2 Corantes ciânicos com dois cromóforos (BCDs)	27
2.2 Preparação das amostras	
2.2.1 Fotossensibilizadores	28
2.2.2 Soluções de tensoativos	28
2.2.3 Células <i>ghost</i> de eritrócitos	29
2.3 Experimentos com cultura de células	29
2.3.1 Condições para o crescimento da cultura de células HT29.....	29
2.3.2 Internalização celular. Citometria de Fluxo	29
2.3.3 Determinação da localização intracelular dos FS. Microscopia de Imagem por Fluorescência	30
2.3.4 Testes de fotocitotoxicidade	30
2.3.5 Extração celular	31
2.3.6 Determinação dos coeficientes de partição	32
2.4 Métodos – Princípios básicos	
2.4.1 Absorção Ótica	32
2.4.2 Fluorescência	33
2.4.3 Espalhamento de Luz Ressonante	37
2.4.4 Flash-Fotólise	39
2.4.5 Fluorescência com resolução temporal	42
2.4.6 Fosforescência de oxigênio singlete	45
2.4.7 Microespectrofluorimetria confocal	46
2.4.8 Microscopia confocal de imagem por fluorescência	48
2.4.9 Tensão Superficial	49

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Efeitos do pH e da força iônica nas características espectroscópicas de TPPS ₄ e TMPyP em soluções aquosas homogêneas	53
3.1.1 TPPS ₄	53
3.1.2 TPPS ₄ pH 7.0	74
3.1.3 TMPyP	76
3.2 Interação da porfirina TPPS ₄ com tensoativos	78
3.2.1 Influência da presença de TPPS ₄ na c.m.c de tensoativos iônicos....	78
3.2.2 Interação da porfirina TPPS ₄ com CTAB, HPS e SDS: análises de absorção ótica, espalhamento de luz ressoante e fluorescência	82
3.2.3 Efeitos da presença de NaCl na interação da porfirina TPPS ₄ com tensoativos em pH 4.0 e 7.0	102
3.3 Interação das porfirinas TPPS ₄ e TMPyP com frações de membranas de células "ghost" de eritrócitos	114
3.4 Efeitos da interação das porfirinas TPPS ₄ e TMPyP com micelas e células ghost nas características do estado tripleto.....	127
3.5 Determinação da intensidade e do tempo de vida do oxigênio singleto produzido pela porfirina TPPS ₄ em função das condições externas: pH, força iônica, presença de micelas e células ghost de eritrócitos	134
3.6 Estudo da internalização, localização e fotocitotoxicidade das porfirinas TPPS ₄ e TMPyP e das bescianinas em células de adenocarcinoma coloretal humano	137
4 Conclusões	148
5. Referências Bibliográficas	152

Lista de abreviações

FS : Fotossensibilizador

PDT : Terapia Fotodinâmica (do termo inglês *Photodynamic Therapy*)

TPPS₄ : porfirina meso-tetrasulfonatofenil

TMPyP : porfirina meso-tetrametilpiridil

c.m.c : concentração micelar crítica

CTAB : brometo de cetiltrimetilamônio

HPS : N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato

SDS : dodecil sulfato de sódio

RLS : Espalhamento de luz ressonante (do termo inglês *resonance light scattering*)

RMN : Ressonância Magnética Nuclear

RESUMO

As porfirinas e seus derivados têm sido, ao longo dos anos, alvos de vários campos diferentes de interesse, obtendo diversas aplicações, as quais tem aumentado constantemente com o decorrer dos anos. Dentre suas aplicações, uma das mais importantes se encontra no campo da Medicina moderna, sendo a principal na área de detecção e extirpação de tecidos modificados, a partir da Terapia Fotodinâmica (do termo inglês *Photodynamic Therapy* – PDT), apresentando resultados promissores.

Em diversos processos biológicos, as porfirinas podem existir na forma monomérica ou na forma agregada. Entretanto, a agregação de porfirinas reduz sua eficiência nas aplicações em PDT devido a redução dos tempos de vida e rendimentos quânticos de produção dos estados excitados singleto e tripleto e levando, conseqüentemente, a redução na produção de oxigênio singleto.

Diversos fatores influenciam o processo de agregação das porfirinas. Dentre eles, a interação eletrostática exerce um importante papel. A modulação dessa interação pode tanto estimular a agregação, quanto diminuir a probabilidade de formação dos agregados. Deste modo, condições externas, tais como pH, força iônica e especialmente a interação com sistemas microheterogêneos podem modificar essa interação e influenciar também nas características de agregação.

Neste trabalho buscamos avaliar, através de diversos métodos espectroscópicos, os efeitos da interação das porfirinas meso-tetrakis (p-sulfonatofenil) porfirina (TPPS₄), aniônica, e meso-tetrakis (4-N-metilpiridil) porfirina (TMPyP), catiônica, com sistemas microheterogêneos naturais e sintéticos (células “ghost” de eritrócitos e micelas) em função da sua própria estrutura, da estrutura destes sistemas e de fatores externos (concentração, pH, força iônica). O interesse principal foi dedicado aos efeitos dessa interação na formação de agregados das porfirinas. Foram analisadas as mudanças nas

características fotofísicas e fotoquímicas destes compostos, tais como espectros de absorção, rendimentos quânticos e tempos de vida dos estados excitados singlete e tripleto, produção de oxigênio singlete, etc, visando obter informações sobre o comportamento coletivo dessas porfirinas, o que é muito importante para as suas possíveis aplicações em medicina, em particular na Terapia Fotodinâmica do câncer.

Foi descoberto que a interação da porfirina aniônica TPPS₄ com micelas de carga oposta ou na presença de alta força iônica em $\text{pH} < \text{pK}_a$ estimula a formação seqüencial de dois tipos de agregados: inicialmente são formados agregados H que após certo período se transformam em agregados J. A formação desses agregados altera os espectros de absorção, rendimentos quânticos e tempos de vida dos estados excitados singlete e tripleto e produção de oxigênio singlete.

Foi observado que a interação com porfirinas altera a c.m.c dos tensoativos, reduzindo em até três ordens de grandeza o valor da c.m.c dos tensoativos de carga oposta à das porfirinas. Associamos esta c.m.c com a formação de micelas mistas porfirina+tensoativo.

Foi também observado que a adição de NaCl no sistema porfirina+micelas ou porfirina+células ghost facilita a penetração da porfirina no interior da micela ou membrana, diminuindo assim a probabilidade de contato entre as porfirinas e o oxigênio, reduzindo a constante bimolecular de supressão do estado tripleto da porfirina pelo O₂.

A fim de avaliar a influência da estrutura dos fotossensibilizadores (FS) na sua fototoxicidade, comparamos o efeito fototóxico de ambas porfirinas e dois corantes bisciânicos em células de linhagem neoplásica HT29. Os resultados foram analisados levando em consideração as características de ligação dos FS, sua penetração e localização nas células HT29.

A fototividade de ambas porfirinas em cultura celular demonstrou ser independente do tipo de suas cargas, apresentado um perfil de toxicidade muito similar. Os BCDs apresentaram uma elevada toxicidade em comparação com a das porfirinas. Observamos que as porfirinas e os BCDs possuem uma cinética de acumulação muito similar e períodos de ligação muito próximos (2h). Entretanto, o tempo e o local de

internalização parecem ser dependentes tanto da estrutura quanto da carga do FS. Assim, os BCDs se internalizaram após apenas 2 horas e se localizaram preferencialmente nas mitocôndrias. Por outro lado, a TPPS₄ localiza-se principalmente nos lisossomos enquanto que a TMPyP parece estar localizada na membrana celular, ambas com um tempo de internalização de 24 horas. Estes resultados podem explicar a elevada fototoxicidade dos BCDs observada em nossos experimentos.

ABSTRACT

During several decades the porphyrins and their derivatives continue of interest in different areas including various applications, the number of which is increasing with time. One of their most important applications is in modern medicine to detect and extirpate modified tissues, the photodynamic therapy (PDT) being the principle area, which demonstrates promising results.

Taking part of various biological processes, the porphyrins may exist as monomers or aggregates. However, aggregation reduces their efficacy in PDT as it shortens their lifetimes and quantum yields of excited singlet and triplet states, thus reducing the production of singlet oxygen.

There exist various factors, which may modify aggregation of the porphyrins, the electrostatic interaction being very important. Modulation of this interaction can stimulate aggregation or reduce the probability of the aggregate formation. So external conditions such as pH, ionic strength and interaction with microheterogeneous systems can modify this interaction and thus affect the aggregation characteristics.

In this work we present the results received with the help of various spectroscopic techniques on interaction of anionic meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl) (TPPS₄) and cationic meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiumil) (TMPyP) porphyrins with natural and synthetic microheterogeneous systems ("*ghost*" erythrocyte membranes and micelles) in function of their proper structure, the structure of these systems and the external factors (concentration, pH, ionic strength). The principle attention was paid to the effects of this interaction on aggregation of the porphyrins. We analyzed variations in the porphyrin photophysical and photochemical characteristics such as absorption spectra, quantum yields and lifetimes of excited singlet and triplet states, singlet oxygen production, etc., to look for the regularities in their collective behavior which is very important at their possible application in medicine, in PDT of cancer, in particular.

We found that the interaction of the anionic porphyrin TPPS₄ with micelles of the opposite charge or in the presence of high ionic strength at pH < pK_a stimulated sequential formation of two types of aggregates: at the beginning H aggregates were formed which transformed with time in J type. Formation of the aggregates modified the porphyrin absorption spectra, their lifetimes and quantum yields of excited singlet and triplet states and the production of singlet oxygen, as well.

We observed that the interaction with porphyrins reduced up to three orders of magnitude the c.m.c. values for surfactants with the charge opposite to that of the porphyrin. We attribute these reduced c.m.c. values to formation of mixed micelles (surfactant + porphyrin).

We observed that in the presence of NaCl in the systems (porphyrin + micelle) or (porphyrin + "ghost" cells) the dye penetrated more easily the interior of the micelle or the membrane, reducing the probability of its contact with oxygen, and, hence, reducing the bimolecular constant of triplet suppression by O₂.

To evaluate the influence of the structure of photosensitizers (PS) on their phototoxicity we compared phototoxic effects of both porphyrins and two biscyanine dyes upon the neoplastic cells line HT29. The results were analyzed taking into account the characteristics of photosensitizer binding, penetration and localization in cells.

The photoefficacy of both porphyrins was demonstrated independent of the type of their charge, their phototoxicities being very close. The BCDs demonstrated the elevated phototoxicity as compared with that of porphyrins. We observed that both porphyrins and BCDs possessed very close accumulation kinetics and their binding periods were similar (2 h). Nevertheless, the time of the PS entrance to the cell and their intracellular localization were shown to depend on their structure and charge. So, the BCDs entered the cell in two hours and were localized preferably in mitochondrias. The TPPS₄ localized in lysosomes, while TMPyP seemed to prefer the cell membrane, the time of entrance for both being close to 24 hours. These results may explain higher BCDs phototoxicity observed in the experiments.