

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Alexandre de Lima Oliveira

Estudo dos eventos apoptóticos após Terapia Fotodinâmica com  
Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS<sub>4</sub>)

São José dos Campos, SP  
2007

Alexandre de Lima Oliveira

Estudo dos eventos apoptóticos após Terapia Fotodinâmica com  
Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Pacheco-Soares

São José dos Campos, SP  
2007

O45e

Oliveira, Alexandre de Lima  
Estudos dos eventos Apoptóticos após a Terapia Fotodinâmica  
com a

Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada AIPcS<sub>4</sub>. / Alexandre de Lima  
Oliveira. São José dos Campos: UNIVAP, 2007.  
1 disco laser.: Color

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1. Fotoquimioterapia 2. Apoptose 3. Microscopia de  
Fluorescência.
4. Cultura de células I. Soares, Cristina Pacheco, Orient  
II. Título

CDU: 615.831

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:



Data: 27/03/07

**“ESTUDO DOS EVENTOS APOPTÓTICOS APÓS A TERAPIA FOTODINÂMICA COM A  
ALUMÍNIO FTALOCIANINA TETRASULFONADA (AlPcS<sub>4</sub>)”**

Alexandre de Lima Oliveira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP)



Prof<sup>a</sup>. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP)



Prof. Dr. **CLAUDEMIR DE CARVALHO** (FAPÍ)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Cláudio Rocha de Oliveira e Maria Elisa de Lima Oliveira por terem sempre incentivado e acreditado em mim por todos estes anos de estudo, desde meu início na faculdade até agora na conclusão do mestrado.

Dedico também ao meu irmão Felipe Luiz de Lima Oliveira por me fazer rir nos momentos bons e nos momentos ruins e por me apoiar na pós-graduação.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus professores Newton Soares da Silva e Cristina Pacheco Soares por estarem sempre me passando conhecimento e ajudando a desenvolver meu trabalho de pós-graduação.

À professora Josane Mittmann pelo enriquecimento na biologia molecular e também pela paciência em ensinar tudo aquilo que aprendi na “bancada”.

Ao Vinícius Carneiro de Oliveira pelo bom humor e companheirismo nesta jornada, e pelo apoio nos experimentos.

À Aline Helena Araújo Machado, que também colaborou em minhas pesquisas.

À todas as meninas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual pela companhia durante todo este tempo.

À CAPES pelo financiamento.

## Epígrafe

A vida é combate.  
Que os fracos abate.  
Que os forte, os bravos.  
Só podem exaltar

Gonçalves Dias

# Estudo dos eventos apoptóticos após Terapia Fotodinâmica com a Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>)

## Resumo

---

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento para uma variedade de tumores, bem como para selecionadas doenças não-oncológicas. O procedimento requer a exposição de células ou tecidos a uma droga fotossensibilizante seguida pela irradiação com luz de um comprimento de onda apropriado, usualmente na região vermelho ou infravermelho próxima e compatível com o espectro de absorção da droga. Diversas organelas celulares podem ser postuladas como alvos para TFD com diferentes fotossensibilizantes, como, membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomos e estruturas citoesqueléticas. Objetivando verificar a ativação das caspases-3 e fragmentação do DNA, em células Hep-2, decorrentes da TFD foi utilizado o fotossensibilizante Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>- 10 µM) e irradiação com laser diodo em comprimento de onda 685 nm, densidade de energia 4,5 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados obtidos indicaram atividade das caspases-3 em todo o citoplasma das células. Juntamente com a microscopia de fluorescência foi analisado o DNA que apresentou fragmentado após a TFD sugerindo uma morte celular apoptótica.

Palavras chave: Terapia Fotodinâmica, apoptose, células Hep-2, AIPcS<sub>4</sub>, câncer.



# **Study of the apoptotic events after Photodynamic Therapy with the Aluminum Phthalocyanine Tetrasulfonate**

## **Abstract**

---

Photodynamic Therapy (PDT) is a treatment modality for one variety of tumors, as well as to some selected non-oncologic diseases. The procedure requests the exhibition of the cells or tissue to a photosensitizer drug followed by light irradiation of an appropriate wave length, usually in the red area or close infrared and compatible with the drug absorption spectrum. Several cellular organelles can be postulated as target for PDT with different photosensitizers as plasmatic membrane, nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi complex, and others. Aiming to verify the caspase-3 activation and DNA fragmentation, in Hep-2 cells, after PDT, we used the Aluminum Phthalocyanine Tetrasulphonated (AlPcS<sub>4</sub> - 10 µM) and irradiation with laser diode at 685 nm wavelengths, energy density of 4.5 J/cm<sup>2</sup>. The results indicated significant activation of caspase-3. Together with the fluorescence microscopy, the DNA showed fragments after PDT, suggesting cellular death by apoptosis.

Keywords: Photodynamic Therapy, Apoptosis, Fluorescence microscopy, Hep-2 cell, DNA fragmentation.

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1:</b> Envolvimento da mitocôndria na apoptose.....	09
<b>Figura 2:</b> Via extrínseca de morte desencadeada pelos receptores de morte Fas e TNF.....	12
<b>Figura 3:</b> Processo fotoquímico e fotofísico da Terapia Fotodinâmica.....	16
<b>Figura 4:</b> Estrutura da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS <sub>4</sub> ).....	19
<b>Figura 5:</b> Diferentes alvos intracelulares da Terapia.....	21
<b>Figura 6:</b> Células Hep-2 sem tratamento fotodinâmico, grupo controle.....	35
<b>Figura 7:</b> Células Hep-2 incubadas com o marcador fluorescente z-DEVD-amc mostrando a atividade das caspases-3 (setas) 12h após a Terapia Fotodinâmica...35	35
<b>Figura 8:</b> Células Hep-2 sem o tratamento fotodinâmico, grupo controle.....	36
<b>Figura 9:</b> Células Hep-2 incubadas com o marcador fluorescente z-DEVD-amc mostrando a atividade das caspases-3 24h após a Terapia Fotodinâmica.....	37
<b>Figura 10:</b> Células Hep-2 sem tratamento fotodinâmico, grupo controle.....	38
<b>Figura 11:</b> Células Hep-2 incubadas com o marcador fluorescente z-DEVD-amc mostrando a atividade das caspases-3 48h após a Terapia Fotodinâmica.....	39
<b>Figura 12:</b> DNA extraído de células Hep-2. 1, marcador molecular; 2, DNA de células Hep-2 sem tratamento; 3, DNA extraído de células Hep-2 24 horas após a terapia fotodinâmica.....	40
<b>Tabela 1</b> .....	31

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

---

AlPcS<sub>4</sub> – Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada

Apaf-1 – Fator de ativação apoptótica

ATP – Adenosinatrifosfato

cm – Centímetro

cm<sup>2</sup> – Centímetro quadrado

SDS – Sódio dodecil sulfóxido

DMSO – Dimetil sulfóxido

J – Joules

ml – Mililitro

mM – Milimolar

mW – Miliwatts

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanômetros

°C – Grau centígrado

PBS – tampão fosfato salina

RPM – Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino

TFD – Terapia fotodinâmica

Z-DEVD-amc – Acetil- asp-glu-val-asp-7-amido-4-metil-coumarina.

μl – Microlitro

μM – Micromolar

# SUMÁRIO

---

1. Introdução.....	14
2. Objetivos gerais.....	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3. Revisão de Literatura.....	16
3.1 Câncer.....	16
3.2 Morte Celular Programada.....	19
3.2.1 Via intrínseca de morte por apoptose.....	20
3.2.2 Via extrínseca de morte celular por apoptose.....	22
3.2.3 Fragmentação do DNA.....	25
3.2.4 Necrose.....	26
3.3 Terapia Fotodinâmica e Fotossensibilização.....	28
3.3.1 Fotossensibilizante.....	30
3.3.2 Mecanismos de Morte na Terapia Fotodinâmica.....	33
3.3.3 Laser.....	37
4. Material e Métodos.....	39
4.1 Linhagem Celular.....	39
4.2 Meio de Cultura.....	39
4.3 Soro Fetal Bovino.....	40
4.4 Crescimento e Manutenção da Cultura de Células.....	40
4.5 Reagentes, Soluções e Tampões.....	41
4.6 Fotossensibilizante e Incubação.....	42

4.7 Laser e Irradiação.....	43
4.8 Quimioluminescência da Caspase-3.....	44
4.9 Extração de DNA e eletroforese em Gel de Agarose.....	45
5. Resultados.....	47
5.1 Microscopia de Fluorescência de Caspase-3 Ativa.....	47
5.2 Fragmentação do DNA.....	53
6. Discussão.....	54
7. Conclusã.....	57
Referências Bibliográficas.....	58

# 1. INTRODUÇÃO

---

A Terapia Fotodinâmica (TFD) se estabeleceu em todo o mundo como um processo seletivo, em que as células neoplásicas são eliminadas do organismo com um traumatismo mínimo para as células normais (FABRIS et al., 2001).

O princípio básico da Terapia Fotodinâmica baseia-se na iluminação de células neoplásicas, que absorveram corantes fotossensibilizantes que se acumularam preferencialmente nestas células. Estas características permitem que a luz em conjunto com o fotossensibilizante atue somente no tumor, elevando a possibilidade de sobrevivência dos pacientes para mais de 95% (ALLISON et al., 2004).

Esta terapia desencadeia uma série de processos fotoquímicos e fotobiológicos, cujo resultado é um dano irreversível no tecido tumoral. O fotossensibilizante ao receber irradiação laser com comprimento de onda específico, na presença de oxigênio no ambiente, induz vários processos fotoquímicos envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio - EROs ( $O_2$ , OH,  $H_2O_2$ ), os quais atacam centros dos sistemas celulares, desencadeando a morte dos tecidos tumorais por necrose ou apoptose (morte celular programada) (SAKHAROV et al., 2003).

## 2. OBJETIVOS GERAIS

---

Através de técnicas de microscopia de fluorescência e eletroforese em gel de agarose, este trabalho buscou analisar os efeitos decorrentes da terapia fotodinâmica através da observação de alterações ocorridas no DNA das células e ativação de determinadas vias bioquímicas celulares.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos da TFD com a AIPcS<sub>4</sub> (Alumínio ftalocianina tetrasulfonada) em células Hep-2, dando ênfase na atividade das caspases-3 através da utilização de marcadores fluorescentes específicos;
- Observar a fragmentação do DNA após a TFD com a AIPcS<sub>4</sub>;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

---

#### 3.1 CÂNCER

O câncer hoje é claramente compreendido como uma doença genética das células somáticas. No câncer, os mecanismos contra falhas para garantir que o número de células permaneça balanceado em relação ao organismo total estão subvertidos, e as células cancerosas multiplicam-se descontroladamente. Os cânceres são agregados de células, todas derivadas de uma célula fundadora aberrante que, embora rodeada de tecido normal, não está mais integrada a este ambiente. As células cancerosas em geral diferem de suas vizinhas normais por várias alterações fenotípicas específicas, tais como taxa de multiplicação rápida, invasão de novos territórios celulares, alta taxa metabólica e forma anormal (GRIFFITHS et al., 2001).

Certos eventos convertem células normais em células transformadas, constituindo modelos para os processos envolvidos na formação de tumores. Geralmente, são necessárias alterações genéticas múltiplas para criar um câncer. E às vezes os tumores têm a taxa de multiplicação aumentada em função de uma série progressiva de modificações.

Uma variedade de agentes aumenta a freqüência na qual as células são convertidas em condições transformadas. Esses agentes são chamados de carcinogênicos. Eles podem iniciar ou promover a formação de tumores, indicando a existência de diferentes estágios no desenvolvimento de câncer. Os oncogenes



foram inicialmente identificados como genes carregados por vírus que causam a transformação de células alvo. Os genes celulares são chamados de proto-oncogenes e, em certos casos, mutações ou ativação dos mesmos na célula estão associadas à formação de tumores. Os oncogenes são enquadrados em vários grupos, representando diversos tipos de atividades, que vão desde proteínas de membrana até fatores de transcrição. A definição destas funções pode, portanto, levar ao entendimento dos tipos de modificações envolvidos na formação de tumores. A geração de um oncogene representa um evento de ganho de função, no qual um proto-oncogene celular é ativado inapropriadamente. Isto envolve a mutação de uma proteína, expressão do gene de uma forma constitutiva e a super expressão ou a falha na ativação da sua expressão no seu momento adequado (LEWIN., 1997).

O causador central de cânceres humanos é a ação do oncogene *ras* que produz uma proteína *ras* anormal promovendo excessiva proliferação celular. Os proto-oncogenes da família *ras* codificam uma proteína de 21 KDa (p21/*ras*), que ocupa uma função central na via de transdução de sinal da membrana da célula para o núcleo e que tem uma função crítica no controle do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência (AURORA et al., 2006).

Os genes supressores de tumor são detectados por deleções que são tumorigênicas. A evidência mais convincente da natureza destes genes é fornecida por certos cânceres hereditários, que se desenvolvem em pacientes que perderam ambos os alelos e, portanto não possuem um gene ativo (LEWIN., 1997).

Células eucarióticas respondem a danos ao DNA pela ativação de vias de transdução de sinal que leva a retenção do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. Talvez a mais proeminente entre as respostas induzidas por danos ao DNA seja a

ativação do fator de transcrição p53. Ela é uma proteína de ligação a seqüências específicas do DNA, que promove detenção do ciclo celular e apoptose em resposta a uma variedade de estresse (LOWE., 1999).

Em células normais, sob condições fisiológicas, a proteína supressora de tumor p53 é expressada em baixos níveis. A proteína Mdm (do inglês “murine double minute”) se liga ao p53 e a direciona a um processo de ubiquitinação, ligação da proteína ubiquitina a resíduos de lisina de proteínas a serem degradadas e proteólise. No entanto, sua expressão é estabilizada em resposta a danos ao DNA e irregularidade causada por oncogenes. Como ele é um fator de transcrição, ele pode dirigir a transcrição de genes responsáveis na via de apoptose da célula garantindo que células com o genoma comprometido sejam eliminadas impedindo o surgimento de tumores. ( DI BACCO et al., 2000).

### **3.2 MORTE CELULAR PROGRAMADA**

Jonh Kerr, durante os anos 60, observou um padrão de morte celular consistente a qual denominou “necrose por encolhimento”. Foi relativamente fácil observar como as células necróticas poderiam se romper caso as bombas iônicas falhassem, elas acumulariam lactato levando à entrada de água por osmose e acidificação, assim elas inchariam e em seguida ocorreria a lise celular. Porém, foi difícil entender porque as células encolhiam, sendo que isto só poderia ser feito por perda de solutos.

No inicio da morte celular, Benjamin Trump (1971), interpretou tal conhecimento descrito por Kerr e reconheceu a importância do ATP (fonte de energia) neste processo. Ao se juntar com Andrew Wyllie e A R. Currie, Kerr, em

1972, generalizou a idéia de que a morte celular seguia um padrão específico que incluía encolhimento da célula, pequeno dano aparente às organelas, marginalização da cromatina, fragmentação celular e nuclear e estruturas celulares fragmentadas dentro de vesículas (corpos apoptóticos) (TAMIETTI., 2006). Estas características são acompanhadas por uma série de eventos bioquímicos os quais incluem a exposição de fosfatidilserina e outras alterações que promovem o reconhecimento por células fagocitárias (EARNSHAW, MARTINS, KAUFMANN., 1999).

Depois da descrição feita por Wyllie e colaboradores em 1972, a compreensão sobre a morte celular por apoptose foi expandida exponencialmente. Ela é essencial para o desenvolvimento embrionário e desenvolvimento de tecidos normais além da remoção de células com características genéticas instáveis (REGULA, ENS, KIRSHENBAUM., 2003).

A morte celular programada pode ser desencadeada por uma variedade de sinais de morte. Estes consistem na interação de um ligante a um receptor de morte (via extrínseca), danos a mitocôndria (via intrínseca), perturbação no balanço entre a redução e a oxidação das células (redox), perturbação no metabolismo de energia, geração de ceramida, mobilização de  $Ca^{2+}$ , ou a ativação das proteínas membros da família da Bcl-2 (CHEN, CROSBY, ALMASAN., 2003).

### **3.2.1 VIA INTRÍNSECA DE MORTE POR APOPTOSE**

Por mais de uma década ficou claro que a apoptose é freqüentemente controlada por um ou mais passos cruciais os quais envolvem diretamente a mitocôndria. Estudos recentes ajudaram a elucidar aspectos fundamentais deste

envolvimento enquanto novas questões surgiam sobre as rotas mitocondriais de morte celular (via intrínseca) (figura 1). A primeira alteração que ocorre na mitocôndria durante a apoptose é a perda do potencial de membrana mitocondrial e vazamento do citocromo C para o citossol. Quando presente no citoplasma, o citocromo C se liga a Apaf-1 (fator ativador de proteases apoptóticas) e a pro-caspase-9 para formar um complexo protéico chamado de apoptossomo levando a autoclivagem e ativação da caspase-9, que por sua vez, cliva e ativa as caspases-3 e 6 (NOWIS et al., 2005). Elas são uma família de cisteases, ricas em cisteínas, que clivam proteínas alvo em resíduos de ácido aspártico no lado carboxila da cadeia polipeptídica, e são divididas em duas classes de acordo com o comprimento de seus pró-domínios N-terminal: caspases iniciadoras tais como caspases-8 e 10, e caspases efetoras tais como -3, -6 e -7 (KAUFMANN, HENGARTNER., 2001; HUANG et al., 2005).

A liberação de outras proteínas facilita a ativação das caspases através da inativação de inibidores destas. Sua ativação leva à apoptose como descrito anteriormente, mas a inibição delas após um estímulo apoptótico apenas protege as células transitoriamente. Uma vez que a mitocôndria é permeabilizada, a morte prosseguirá devido a mediadores tóxicos liberados da mitocôndria, ou eventual perda das funções essenciais da mesma (TAMIETTI., 2006).

No que diz respeito ao citocromo C, ela é uma proteína solúvel localizado no lado externo da membrana interna da mitocôndria ligada ao fosfolípídeo aniônico cardiolipina. Sob condições fisiológicas normais, ela funciona como um carreador de elétrons entre os complexos III e IV da cadeia transportadora de elétrons, necessário para a produção de ATP na célula (CHEN, CROSBY, ALMASAN., 2003). Além disso, o citocromo C tem uma função protetora da célula contra os radicais de oxigênio produzidos pela cadeia respiratória, convertendo o oxigênio singlete ( $O_2^-$ ) à

oxigênio molecular (SKULACHEV., 1998). Evidências sugerem que a dissociação do citocromo C da cardiolipina é um passo crítico para a liberação deste para o citossol e a indução do processo apoptótico. Estudos sobre o envolvimento mitocondrial na apoptose abrange uma enorme gama de tipos celulares que variam desde células em desenvolvimento de minhocas e ovos de sapo até células tumorais indiferenciadas e outros tipos celulares como hepatócitos, enterócitos e miócitos. Embora estas linhagens apresentem ambos os tipos de sinalização, na realidade estes caminhos coexistem. O que ocorre é que, simplesmente, a produção de sinais é mais rápida em um quando comparado com o outro, (TAMIETTI., 2006).

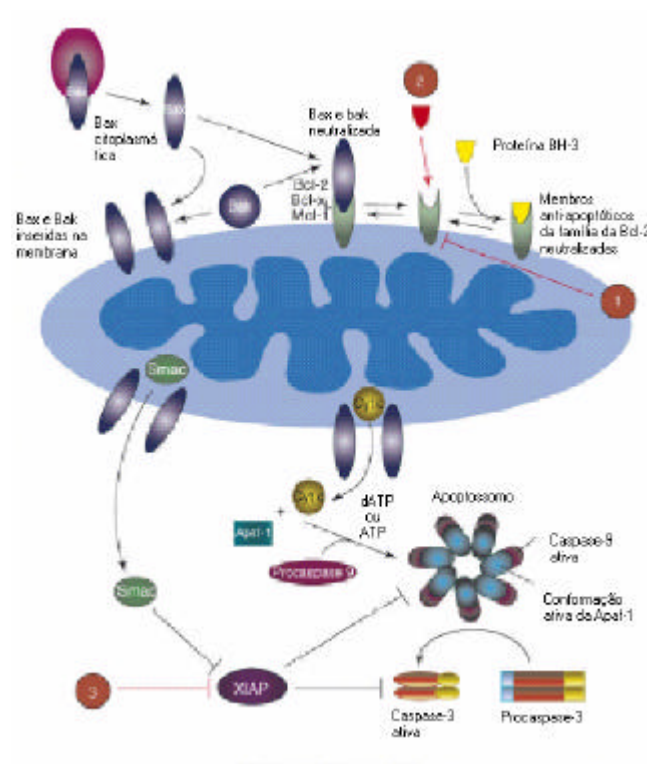


Figura 1. Envolvimento da mitocôndria na apoptose. (MENG, LEE, KAUFMANN., 2006).

### 3.2.2 VIA EXTRÍNSECA DE MORTE POR APOPTOSE

A apoptose pode também ocorrer após um estímulo externo pela ligação de um ligando a um receptor de morte da célula designado de via extrínseca (figura 2).

Um modelo bem descrito é a morte celular desencadeada pelo ligando Fas (FasL). Neste modelo, o ligando se liga ao seu respectivo receptor, receptor Fas, e posteriormente, irá formar um complexo no citoplasma com uma outra proteína adaptadora, a FADD (do inglês, Fas-associated death domain, domínio de morte associado ao Fas). Por sua vez é recrutada a pro-caspase-8 que se auto-cliva (PETAK, HOUGHTON., 2001).

Uma vez ativa, a caspase-8 é capaz de ativar caspases efetoras como a caspase-3. Em certos sistemas de células, a ativação da caspase-8 é suficiente para iniciar a cascata proteolítica requerida para a degradação celular apoptótica. No entanto, a ativação de receptores de morte pode promover o recrutamento da via intrínseca, necessário para a ativação da apoptose em certos tipos de células. Por exemplo, ao invés da ativação das caspases efetoras, outro alvo notável da caspase-8 é a proteína contendo somente o domínio BH3, a Bid. Em resposta ao ligando Fas ou outro tipo de ligando como a TNF (fator de necrose tumoral), a caspase-8 induz a clivagem da Bid para produzir um fragmento carboxila terminal truncado (tBid, do inglês trunqued Bid) que transloca do citossol para a membrana mitocondrial externa. Oligômeros da Bid truncada podem desencadear a permabilização da membrana mitocondrial (MMP, do inglês mitochondrial membrane permeability) e ativação das caspases pelo vazamento do citocromo C para o citossol. Há evidências indicando que a Bid truncada pode desencadear uma mudança conformacional na Bax, que então se locomove para o canal aniônico

voltagem dependente na membrana mitocondrial externa desencadeando a MMP. Posteriormente, o recrutamento da via intrínseca da apoptose pela ativação da caspase-8 pode servir como iniciadora e/ou amplificar sinais intracelulares para ativar a apoptose (HAIL et al. 2006).

Estas vias são reguladas primariamente por membros da família da Bcl-2, que contém proteínas anti e pró-apoptóticas. A proporção delas vai determinar a susceptibilidade da célula a algum estímulo apoptótico. Uma das fortes características das proteínas da família da Bcl-2 é sua habilidade em formar homodímeros e heterodímeros. A heterodimerização entre os membros pró e anti-apoptóticos dos membros desta família é considerada fator de inibição da atividade biológica de seu parceiro (TSUJIMOTO.,1998).

Todas contêm um dos quatro domínios de homologia à Bcl-2 (BH). Os membros anti-apoptóticos incluem, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e Bfl-1, que são caracterizados pela presença de todos os quatro domínios BH (BH1-BH4). A maioria desses membros contém uma cauda hidrofóbica C-terminal, que faz com que estas proteínas se liguem a mitocôndria e/ou ao retículo endoplasmático. Estas proteínas podem prevenir a morte celular pela ligação e seqüestro de proteínas pró-apoptóticas. Esses membros promotores de morte são divididos de acordo com sua função e estrutura bioquímica dentro do multi-domínio da proteína, tais como a Bax e Bak, que são semelhantes à Bcl-2, mas com falta do domínio BH4. O outro subgrupo é representado por membros que contêm somente o domínio BH3, necessário para a ligação de outros membros e promovendo a atividade de morte. Os representantes deste grupo incluem a Bik, Bid, Puma e Noxa. Acredita-se que elas sejam responsáveis pela transdução de um sinal específico de morte celular. Após sua ativação, a Bax e Bak sofrem modificações conformacionais que contribuem para

aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial externa pela formação de poros. Elas também facilitam a liberação do citocromo C e subsequente ativação das caspases (OANCEA et al., 2004).

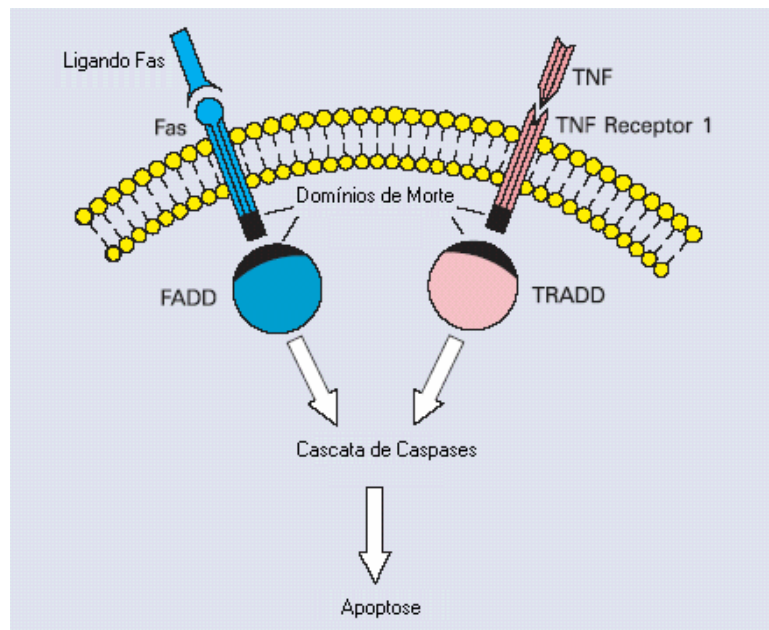


Figura 2. Via extrínseca de morte desencadeada pelos receptores de morte Fas e TNF (ISRAELS, ISRAELS., 1999).

### 3.2.3 FRAGMENTAÇÃO DO DNA

Em 1980, Wyllie demonstrou que quando timócitos de camundongo eram tratados com glicocorticóides, uma substancial quantidade de cromatina era liberada do núcleo. O DNA liberado continha quebra nos dois filamentos, e consistia em fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases, que é o tamanho do DNA complexado com o nucleossomo. Uma vez que a composição protéica não foi diferente dos nucleossomos intactos, foi concluído que endonucleases específicas de dupla quebra eram ativadas durante a apoptose clivando na região nucleossomal para produzir a fragmentação do DNA. Subseqüentemente, a aplicação de



eletroforese em gel de campo pulsado mostrou que antes ou na ausência de clivagem internucleossomal, o DNA cromossomal era clivado em fragmentos maiores com cerca de 50-300 Kb (onde 1 Kb equivale a 1000 pares de base). Quando extratos citosólicos de células em proliferação eram tratados com caspases, elas induziam a fragmentação do DNA em núcleos isolados. Um dos fatores responsáveis por este fenômeno é a CAD (DNAase ativada por caspase) (NAGATA et al., 2003). A caspase-3 está envolvida neste sistema pelo complexo ICAD/CAD (onde ICAD significa inibidor de DNase ativada por caspase), no qual a caspase-3 cliva a ICAD e a CAD que se localiza no núcleo torna-se livre para agir na fragmentação oligonucleossomal do DNA (WIDLAK., 2000).

Tem sido demonstrada a presença de efetores de morte independentes de caspase como o AIF (fator indutor de apoptose) e Endonuclease G na mitocôndria. Durante a apoptose o AIF é importante na fragmentação do DNA em larga escala (aprox. 50 Kb) quando liberada no citoplasma. E a Endo G, como o AIF, transloca para o núcleo causando fragmentação oligonucleossomal do DNA (ARNOULT et al., 2003).

### **3.2.4 NECROSE**

Morfologicamente a necrose é completamente diferente da apoptose. Na necrose ocorre primeiro o aumento do volume celular, e então a membrana plasmática se colapsa e a célula é rapidamente lisada. Dentre os agentes mais comuns responsáveis em induzir a necrose estão os vírus, bactérias e protozoários. Outros agentes também podem induzir a necrose, como as espécies reativas de oxigênio (EROs). Como uma consequência da alta toxicidade do oxigênio, células

aeróbicas possuem sistemas de defesa antioxidativas. O estresse oxidativo induz uma resposta apoptótica se as células tiverem a capacidade de redução contra as EROs, caso contrário a necrose é desencadeada quando a homeostase deste sistema é perturbado (excesso na produção de EROs ou danos aos sistemas antioxidativos). Outro fator importante é a disponibilidade de ATP, uma vez que na apoptose ela é necessária para a formação do apoptossomo, sua depleção pode alternar para a morte celular necrótica (PROSKURYAKOV, KONOPLYANNIKOV, GABAJB et al., 2003).

Vercammen et al (1998) mostraram que células L929 de fibrosarcoma de rato, tratadas com TNF, morrem rapidamente por necrose devido a excessiva produção de radicais de oxigênio na mitocôndria e pela inibição das caspases na presença do inibidor z-VAD-fmk. Eles ainda demonstraram uma função protetora das caspases contra a morte celular necrótica pela remoção de radicais de oxigênio produzidas após a estimulação das células L929 com TNF (VERCAMMEN et al., 1998).

Em modelos *in vivo* a liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular estimula a resposta inflamatória e amplia a lesão tecidual. O fenômeno de morte celular por necrose é facilmente reconhecido nos espécimes de biópsia hepática porque os restos celulares permanecem por longo período antes de serem removidos pelas células inflamatórias (SOUSA., 2005).

### **3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO**

As primeiras tentativas no uso de drogas fotossensíveis para a cura de doenças de pele foram registradas no Egito antigo, Índia e Grécia, onde extrato de

plantas contendo Psolaren e luz eram usadas no tratamento de psoríase e vitiligo. A palavra fotodinâmica foi descrita pela primeira vez por Von Tappeiner em 1904 para descrever as reações químicas envolvendo o oxigênio induzido pela fotossensibilização. A expansão da Terapia Fotodinâmica se deu graças ao pioneirismo de T. J Dougherty que demonstrou sucesso na aplicação desta técnica no tratamento de câncer em 1978 (LUKSIENE., 2003).

A Terapia Fotodinâmica envolve uma droga fotossensível, luz visível que é absorvida pelo corante e oxigênio molecular. O fotossensibilizante, que se acumula preferencialmente ou é retido em tecidos alvos, absorve luz, passando para a forma excitada no estado triplete. (MORGAN et al. 2001).

A droga fotossensível ou fotossensibilizante quando exposta a luz é excitada no estado triplete, que dentro de uma célula alvo pode sofrer reações do tipo I e II. Na reação tipo I, ela pode reagir diretamente com um substrato, tal como uma membrana ou molécula celular, e transferir um próton ou um elétron para formar um radical aniônico ou catiônico, respectivamente. Estes radicais podem reagir diretamente com o oxigênio, passando para a forma excitada no estado singlete. Na do tipo dois o fotossensibilizante no estado triplete pode perder essa energia emitindo fluorescência ou passar para um nível de energia menor (estado singlete), que irá transferir essa energia diretamente para o oxigênio molecular, formando oxigênio excitado no estado singlete (oxigênio singlete). Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente dependendo do fotossensibilizante usado e a concentração de oxigênio disponível. (CASTANHO, DEMINOVA, HAMBLIN., 2004), (Figura 3).

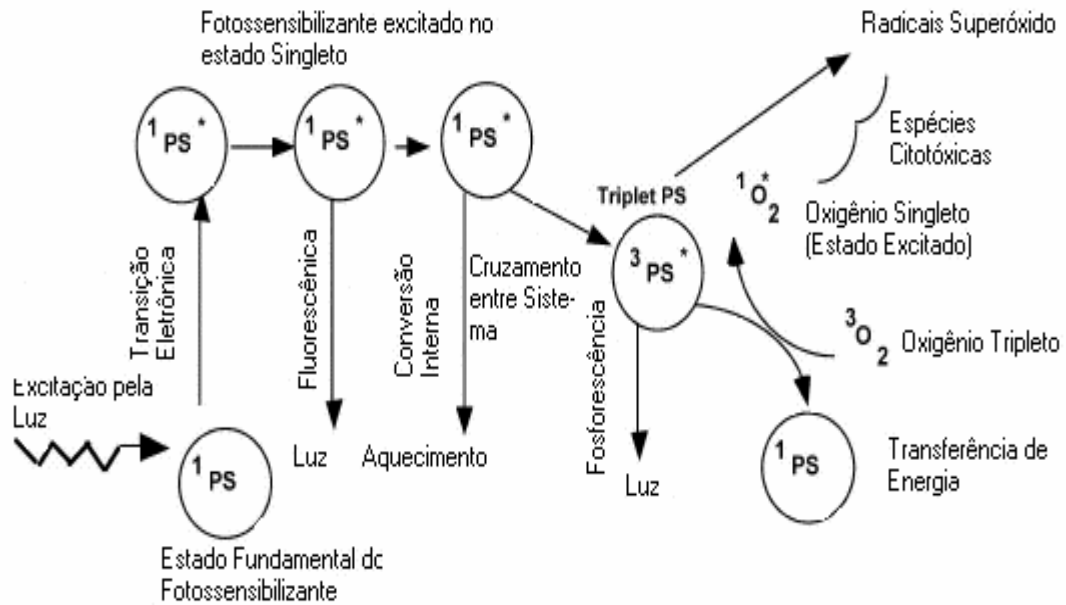
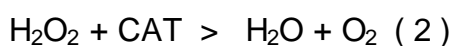
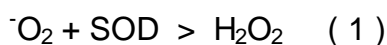
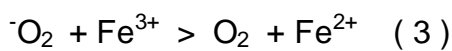


Figura 3. Processo fotoquímico e fotofísico da Terapia Fotodinâmica (CASTANHO, DEMINOVA, HAMBLIN., 2004).

A maioria dos organismos vivos produz enzimas antioxidantes, que constituem um sistema protetor contra as espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto ( $O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $-OH$ ), para preservar a homeostase em sistemas biológicos. A superóxido dismutase (SOD), uma das enzimas mais importantes neste sistema, converte estes radicais aniônicos em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (1), e a enzima Catalase (CAT) decompõe o  $H_2O_2$  em água e oxigênio (2), reação esta chamada dismutação (NAGAMI et al., 2005)



O oxigênio singlete pode ser responsável pela produção de outra molécula altamente reativa, o radical hidroxila (  $\cdot\text{OH}$  ). Isso é devido ao fato de que o  $\cdot\text{O}_2$  doa um elétron para reduzir metais iônicos, tais como, o ferro na forma férrica ou  $\text{Fe}^{3+}$ , formando  $\text{Fe}^{2+}$  ( forma ferrosa ) ( 3 ). Este então catalisa a conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\cdot\text{OH}$  pela quebra da ligação oxigênio - oxigênio do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ( 4 ). Reação esta chamada de Reação de Fenton (URBANSKI, BERÉSEWICZ., 2000).



O que ocorre na Terapia Fotodinâmica é o processo de estresse oxidativo, um mecanismo no qual ocorre a oxidação de moléculas celulares saturando os processos de proteção da célula contra a ação oxidativa das espécies reativas de oxigênio, que são produzidos durante os processos fotoquímicos e fotofísicos desta terapia, levando a célula à morte por apoptose ou necrose.

### 3.3.1 FOTOSSENSIBILIZANTES

As propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizantes são importantes para a sensibilização de tecidos cancerosos. O fotossensibilizante deve possuir uma estrutura pura, deve ser capaz de se localizar em tecidos neoplásicos, ser ativado por comprimentos de onda que sejam ideais não só para a sua ativação, mas também para a penetração em tecidos, rápida eliminação por células normais, ser atóxica no escuro e apresentar alta produção de espécies reativas de oxigênio, (LUKSIENE., 2003).

Os mecanismos envolvidos na distribuição preferencial do fotossensibilizante nos tumores ainda não estão completamente compreendido. As propriedades do tumor podem contribuir para a distribuição seletiva do corante, como a alta expressão de receptores lipoprotéicos de baixa densidade. Muitos tipos de tumores expressam alto número de receptores de membrana lipoprotéicos de baixa densidade. A associação do fotossensibilizante aos receptores acaba por interiorizado-lo nas células anormais pela via endocítica, podendo, dependendo do fotossensibilizante usado, se localizar em sítios subcelulares (DOUGHERTY et al., 1998).

O Ácido-5-aminolevulínico (ALA) é um dos fotossensibilizantes mais empregados na Terapia Fotodinâmica. Ele funciona como uma pró-droga, isto é, ele age como um precursor na via de biossíntese de grupamentos heme, molécula essa que irá constituir os citocromos na mitocôndria e hemácias na circulação sanguínea (MORGAN, OSEROFF., 2001). O ALA, após uma série de transformações metabólicas, é convertido em protoporfirina IX dentro da mitocôndria pela enzima porfobilinogênio deaminase e a protoporfirina IX é então convertida em heme pela enzima ferroquelatase (ZHANG, ZHEN., 2004). Em células malignas, há um aumento na atividade da porfobilinogênio deaminase e deficiência na atividade da ferroquelatase. Conseqüentemente a protoporfina IX, que possui excelente propriedade fotossensível, é acumulada podendo então um tecido ou uma cultura de células ser irradiada com laser (GREBENOVA et al., 2000).

Na terapia fotodinâmica, uma variedade de componentes fotossensibilizantes sintéticos de segunda geração tem sido produzidos, entre eles as ftalocianinas. As ftalocianinas constituem uma ampla classe de componentes com alto coeficiente de excitação na região espectral vermelha (630-750 nm), e

apresentam excelentes propriedades de se localizarem em tumores. Muitas das ftalocianinas apresentam características lipofílicas, isto é, insolúveis em ambiente aquoso mas se adicionados sulfatos ou outro grupos aos anéis externos da cadeia, é formado um derivado solúvel que aumenta sua capacidade de absorção pelas células cancerosas. (JUZENAS et al., 2004).

A porção central das ftalocianinas, que compreende a região de excitação da molécula, pode variar de alumínio, zinco ou silício (ALLISON et al., 2004). Seus alvos intracelulares incluem membranas biológicas como a membrana plasmática, membranas do retículo endoplasmático, da mitocôndria e do aparelho de Golgi (FERREIRA et al., 2004). A figura 2 mostra a estrutura molecular da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>).

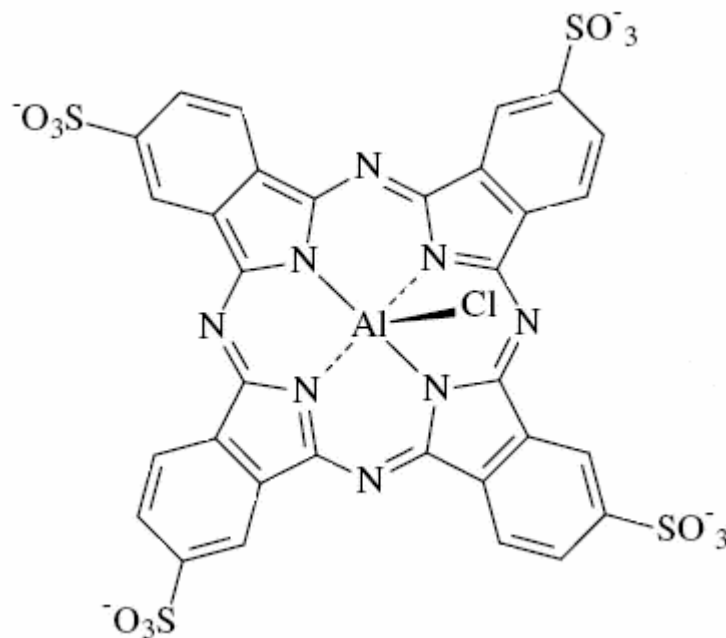


Figura 4. Estrutura da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>).

O padrão específico de localização das ftalocianinas, no entanto, depende do tipo de célula e do tempo de exposição do corante. A localização e citotoxicidade da zinco ftalocianina (ZnPc), por exemplo, depende do tempo de incubação em cultura de células 4R (fibroblasto de embrião de rato). Após 2 horas de incubação, a microscopia de fluorescência mostrou que a ZnPc se localizou no aparelho de Golgi e em poucas quantidades na membrana plasmática. Após 24 horas de incubação, a ZnPc permaneceu no aparelho de Golgi, mas foi observado claramente sua sublocalização na mitocôndria (DONGEN, VISSER, VROUENRAETS., 2004).

Usuda et al (2003) demonstraram que a localização da Ftalocianina 4 (Pc 4) em células DU-145 (células de câncer de próstata humana) se dá preferencialmente em membranas da mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, após um período de incubação de 16 horas antes da irradiação (USUDA et al., 2003).

Como as ftalocianinas emitem fluorescência quando excitadas, sua localização pode ser determinada por técnicas de microscopia de fluorescência (DONGEN, VISSER, VROUENRAETS., 2004).

### **3.3.2 MECANISMOS DE MORTE NA TERAPIA FOTODINÂMICA**

Tem sido mostrado que a apoptose é uma dominante forma de morte celular após a TFD em múltiplos experimentos utilizando vários fotossensibilizantes diferentes e tipos diferentes de linhagens celulares (ALMEIDA et al., 2004) (figura 5).



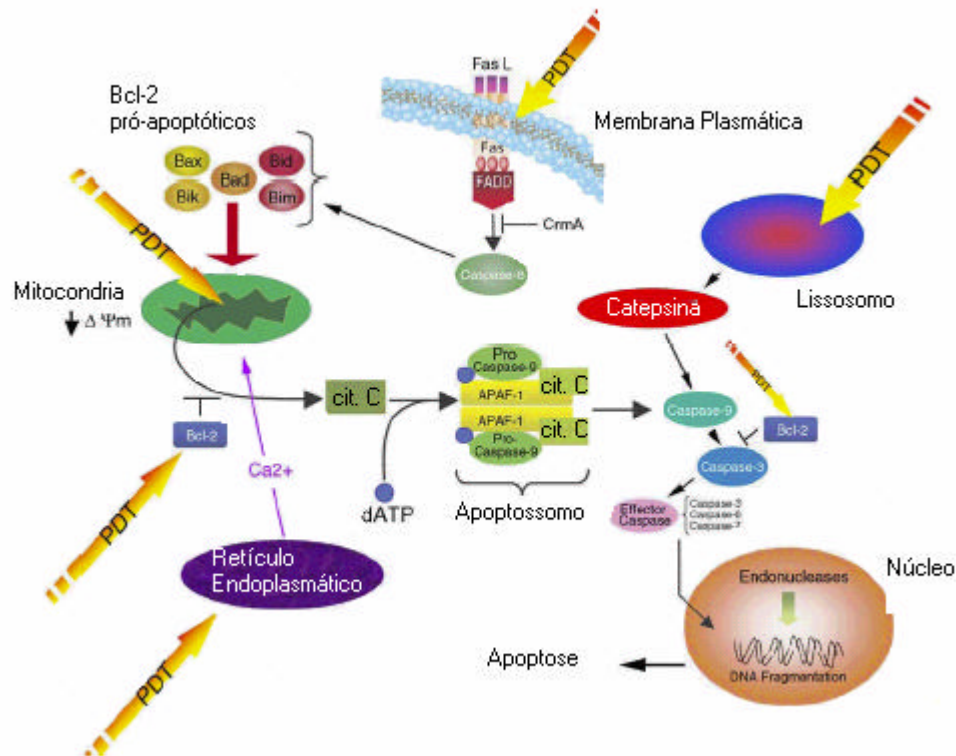


Figura 5. Diferentes alvos intracelulares da Terapia Fotodinâmica (CASTANHO, DEMINOVA, HAMBLIN., 2005).

Huang e colaboradores em 2005 mostraram que na TFD com a Zinco Ftalocianina Disulfonada ( $ZnPcS_2$ ) com localização principal na membrana mitocondrial em células K562 (células de leucemia mielóide crônica), é eficaz em induzir a apoptose. Neste trabalho eles analisaram características clássicas da apoptose como fragmentação do DNA e liberação do citocromo C para o citossol (HUANG, CHEN, WU., 2005).

Foi mostrado que a perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento do volume e ruptura da membrana externa mitocondrial são responsáveis pelo vazamento do citocromo C e AIF. Embora os detalhes da regulação do poro de transição de permeabilidade (PTP) ainda estejam incertos, evidências indicam que as EROs promovem esta permeabilidade via peroxidação das estruturas lipídicas. A

abertura desse poro resulta na permeabilização da membrana interna mitocondrial, desacoplamento da mitocôndria no processo respiratório e aumento do volume. Esse aumento do volume leva à ruptura da membrana externa causando liberação das proteínas internas da membrana para o citossol (LAM, OLEINICK, NIEMINEM., 2001).

A apoptose, no entanto, não é o único tipo de morte celular observada na TFD, a necrose também pode ocorrer. Fatores que a promovem incluem localização extra mitocondrial do fotossensibilizante e alta dose do laser (PIETTE et al., 2003).

Pluskalová (2006), usando o ALA como precursor do fotossensibilizante protoporfirina IX, analisou a necrose causada em células K562 após a Terapia Fotodinâmica. Ela analisou proteínas envolvidas no citoesqueleto da célula como a cofilina, que é responsável na desorganização do citoesqueleto após desfosforilada pela LIM kinase e a septina2, que forma filamentos participando na reorganização da actina após algum estresse. Outras proteínas envolvidas no combate ao estresse são as Hsps (proteínas de choque térmico) que podem impedir a apoptose desencadeada por uma série de estímulos como: hipertermia, estresse oxidativo e várias drogas anti-câncer. (PLUSKALOVÁ et al., 2006; GARRIDO et al., 1999).

Proteínas de choque térmico são proteínas da família das chaperoninas que possuem a habilidade de desagregação, redobramento e renaturação de proteínas que sofreram algum tipo de estímulo danoso. Dentre os membros mais estudados estão as subfamílias Hsp70 e Hsp90 que possuem um domínio C-terminal de ligação a peptídeos alvo que posteriormente exercem sua função anti-apoptótica (BEERE., 2005).

Um dos fatores mais importantes na TFD em modelos *in vivo* é a liberação da Hsp70 de células mortas por necrose desencadeando posterior resposta

inflamatória (CASTANHO et al. 2006). A produção das Hsp-70 e -90 protege as células da apoptose desencadeada pela TFD, uma vez que estas proteínas interagem com a maquinaria apoptótica inibindo-a. A Hsp70 se liga ao domínio de recrutamento de caspase (CARD, do inglês caspase-recruitment domain) da Apaf-1 e previne o recrutamento da caspase-9 ao apoptossomo. A Hsp-90 também é um regulador negativo da via intrínseca. Ela age formando um complexo junto a Apaf-1 que, posteriormente, assim como a Hsp-70, inibe a formação do apoptossomo (ALMEIDA et al., 2004).

Grebenová et al (2003) mostraram o processamento e a ativação das caspases-3 e -9 após a TFD com ALA em células HL60 (células de leucemia promielocítica aguda). Eles também mostraram que a caspase-3 ativa causa a fragmentação da Poly (ADP-ribose) polimerase, uma proteína envolvida no sistema de reparo do genoma pela ligação ao DNA com dupla quebra no filamento (GREBENOVÁ et al., 2003).

### **3.3.3 LASER**

A fonte de luz usada por muitos investigadores em pesquisas experimentais inclui lâmpadas de halogênio, lâmpadas fluorescentes e lâmpadas de tungstênio que apresentam baixo custo. Mas a otimização da luz usada na TFD, no entanto, foi obtida com o uso da luz laser, que apresenta certas características que as distinguem das demais. Esta luz é adequada por ser monocromática, altamente coerente e em uso clínico é fornecida através de cabos de fibra óptica que facilita o alcance em regiões neoplásicas de difícil acesso (NOWIS et al., 2005).

A palavra LASER vem do acrônimo *light amplification by stimulated emission of radiation*, que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. É

uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou não, dependendo da matéria que produz este tipo de radiação. Para emitir energia, o átomo ou molécula deve ser elevado ao nível de excitação de energia, acima de seu estado natural de repouso (no qual existe excesso de energia para ser descarregada). Os átomos não conseguem manter a excitação por longos períodos de tempo. Conseqüentemente, eles têm a tendência natural de se livrar do excesso de energia, na forma de emissão de partículas ou pacotes de cargas luminosas chamadas fótons. Os átomos são excitados em nível de energia elevada por uma fonte externa (elétrica, química ou mecânica). Com a emissão de fótons eles tendem a viajar dentro de uma cavidade ressonante, que se emitidos na direção paralela ao eixo da cavidade ressonante podem excitar outros átomos que irão emitir mais fótons em um processo em cascata, claramente caracterizando um processo de amplificação luminosa que gera um grande fluxo de luz (BRUGNERA et al., 1998).

Os lasers são constituídos de um meio ativo, ou seja, materiais que podem produzir radiação laser, podendo ser sólidos como rubi, gasosos como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hélio-neônio (He-Ne), líquidos como rodamina ou cumarina, ou por semi-condutores, nos quais, a radiação laser é emitida no interior de placas positivas e negativas de arsenieto de gálio e alumínio (AsGaAl), arsenieto de gálio (AsGa) e fosfeto de índio gálio alumínio (InGa Al P) (GENOVESE., 2007).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **4.1 Linhagem Celular**

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular Hep-2 (carcinoma de laringe humana), gentilmente cedida pelo Dr. Celso Granato – Laboratórios Fleury/SP.

### **4.2 Meio de Cultura**

As células Hep-2 foram cultivadas em meio MEM (Gibco BRL). Este tem em sua formulação um sistema de tamponamento com bicarbonato e concentrações modificadas de aminoácidos essenciais e vitaminas para estimular o crescimento celular. Este meio tem sido largamente utilizado em cultura de células humanas normais bem como de células neoplásicas (provenientes de tecidos tumorais) como a Hep-2. Sua conservação foi feita em câmara fria de 2 a 8°C. Para uso nas células o meio foi suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

### **4.3 Soro Fetal Bovino**

O soro fetal bovino é utilizado na complementação do meio de cultura por apresentar em sua composição insulina, hormônios e fatores de crescimento que aceleram o crescimento celular. A solução estoque adquirida da Gibco BRL foi distribuída e estocada em frascos de vidro de 20 ml, conservada em freezer a -20°C.

#### 4.4 Crescimento e Manutenção da Cultura de Células

Partindo-se inicialmente de uma garrafa de células-mãe, foram preparadas garrafas de cultura pelo processo de tripsinização no qual a tripsina, uma protease secretada pelas células acinosas do pâncreas, digere as proteínas que formam a trama protéica que liga as células umas às outras. Para soltar as células, após incubação por 3 minutos com 2 mL de tripsina a 0,005% (Gibco BRL), usaram-se jets de meio de cultura. Este meio com células em suspensão foi retirado e distribuído em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (TPP) e adicionado meio MEM a fim de completar 3 mL. As células foram mantidas em uma incubadora (Forma Scientific) com controle automático de temperatura (37°C) e 5% de CO<sub>2</sub>.

O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40 e as células subcultivadas através de tripsinização quando a densidade celular formava uma monocamada confluyente.

Para manter o estoque de células parte das culturas foram congeladas. As células foram removidas das garrafas de cultura por tripsinização e centrifugadas por 5 minutos a 1200 rotações por um minuto. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 3 mL de meio de congelamento contendo 60% de meio MEM, 30% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) que desidrata a célula e impede que elas sejam criofaturadas pelos cristais de gelo formado. O material foi transferido para ampolas de congelamento (NALGENE®) e estocado em nitrogênio líquido.

## 4.5 REAGENTES, SOLUÇÕES E TAMPÕES

Dimetilsulfóxido – DMSO (Synth)

Glutaraldeído (Fluka-Biochemica)

N-propil galato

4,24 g de n-propil galato (Sigma) + 10 mL PBS + 90 mL Glicerina (Sigma).

Paraformaldeído – PA 4%

80 mL Tampão Fosfato + 4 g de Paraformaldeído (Sigma) + Hidróxido de Sódio 2 M.

Para fixação das células fez-se uma diluição em Tampão PHEM para concentração de 4%.

Salina Tampão Fosfato - PBS

50 mL Tampão Fosfato 0,2 M + 950 mL Água destilada + 9 g NaCl (Merck).

Tampão Fosfato 0,2 M

16,5 mL Solução A + 33,5 mL Solução B.

Solução A: 2,76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Fisher Scientific) + 100 mL Água ultrapura.

Solução B: 5,36 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fisher Scientific) + 100 mL Água ultrapura.

Tampão PHEM (Sigma)

1,9 g EDTA (Analyticals) + 3,25 g Hepes (Sigma) + 0,27 g  $\text{MgCl}_2$  (Analyticals) + 10,36 g Pipes (Sigma) + 500 mL Água ultrapura.

Tripsina

0,1 g tripsina (Gibco BRL) + 0,05 g EDTA (Analyticals) + 100 mL PBS.

Tampão TAE

40 mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L ácido acético e 2 mmol/L EDTA, pH 8.0.

Tampão TE/Triton

0,2 (v/v) Triton x-100, 10 mM tris, 1mM EDTA, pH 8,0.

#### Tampão TE

10 mM tris, 1mM EDTA, pH 8,0.

NaCl 5 M

20 µg/ml de Proteinase K

10% de SDS (sódio dodecil sulfato)

10mg/ml de Rnase A

Álcool isopropílico

## **4.6 FOTOSSENSIBILIZANTE E INCUBAÇÃO**

O corante fotossensibilizante utilizado foi a Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada – AlPcS<sub>4</sub> – adquirido da Porphyrin Products, INC. Esta foi dissolvida em PBS para uma concentração estoque de 1mM e esterilizada através de filtração com Filtro Millipore 0,22µM de diâmetro (Millex™) e estocada no escuro à 4 °C. Uma segunda diluição foi realizada para incubação direta nas células à 10 µM.

Para incubação as células foram cultivadas em garrafas de cultura (TTP, Suíça) e placas de 24 poços (NUNC), sendo as primeiras destinadas à eletroforese em gel de agarose e as segundas para diferentes análises em microscopia de epifluorescência, sempre em duplicata, contendo meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e incubadas por toda a noite para adesão. Para as análises de microscopia de epifluorescência as células foram cultivadas em lamínulas redondas estéreis colocadas dentro das placas. O meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS. Colocaram-se 1000µL e 200µL da solução 10µM da ftalocianina nas garrafas de cultura e de 24 poços, respectivamente. Estas foram incubadas em



estufa a 37°C por uma hora e em seguida lavadas em PBS e incubadas com PBS para irradiação.

#### 4.7 Laser e irradiação

Para irradiação das células foi utilizado um aparelho clínico portátil diodo laser semiconductor (Thera Laser-DMC) com meio ativo de Fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP). Após a retirada do fotossensibilizante as células já incubadas em PBS foram irradiadas no escuro, sendo que foi colocado sobre a placa uma barreira preta com um orifício do diâmetro do poço para evitar o espalhamento da luz durante a irradiação. Já no caso das garrafas de cultura, elas foram irradiadas sem o auxílio de um protetor e a irradiação laser foi feita duas vezes na mesma garrafa, metade recebendo irradiação laser com os parâmetros estipulados na tabela abaixo e a outra metade recebendo irradiação com os mesmos parâmetros. Os parâmetros utilizados foram pré-determinados em estudos anteriores (TAMIETI., 2006; FERREIRA., 2004) e estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 parâmetros do laser utilizado para a TFD.

Parâmetros	Valores para as garrafas de cultura	Valores para placa de 24 poços
Comprimento de Onda ( $\lambda$ )	685 nm	685 nm
Densidade de Energia (D)	4,5 J/cm <sup>2</sup>	4,5 J/cm <sup>2</sup>
Potência (P)	35 mW	35 mW
Área	10 cm <sup>2</sup>	2,0 cm <sup>2</sup>
Tempo	21 minutos	4 minutos e 18 segundos

---

Distância da Fibra a placa	17 cm	5 cm
Diâmetro do Feixe	5 cm	1,5 cm

---

#### 4.8 QUIMIOLUMINESCÊNCIA DA CASPASE-3

Foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/ml da linhagem Hep-2 em placas NUNC de 24 poços intercalados, as quais foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de SFB e incubados por toda a noite a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células tratadas com TFD e grupo controle (sem nenhum tratamento) foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 12, 24 e 48 horas para que se pudesse observar o metabolismo celular após o tratamento. Após os tempos estipulados, as células foram incubados com albumina 1% - Triton X-100 0,1% em PBS por 2 horas em temperatura ambiente, depois o material foi incubado com z-DEVD-amc (concentração de 1 mM em PBS) por um período de 30 minutos no escuro e depois fixado por 5 minutos em paraformaldeído 4% e posteriormente lavado em PBS.

Em seguida, as lâminas foram montadas utilizando o n-propil-galato e vedadas com esmalte. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

#### 4.9 EXTRAÇÃO DE DNA E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Após o tratamento fotodinâmico as células Hep-2 foram removidas das garrafas de cultura por tripsinização e centrifugadas (centrifuga FANEM, modelo exelsea baby I) em um tubo Corning de 15 ml. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensão em 300  $\mu$ L de tampão TE/Triton X-100 e deixado no gelo por 10 minutos em um tubo de 1,5 ml. Passado este tempo, as amostras foram centrifugadas a 9.900 rpm por 15 minutos a 4 °C (JOUAN, modelo CR3).

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionados 12,5  $\mu$ l de SDS (10%) e incubado com 15  $\mu$ l proteinase K (20  $\mu$ g/ml) por uma hora à 57 °C. Para o processo de precipitação do DNA foram adicionados 26,5  $\mu$ l de NaCl (5M) mais 256  $\mu$ l de álcool isopropílico a -20°C e incubado no gelo por 20 minutos. Após esse processo a amostra foi centrifugada novamente (9.900 rpm por 15 minutos a 4°C), o sobrenadante descartado e o DNA precipitado dissolvido em 20  $\mu$ l de tampão TE-Rnase (20 mg/ml), pH 8,0, e incubado em uma estufa (Fanem, modelo Orion 502) por uma hora à 37°C. Ao DNA foram adicionados mais 30  $\mu$ l de tampão TE para ter uma solução de 50  $\mu$ l de amostra e armazenado no freezer a -20 °C para posterior eletroforese em gel de agarose.

Para análise do DNA de células Hep-2, foram adicionados 3,3  $\mu$ L de tampão de amostra 6 vezes concentrado em 20  $\mu$ L de amostra de DNA para cada uma das amostras analisadas. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% contendo TAE 1X e 2,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídeo. As amostras de DNA foram visualizadas por exposição à radiação ultravioleta no transluminador (Transluminador UV 302 nm – T26M, BioAgency) e os resultados foram registrados por fotodocumentador (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak®).

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CASPASE-3 ATIVA

Os resultados foram obtidos através de análise das fotos de lâminas observadas em microscópio de fluorescência.

O marcador utilizado para medir a atividade da caspase-3 foi o z-DEVD-amc - Sigma, um polipeptídeo que se liga a caspase-3 quando ela é clivada e consequentemente ativada, indicando morte celular apoptótica. A figura 6 mostra as células Hep-2 do grupo controle sem o tratamento fotodinâmico, a fluorescência é devido a marcação inespecífica do z-DEVD-amc Na figura 7 o grupo de células tratadas com a TFD e incubadas com meio MEM fresco por 12h após a TFD. O marcador z-DEVD-amc mostrou pontos fluorescentes no citoplasma indicando atividade de caspase-3 12 horas após a Terapia Fotodinâmica.

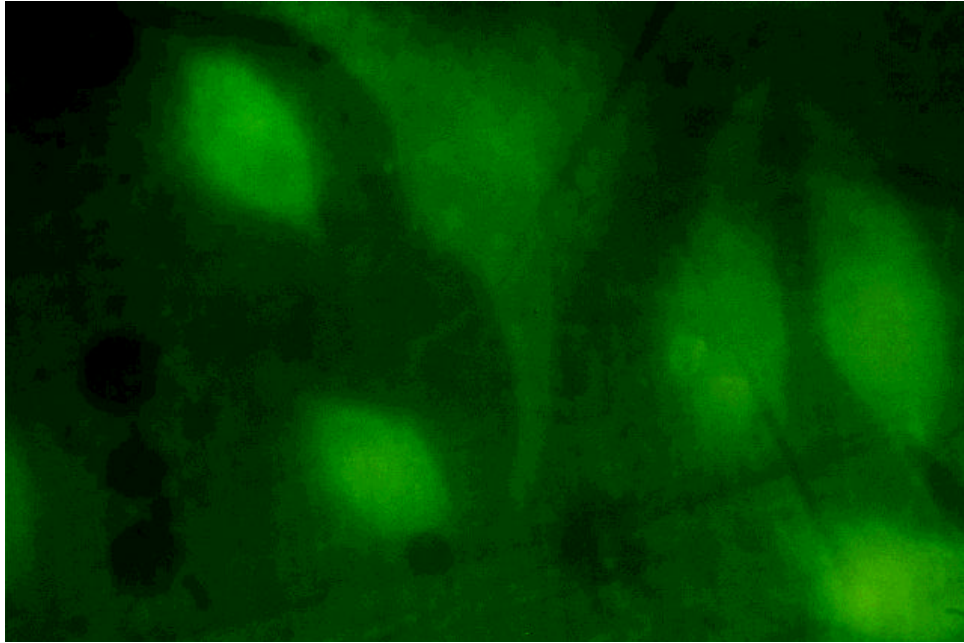


Figura 6. Células Hep-2 sem tratamento fotodinâmico, grupo controle.

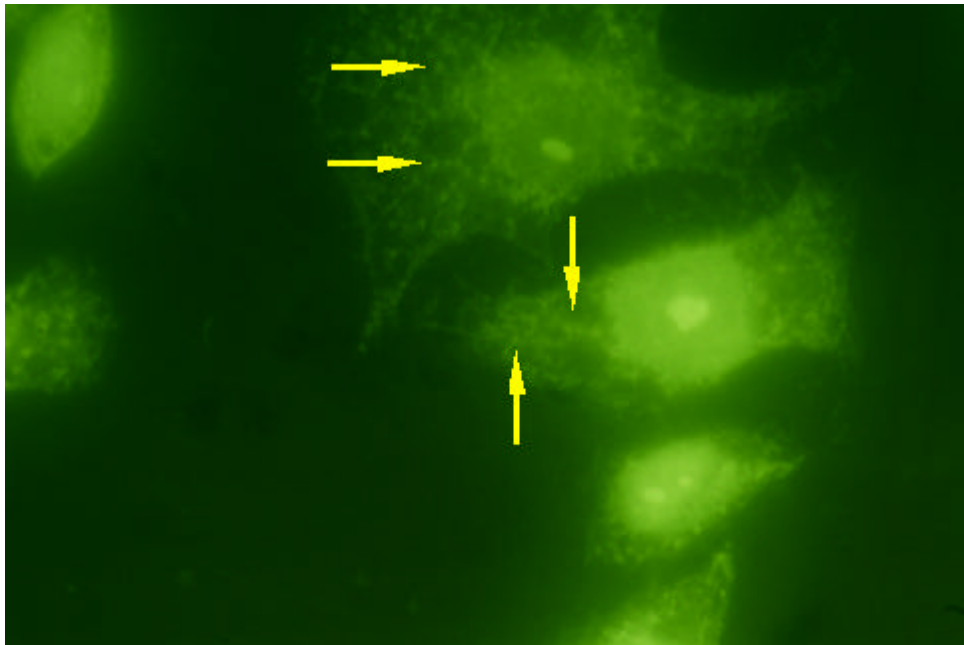


Figura 7. Células Hep-2 incubadas com o marcador fluorescente z-DEVD-amc mostrando a atividade das caspases-3 (setas) 12h após a Terapia Fotodinâmica.

A figura 8 mostra o grupo controle sem o tratamento fotodinâmico com ausência de atividade das caspases. E o grupo das células Hep-2 tratadas com a TFD (figura 9), mostrando a atividade das caspases-3 após um período de 24 horas, que da mesma forma que o grupo das 12 horas, apresentou uma fluorescência mais evidente no citoplasma, indicando atividade das caspases-3,.

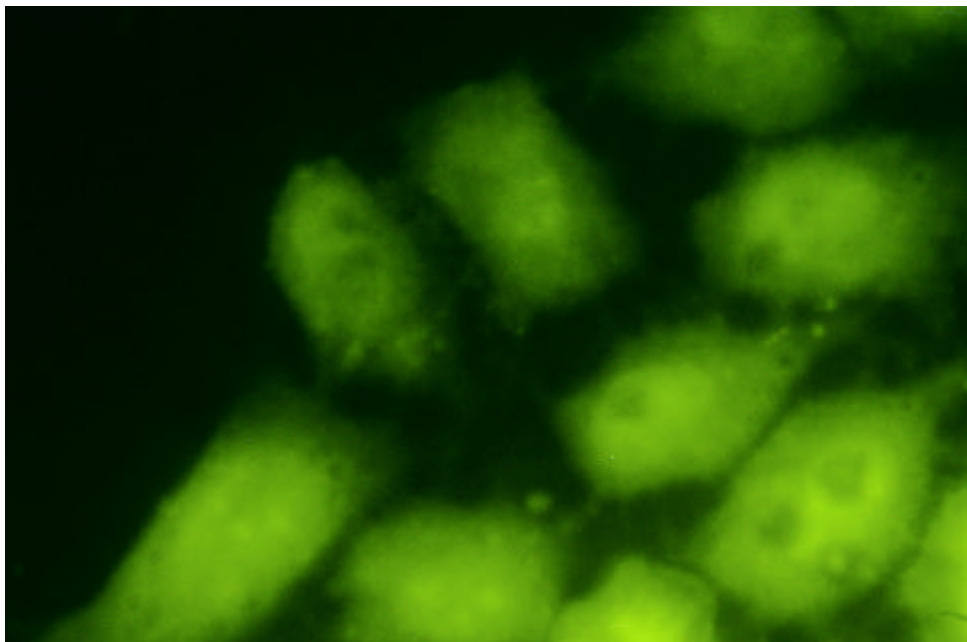


Figura 8. Células Hep-2 sem o tratamento fotodinâmico, grupo controle.

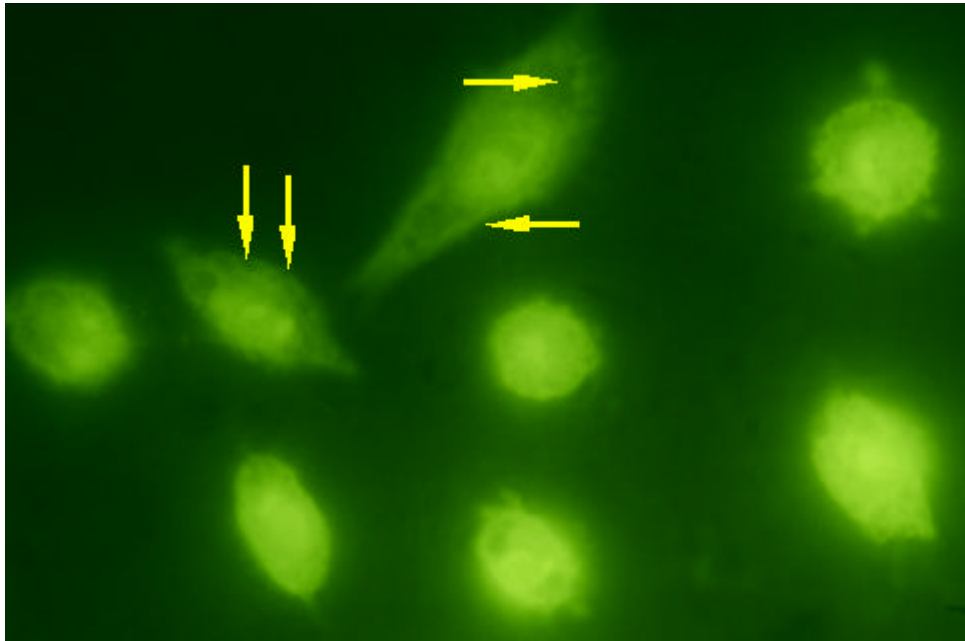


Figura 9. Células Hep-2 incubadas com o marcador fluorescente z-DEVD-amc mostrando a atividade das caspases-3 24h após a Terapia Fotodinâmica

A figura 10 mostra o grupo controle apresentando nenhuma atividade de caspase-3.

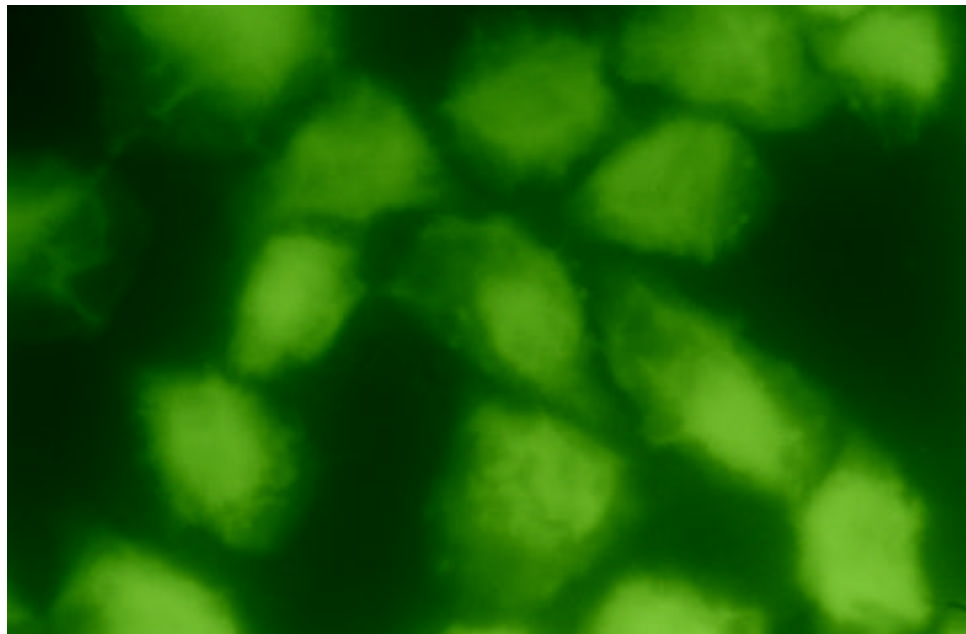


Figura 10. Células Hep-2 sem tratamento fotodinâmico, grupo controle

A Figura 11 mostra o grupo de células Hep-2 tratadas com a TFD e incubadas com meio MEM fresco por 48 horas. Neste grupo aparece uma fluorescência pontual, mais evidente no citoplasma das células.

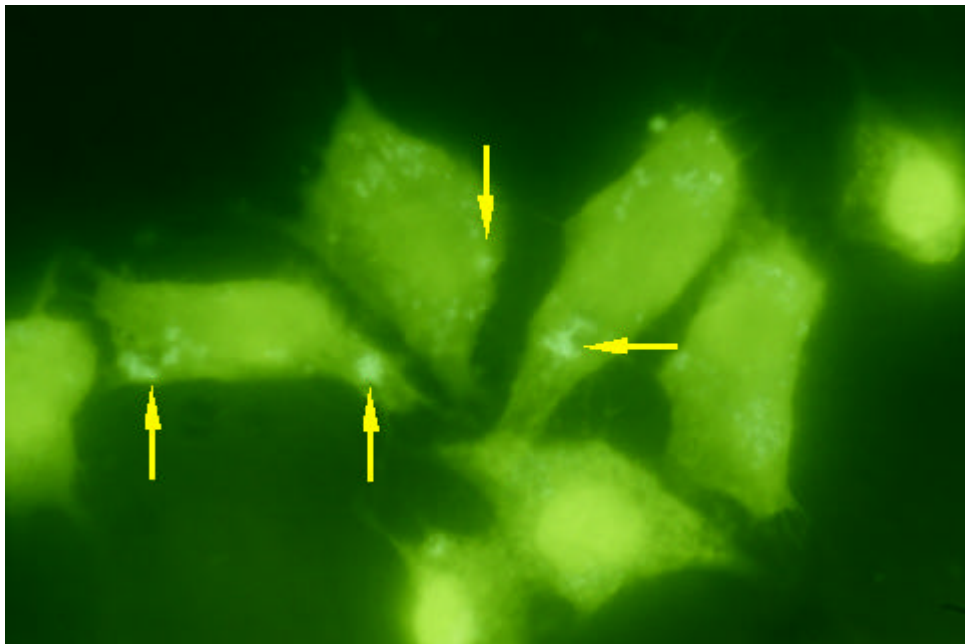


Figura 11. Células Hep-2 incubadas com o marcador fluorescente z-DEVD-amc mostrando a atividade das caspases-3 48h após a Terapia Fotodinâmica

## 5.2 FRAGMENTAÇÃO DO DNA

A figura 12 é representada o gel de agarose a 1% contendo o DNA extraído de células Hep-2 sem nenhum tratamento, grupo controle, e células tratadas com a terapia fotodinâmica, grupo de 24 horas. Após 24 horas de terapia fotodinâmica o DNA apresentou fragmentos de 200 pares de base comparado com o marcador molecular, confirmando a morte celular desencadeada pela TFD usando o fotossensibilizante AIPcS<sub>4</sub>.



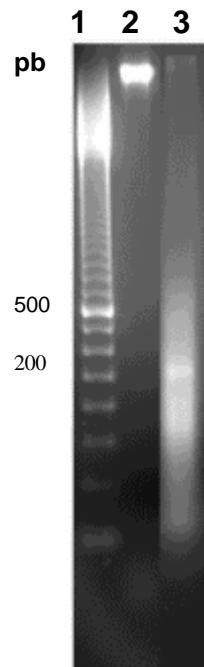


Figura 12. DNA extraído de células Hep-2. 1, marcador molecular; 2, DNA de células Hep-2 sem tratamento; 3, DNA extraído de células Hep-2 24 horas após a terapia fotodinâmica.

## 6. DISCUSSÃO

---

A apoptose tem sido a forma mais comum de morte celular em resposta à TFD em diferentes culturas de células, com base na medida da fragmentação do DNA ou condensação da cromatina (OLEINICK et al., 2001).

As caspases são as proteínas conclusivas no processo de morte celular apoptótica (ISRAELS et al. 1999). Vercammen et al (1998) analisaram a morte de células L929, fibrosarcoma de rato, após o estímulo com TNF- $\alpha$ . Neste trabalho utilizou-se o inibidor de caspases z-VAD-fmk, demonstrando que quando as caspases são impedidas de executar sua ação, a morte destas células ocorre por necrose (VERCAMMEN et al., 1998). Da mesma forma Pandey et al (2000) mostraram a mudança da apoptose para necrose pela inibição das caspases em células de hepatoma de rato 5123tc (PANDEY et al., 2000).

Isso mostra a importância das caspases na fase de execução da morte celular apoptótica, fragmentando todos os constituintes celulares que são empacotados dentro dos corpúsculos apoptóticos e fagocitados pelas células vizinhas, impedindo desta forma, uma resposta imune em modelos *in vivo* (LUKISIENE., 2003).

12 horas após o tratamento fotodinâmico a atividade das caspases-3 em células Hep-2 mostrou predominante por todo o citoplasma (figura 7) indicando um processo apoptótico. Essas caspases continuariam ativas após 24 e 48 horas de tratamento, e como no grupo de 12 horas, apresentaram uma distribuição distinta de fluorescência indicando atividade de caspases-3 (Figuras 9 e 11) respectivamente.

Interessante observar que a atividade desta caspase tem início nas primeiras 12 horas após a TFD e sua ação persiste por até 48 horas, demonstrando que a resposta celular frente a este tratamento não é homogênea: algumas células apresenta resposta nos primeiros períodos, enquanto outras respondem tardiamente.

A específica degradação da cromatina é um dos componentes chave do processo apoptótico (OLIVER et al., 1998). Conseqüentemente, recente interesse de pesquisadores pela apoptose tem focalizado a habilidade dos eventos proteolíticos em gerar mudanças nucleares características da apoptose. Na apoptose, os substratos da caspase-3 incluem a ICAD, que pela sua degradação, regula, em parte, mas não totalmente, os eventos apoptóticos nucleares. A CAD liberada de seu inibidor, a ICAD degradada pela caspase-3, fica livre para atuar na degradação do DNA (ROBERTSON, ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY., 2000). Em, 1999 Xue e seu grupo de pesquisadores mostraram que, após 60 minutos de TFD usando o fotossensibilizante Pc-4 (Ftalocianina 4), o DNA das células L5178Y-R, linfoma de rato, apresentou-se totalmente fragmentados e ao mesmo tempo intensa atividade de caspases-3 (XUE, HE, OLEINICK., 1999). Na figura 12 é possível observar a fragmentação do DNA de células Hep-2 após 24 horas de tratamento fotodinâmico que coincide com a ativação das caspases-3 (figura 9) mostrando a eficiência da TFD em induzir morte celular apoptótica em modelos de células neoplásicas. A correlação dos dados obtidos por microscopia de fluorescência e fragmentação de DNA, demonstra que o período de 24 horas é o tempo ótimo para observação da fragmentação decorrente de ativação da caspase-3.

Estes resultados indicam que parte dos eventos apoptóticos nucleares são de responsabilidade da caspase-3. Devido ao fato de existirem fatores

apoptogênicos nucleares independentes de caspases como a AIF e EndoG que são liberadas após injúria mitocondrial (ARNOULT et al., 2002).

## 7. CONCLUSÃO

---

A análise dos resultados após a terapia fotodinâmica com a AIPcS<sub>4</sub> em células Hep-2 nos leva as seguintes conclusões:

- As caspases-3 mostraram-se ativadas como resultado da injúria causada pelo estresse oxidativo na TFD com a AIPcS<sub>4</sub>;
- O DNA genômico das células Hep-2 apresentou fragmentos de 200 pares de base, como uma consequência da ativação das caspases-3;
- Esses dados demonstra uma morte celular apoptótica;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDULLAEV, Z. K. et al. A Cytochrome C Mutant with High Electron Transfer and Antioxidant Activities but Devoid of Apoptogenic Effect. **Biochemistry Journal.**, v. 362, p. 749-754, 2002.

AGARWAL, M. L. et al. Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in LSI78Y Mouse Lymphoma Cells. **Cancer Research.**, v. 5, p. 5993-5996, 1991.

ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in Clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.**, v. 1, p. 27-42, 2004.

ALMEIDA, R. D. et al. Intracellular Signaling Mechanisms in Photodynamic Therapy. **Biochimica et Biophysica Acta.**, n. 1704, n. 2, p. 59- 86, 2004.

ANDERSEN, M. H.; BECKER, J. C.; STRATEN, P. Regulators of Apoptosis: Suitable Targets for Immune Therapy of Cancer. **Nature Reviews.**, v. 4, n5, p. 399-409, 2005.

ARNOULT, D. et al. Mitochondrial Release of Apoptosis-inducing Factor Occur Downstream of Cytochrome c Release in Response to Several Proapoptotic Stimuli. **The Journal of Cell Biology.**, v. 159, n. 6, p 923-929, 2002.

ARNOULT, D. et al. Mitochondrial Release of AIF and EndoG Requires Caspase Activation Downstream of Bax/Bak-Mediated Permeabilization. **The EMBO Journal.**, v. 22, n. 17, p. 4385-4399, 2003.

AURORA, A.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Regulation of A21/Ras Protein Expression by Diallyl Sulfide in DMBA Induced Neoplastic Changes in Mouse Skin. **Cancer letters.**, v. 242, p. 28-36, 2006.

BEERE. M. H. Death Versus Survival: Functional Interaction Between the Apoptotic and Stress-inducible Heat Shock Protein Pathways. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 115, n.10, p. 2633-2639, 2005.

BRUGNERA, J. A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na Odontologia Moderna.** São Paulo: Pancast, 1998, 356 p.

CASTANHO, A. P.; DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One-Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.**, v. 1, n.1, p. 279-293, 2004.

CASTANHO, A. P.; DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part Two-Cellular Signaling, Cell Metabolism and Modes of Cell Death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**., v. 2, p. 1-23, 2005.

CASTANHO, A. P.; DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part Three-Photosensitizer Pharmacokinetics, Biodistribution, Tumor Localization and Modes of Tumor Destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**., v. 2, n. 9, p. 1-106, 2005.

CHEN, Q.; CROSBY, M.; ALMASAN, A. Redox Regulation of Apoptosis Before and After Cytochrome C Release. **Korean Journal Biology Science**., v. 7, n. 1, 1-9, 2003.

CHWILKOWSKA, A. et al.. Uptake Of Photofrin II, A Photosensitizer Used in Photodynamic Therapy by Tumour Cells *In Vitro* **Acta Biochimica Polonica**., v. 50, n. 2, p. 509-513, 2003

CRESCENZI, E. et al. Photodynamic Therapy With Indocyanine Green Complements and Enhances Low-Dose Cisplatin Cytotoxicity in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapy**., v. 3, n. 5, p. 537-44, 2004.

DARZYNKIEWICZ, Z.; HUANG, X.; OKAFUJI, M. Detection Of DNA Strand Breaks By Flow and Laser Scanning Cytometry in Studies of Apoptosis and Cell Proliferation (DNA Replication). **Methods in Molecular Biology**., v. 314, p. 81-93, 2006.

DONGEN, G. A. M. S.; VISSER, G. W. M.; VROUENRAETS, M. B. Photosensitizer-antibody Conjugates for Detection and Therapy of Cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**., v. 56, p. 31-52, 2004.

DOUGHERTY, T. G.; Photodynamic Therapy. **Journal of National Cancer Institute**., v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

DI BACCO, A. et al. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Regulation of Cell Growth and Apoptosis. **The Oncologist**., v. 5, p. 405-415, 2000.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H.; MAMMALIAN Caspases: structure, activation, substrates And functions during apoptosis. **Annual Reviews of Biochemistry**. v. 68, p. 383-424, 1999.

ENOKSSON, M. et al. Caspase-2 Permeabilizes the Outer Mitochondrial Membrane and Disrupts the Binding Of Cytochrome C to Anionic Phospholipids. **The Journal Of Biological Chemistry**., v. 279, n. 48, p. 49575-49578, 2004.

FABRIS, C. et al. Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. **CANCER RESEARCH**., v. 61, p. 7495-7500, 2001.

FERREIRA, S. D. R. M. et al. Analysis of Mitochondria, Endoplasmic Reticulum and Actin Filaments After PDT with AIPc<sub>4</sub>. **Lasers in Medical Science**. v. 18, p. 207-212, 2004.

- GARRIDO, C., et al. Hsp27 Inhibits Cytochrome c-dependent Activation of Procaspase-9. **FASEB Journal.**, v. 13, p. 2061-2070. 1999.
- GENOVESE, W. J. **Laser De Baixa Intensidade: Aplicações Terapêuticas em Odontologia.** São Paulo: Santos, 2007, 130 p.
- GIROTTI, A. W. Photosensitized Oxidation of Membrane Lipids: Reaction Pathways, Cytotoxic Effects, and Cytoprotective Mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v. 63, p. 103-113, 2001.
- GOGVADZE, V. et al. Mitochondrial Cytochrome C Release May Occur by Volume-Dependent Mechanisms not Involving Permeability Transition. **Biochemistry Journal.**, v. 378, p. 213-217, 2004.
- GOLAB, J. et al. Antitumor Effects of Photodynamic Therapy are Potentiated By 2-Methoxyestradiol. **The Journal Of Biological Chemistry Of Biological Chemistry.**, v. 278, p. 407–414, 2003
- GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial Membrane Potential Regulates Matrix Configuration and Cytochrome C Release During Apoptosis. **Cell Death and Differentiation.**, v. 10, p. 709-717, 2003.
- GRANVILLE, D. J. et al. Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor and Cytochrome C During Smooth Muscle Cell Apoptosis. **American Journal of Pathology.**, v. 159, n. 1, p. 305-311, 2001
- GREBENOVÁ, D. et al. Protein Changes in HL60 Leukemia Cells Associated with 5-Aminolevulinic Acid–Based Photodynamic Therapy. Early Effects on Endoplasmic Reticulum Chaperones. **Photochemistry and Photobiology.**, v. 72, n. 1, p. 16-22, 2000.
- GREBENOVÁ, D. et al. Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptotic Pathways are Activated by 5-aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy in HL60 Leukemia Cells
- GRIFFITHS, et al. **Genética Moderna.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 420-440.
- HAIL, N. J. et al. Apoptosis Effector Mechanisms: A Requiem Performed in Different Keys. **Apoptosis.**, v. 11, n.6, p. 889-904, 2006.
- HUANG, H. F.; CHEN, Y. Z.; WU, Y. Znpcs2p2-Based Photodynamic Therapy Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in K562 Cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica.**, v. 37, n. 7, p. 488–494, 2005
- HUANG, H. F.; CHEN, Y. Z.; WU, Y. Experimental Studies of the Effects on Znpcs2p2-Based-Photodynamic Therapy on Bone Marrow Purging. **Chinese Medical Journal.**, v. 118, n. 2, p. 105-110, 2005.
- HUANG, H. F.; CHEN, Y. Z.; WU, Y. Mitochondria-dependent Apoptosis Induced by a Novel Amphipathic Photochemotherapeutic Agent ZnPcS2P2 in HL60 cells. **Acta Pharmacologica Sinica.**, v. 26, n. 9, p. 1138-1144, 2005.



HUANG, J. et al. A comparison of the Signal Pathways of Between of TNF- $\alpha$  and Oridinin-induced Murine L929 Fibrosarcoma Cell Death. **Acta Medica Okayama.**, v. 59, n. 6, p. 261-270, 2005.

HUANG, J. et al. Fibroblast Growth Factor-2 Suppresses Oridonin-induced L929 Apoptosis Through Extracellular Signal-regulated kinase-dependent and Phosphatidylinositol 3-kinase-independent Pathway. **Journal of Pharmacological Sciences.**, v. 102, n.3, p. 305-313, 2006.

HUANG, J. et al. The Augmentation of TNF- $\alpha$ -induced Cell Death in Murine L929 Fibrosarcoma by the Pan-caspase Inhibitor Z-VAD-fmk Through Pre-mitochondrial and MAPK-dependent Pathways. **Acta medica Okayama.**, v. 59, n. 6, p. 253-260, 2005.

HUANG, Z. H. et al. Effect Of Therapy Photodynamic with 5-Aminolevulinic Acid on Human Gastric Cancer Cells in vitro. **Journal of South Medicine University.**, v. 26, n. 3, p. 255-257, 2006.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells.**, v. 17, p. 306-313, 1999.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 339 p

JUZENAS, P. *et al.* Spectroscopic Evidence of Monomeric Aluminium Phthalocyanine Tetrasulphonate in Aqueous Solutions. **Journal of Photochemistry an Photobiology B: Biology.** v. 75, p. 107-110, 2004.

KAMIYA, Y.; OHTA, K.; KANEKO, Y. Lidocaine-Induced Apoptosis and Necrosis in U937 Cells Depending on its Dosage. **Biochemical reseach.**, v. 6, n. 6, p. 231-239, 2005.

KAUFMANN, S. H.; HENGARTNER, M. O. Programmed Cell Death: Alive and Well in the New Millennium. **TRENDS in Cell Biology.**, v.11, n.12, p. 526-534, 2001.

KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic Therapy: A Mitochondrial Inducer of Apoptosis. **Cell Death and Differentiation.**, v. 6, n.1, p. 28-35, 1999.

KHARBANDA, S. et al. Role for Bcl-XI as an Inhibitor of Cytosolic Cytochrome C Accumulation in DNA Damage-induced Apoptosis. **The National Academy Science.**, v. 94, p. 6939-6942, 1997.

KIM, H. R. C.; Luo, Y.; LI, G.; KESSEL, D. Enhanced Apoptotic Response to Photodynamic Therapy After Bcl-2 Transfection. **CANCER RESEARCH.**, v. 59, p. 3429-3432, 1999.

KUZELOVÁ, K. et al. Early Apoptotic Features of K562 Cell Death Induced by 5-aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v. 73, p. 67-78, 2004.

LAM, M.; OLEINICK, N. L.; NIEMINEM, A. L. Photodynamic Therapy-induced Apoptosis in Epidermoid Carcinoma Cells. **The Journal Of Biological Chemistry.**, v. 276, n. 50, p. 47379-47386, 2001.

LAZEBNIK, A. Y. et al. Nuclear Events of Apoptosis *in vitro* in Cell-Free Mitotic Extracts: A Model System for Analysis of the Active Phase of Apoptosis. **The Journal of Cell Biology.**, v. 123, n 1, p. 7-22, 1993.

LEWIN, B. **Genes.** Oxford: University press, 1997. 1260p.

LOWE, S. W. Activation of p53 by Oncogenes. **Endocrine-Related Cancer.**, v. 6, p.45-48, 1999.

LUKSIENE, Z. Photodynamic Therapy: Mechanism of Action and Ways to Improve the Efficiency of Treatment. **Medicina.**, v. 39, p. 1137-1150, 2003.

MARSDEN, V. S. et al. Apoptosis Initiated by Bcl-2-Regulated Caspase Activation Independently of the Cytochrome C/Apaf-1/Caspase-9 Apoptosome. **Nature.**, v. 419, p. 634-637, 2002.

MENG, X. W.; LEE, S. H.; KAUFMANN, S. H. Apoptosis in the Treatment of Cancer: a Promise Kept?., **Current Opinion in Cell Biology.**, v. 18, p. 668–676, 2006.

MICHALAK, E. et al. Death Squads Enlisted by the Tumour Suppressor p53. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 331, p. 786-798, 2005.

MORGAN, J.; OSEROFF, A. R. Mitochondria-based Photodynamic Anti-cancer Therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, n. 49, p. 71-86, 2001.

NAGAMI, H. et al. Liposome-assisted Activity of Superoxide Dismutase Under Oxidative Stress. **Journal of Biocience and bioengineering.**, v. 99. n. 4, p. 423-428, 2005.

NAGATA, S. et al. Degradation of Chromosomal DNA During Apoptosis. **Cell Death and Differentiation.**, v. 10, n.1, p. 108-116, 2003.

NIEDRE, M. J. et al. *in vitro* Tests of the Validity of Singlet Oxygen Luminescence Measurements as a Dose Metric in Photodynamic Therapy. **Cancer Research.**, v. 63, p. 7986-7994, 2003.

NILCENÉIA, S. M. **Avaliação do Processo de Morte Celular Após Terapia Fotodinâmica.** 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomedica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.

NOWIS, D. et al. Direct Tumor Damage Mechanisms of Photodynamic Therapy. **Acta Biochimica polonica.**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

OANCEA, M. et al. Apoptosis of Multiple Myeloma. **International Journal of Hematology.**, v. 80, n. 3, p.224–231, 2004.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENCO, I. The Role of Apoptosis in Response to Photodynamic Therapy: What, Where, Why, and How. **Photochemistry and Photobiology Science.**, v.1, p. 1-21, 2002.

OLIVER, F. J. et al. Importance of Poly (ADP-Ribose) Polymerase and Its Cleavage in Apoptosis. **The Journal Of Biological Chemistry.**, v. 273, n. 50, p. 33533-33539, 1998

PANDEY, S. et al. Caspase-Dependent and Independent Cell Death in Rat Hepatoma 5123tc Cells. **Apoptosis.**, v. 5, n.3, p. 265-275, 2000.

PERVAIZ, S.; OLIVO, M. Art and Science of Photodynamic Therapy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.**, v. 33, p. 551-556, 2006.

PETAK, I.; HOUGHTON, J. A. Shared Pathways: Death Receptors and Cytotoxic Drugs in Cancer Therapy. **Pathology Oncology Research.**, v. 7, n. 2, p. 95-106, 2001.

PIETTE, J. et al. Cell Death and Growth Arrest in Response to Photodynamic Therapy with Membrane-Bound Photosensitizers. **Biochemical Pharmacology.**, v. 66, p. 1651-1659, 2003.

PLUSKALOVA, M. et al, Photodynamic Treatment (ALA-PDT) Suppresses the Expression of the Oncogenic Bcr-Abl Kinase and Affects the Cytoskeleton Organization in K562 Cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v. 83, p. 205–212, 2006.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAJB, V. L. Necrosis: A Specific Form of Programmed Cell Death? **Experimental Cell Research.**, v. 283, p. 1-16, 2003.

REGULA, K. M.; ENS, K.; KIRSHENBAUM, L. A. Mitochondria-Assisted Cell Suicide: A License to Kill. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.**,v. 35, p. 559-567, 2003.

REINERS, J. J. et al. Release of Cytochrome C and Activation of Pro-Caspase-9 Following Lysosomal Photodamage Involves Bid Cleavage. **Cell Death and Differentiation.**, v. 9, n.9, p. 934-944, 2002.

ROBERTSON, J. D.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Review: Nuclear Events in Apoptosis. **Journal of Structural Biology.**, v. 129, p. 346-358. 2000.

ROKITSKAYA, T. I.; ANTONENKO, Y. N.; KOTOVA, E. A. The Interaction of Phthalocyanine with Planar Lipid Bilayers Photodynamic Inactivation of Gramicidin Channels. **Federation of European Biochemical Societies.**, v. 329, n. 3, p. 332-335, 1993.

ROY, K. M. et al. Apoptosis, Necrosis and Cell Proliferation-Inhibition by Cyclosporine A in U937 Cells (A Human Monocytic Cell Line). **Pharmacological Research.**, p. 1-10, 2006.

SAKHAROV, D. V. et al. Photodynamic Treatment and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress Result in Different Patterns of Cellular Protein Oxidation. **Europe Journal Of Biochemistry.**, v. 270, p. 4859-4865, 2003.

SKULACHEV, V. P. Cytochrome C in the Apoptotic and Antioxidant Cascades. **FEBS Letters.**, v. 423, p. 275-280, 1998.

SOUSA, G. **Terapia Fotodinâmica em Células HEP-2: Desencadeamento e Monitoramento do Processo Apoptótico.** 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2005.

SRIVASTAVA, M. et al. Involvement of Bcl-2 and Bax in Photodynamic Therapy-mediated Apoptosis. **The Journal Of Biological Chemistry.**, v. 276, n. 18, p. 15481-15488, 2001.

SUSIN, S. A. et al. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. **Journal of Experimental Medicine.**, v. 192, n. 4, p. 571-579, 2000.

TAMIETTI, B. F. P. **Análise da Atividade Mitocondrial Associado à Morte Celular Após a Terapia Fotodinâmica.** 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

TSUJIMOTO, Y. Role Of Bcl-2 Family Proteins in Apoptosis: Apoptosomes or Mitochondria? **Genes to Cells.**, v. 3, p. 697-707, 1998.

TWOMEY, C.; MCCARTHY, J. V. Pathways of Apoptosis and Importance in Development. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.**, v. 9, n. 2, p. 345-359, 2005.

URBANSKI, N.; BERÊSEWICZ, A. Generation of  $\cdot\text{OH}$  Initiated by Interaction of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{+}$  with Dioxygen; Comparison with the Fenton Chemistry. **Acta Biochimica Polonica.**, v. 47, n. 4, p. 951-962, 2000.

USUDA, J. et al. Domain-dependent Photodamage to Bcl-2. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 278, n. 3, p. 2021–2029, 2003.

VANTIEGHEM, A. et al. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M Phase-arrested Cells Following Photodynamic Therapy with Hypericin Involves a Cdk1-Mediated Signal and Delays the Onset of Apoptosis. **The Journal Of Biological Chemistry.**, v. 277, n. 40, p. 37718-37731, 2002.

VARNES, M. E. et al. 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, v.3, p. 673-679, 1999.

VERCAMMEN, D, et al. Inhibition Of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. **Journal of Experimental Medicine.**, v. 187, n. 9, p. 1477-1485, 1998.

VERCAMMEN, D. et al. Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation of Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways. **Journal of Experimental Medicine.**, v. 188, n. 5, p. 919-930, 1998.

VERCAMMEN, D. et al. Tumour Necrosis Factor-Induced Necrosis Versus Anti-Fas-Induced Apoptosis in L929 Cells. **Cytokine.**, v. 8, n. 11, p 790-797, 1997.

VROUENRAETS, M. B. et al. Targeting of Aluminum (III) Phthalocyanine Tetrasulfonate by Use of Internalizing Monoclonal Antibodies: Improved Efficacy in Photodynamic Therapy. **Cancer Research.**, v. 61, p. 1970–1975, 2001.

WALKER, P. R. et al. Detection of DNA Fragmentation and Endonucleases in Apoptosis. **Methods: A Companion To Methods In Enzymology.**, v. 17, p. 329-338, 1999.

WARD, A. J.; MATTHEWS, E. K. Cytotoxic, Nuclear, and Growth Inhibitory Effects of Photodynamic Drugs on Pancreatic Carcinoma Cells. **Cancer Letters.**, v. 102, p. 39-47, 1996.

WIDLAK, P. The DFF40/CAD Endonuclease and its Role in Apoptosis. **Acta Biochemica Polonica.**, v. 47, n. 4, p. 1037-1044, 2000.

XIAO, Z. et al. Distribution of Photosensitizers in Bladder Cancer Spheroids: Implications for Intravesical Instillation of Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Bladder Cancer. **Journal Pharmacological and Pharmaceutic Science.**, v. 8, n. 3, p. 536-543, 2005.

XUE, L. Y.; HE, J.; OLEINICK, N. L. Promotion of Photodynamic Therapy-induced Apoptosis by Stress Kinases. **Cell Death and Differentiation.**, v. 6, n.9, p. 855-864, 1999.

ZHANG, S. J.; ZHEN, X. Z. 5-aminolevulinic Acid–based Photodynamic Therapy in Leukemia Cell HL60. **Photochemistry and Photobiology.**, v. 79, n. 6, p. 545-550, 2004.

ZHIVOTOVSKY, B. et al. Caspases: Their Intracelular Localization and Translocation During Apoptosis. **Cell Death and Differentiation.**, v. 6, p. 644-651, 1999.

ZORATTIA, M.; SZABO, I.; MARCHIA, U. Mitochondrial Permeability Transitions: How Many Doors to the House? **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1706, p. 40-52, 2005.