

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

DINO SANTESSO GABRIELLI

**Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias
e células tumorais.**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
07/05/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DINO SANTESSO GABRIELLI

Título da Dissertação de Mestrado

Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias
e células tumorais.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

São Paulo

2007

Dino Santesso Gabrielli

Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias e células tumorais.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço ao Professor Mauricio Baptista, por ter me orientado e me auxiliado a chegar aonde cheguei. Agradeço também a todas as pessoas do laboratório, especialmente Helena, Divino, Adjaci, Carla, Patrícia, Dayane, Carla 2, pelo apoio, ajuda e ensinamentos para que eu conseguisse escrever esse trabalho.

Agradeço a Professora Alicia Kowaltowski por todo suporte durante a iniciação e o mestrado. Agradeço também a todas as pessoas de seu laboratório, Graciele, Erich, Camille, Maynara, entre outros, que me suportaram e ajudaram durante esse período.

Agradeço a ajuda do Prof. Amarante Mendes, Mônica Yon e Luís Zirnberger.

Agradeço a meus pais, meus amigos e meus familiares por me suportarem nesse período. Algumas conversas foram fundamentais.

Agradeço a CNPQ e FAPESP pelo auxílio.

Com certeza, esqueci de alguém.

RESUMO

Gabrielli, D. S. – Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias e células tumorais. 2007. 69p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O mecanismo de ação de fotossensibilizadores (FS) fenotiazínicos (azul de metileno - AM, tionina - TIO e azure B - AB) foi estudado em mitocôndrias e células Hela, e a dosimetria de AM em células HL60. Foi observado que a ligação de AM em mitocôndrias é dependente da concentração de mitocôndrias, concentração de AM e do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). A geração de oxigênio singlete a partir de AM é influenciada pelo $\Delta\Psi$, sendo aproximadamente o dobro em mitocôndrias desacopladas. Essa variação se deve a influência do $\Delta\Psi$ sobre a relação dímero/monômero (D/M) do AM. A ligação de AM também é reduzida pela metade em mitocôndrias desacopladas. Esses efeitos não foram observados para os outros fotossensibilizadores, embora tenham a mesma carga e estrutura semelhante. Isso indica um efeito diferencial do $\Delta\Psi$ sobre o AM.

Foi observada a toxicidade desses FSs em células Hela. Sem irradiação, apenas AB se mostrou tóxico. Em amostras irradiadas, AB e AM se mostraram tóxicos. Todos os FSs mostraram capacidade de produzir núcleos sub-diplóides, típicos de apoptose, com a maior eficiência sendo do AB. Em relação a toxicidade no escuro e claro, AB mostrou toxicidade em ambas as condições, TIO mostrou pouca toxicidade em ambas as condições e AM mostrou pouca toxicidade no escuro e alta toxicidade quando irradiado.

A dosimetria que favorece apoptose em células HL60 também foi testada, sendo que os melhores resultados para formação de núcleos sub-diplóides foram com 10 μM de AM, com irradiação (contínua ou fracionada) de 0,55 J/cm^2 . Essas dosagens foram as mais baixas utilizadas, indicando que um aumento na concentração de FS ou de luz tende a levar as células à morte necrótica.

Conclui-se que os FSs fenotiazínicos tem afinidade por mitocôndrias e por células, podendo levar a indução de apoptose em doses não tóxicas no escuro.

Palavras-chave: Fenotiazinas, azul de metileno, terapia fotodinâmica, mitocôndrias, células em cultura.

ABSTRACT

Gabrielli, D. S. **Photodynamic efficiency of phenothiazinic compounds into mitochondria and tumor cells.** 2007. 69p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The mechanism of action of phenothiazinic photosensitizers (FS) (methylene blue - AM, tironin - TIO and azure B - AB) was studied into mitochondria and Hela cells, and AM dosimetry into HL60 cells was determined. AM binding to mitochondria is dependent of mitochondrial concentration, AM concentration and mitochondrial membrane potentials ($\Delta\Psi$). Singlet oxygen generation from AM is influenced by $\Delta\Psi$, almost doubling in uncoupled mitochondria. This effect is due to the influence of $\Delta\Psi$ on AM dimer/monomer (D/M) ratio. Also, AM binding drops to half into uncoupled mitochondria. For all the others FSs studied, these effects were not observed, even though they present the same charge and similar structure. This indicates a specific $\Delta\Psi$ action over AM.

FSs toxicity was observed in Hela cells. In the dark, only AB showed toxicity. In irradiated samples, AM and AB showed toxicity. All the tested FSs showed capacity to induce sub-diploid nuclei formation, a hallmark of apoptosis, with AB showing the highest efficiency. AB showed high toxicity in both (irradiated and non-irradiated) conditions, TIO showed low toxicity in both conditions and AM showed low toxicity in the dark and high toxicity with laser irradiation.

The dose that promotes apoptotic cell death in HL60 cells was also tested. Results were observed at 10 μM AM, with laser irradiation (fraction or continuous) of 0,55 J/cm^2 . These doses were the lowest doses tested, indicating that high doses of FS or laser induce necrotic cell death.

We conclude that phenothiazinic FSs have affinity for mitochondria and cells, and induce apoptosis at doses that are not toxic without irradiation.

Keywords: Phenothiazines, methylene blue, photodynamic therapy, mitochondria, culture cells.

1.Introdução

1.1 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é um tratamento que se baseia no uso de um composto que absorve luz (fotossensibilizador - FS) que se acumula em tecidos de rápido crescimento, como tumores, e na iluminação do tecido na presença de FS utilizando uma fonte luminosa, que pode ser um laser, LED (light emitting device) ou fontes não coerentes (1). Na presença de oxigênio molecular, a ativação luminosa do FS gera espécies reativas de oxigênio, que levam a morte celular (1). As drogas são geralmente aplicadas de maneira sistêmica, mas como o direcionamento do processo é dado pela irradiação luminosa, o efeito é local e não sistêmico.

A PDT foi trazida para a clínica há aproximadamente 25 anos e apresenta como vantagens aos tratamentos convencionais do câncer o fato de ser minimamente invasiva e com poucos efeitos colaterais (1). Uma simples dose pode erradicar tumores, tendo excelentes resultados estéticos (1). A citotoxicidade da PDT provém de espécies reativas formadas pela interação de oxigênio molecular, FS e luz, as quais reagem com componentes celulares levando a célula a morte (2). O mecanismo de regressão tumoral pode ocorrer através de ataque direto ao tumor ou ataque a vasculatura que o alimenta (1) e depende da distribuição da droga no momento da irradiação (3).

Esse efeito antivascular expandiu o uso da PDT para uma variedade de doenças caracterizadas por neovascularização, como neovascularização da coróide em degeneração de mácula relacionada à idade, arteriosclerose e artrite reumática (3). Além disso, PDT desencadeia uma forte resposta imunomodulatória, que pode contribuir para a supressão do crescimento do tumor em longo prazo após PDT (4).

A seletividade de FSs a tecidos com rápido crescimento fez da PDT uma ferramenta minimamente invasiva para a detecção de displasias cancerosas e não cancerosas. Também há potencial na dermatologia, podendo ser utilizada em neoplasias não melanômicas na pele, doenças de inflamação à pele e lesões cutâneas causadas por vírus (3).

A PDT encontra uma série de limitações para aplicação clínica. Atualmente, não é possível o tratamento de tumores distribuídos pelo corpo, já que não é possível à irradiação

do corpo inteiro (1). A penetração da luz em tecidos é pequena, limitando a aplicação a tecidos superficiais (5).

1.2 Fotossensibilizadores e Fotossensibilizadores Fenotiazínicos

FSs são compostos que, ao serem excitados por luz, produzem espécies reativas, que causam danos em biomoléculas e são responsáveis pela citotoxicidade da PDT. Algumas características são desejadas para um FS, como alta seletividade por células tumorais, baixa toxicidade no escuro e grande rendimento na geração de espécies reativas.

Três gerações de FSs já foram desenvolvidas. O primeiro fotossensibilizador que foi utilizado na prática clínica (1^o geração) era constituído de uma mistura de derivados oligoméricos de hematoporfirinas, hoje comercializado com o nome de Photofrin. Photofrin tem como vantagens a síntese simples, atividade clínica demonstrada e ser aprovado para uso em diversos países. Porém, tem composição complexa devido a ser constituído por uma mistura de diversos componentes, o que dificulta a reprodutibilidade da sua síntese. É pouco seletivo e deixa sensibilidade a luz por muito tempo, especialmente na pele. Tem seu máximo de absorção em faixas que tem pouca penetração nos tecidos, sendo necessário o uso de lasers de alta potência no tratamento (1,5). Estas características dificultam a utilização de PDT e a tornam restrita a poucos centros de fototerapia no mundo.

FSs da segunda geração foram desenvolvidos posteriormente e são geralmente substâncias simples (porfirinas, clorinas, bactericlorinas, phtalocianinas, hipericinas e fenotiazinas), com seletividade e atividades melhoradas. Têm baixa toxicidade no escuro, composição constante e são sintetizados com alto rendimento. Apresentam grande seletividade pelo tumor, mas não são retidos no corpo por muito tempo, podendo ser aplicados por via intravenosa ou tópica (5). FSs de terceira geração têm um mecanismo de direcionamento adicional, como ligação a anticorpos monoclonais. Estes ainda estão em fase inicial de desenvolvimento (5).

Estudos com uso de FSs fenotiazínicos tem se concentrado no Azul de Metileno (AM), Azure C, Tionina (TIO) e Azul de Toluidina (6). AM exhibe fototoxicidade contra várias linhagens tumorais *in vitro*, como linfoma de Gardner de ratos, sarcoma 180, adenocarcinoma mamário, carcinoma de bexiga de rato, carcinoma de bexiga humano,

adenocarcinoma cervical humano e linfoma humano de células T e de células B (6,7). Tionina mostrou fototoxicidade equivalente a do AM nas linhagens tumorais de roedores (7), enquanto o Azure C se mostrou menos fototóxico que AM nas células de carcinoma de bexiga humano (6). Azul de toluidina é fototóxico para células de carcinoma epidermal da glândula submaxilar e para células HeLa. Porém, no último caso, sua atividade é inferior à do AM (6). Uma característica interessante das fenotiazinas é sua carga positiva, podendo ser atraídas por cargas negativas, o que lhes confere afinidade especial a alguns sítios celulares, como mitocôndrias.

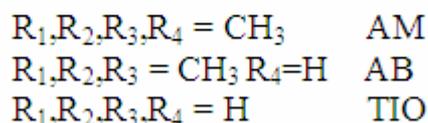
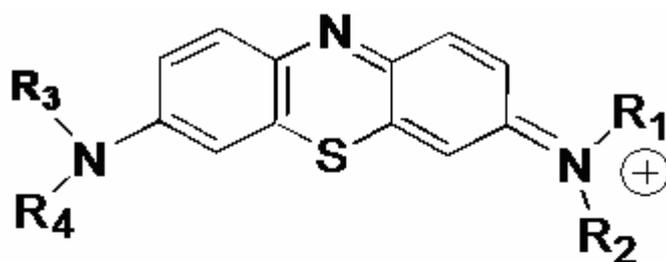


Figura 1: Estrutura química dos compostos fenotiazínicos. O que os diferencia são os grupos R (R1, R2, R3 e R4). Na figura, está exemplificada a estrutura de três fenotiazinas, azul de metileno (AM), tionina (TIO) e azure B (AB), que foram estudados neste trabalho.

O AM é um FS com características interessantes para uso em PDT (8-10). Possui alto rendimento quântico de cruzamento entre sistemas, podendo gerar concentrações elevadas de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), principal espécie responsável pela indução de morte celular em PDT (8-12). AM pode também induzir a formação de radicais, que podem levar a danos em biomoléculas (8). Possui citotoxicidade no escuro relativamente baixa além de ser economicamente acessível (10). Resultados positivos da aplicação clínica de AM tem sido obtidos (10,11). Na figura 2, observa-se o efeito da PDT com AM em melanoma, onde

se percebe o desaparecimento total de um dos tumores e a redução significativa do outro. Neste estudo, cinco das seis lesões tratadas sofreram remissão completa e uma remissão parcial (fig. 2).

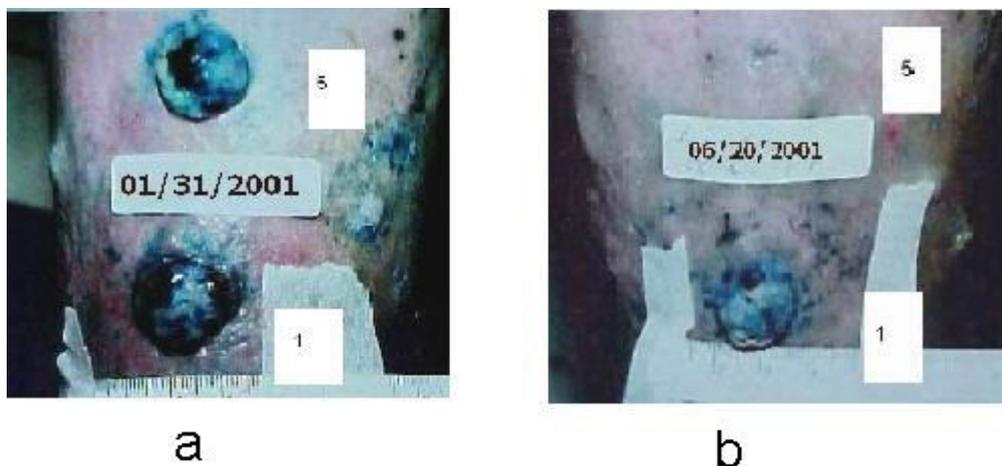


Figura 2: Fotografia de duas das seis lesões tratadas de uma paciente de 92 anos da Faculdade de Medicina do ABC (FM-ABC) (a) antes (b) após cinco sessões de PDT com AM, aplicadas a cada duas semanas. A resposta da lesão cinco foi classificada com remissão completa e a resposta a lesão um foi classificada com remissão parcial (redução de pelo menos 50% no volume do tumor) (10).

AM, em solução, pode se agregar, formando dímeros. Monômeros de AM têm máximo de absorvância em 664 nm, enquanto o dímero tem máximo de absorção em 590 nm. Essa diferença de absorção facilita o cálculo da concentração de cada espécie em solução (8). Em solução aquosa, em concentrações menores que 20 μM , apenas monômeros estão presentes. Entretanto, após a aplicação *in vivo* de uma solução de AM 2% em um tumor de epiderme, foi observado máximo de absorvância em 580 nm, indicando a presença de dímeros (10).

Apesar de todas as suas potenciais vantagens, estudos com AM *in vivo* e *in vitro* mostraram resultados inconsistentes que variam com diversos fatores, como linhagem celular, pH e o coeficiente de partição octanol-água do estado basal (6, 9,12,13). Não há um mecanismo que unifique esses resultados variáveis.

1.3 Mecanismo de morte celular

O estudo dos mecanismos fotoquímicos principais em PDT está relacionado com dois mecanismos foto-induzidos: mecanismo tipo I, iniciado por reações de transferência de elétrons entre o estado triplete do FS e biomoléculas ou por abstração de um átomo de hidrogênio do substrato, gerando diversas espécies radicalares, e o mecanismo tipo II, iniciado por uma transferência de energia do estado triplete para o oxigênio molecular, levando a formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (5,9).

A dimerização do AM influencia no tipo de mecanismo fotoquímico. Na excitação eletrônica de dímeros, são observadas reações de transferência de elétrons, formando radicais semi-reduzidos e semi-oxidados. Ou seja, em alta concentração de dímeros, o mecanismo tipo II é suprimido, favorecendo o mecanismo tipo I, diminuindo ou até eliminando a formação de oxigênio singlete (8,10). Os radicais semi-reduzidos podem reagir com oxigênio formando superóxido, que pode levar à formação de várias outras espécies reativas de oxigênio, como radical hidroxila (figura 3).

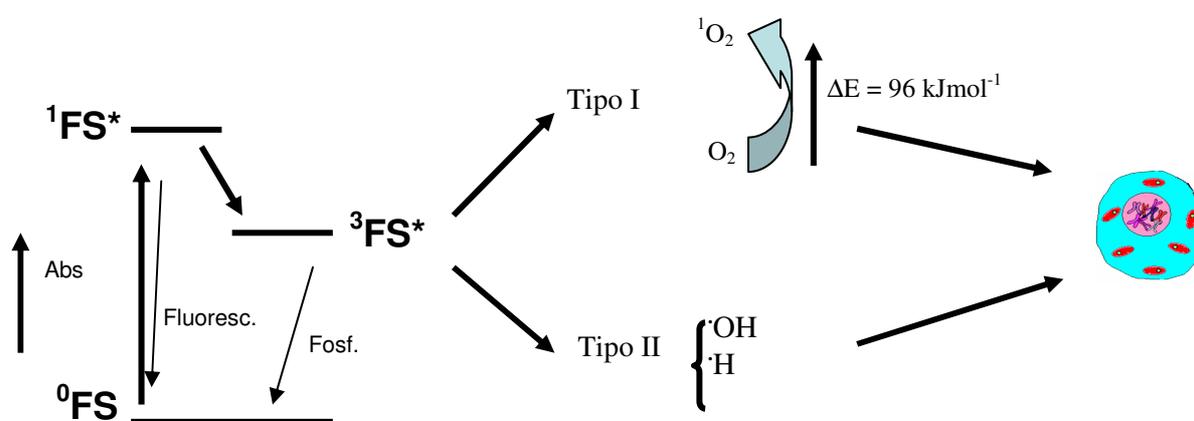


Fig. 3- Rotas fotoquímicas da reação de um FS. O FS no estado fundamental (^0FS) absorve energia se transformando no estado singlete excitado ($^1\text{FS}^*$), que pode fluorescer e decair ao estado fundamental ou decair ao estado triplete excitado ($^3\text{FS}^*$), o qual pode fosforescer, decaindo ao estado fundamental. Uma rota de decaimento do triplete é reagindo com oxigênio por transferência de energia ou de elétron. Estas reações que formam os mecanismos tipo I ou tipo II geram espécies reativas que podem levar a célula à morte.

O dano foto-induzido em células pode levar a morte por dois processos: apoptose ou necrose. O processo necrótico é caracterizado por rompimento da membrana plasmática. A célula incha e derrama o conteúdo celular na região que se localiza. Esse vazamento pode causar dano às células vizinhas, além de causar inflamação (14).

A apoptose é um processo ativo de morte celular que tem características mais desejáveis que a necrose. A apoptose é caracterizada morfológicamente por diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, que impedem o vazamento de matriz intracelular no meio extracelular. Também possui outras características, como supressão do potencial eletroquímico mitocondrial ($\Delta\Psi$) e consumo de energia (9,14).

Apoptose costuma ocorrer em concentrações menores de drogas do que as necessárias para ocorrência de necrose. Além disso, a apoptose não está relacionada à inflamação severa, como no caso que pode ocorrer acompanhada de necrose. Essas características tornam esse processo mais desejável para PDT.

Existem duas vias bem caracterizadas para apoptose: a via mediada pelo *death receptor* (via extrínseca) e a apoptose relacionada com a alteração da função mitocondrial, com permeabilização da membrana externa (via intrínseca) (3,15). Na via extrínseca, a família dos genes para os receptores da superfície celular para o fator de necrose tumoral (TNF) é estimulada, e a ativação desses receptores pelo TNF ativa a caspase-8. A ocorrência dessa via de sinalização em PDT foi demonstrada através da fotossensibilização de células de carcinoma epidérmico humanas A 431 por fitalocianina 4 (Pc 4), que momentaneamente aumentou os níveis de proteína do receptor de superfície Fas (CD95) e de seu ligante FasL, em condições onde a morte celular ocorreu por apoptose. Nessas condições, também foi observada multimerização da proteína Fas e interação do receptor com a molécula adaptadora FADD. O complexo Fas-FADD se liga à procaspase-8, que torna-se ativa e inicia a apoptose (15).

A via intrínseca é desencadeada em PDT principalmente por FSs que se ligam à mitocôndria. Porém, como esses também podem se acumular em outros compartimentos celulares, como lisossomos e retículo endoplasmático, o dano induzido pela fotossensibilização pode ser propagado à mitocôndria de várias maneiras

A mitocôndria tem sido relacionada como sítio iniciador de apoptose. Nessa organela, estão alojadas moléculas no espaço inter-membranas, como o citocromo C, AIF (apoptosis inducing factor) e SMAC/Diablo. Estas moléculas, quando liberadas para o citosol, iniciam a via intrínseca da apoptose através da ativação de caspases (3,15). O citocromo c no citosol se liga a Apaf-1 que, na presença de ATP ou dATP, leva a ativação da procaspase 9 no complexo oligomérico chamado apoptosomo. A caspase 9 ativa outras caspases, como a procaspase 3, disparando a apoptose. . Esse mecanismo parece ser dependente do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} para a liberação de citocromo c (15). O complexo SMAC/Diablo também ativa caspases, enquanto Omi/HtrA2 elimina o efeito inibitório dos IAPs (inhibitor of apoptosis protein). AIF e endonuclease G, quando liberados no citosol, se dirigem ao núcleo, onde promovem a quebra do DNA independente de caspases.

Dois modelos foram propostos para explicar como as proteínas mitocôndrias são liberadas no citosol durante a apoptose. O primeiro modelo é através da formação do MPT (poro de transição de permeabilidade mitocondrial), que é definido como um aumento na permeabilidade da membrana interna mitocondrial a solutos com massa molecular de aproximadamente 1500 Da. A abertura desse poro ocorre em uma região de contato entre as membranas interna e externa da mitocôndria. Assim, ocorre a supressão do gradiente de prótons e perda do $\Delta\Psi$, desacoplando a cadeia respiratória (3).

O segundo modelo prediz que a integridade estrutural da mitocôndria seria mantida e a formação de um poro específico na membrana externa permitiria a saída do citocromo c. Esse poro provavelmente seria formado por uma proteína da família Bcl-2, a Bax (3).

A família Bcl-2 contém proteínas pró-apoptóticas, como Bax, Bak, Bim, Bid, Bik e Bad e proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xl. Tem recebido atenção a proposta de que os membros da família Bcl-2 governam a ativação de caspases indiretamente através de efeitos em organelas, principalmente mitocôndrias. Como o dano nessas proteínas precede os distúrbios mitocondriais associados com apoptose, como diminuição do pH, alteração da permeabilidade de membrana e alterações na integridade da membrana externa, as proteínas da família Bcl-2 parecem controlar a apoptose em um ponto regulatório inicial (3). No entanto, o papel exato destas proteínas ainda não está claro uma vez que atividades proapoptóticas e antiapoptóticas tem sido demonstrada (15).

1.4 Oxigênio Singlete

São considerados estados singletes do oxigênio molecular os dois estados eletrônicos excitados imediatamente acima do estado fundamental (5). O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em soluções varia com o solvente, sendo mais longo em solventes deuterados. As interações entre os estados vibracionais das moléculas do solvente e os níveis eletrônicos/vibracionais do $^1\text{O}_2$ produzem a sua desativação. Este processo é menos eficiente em solventes deuterados.

$^1\text{O}_2$ tem sido considerado o principal mediador de dano foto-induzido em vários sistemas biológicos sensibilizados (5). A sua formação (mecanismo tipo II) envolve a transferência de energia do nível triplete menos energético para o oxigênio molecular no seu estado fundamental triplete, levando a formação do $^1\text{O}_2$. Quando formado, o $^1\text{O}_2$ pode reagir com vários substratos biológicos, como membranas, proteínas e DNA (17). Em sistemas onde o mecanismo tipo II é predominante, é importante um alto rendimento de formação de $^1\text{O}_2$.

$^1\text{O}_2$ causa danos celulares em biomoléculas induzindo morte celular, muitas vezes ocasionando apoptose ao invés de necrose (3, 15-19). Por exemplo, $^1\text{O}_2$ gerado com phthalocianina Pc4 em células A431 causou rápida permeabilização da membrana mitocondrial interna e vazamento de citocromo C para o citosol. Um fator limitante para a toxicidade do $^1\text{O}_2$ é o seu pequeno tempo de vida em células (meia-vida: $< 0.04 \mu\text{s}$), tornando a sua dispersão pequena (raio de ação: $< 0.02 \mu\text{m}$) (9, 15). Portanto $^1\text{O}_2$ causa dano em local próximo de onde é gerado, o que explica a importância da localização de FSs em sítios indutores de apoptose, como as mitocôndrias, no mecanismo de toxicidade aos tumores.

1.5 Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela intracelular presente na maioria das células eucarióticas. É composta de duas membranas, a interna e a externa, e da matriz mitocondrial, encontrada dentro da membrana interna. O espaço entre as duas membranas é denominado espaço intermembranas. A mitocôndria tem tipicamente entre 0.7 e 1 μm de comprimento. Sua forma não é fixa e varia continuamente dentro da célula, e o aparecimento das cristas (dobras da membrana interna mitocondrial) pode ser diferente em mitocôndrias isoladas de tecidos diferentes ou na mesma mitocôndria em diferentes tampões. Nessas cristas, ocorre o transporte de elétrons, a geração de um gradiente de prótons e a formação de ATP pela ATPsintase. Mitocôndrias de coração, por exemplo, que tem períodos de alta atividade respiratória, tendem a ter uma maior área de cristas do que mitocôndrias de fígado. Mitocôndrias podem ser maiores e mais filamentosas em alguns tipos de células (19).

A membrana mitocondrial externa possui proteínas chamadas porinas, que são poros não específicos para solutos com massa molecular menor que 10 KDa, sendo livremente permeável a íons e outros metabólitos. A membrana interna é muito mais seletiva, sendo impermeável a íons, o que acaba criando uma diferença de potencial entre a membrana interna e a matriz mitocondrial. As enzimas do ciclo do ácido cítrico ficam na matriz, exceto pela succinato desidrogenase, que é ligada a membrana interna. A concentração de proteínas na matriz pode chegar a 500 mg/ml e deve haver uma considerável organização a fim de se adequar a essa alta concentração protéica (19). O reservatório da matriz de NAD e FAD é isolado do citossol, enquanto o ATP e ADP da matriz se comunicam com o citoplasma através de um trocador de nucleotídeos de adenina (19).

Mitocôndrias possuem carga negativa matricial devido a seu potencial eletroquímico negativo ($\Delta\Psi$). A diferença de potencial elétrico nas fases aquosas separadas pela membrana interna mitocondrial (matriz mitocondrial negativa, espaço intermembranas positivo) é gerada pelo bombeamento de prótons pelos complexos mitocondriais para o espaço intermembranas. Esse $\Delta\Psi$ é reflexo dessa diferença de carga. Em mitocôndrias desacopladas, a membrana interna se torna permeável aos prótons, permitindo que eles

voltem a matriz por outros meios que não são a ATPsintase. Assim, o transporte de elétrons é desacoplado da produção de energia e o potencial mitocondrial é suprimido e (19).

A suspensão mitocondrial é geralmente preparada por homogeneização do tecido em sacarose isotônica seguida por centrifugação diferencial para separar a mitocôndrias de núcleos, debris e microssomos (retículo endoplasmático fragmentado). Esse processo simples torna a extração de mitocôndrias de tecidos moles, como o fígado, um processo fácil e confiável.

1.6 Citolocalização do Fotossensibilizador

A citolocalização de um fotossensibilizador é determinante para o mecanismo de morte que ele pode induzir. Por exemplo, um FS que se localiza na membrana celular tende a induzir necrose, enquanto um outro com citolocalização próxima a um sitio indutor de apoptose tende a induzir este tipo de morte (14).

FSs podem se localizar em vários compartimentos celulares, como lisossomo, retículo endoplasmático e complexo golgiense, transmitindo o sinal de dano as mitocôndrias de outras maneiras (15, 21). Em alguns casos, a sinalização para a mitocôndria parece ocorrer através de danos em proteínas da família Bcl-2 (21). A influência da citolocalização para a morte celular já foi demonstrada como um dos fatores chaves para a eficiência de morte induzida por PDT (22).

As características estruturais que influem na citolocalização do FS são a sua carga, o grau de hidrofobicidade e o grau de assimetria da molécula (20). FSs que são hidrofóbicos e tem duas ou menos cargas podem permear a membrana plasmática, e depois se difundir a outros compartimentos celulares, além de serem mais incorporados por células *in vitro*. FSs menos hidrofóbicos e que tenham mais de duas cargas são muito polares para atravessarem a membrana, sendo então assimilados por endocitose (20).

FSs que se localizam na mitocôndria apresentam bom potencial de indução de apoptose. A ação do FS na mitocôndria tem que ser controlada, a fim de evitar a depleção total do ATP, necessário para a ocorrência de apoptose (15). BPD (benzoporphyrin derivative), PC4 (aluminium phthalocyanine 4) e N,N`-bis (2-ethyl-1,3-dioxolane) kryptocianina são FSs bem estudados que se localizam na mitocôndria (20). FSs catiônicos e que são hidrofóbicos podem se localizar na mitocôndria, devido a influência do $\Delta\Psi$ e da

bi-camada lipídica da membrana. É conhecido que mitocôndrias de células de carcinoma acumulam e retêm moléculas catiônicas em maior proporção que células normais (20).

A atração de FSs pela mitocôndria pode se dar por vários fatores. FSs positivos tendem a ser atraídos pela mitocôndria devido a seu $\Delta\Psi$, mas também podem ser atraídos para outros lugares com carga negativa na célula, como o núcleo (6). A polaridade também pode ser um fator determinante na interação, já que alguns FSs possuem afinidade por membranas biológicas, se ligando a mitocôndrias e outras organelas membranosas. Esse direcionamento pode ocorrer também por um conjunto de fatores, que ainda precisam ser identificados.

2-Objetivos:

Este trabalho tem como objetivos:

- Caracterizar a ligação de fenotiazinas à mitocôndrias.
- Identificar as características mitocondriais que afetam essa ligação.
- Identificar as características estruturais da fenotiazina que influenciam essa ligação.
- Identificar como essa ligação afeta a formação de oxigênio singlete.
- Identificar a ligação dessas fenotiazinas em células.
- Determinar a dose de luz e concentração de AM que favorecem apoptose.

3-Materiais e Métodos:

Solventes: Foram preparadas soluções estoque de azul de metileno (AM), azure B (AB) e tionina (TIO). Os corantes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e diluídos em água bi destilada Mili-Q. A pureza das soluções foi confirmada através de TLC (thin layer chromatography). As soluções foram estocadas a 4°C e diluídas conforme a necessidade.

Mitocôndrias: As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos Sprague-Dowley fêmeas, entre 300-350g, do biotério do Conjunto das Químicas-USP. Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo comitê de Ética e Cuidado Animal. Para extração, foi utilizado tampão com sacarose 250 mM, Hepes 5mM e EGTA 1 mM. Foram separadas após homogeneização do tecido e centrifugação. Após a homogeneização, foi feita uma centrifugação a 465 g, 4°C. O sobrenadante era então centrifugado a 11627 g, 4°C e o procedimento era então repetido (9). Para determinação da concentração mitocondrial, foi utilizado o método do biureto (9), tendo as medidas de absorção sendo feitas em um aparelho Ultrospec 1000 da Amersham Pharmacia Biotech. Logo, a concentração de mitocôndrias expressas no trabalho se referem a concentração de proteínas na mitocôndria. Para experimento, foi utilizado tampão com sacarose 250mM, Hepes 10 mM, EGTA 1 mM, succinato 2 mM e fosfato de sódio 1 mM. Todas as amostras foram utilizadas assim que extraídas. Em todos os experimentos adicionou-se rotenona e oligomicina (1 µM). Para suprimir o potencial eletroquímico mitocondrial, foi usado CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) ou FCCP (carbonyl cianide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) (desacopladores, 2 µM). Para alteração do potencial eletroquímico mitocondrial foi usada Valinomicina e adicionado KCl a suspensão (9).

Cultura de células: Duas linhagens celulares foram utilizadas nos experimentos. Células HeLa foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/streptomomicina). Estas são células de melanoma humano que crescem aderidas a superfície. Para repicar essas células, era feita lavagem com PBS (Phosphate-buffered Saline) e adição de tripsina (1 ml) por 3 minutos. As células eram então espalhadas em garrafas e era adicionado meio DMEM, com inibidor de tripsina.

Células HL60 foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640, com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/streptomicina). Estas células são células pré-mielocíticas humanas que crescem em suspensão. Para repicar essas células, elas eram centrifugadas no próprio meio (1500 RPM, 3 minutos), o meio era descartado e então era adicionado um novo meio. As células foram mantidas em estufa Thermo electron corporation, HEPA Class 100 (37°C, 5% CO₂).

Experimentos de ligação de FSs em mitocôndrias e células: Para determinar a quantidade de corantes ligados, foi adicionada à suspensão de mitocôndrias tampão com o corante. As mitocôndrias foram então centrifugadas. A absorbância do sobrenadante e do precipitado foi lida (400-800 nm) em um espectrofotômetro UV-2401 PC da Shimadzu Co. Antes da leitura, foi adicionado 200 µl de SDS (Sigma Aldrich) 10% e 200 µl de triton x-100 (Sigma-Aldrich) com cloreto de ferro 10 µM, para remover os constituintes das mitocôndrias e reduzir o corante (9).

Em células, da ordem de 10⁶ células foram incubadas em meio sem fenol red com a diluição desejada do corante. As células foram mantidas em estufa por 3 horas. Após esse período, o meio com corante foi trocado por um meio sem corante. As células HL60 foram centrifugadas (3 min, 1500 RPM) e tinham o sobrenadante lido espectrofotometricamente (400-800 nm). No caso das células HeLa não havia centrifugação, já que são células aderentes e a separação ocorre na própria garrafa.

Determinação da relação dímero/monômero (D/M): A relação D/M foi realizada através de medidas no espectrofotômetro UV-2401 PC da Shimadzu Co. As bandas de dímero (590 nm) e monômero (664 nm) do AM são distintas (8,9). Assim, eram calculadas as concentrações dessas espécies e calculada a razão entre elas.

Partição Octanol-água: Uma solução estoque 3 mM em tampão fosfato 5 mM pH 7,2 foi preparada. Amostras de 5 mL desta solução foram adicionadas a 5 mL de octanol, agitadas por 1 h e deixadas equilibrar por 24 h. Após este período, a absorbância das fases aquosa foi medida a 644 nm e a absorbância da fase octanólica foi medida a 640 nm. O coeficiente de partição foi calculado como a média dos logaritmos das razões entre as absorbâncias da fase octanólica e as absorbâncias da fase aquosa.

Determinação de oxigênio singlete: Os experimentos de emissão no infravermelho próximo (1270 nm) foram realizados num sistema desenvolvido pela Edinburg

Analytical Instruments. Este sistema é composto por um laser Nd-YAG Continuum Surelite III (Q-switched variável), o qual fornece 10 pulsos por segundo. Há um compartimento de cubeta com agitação de solução com temperatura controlável. Tem-se um monocromador com grade de difração para região do infra-vermelho próximo, uma fotomultiplicadora NIR R5509 da Hamamatsu Company, dispostos conforme a Figura 4. Um micro-computador é conectado ao sistema e a análise dos transientes é efetuada por duas placas F900 e MSA-250 de aquisições. Os demais equipamentos são os usualmente utilizados em pesquisa e não necessitam da descrição detalhada.

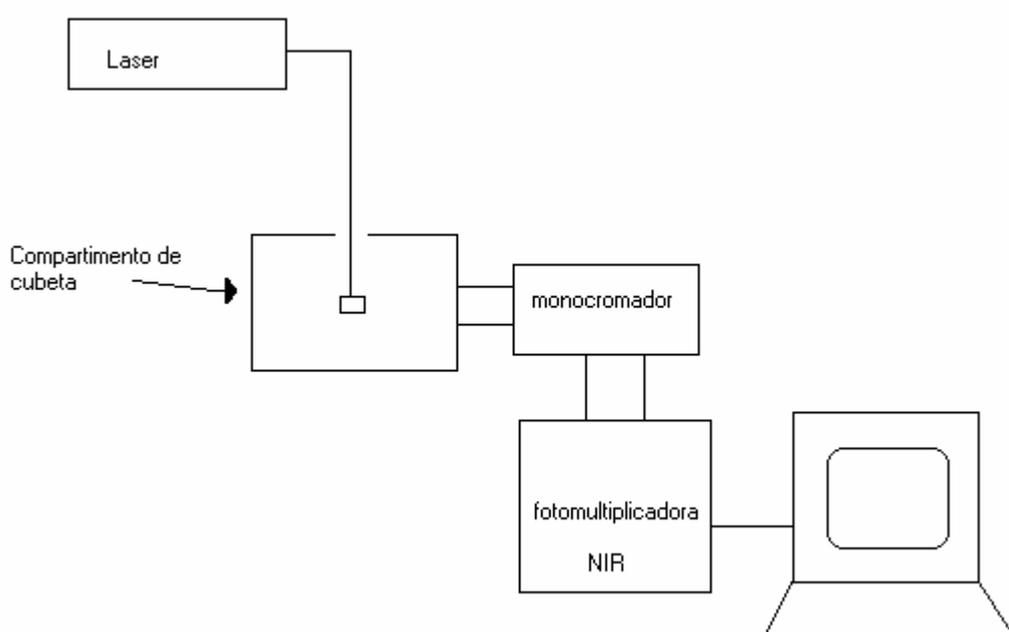


Figura 4: Sistema de emissão no infra-vermelho

Oxidação de NAD(P)H: A velocidade de oxidação do NAD(P)H foi obtida em um fluorímetro F-4500 *Hitachi*, operando a 352 nm de excitação e 464 nm de emissão (9). Após estabilização da fluorescência, era adicionado o corante na suspensão mitocondrial. As constantes de decaimento observadas para a oxidação de NAD(P)H foram obtidas através do ajuste do decaimento da fluorescência em uma função monoexponencial,

realizadas no Microcal Origin 6. Ambos os compostos (NADH e NAD(P)H) são oxidados por AM. Apenas a forma reduzida fluoresce.

Obtenção de mitoplastos: Mitoplastos são mitocôndrias desprovidas da membrana externa. A fim de se obter mitoplastos, as mitocôndrias eram isoladas conforme descrito anteriormente e re-suspendidas em um tampão com sacarose 50 mM, Hepes 5 mM e EGTA 1 mM. Nesse novo tampão, a diminuição da concentração de sacarose leva a alterações na força iônica, causando inchamento da organela e ruptura da membrana externa.

Irradiação das células: Após a incubação, as células foram re-suspendidas em meio sem fenol red para serem irradiadas. As irradiações foram feitas usando um laser-line INOVA de 664 nm, com potência de 40 mW, ou com um laser de 532 nm da Laser Morgotron, operando a 25 mW. As irradiações foram realizadas em placas transparentes de 3,5 cm de diâmetro, o mesmo diâmetro da caneta laser, o que garante uma irradiação uniforme.

Contagem das células e determinação de células viáveis: A contagem de células foi realizada pelo método de azul de tripan. 90 µL de suspensão de células foi misturado com 10 µL de azul de trypan (Sigma-Aldrich) e depois contada no microscópio, com o auxílio de um hematocítmetro. O azul de tripan cora as células com membrana comprometida, as quais não são consideradas viáveis.

Medida de proporção de fenotiazinas reduzidas/oxidadas: Após as células serem incubadas com a fenotiazina por 3 horas, elas foram centrifugadas (1500 RPM, 3 minutos) e o precipitado era re-suspendido em CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 50 mM, o que fornecia a quantidade de fenotiazinas oxidadas. Outra amostra foi re-suspensa em CTAB 50 mM + Fe 50 mM, para determinar a concentração de fenotiazina total.

Citometria de fluxo: A contagem da porcentagem de núcleos sub-G1 foi obtida através da emissão de DNA marcada com iodeto de propídio (IP). Em uma célula humana (2n), uma quantidade mínima de DNA está na fase G1. Se forem encontrados pedaços de DNA menores que os característicos de G1, esses pedaços são considerados sub-diplóides, por seu menor tamanho, e são característicos de apoptose. Assim, a porcentagem de DNA sub-G1 é um indicativo da quantidade de células que morreram por apoptose. Essa característica não é suficiente para caracterizar apoptose. Para se medir essa emissão foi utilizada a técnica de citometria de fluxo (FACS ou Fluorescence Activated Cell Sorting).

FACS permite a contagem e análise de atributos físicos e moleculares de células em meio líquido. O princípio do FACS consiste em analisar a fluorescência ativada em células. Pode-se quantificar receptores de superfície bem como proteínas intracelulares. A análise é baseada na interação específica do antígeno de células, organelas ou moléculas com uma molécula fluorescente, no caso o IP. Durante a análise, as células passam por um feixe laser de comprimento de onda apropriado. As moléculas fluorescentes são excitadas pelo feixe laser monocromático e emitem luz com comprimento de onda maior, o qual pode ser detectado. A quantidade de fótons emitidos é relacionada com a quantidade de IP ligados no DNA celular. Essa fluorescência pode ser relacionada a quantidade de DNA nos núcleos celulares analisados. Informações adicionais são dadas através do espalhamento do sinal laser. O FSC (forward scatter signal) está relacionado com o tamanho das células, enquanto o SSC (side scatter signal) informa sobre a granularidade do citoplasma.

Foram plaqueadas aproximadamente 120.000 células HeLa em placas de aproximadamente 35 mm de diâmetro. Foram incubadas na estufa a 37 °C por aproximadamente 12 horas. Depois essas células foram lavadas com PBS (tampão fosfato) e colocadas em meio DMEM sem soro e sem vermelho de fenol com diferentes concentrações de AM, onde foram encubadas na estufa a 37 °C por 3 horas. Depois, foram lavadas com PBS e irradiadas por 350 segundos (50 segundos de irradiação seguidos de 50 segundos de intervalo, até completar 350 segundos de irradiação) com laser (664 nm, 60 mW). Foram realizados 2 controles sem AM, um foi irradiado e outro não. Tirou-se o PBS e colocou-se DMEM com soro e indicador de pH. Incubou-se na estufa por 14 ou 36 horas. Decorrido esse período, retirou-se o sobrenadante e este foi passado para tubos de 15 mL. Lavou-se cuidadosamente com PBS, acrescentou-se 300 µL de tripsina por 5 minutos e adicionou-se 1 mL de meio DMEM com indicador de pH. As amostras foram ressuspensas e transferidas para os mesmos tubos de 15 mL. Estes foram centrifugados a 262 g por 5 minutos. Rapidamente retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 1 mL de PBS gelado. Os tubos foram novamente centrifugados a 262 g por 5 minutos e depois retirou-se o PBS e adicionou-se 2 mL de etanol 70% a -20 °C. Depois homogenizou-se as amostras e estas foram estocadas em freezer a -20 °C.

Para realizar as medidas no FACS (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA), as amostras foram centrifugadas a 262 g por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante (álcool) e

colocou-se em 1 μL de RNase A (Fermentas) de concentração 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a temperatura ambiente por 1 hora. Passado esse tempo, a reação foi interrompida no gelo e adicionou-se 185 μL de IP de concentração 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram transferidas para microtubos e a fluorescência do IP foi medida por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos pela porcentagem de núcleos sub-diplóides (CellQuest Software, Becton Dickinson, CA) que representam células apoptóticas (21).

No caso das células HL60, da ordem de 10^5 células eram tratadas e re-suspendidas em tampão HFS (0,1% citrato de sódio, 0,1% triton X-100 e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodeto de propídio) e então medidas no FACS (21).

Viabilidade por brometo de etídio: A viabilidade celular foi determinada através do método de fluorescência do brometo de etídio. A suspensão de células foi colocada em uma cubeta e levada a um fluorímetro (Hitachi F1000), com excitação de 365 nm e emissão a 580 nm. Era então adicionado brometo de etídio (EB) a concentração final de 50 μM , para se observar as células mortas, e depois digitonina, até a concentração de 1%, para se observar a fluorescência total das células com brometo de etídio (22).

Microscopia de fluorescência: Células HeLa foram tratadas e então submetidas a microscopia de fluorescência. As células foram desplaqueadas com o auxílio de uma espátula e então centrifugadas (11627 g, 5 minutos), resuspensas em 25 μL de PBS e então adicionado 2 μL de solução acridine orange (AO)/brometo de etídio (EB) foi adicionado, sendo esta solução 50% 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AO em PBS e 50% EB 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em PBS. As amostras foram misturadas imediatamente antes da microscopia, onde 10 μL da suspensão de células com a solução foram vistas em um microscópio de fluorescência usando filtro de fluoresceína e uma objetiva 60x. AO entra em todas as células, dando a elas uma coloração verde. Já EB entra apenas nas células necróticas, ou seja, com a membrana rompida, indicando as células mortas, dando uma coloração alaranjada. Células apoptóticas podem ser diferenciadas por pontos brilhantes que correspondem à cromatina condensada (23). As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência e fotografadas.

4-Resultados e Discussão

4.1 – Fenotiazinas em mitocôndrias e células Hela

Inicialmente, foi estudada a ligação e dimerização do AM em mitocôndrias. AM é atraído por superfícies negativas, devido a sua carga positiva (8). A ligação entre AM e mitocôndrias está mostrada na figura 5. Suspensões de mitocôndrias de diferentes concentrações foram incubadas com AM e então centrifugadas. O sobrenadante e o precipitado tiveram então suas absorbâncias medidas.

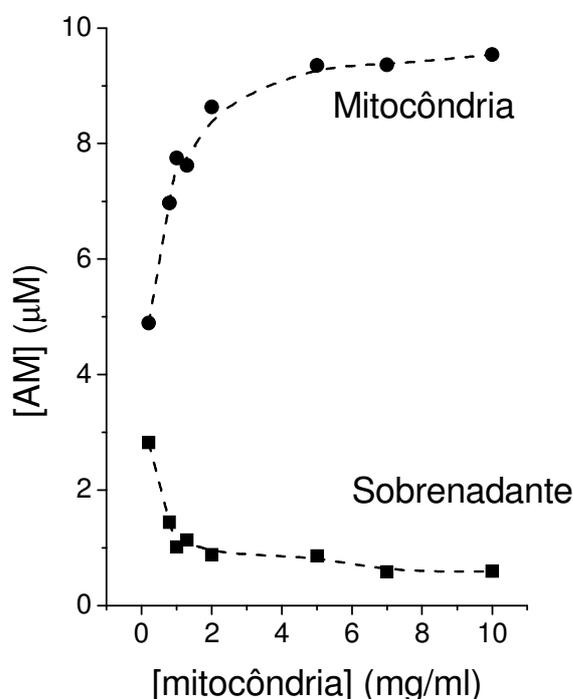


Figura 5- Concentração de AM no precipitado (●, contendo mitocôndrias) e no sobrenadante (■) de uma suspensão de mitocôndrias de concentração variável incubada em meio com 20 µM de AM. Sobrenadante e precipitado foram tratados com solução contendo SDS e Fe³⁺.

A figura 5 mostra que o AM se liga na mitocôndria de maneira dependente da quantidade de mitocôndrias, até um ponto onde parece ocorrer uma saturação dessa

ligação. O $\Delta\Psi$ mitocondrial é negativo, o que deve atrair o AM. Ou seja, AM tem afinidade por essa organela.

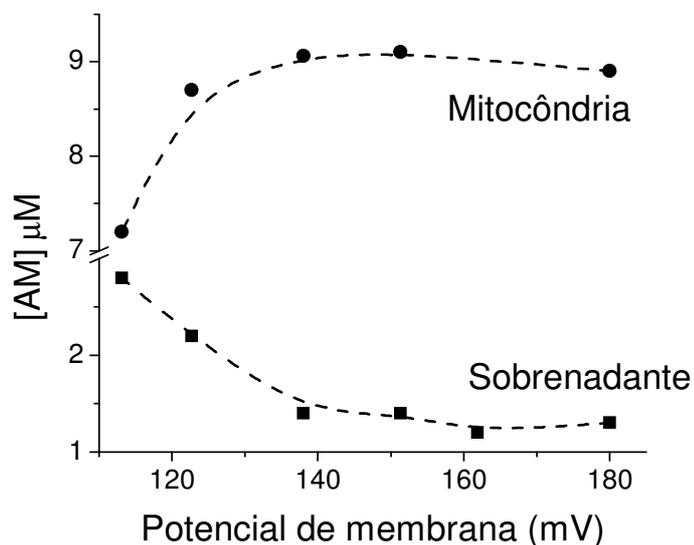


Figura 6- Concentração de AM (μM) no precipitado com mitocôndrias e sobrenadante de uma suspensão mitocondrial de 1 mg/ml em tampão com 20 μM de AM. A variação do potencial de membrana mitocondrial foi obtida com adição de Valinomicina e KCl.

A figura 6 mostra que quanto maior o $\Delta\Psi$, maior a ligação do AM na mitocôndria, mostrando que AM é atraído pelo $\Delta\Psi$ negativo mitocondrial. Logo, AM se liga a mitocôndria devido a suas propriedades eletroquímicas, refletidas pelo $\Delta\Psi$.

A relação D/M (Dímero/Monômero, valor que reflete a proporção entre essas duas formas do AM) do AM em mitocôndrias também foi estudada. Os dímeros de AM tendem a favorecer a ocorrência de mecanismo tipo I, formando radicais livres e diminuindo a geração de oxigênio singlete (8,9). A figura 7 mostra a relação D/M em função da concentração mitocondrial em meio com 20 μM de AM. A maior relação D/M ocorre por volta de uma concentração de 5 mg/ml de mitocôndrias. Depois ocorre uma queda nessa relação. Esse aumento seguido de uma diminuição deve estar relacionado com a quantidade

de superfície para a ligação do AM, sendo que a partir de 5 mg/ml de mitocôndria há mais superfícies disponíveis para ligação do que moléculas de AM, o que diminui a dimerização.

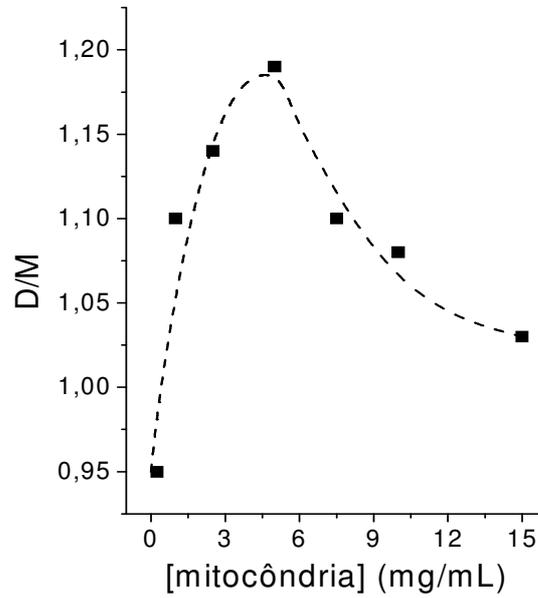


Figura 7- Relação D/M em suspensão mitocondrial de concentração variável com 20 μ M de AM.

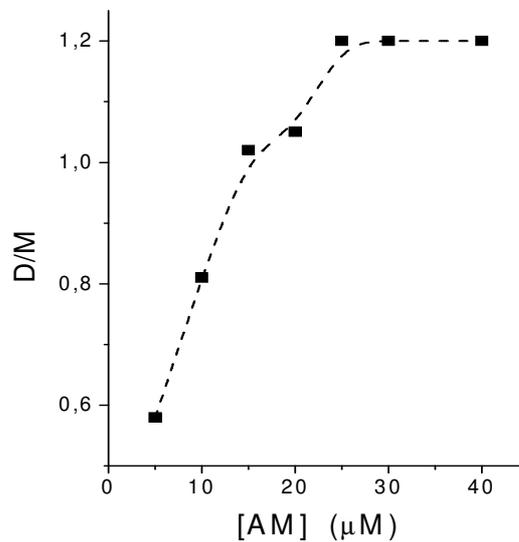


Figura 8- Relação D/M em suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) em diferentes concentrações de AM.

A relação D/M também se mostrou dependente da concentração de AM, conforme mostrado na figura 8. A relação D/M aumenta conforme se aumenta a concentração de AM, até se chegar a um patamar, com valores de D/M alcançando aproximadamente 1,2. Essa fase de estabilização deve ter ocorrido devido à saturação da ligação nas mitocôndrias. Além das concentrações de AM e mitocôndria, a relação D/M é influenciada pelo $\Delta\Psi$, conforme pode ser observado na figura 9.

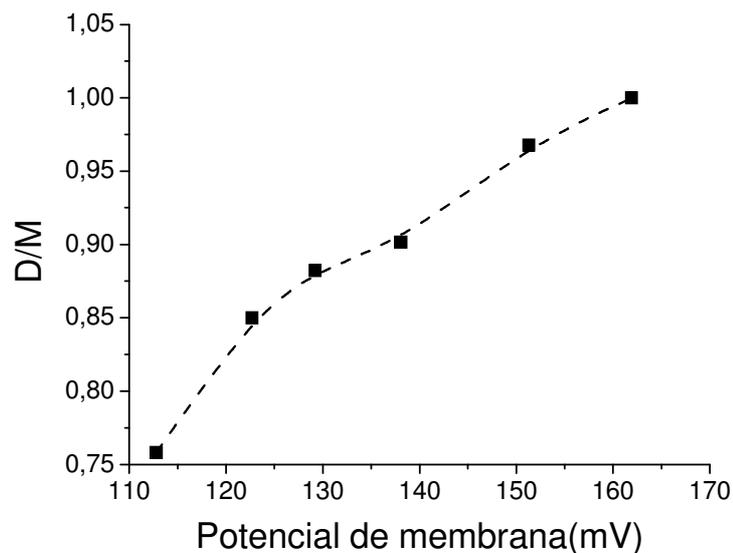


Figura 9- Relação D/M em uma suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) em meio com AM (20 μM). Para se alterar o potencial de membrana, foi utilizado valinomicina e KCl.

Esses dados permitem concluir que o AM dimeriza em mitocôndrias, de maneira dependente da concentração de mitocôndria, da concentração de AM e do potencial de membrana. As figuras 10 e 11 reforçam a importância do $\Delta\Psi$ na dimerização de AM. Com a adição de 2,5 μM de Antimicina A (fig. 10), ocorre a inibição da cadeia de transporte de elétrons. Com a cadeia inibida, a dimerização do AM é reduzida, como pode ser observado pela redução do máximo de absorção de 600 nm e aumento do máximo de 660 nm. O mesmo efeito pode ser observado com a adição de 2,5 μM de CCCP, desacoplador que elimina o gradiente de prótons da membrana interna mitocondrial, suprimindo o $\Delta\Psi$ (fig.

11). Ou seja, condições que alterem o $\Delta\Psi$ alteram também a agregação do AM na mitocôndria.

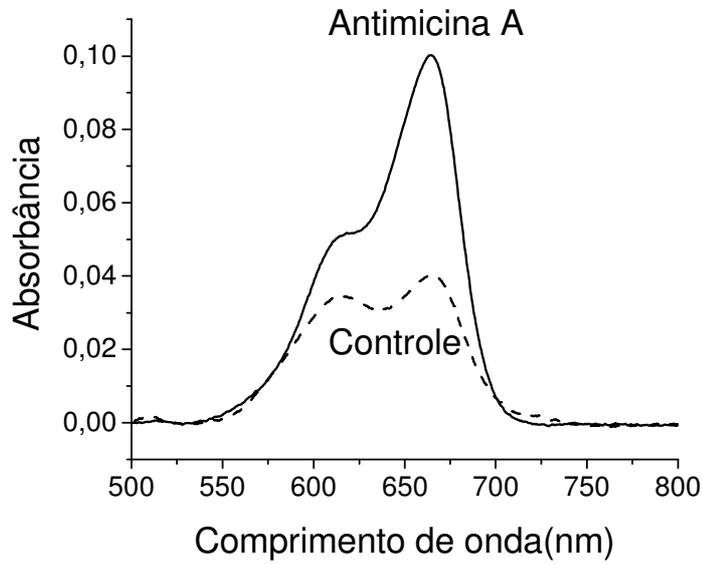


Figura 10- Espectro de absorção da suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) com AM (20 μM) e com 2.5 μM de antimicina A (linha contínua) e controle (AM 20 μM, linha não contínua). Banda do dímero do AM em 600 nm, banda do monômero 660 nm.

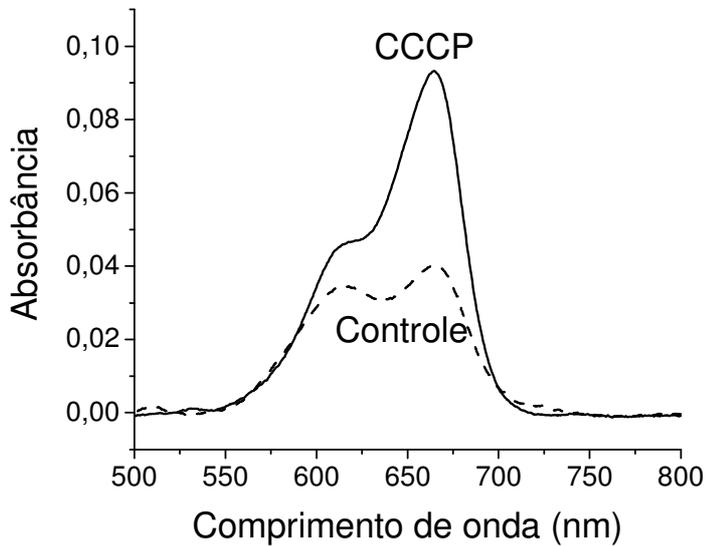


Figura 11- Espectro de absorção da suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) com AM (20 μ M) com 2.5 μ M de CCCP (linha contínua) e controle (AM 20 μ M, linha não contínua). Banda do dímero do AM em 600 nm, banda do monômero 660 nm.

A dimerização do AM se mostrou independente da presença de membrana externa mitocondrial. Em experimentos com mitoplastos, que são mitocôndrias sem a membrana externa, foi observada a dimerização de AM em função da concentração de mitoplastos (fig. 12), mostrando um resultado semelhante com a agregação observada em mitocôndrias intactas (fig. 7).

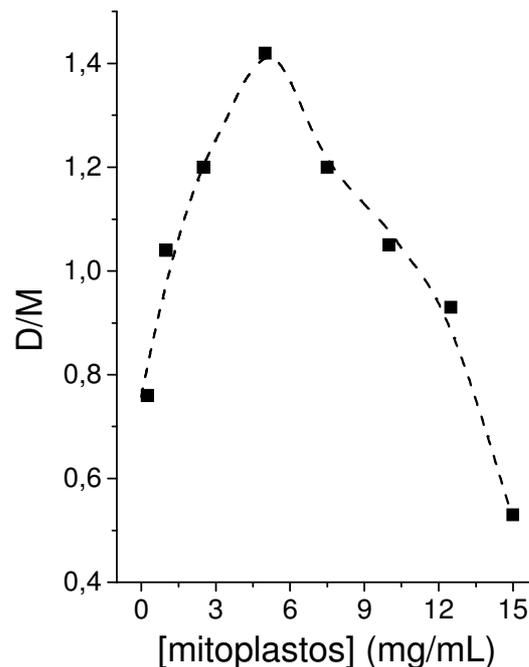


Figura 12- Relação D/M em suspensão de mitoplastos com 20 μ M de AM.

Esse dado permite inferir que a dimerização do AM é independente da membrana externa mitocondrial. A fim de se determinar a localização do AM na mitocôndria, foi monitorada sua reatividade com NAD(P)H intramitocondrial. AM é conhecido por reagir com coenzimas reduzidas (NADH e NADPH) em solução, formando a espécie reduzida de AM (leuco AM) e coenzimas oxidadas. Essa reação é estimulada pela excitação eletrônica do AM devido a um aumento na afinidade por elétrons da sua espécie excitada (9, 23). A diminuição da emissão de NAD(P)H devido a oxidação foi medida com o complexo I

mitocondrial inibido por rotenona para evitar possíveis efeitos do acúmulo de AM no transporte de elétrons mitocondrial. A emissão do NAD(P)H diminui em presença de AM em função do tempo (fig. 13) e a queda na emissão foi proporcional as concentrações testadas de AM. A constante de velocidade de oxidação observada (K_{obs} , s^{-1}), calculada através do ajuste monoexponencial da velocidade de oxidação do NAD(P)H, variou entre $3.3 \times 10^{-3} s^{-1}$ para 1 μM de AM para $4.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ com 10 μM e $7.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ para 40 μM . Assim, percebe-se que o AM oxida o NAD(P)H intramitocondrial e a taxa de oxidação aumenta conforme a concentração de AM aumenta. Pode-se concluir que o AM atravessa as duas membranas mitocondriais e se localiza na matriz mitocondrial, onde interage com NAD(P)H.

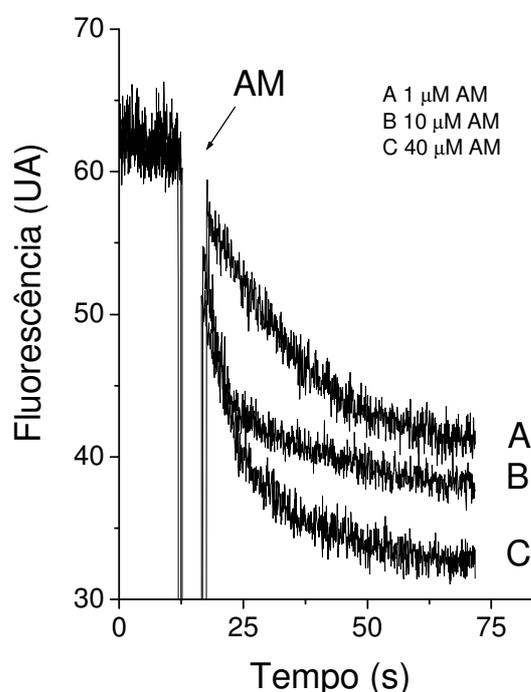


Figura 13 – Fluorescência do NAD(P)H intramitocondrial em função do tempo, com adição de AM no ponto indicado em suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml).

O resultado da oxidação do NAD(P)H é a redução do AM, formando o leuco AM, que é re-oxidado na presença de oxigênio (24). Com o intuito de observar o aparecimento do leuco, suspensões de mitocôndrias com AM foram irradiadas com laser de 532 nm, a qual favorece a redução do AM na presença de agentes redutores. Nessas condições, foi

confirmada a formação de leuco AM com o aparecimento de uma banda em 410 nm (fig. 14), que corresponde ao máximo de absorção do leuco AM (9). A formação dessa banda aumenta com o tempo de irradiação em situações em que a mitocôndria apresenta elevado $\Delta\Psi$. Quando o $\Delta\Psi$ é suprimido pela adição de CCCP (fig. 15) não há o aparecimento da banda de 410 nm, indicando que o leuco AM não é formado. Esse dado sugere que a mitocôndria desacoplada não forma leuco AM o suficiente para ser detectado espectrofotometricamente, já que o NAD(P)H se manteve reduzido em ambas as condições devido a presença de rotenona.

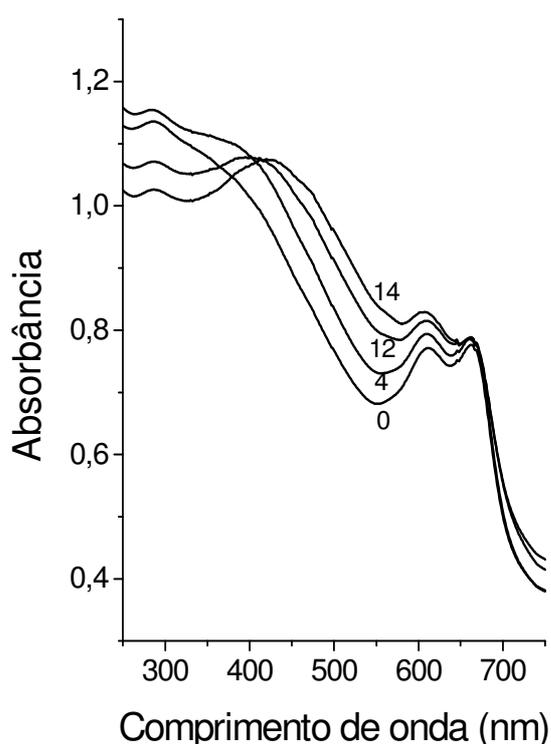


Figura 14 – Espectro de absorção de suspensões de mitocôndrias (1 mg/ml) em meio com 20 µM de AM irradiadas com laser de 532 nm em diferentes tempos (tempo indicado na linha, em minutos).

Na figura 14, fica evidente a formação de uma banda em 410 nm, que começa a aparecer após 4 minutos de irradiação. Essa banda corresponde a formação de leuco AM, ficando mais evidente nas amostras com 12 e 14 minutos de irradiação.

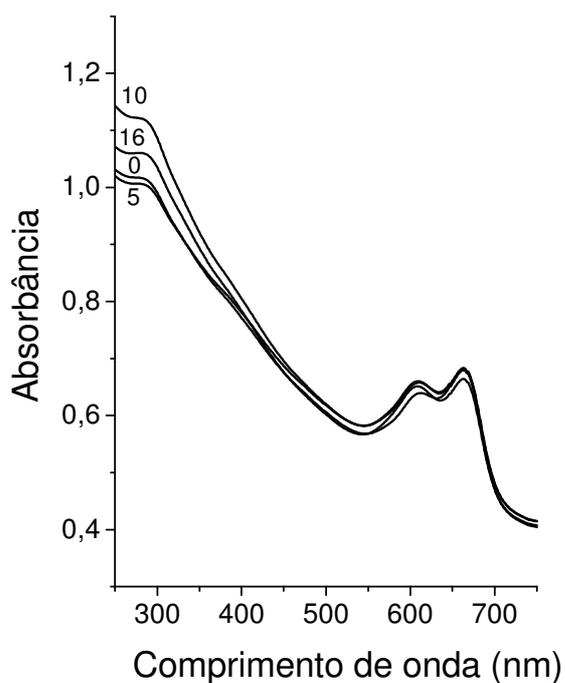


Figura 15 – Espectro de absorção de suspensões de mitocôndrias (1 mg/ml) em meio com 20 μM de AM e 2,5 μM de CCP, irradiadas com laser de 532 nm em diferentes tempos (tempo indicado na linha, em minutos).

A influência do $\Delta\Psi$ na formação de $^1\text{O}_2$ também foi investigada. Dímeros de AM tendem a diminuir a produção de $^1\text{O}_2$ (8), e foi demonstrado que a supressão do $\Delta\Psi$ diminui a dimerização do AM. Logo, a supressão do $\Delta\Psi$ deve ter algum efeito na geração de $^1\text{O}_2$. Medidas de emissão de luz a 1270 nm foram então realizadas para quantificar esse efeito.

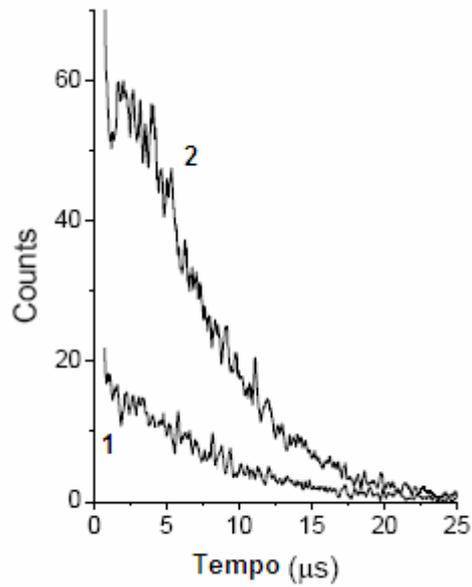


Figura 16- Emissão de $^1\text{O}_2$ (counts) em mitocôndrias (1 mg/ml) em meio com 20 μM de AM em função do tempo. Linha 1- mitocôndrias controle, Linha 2- mitocôndrias com CCCP (2.5 μM)

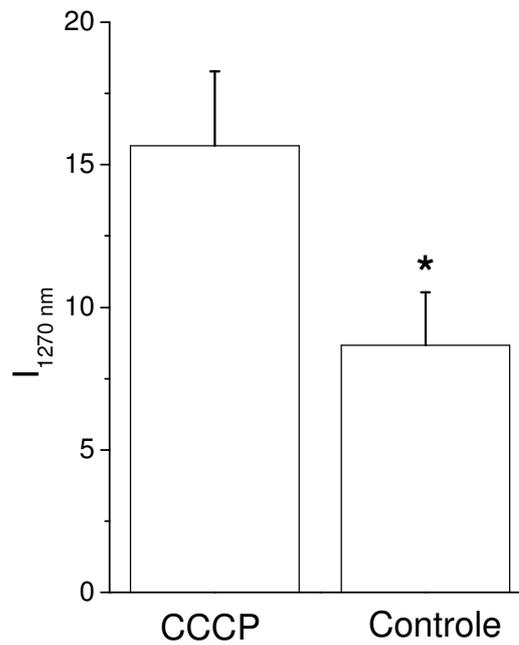


Figura 17- Intensidade de emissão a 1270 nm em suspensão de mitocôndrias (4 mg/ml) com AM (20 μM) com $\Delta\Psi$ (controle) e sem $\Delta\Psi$ (CCCP, 2.5 μM). *- Anova, p = 0,05.

Na figura 16 mostra o transiente de emissão de $^1\text{O}_2$ em mitocôndrias controle e desacopladas, com maior emissão na amostra desacoplada. A partir desses dados, foi montada a figura 17, que mostra a emissão de $^1\text{O}_2$ sendo aproximadamente o dobro na amostra com mitocôndrias desacopladas do que na amostra controle. Isso demonstra que a emissão de $^1\text{O}_2$ é afetada pelo $\Delta\Psi$. Para se comprovar que essa alteração na emissão é consequência da alteração da relação D/M causada pela supressão do $\Delta\Psi$, foram feitas medidas de emissão de $^1\text{O}_2$ em diferentes concentrações de mitocôndrias, com diferentes relações D/M (tabela 1).

Amostra	[AM] μM	[Mit] mg/ml	FCCP	D/M	Emissão
1	20	4	-	0,83	15
2	20	4	+	0,5	58
3	20	15	-	0,44	10
4	20	15	+	0,39	10

Tabela 1- Intensidade de emissão a 1270 nm em suspensões de mitocôndrias com diferentes concentrações, em meio com AM de concentração constante, com e sem FCCP (2.5 μM).

A tabela 1 mostra que a presença de um desacoplador não é diretamente responsável pelo aumento da emissão de $^1\text{O}_2$, já que nas amostras 3 e 4 não há diferença na emissão de $^1\text{O}_2$, embora a amostra 4 esteja desacoplada. Nessas amostras, a quantidade de mitocôndria livre para a ligação de AM impede que ele se dimerize, mesmo sem FCCP, já que há muita superfície disponível para a ligação. Dessa forma, não há diferença na dimerização.

Nas amostras 1 e 2 há a diferença de emissão, sendo a emissão de $^1\text{O}_2$ da amostra 2 muito maior que a da amostra 1. A diferença nesse caso é observada também na relação D/M. Com a supressão do $\Delta\Psi$ da amostra 2, a formação de dímeros é prejudicada, havendo maior proporção de monômeros, o que leva a uma maior emissão de $^1\text{O}_2$. Logo, pode-se concluir que o $\Delta\Psi$ não é diretamente responsável pela diferença na emissão de $^1\text{O}_2$, mas sim a relação D/M, que é afetada pela supressão do $\Delta\Psi$ e leva a diferenças na emissão de $^1\text{O}_2$.

Visto que a emissão de $^1\text{O}_2$ é altamente influenciada pelo $\Delta\Psi$ e que a geração de $^1\text{O}_2$ é essencial para a indução de morte celular em PDT, o comportamento do AM em mitocôndrias desacopladas foi estudado em maior detalhe. Note na figura 6 que, mesmo na

presença de mitocôndrias com pequeno potencial de membrana, o AM ainda se liga na mitocôndria. Hipotetizamos que este fenômeno deve ocorrer devido a ligação do AM em diferentes sítios na mitocôndria.

Este efeito está quantificado na figura 18, que mostra a porcentagem de ligação do AM em mitocôndrias controle e desacopladas. Pode se observar que em mitocôndrias desacopladas, a ligação do AM é aproximadamente a metade da ligação do AM em mitocôndrias com $\Delta\Psi$. Assim, fica demonstrado que a ligação do AM na mitocôndria é influenciada pelo $\Delta\Psi$, porém existe um evento de ligação que é independente do $\Delta\Psi$.

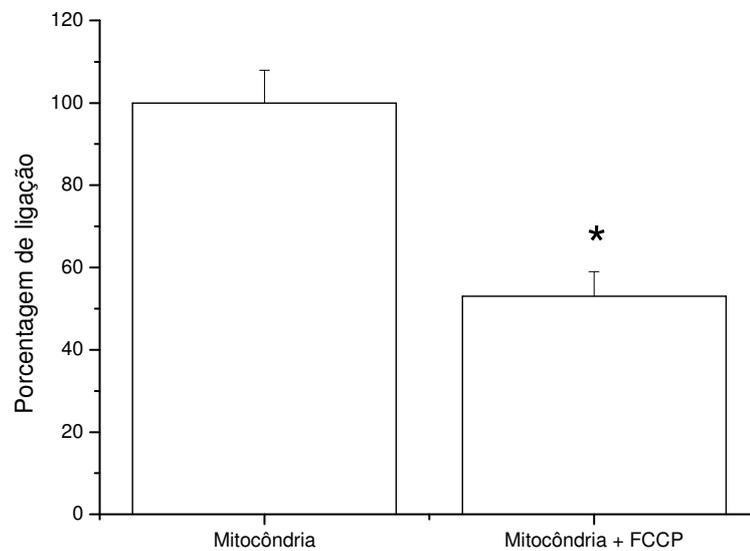


Figura 18- Porcentagem de ligação de AM em suspensão de mitocôndrias (5 mg/ml) em meio com 20 μM de AM (100%) em amostras de mitocôndria controle e desacopladas (FCCP, 2.5 μM). *- Anova, $p = 0,05$.

Esse evento de ligação independente do $\Delta\Psi$ foi estudado em maior detalhe. Foi observada a ligação de AM em mitocôndrias e mitoplastos com e sem potencial, a fim de se determinar a importância da membrana externa mitocondrial.

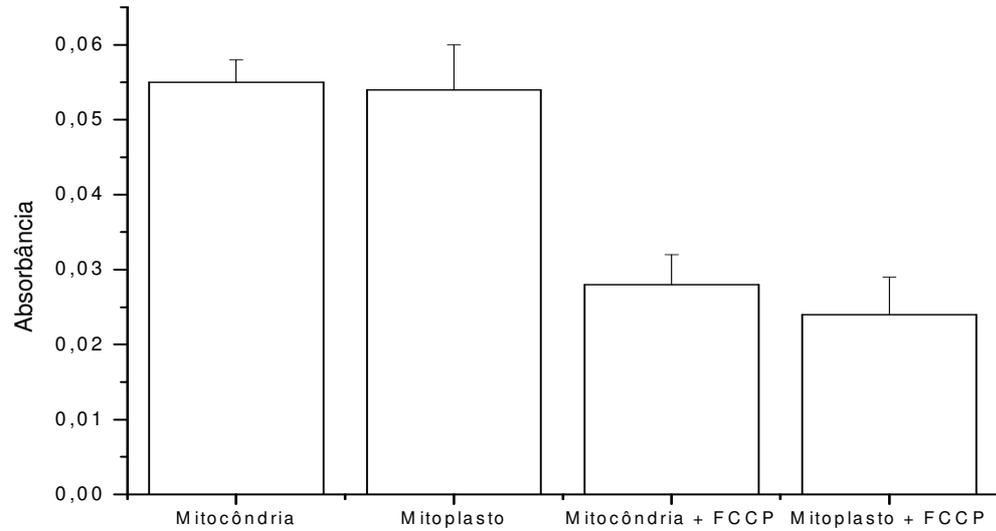


Figura 19- Absorbância do AM (664 nm) do precipitado de uma suspensão de mitocôndrias e mitoplastos (5 mg/ml) em meio com 20 μM de AM, em amostras de mitocôndria com $\Delta\Psi$ e desacopladas (FCCP, 2.5 μM).

A figura 19 mostra que a membrana externa mitocondrial não tem influencia nenhuma sobre a ligação do AM nas mitocôndrias, já que a ligação em mitocôndrias e mitoplastos com $\Delta\Psi$ é igual, assim como a ligação de AM em mitocôndrias e mitoplastos desacoplados é igual.

A supressão do $\Delta\Psi$ também poderia causar alteração na localização mitocondrial do AM. Essa alteração poderia ser a responsável pelo aumento na emissão de $^1\text{O}_2$, explicando também os resultados acima. A fim de se descartar essa possibilidade, foi observada a reatividade com o NAD(P)H de mitocôndrias desacopladas.

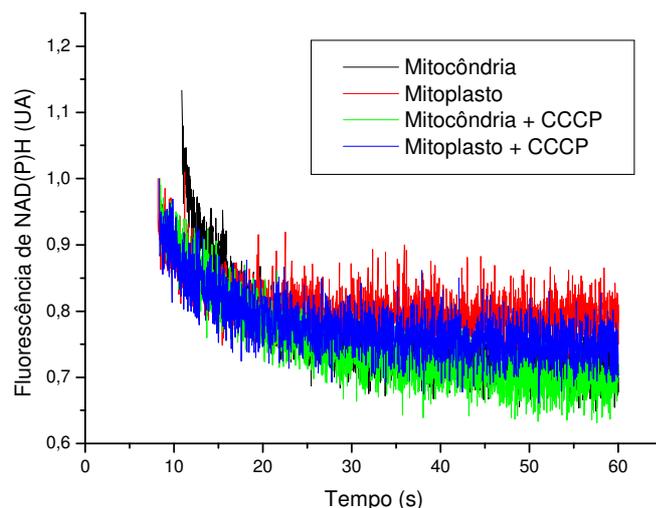


Figura 20- Decaimento de fluorescência do NAD(P)H em suspensão de mitocôndrias, mitocôndrias desacopladas, mitoplastos e mitoplastos desacoplados (CCCP, 2.5 μ M). As suspensões tem concentração de 1 mg/ml. A concentração de AM em todas as amostras foi de 20 μ M.

A figura 20 mostra que o desacoplamento tanto de mitocôndrias quanto de mitoplastos não leva a alteração da localização do AM, já que em todos os casos o decaimento de fluorescência do NAD(P)H é semelhante.

A fim de se estudar melhor essa ligação, outros FSs fenotiazínicos foram testados, para determinar a influência da estrutura do FS nessa ligação. Todos os FSs testados tem uma carga positiva, ou seja, a atração eletroquímica do $\Delta\Psi$ sobre eles é igual. Foram realizados experimentos com Tionina (TIO) e azure B (AB) (figura 1), que possuem características estruturais diferentes do AM. Essas características moleculares levam a alterações na partição octanol-água (Log P), que é o logaritmo da partição entre as concentrações de compostos em octanol e em água. Se LogP é igual a zero, a concentração da molécula em octanol e água é igual. Se maior zero significa que o FS se distribui preferencialmente em octanol, e se menor que zero se distribui preferencialmente na água. Alterações no Log P podem levar a alterações na localização do FS (25), devido a uma diferença entre afinidade por membranas celulares ou por sítios de interação mais

hidrofóbicos. Essa diferença nas afinidades podem levar a alterações nas ligações dependentes e não dependentes do $\Delta\Psi$.

Foi medida então a oxidação do NADH mitocondrial pelos FSs. Todos os FSs causaram a redução da fluorescência do NADH. A partir desses dados, foi calculada uma constante de velocidade de oxidação observada (K_{obs} , s^{-1}).

FS/ K_{obs}	Mitocôndria	Mitocôndria + CCCP
AM	1,9 (0,13)	0,71 (0,06)
TIO	3,6 (0,3)	0,84 (0,03)
AB	2,24 (0,05)	1,7 (0,5)

Tabela 2: K_{obs} (s^{-1}) em suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) com $\Delta\Psi$ ou desacopladas (CCCP, 2.5 μ M) para os diferentes FSs. As medidas de oxidação do NADH foram feitas com adição de 20 μ M de cada FS. O desvio padrão está entre parênteses.

A tabela 2 mostra que em todos os casos há uma redução da constante observada. Assim, percebe-se que a supressão do $\Delta\Psi$ interfere na velocidade de oxidação do NADH, alterando a formação das espécies reduzidas dos FSs.

Após a observação de dois sítios de ligação para o AM em mitocôndrias, um dependente do $\Delta\Psi$ e outro independente, a afinidade da ligação do AM a esses sítios foi comparada. Uma suspensão de mitocôndrias de concentração constante foi submetida a meios com diferentes concentrações de AM e teve sua ligação medida. O mesmo ocorreu com mitocôndrias desacopladas (fig. 21).

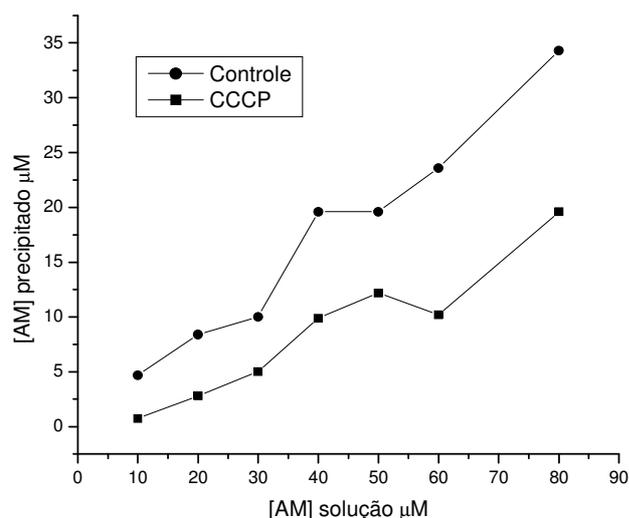


Figura 21- Concentração de AM no precipitado de suspensões (1 mg/ml) de mitocôndrias com $\Delta\Psi$ (controle) e sem $\Delta\Psi$ (CCCP, 2.5 μM) submetidas a meios com diferentes concentrações de AM.

A figura 21 mostra que, tanto para mitocôndrias com $\Delta\Psi$ como sem $\Delta\Psi$, a ligação com AM aumenta conforme aumenta a concentração de AM no meio. A inclinação das retas que representam a relação entre AM em solução/AM no precipitado é semelhante, o que indica que a afinidade desse eventos, $\Delta\Psi$ dependente e $\Delta\Psi$ independente, para AM, é semelhante.

Pela figura 1, observa-se que a fenotiazina mais polar é a tionina, com menor número de substituintes metílenos. Utilizando esse conceito, AM seria o mais apolar e AB seria um intermediário. Vale citar também que AB é o mais assimétrico, ou seja, tem duas regiões distintas em termos de polaridade (um lado com dois metílenos e um lado com um metileno e um hidrogênio). O Log P, experimentalmente determinado, está mostrado na tabela 3.

FS	Log P	Desvio padrão
AM	0,4	0,1
AB	0,26	0,07
TIO	0,06	0,02

Tabela 3: Valores de Log P determinado experimentalmente das fenotiazinas.

Analisando os valores de Log P, percebe-se que o AM tem maior preferência pelo octanol, já que tem o maior Log P (0,4). O AB também tem preferência pelo octanol, com Log P positivo (0,26). Já TIO tem o Log P próximo de zero (0,06), indicando que tem uma pequena preferência pela parte octanólica, porém com afinidade muito semelhante pela parte aquosa. Devido a essas diferença no Log P, pode-se esperar uma alteração na ligação desses corantes com a mitocôndria. Assim, foi medida a ligação de AM, TIO e AB a mitocôndrias com e sem $\Delta\Psi$.

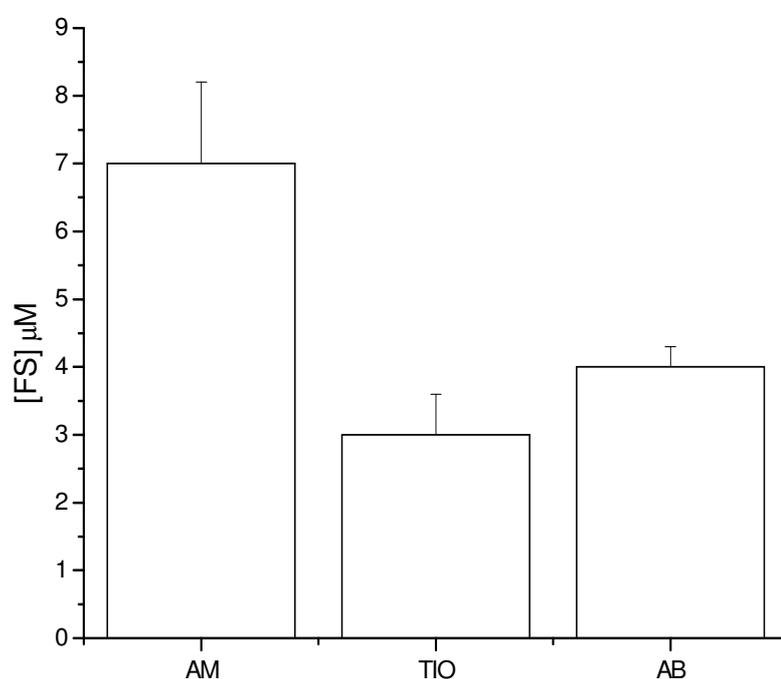


Figura 22- Concentração dos FSs testados (AM, TIO e AB) em precipitado de uma suspensão de mitocôndrias de 1 mg/ml em meio com 20 μM de cada FS.

A figura 22 mostra que todos os FSs testados se ligam à mitocôndria. A ligação do AM se revela a mais intensa, enquanto a ligação da TIO se mostra a menos intensa. Esses valores podem estar relacionados com o Log P, indicando que quanto maior o Log P, maior

a ligação nas mitocôndrias. A ligação de FS independente de $\Delta\Psi$ também foi medida, a fim de se determinar se o efeito do $\Delta\Psi$ observado para o AM se repetia para os outros FSs.

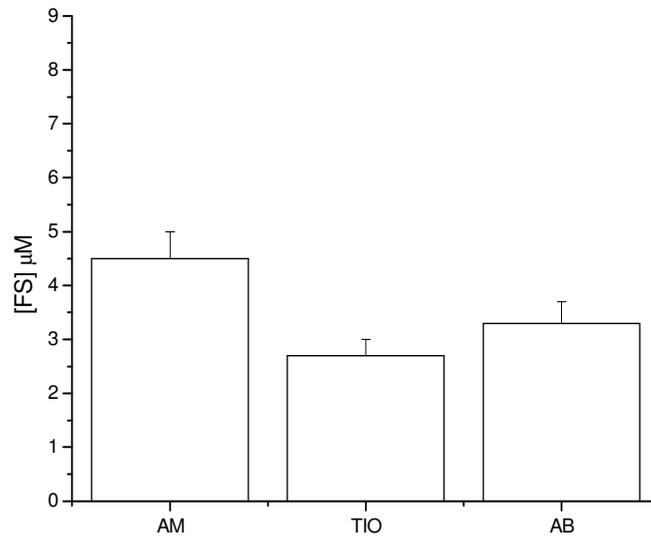


Figura 23- Concentração dos FSs testados (AM, AB, TIO) em precipitado de suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) desacopladas por CCCP (2.5 μM) após incubação em meio com 20 μM de FS.

A figura 23 mostra a ligação dos FSs testados em mitocôndrias sem $\Delta\Psi$. Todos os corantes se ligam a mitocôndrias desacopladas, sendo o AM o que possui a maior ligação e TIO o que possui a menor. Assim, a ligação a mitocôndria mais intensa em todos os casos é a do AM, sendo TIO a de ligação mais fraca. A ligação independente do $\Delta\Psi$ parece seguir o que se espera para a ligação de compostos em membranas, ou seja, aumenta com o aumento de Log P e com a assimetria molecular (25).

Em todos os casos estudados, a ligação do FS a mitocôndria tem um fator independente do $\Delta\Psi$. Porém, as alterações entre a ligação em mitocôndrias com $\Delta\Psi$ e sem $\Delta\Psi$ é diferente entre os FSs testados. A ligação com AM cai de 7 μM para 4,5 μM , enquanto para TIO cai de 3 μM para 2,7 μM e para AB cai de 4,0 para 3,3 μM . Ou seja, o $\Delta\Psi$ é mais importante na ligação com AM. A fim de melhor ilustrar essa relação, foi preparada a figura 24, que mostra a porcentagem de FS que fica ligado na mitocôndria

quando esta é desacoplada, considerando a ligação em mitocôndrias padrão (com $\Delta\Psi$) como 100% de ligação.

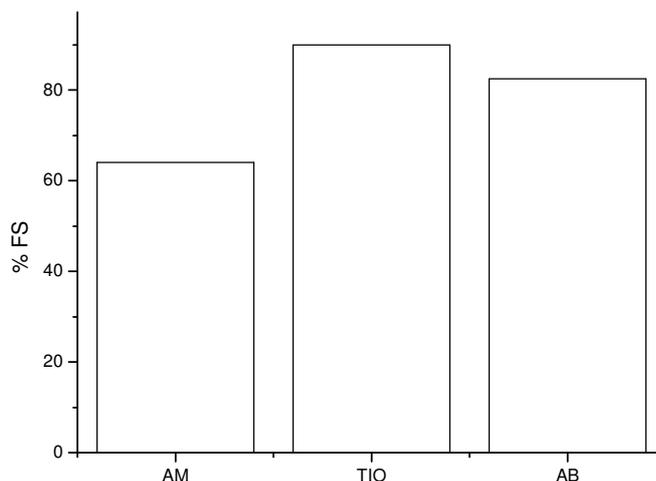


Figura 24- Relação (esquema em %) entre a quantidade de FSs ligados a mitocôndrias desacopladas e com $\Delta\Psi$ para os FSs testados.

A figura 24 mostra que aproximadamente 60% do AM continua ligado com a supressão do $\Delta\Psi$, enquanto para TIO e AB aproximadamente 80% do FS continua na mitocôndria desacoplada. Isso comprova que o $\Delta\Psi$ é um fator responsável pela ligação de todos os FSs testados em mitocôndrias, mas não é o único fator responsável por essa ligação. Além disso, o AM mostrou-se, dentre os FSs estudados, o FS mais sensível a supressão do $\Delta\Psi$. Esse fato mostra que o $\Delta\Psi$ afeta diferentemente FSs com a mesma carga, indicando que a estrutura do FS e seu Log P são tão importantes quanto a carga do FS para a sua interação com mitocôndrias. Pelo fato do AM ter partição mais favorável em membranas ele é mais responsivo ao $\Delta\Psi$, como já foi demonstrado em porfirinas carregadas positivamente (25).

Considerando que a ligação dos FSs foi diferencialmente afetada pelo $\Delta\Psi$, é interessante testar se a geração de $^1\text{O}_2$ em mitocôndrias com e sem $\Delta\Psi$, a fim de se determinar se os FSs respondem diferentemente a supressão do $\Delta\Psi$. No caso do AM, já foi

mostrado o efeito da supressão do $\Delta\Psi$, que faz com que a emissão de $^1\text{O}_2$ praticamente dobre. Porém, essa relação não foi observada para os outros FSs.

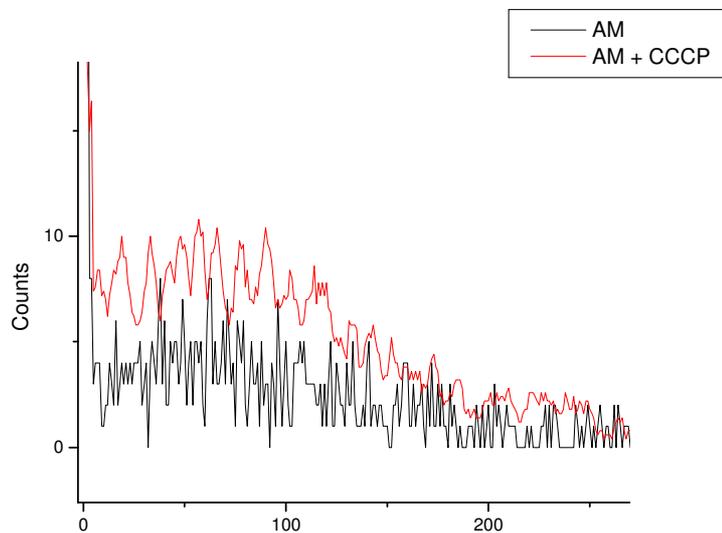


Figura 25- Emissão de $^1\text{O}_2$ em mitocôndrias (1 mg/ml) com e sem $\Delta\Psi$ (CCCP, 2.5 μM) em meio com 20 μM de AM.

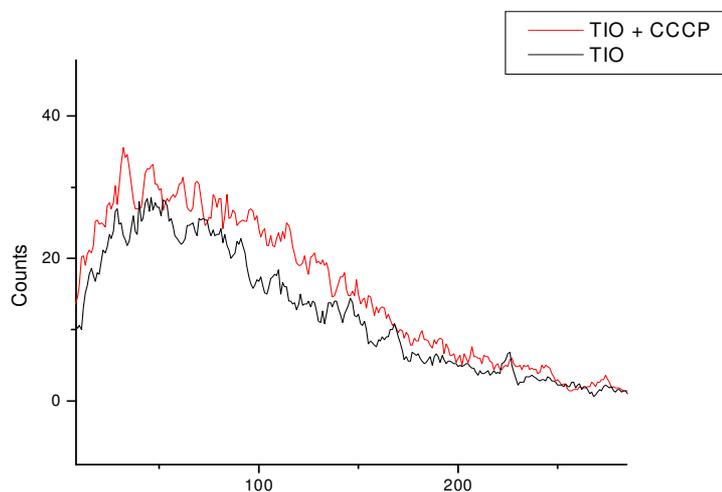


Figura 26- Emissão de $^1\text{O}_2$ em mitocôndrias (1 mg/ml) com e sem $\Delta\Psi$ (CCCP, 2.5 μM) em meio com 20 μM de TIO.

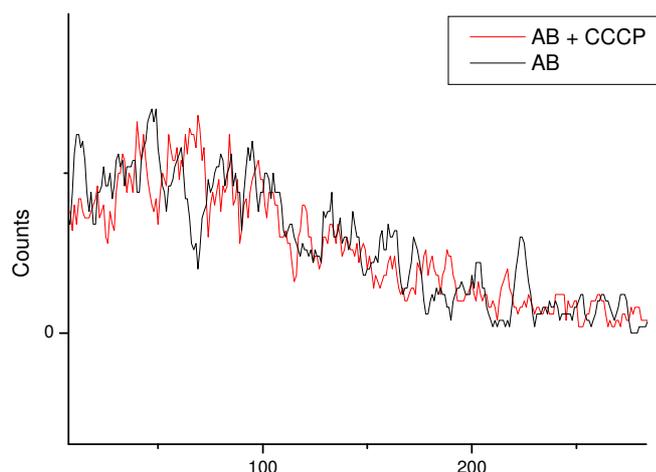


Figura 27- Emissão de $^1\text{O}_2$ em mitocôndrias (1 mg/ml) com e sem $\Delta\Psi$ (CCCP, 2.5 μM) em meio com 20 μM de AB.

Na fig. 25, percebe-se que a emissão do AM em mitocôndrias desacopladas é maior do que em mitocôndrias com $\Delta\Psi$. Nas figuras 26 e 27, percebe-se que não existe diferença na emissão de $^1\text{O}_2$ nas mitocôndrias, ou seja, para esses FSs, a emissão de $^1\text{O}_2$ independe do $\Delta\Psi$, conforme explicitado na tabela 2.

Corante	Contagem	Contagem (CCCP)
AM	4,2	9,6
AB	6,4	6,9
TIO	28,4	26,2

Tabela 2: Intensidade de emissão de $^1\text{O}_2$ (counts) em suspensão de mitocôndrias (1mg/mL) controle e desacopladas (CCCP, 2.5 μM) na presença de 20 μM dos corantes.

A tabela 2 mostra os valores obtidos de emissão de $^1\text{O}_2$ a partir das figuras 25, 26 e 27. A intensidade de emissão de TIO se mostra maior por causa do comprimento de onda do laser usado (verde, $\lambda=532$ nm), que é melhor absorvido por esse FS do que pelos outros, que têm seu máximo de absorção na região do vermelho ($\lambda=660$ nm). A tabela deixa claro que a supressão do $\Delta\Psi$ só afeta a emissão do AM. Como mostrado anteriormente, isso se deve a alteração da dimerização do AM. No caso dos outros FSs, não há alteração no

espectro de absorção (fig. 28), indicando que estes FSs não agregam na mitocôndria, independentemente do $\Delta\Psi$.

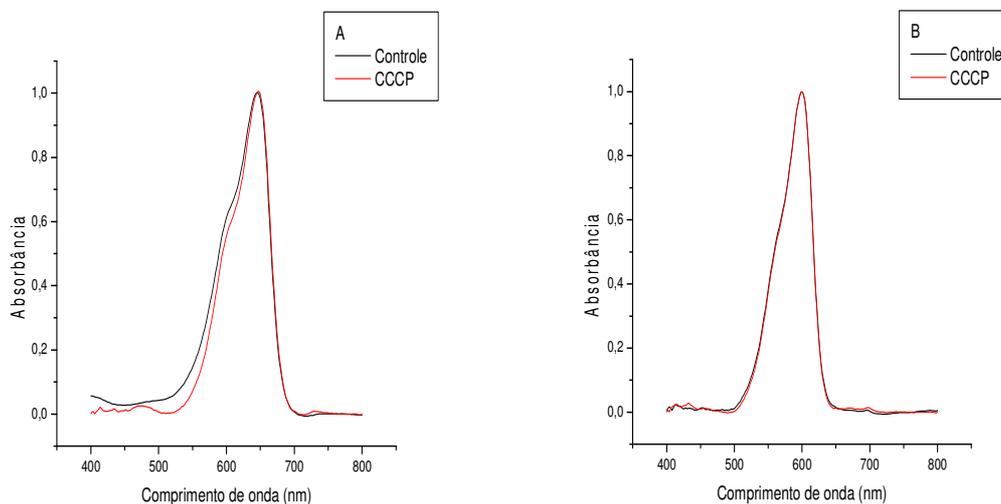


Figura 28 – espectros de absorção de AB (A) e TIO (B), ambos a 20 μM , em suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) controle ou desacopladas (CCCP, 2.5 μM). Gráficos normalizados para absorbância máxima de 1.

A figura 11 mostra outra realidade para AM, onde são observadas alterações no espectro com a adição de CCCP à suspensão mitocondrial. Assim, o efeito da maior emissão de $^1\text{O}_2$ por AM em mitocôndrias desacopladas, fato que não é observado para os outros FSs testados, deve-se a alteração da relação D/M, e não a um efeito direto da supressão do $\Delta\Psi$.

A partir dos dados apresentados, percebe-se que todos os FSs testados se ligam as mitocôndrias, porém a afinidade dessas pelos FSs é diferente, sendo que o FS mais sensível a alterações nas propriedades mitocondriais, como supressão do $\Delta\Psi$ é o AM. A ligação de todos os FSs em parte é devida a carga, mas em parte a sua lipofilia/hidrofília, caracterizada pelo Log P. A ligação que tem maior interação com o $\Delta\Psi$ negativo da mitocôndria é o AM,

sendo esta interação responsável por uma fração de aproximadamente 50% da ligação, enquanto para os outros FSs testados, a proporção dependente de $\Delta\Psi$ esta por volta de 20%.

O comportamento desses FSs foi então testado em células. O modelo utilizado foi de células Hela, que são células de melanoma humano que crescem aderidas a superfícies. Essas células eram plaqueadas e depois embebidas por 3 horas em meio com os FSs testados, que tinham sua absorvância medida. Em alguns poços de cultivo, era adicionado CCCP. Após 3 horas, o sobrenadante era recolhido e tinha sua absorvância medida, que era então comparada com a absorvância original, a fim de determinar a porcentagem de FS incorporado pelas células.

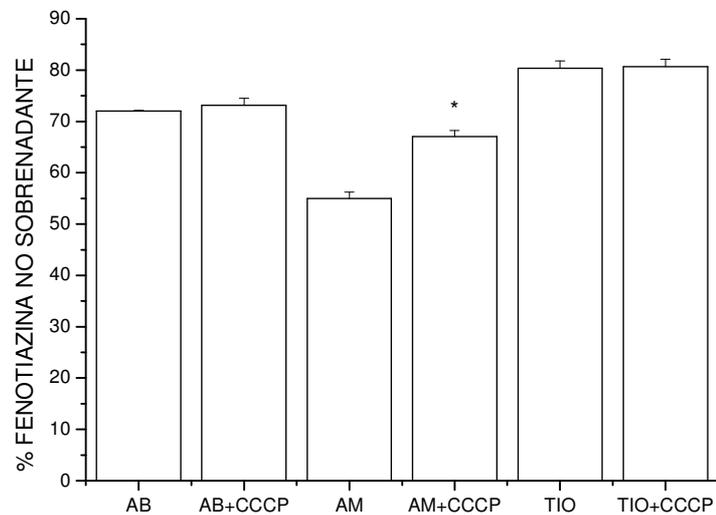


Figura 29– Porcentagem de fenotiazina no sobrenadante de células Hela (10^5 por ml), com e sem potencial de membrana mitocondrial (CCCP, $2,5 \mu\text{M}$). Concentração original das fenotiazinas: $20 \mu\text{M}$, 3 horas de incubação. *= diferença significativa entre a amostra com e sem CCCP (ANOVA, $p = 0,05$).

A figura 29 mostra que, considerando as fenotiazinas testadas, apenas o AM mostrou uma correlação significativa com a supressão do potencial de membrana mitocondrial. Isso indica que o mecanismo de atração dessas fenotiazinas as células é diferente, sendo que o AM se mostra dependente do potencial mitocondrial, enquanto as outras fenotiazinas não. Esse padrão repete o observado na ligação com mitocôndrias (fig.

24). A partir dessa mesma figura, percebe-se que o AM é o corante que tem maior facilidade de penetrar na célula, chegando, nesse caso, a uma penetração de aproximadamente 50%. TIO é a que menos penetra, com uma penetração máxima de aproximadamente 20%.

A eficiência dos FSs em induzir morte celular foi testada de várias maneiras. No teste de viabilidade com azul de tripan, ocorre a detecção de células com membrana comprometida, sinal característico de necrose. Células Hela foram incubadas com os FSs e irradiadas (AB e AM, $\lambda= 664 \text{ nm}$, $1,27\text{J}/\text{cm}^2$ e TIO, $\lambda= 532\text{nm}$, $1,2 \text{ J}/\text{cm}^2$). O comprimento de onda dos lasers foi escolhido para maximizar a absorção de luz pelos FSs. A morte em células irradiadas nessas doses foi comparada com amostras de células que receberam o FS, porem não foram irradiadas, a fim de se determinar a eficiência de indução de morte celular desses FSs quando irradiados e quando no escuro (fig. 30). As doses de laser utilizadas não afetam as células (26).

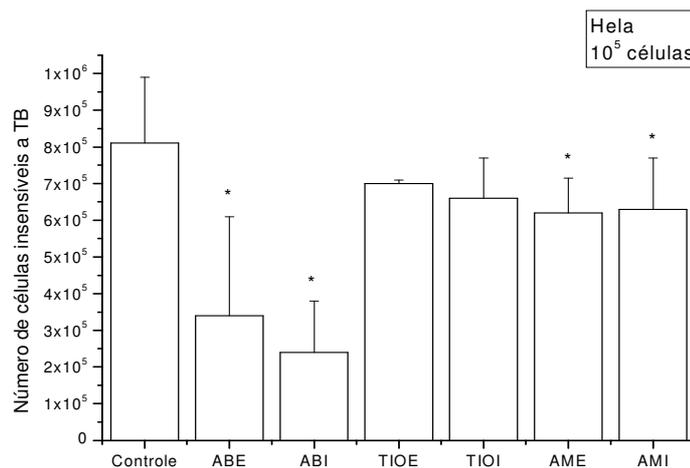


Figura 30- Número de células Hela insensíveis a coloração com TB (azul de tripan) em diferentes tratamentos. 10^5 células foram plaqueadas, deixadas em contato com meio contendo o FS ($20 \mu\text{M}$) por 3 horas e lavadas com PBS. As amostras I foram irradiadas (AB e AM, $\lambda= 664 \text{ nm}$, $1,27\text{J}/\text{cm}^2$ e TIO, $\lambda= 532\text{nm}$, $1,2 \text{ J}/\text{cm}^2$), incubadas em estufa (48 horas, 27°C) e depois coradas com TB. As amostras E não foram irradiadas, permanecendo no escuro. *= diferença significativa em relação ao controle (ANOVA, $p=0,05$).

A figura acima mostra que, dentre os FSs testados, TIO induziu menos necrose, tanto em amostras irradiadas quanto em amostras mantidas no escuro, enquanto AB se mostrou o mais necrótico, em ambos os casos. O tratamento com AM, embora seja significativamente diferente do controle, se mostra pouco necrótico, quando comparado com AB. O fato dessas células não possuírem membranas permeáveis a TB não indica que estejam vivas, já que elas podem morrer por apoptose, processo que não compromete a membrana plasmática.

A fim de se determinar a capacidade desses FSs de induzir a produção de núcleos sub-diplóides, evento característico da apoptose, foram realizados experimentos de citometria de fluxo. Foi testada a eficiência de clivagem de DNA pelos FSs em células HeLa. As células (2×10^5) foram plaqueadas, incubadas com diferentes concentrações das fenotiazinas por 3 horas e irradiadas com laser (664 nm para AM e AB e 532 nm para TIO) por 350 segundos de maneira fracionada.

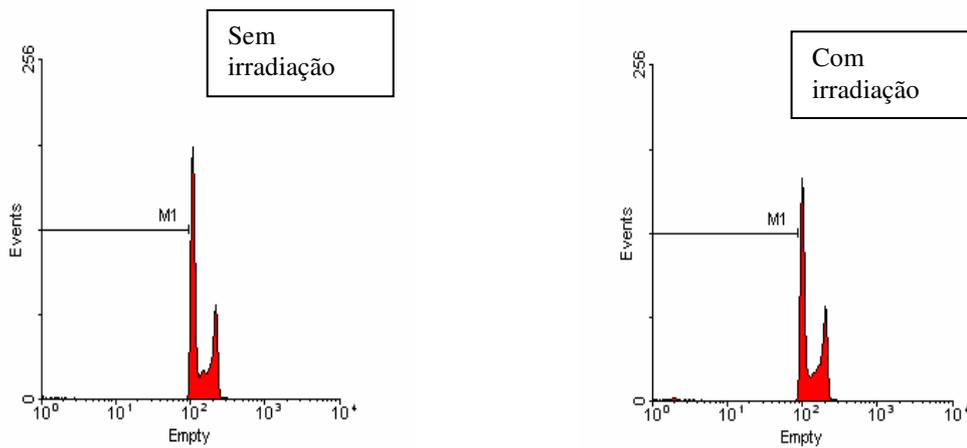


Figura 31 – Citometria de fluxo de duas amostras de células HeLa (controle e células+laser). MI indica a porcentagem de núcleos sub-diplóides na amostra. O eixo X indica a quantidade de DNA e o eixo Y o numero de eventos.

Na figura 31, M1 indica a região de fragmentação de DNA, já que depois de M1 ocorrem os picos característicos das fases celulares (G1, S e G2). Os valores de MI (4,1 e

5,6) são baixos, o que indica que a amostra estava boa e que a irradiação, na ausência de corantes, não lesionou as células.

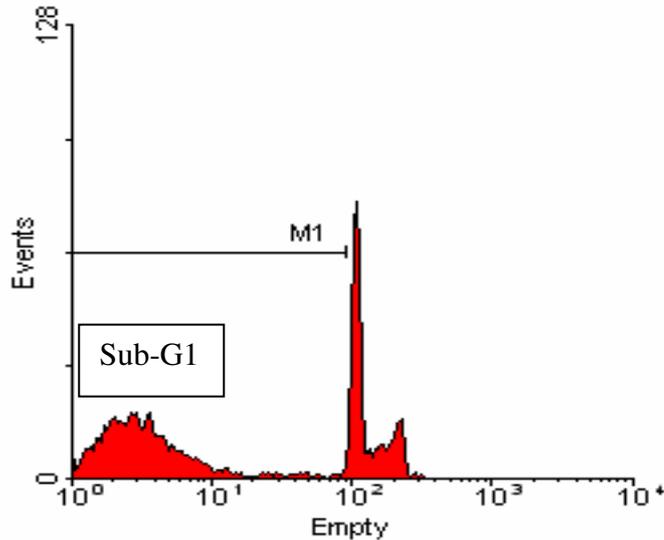


Figura 32- Tratamento com 20 μM de AM irradiado ($1,27 \text{ J/cm}^2$), medida feita após 36 horas. Fluorescência do IP (iodeto de propídio) ligado a DNA em células Hela. O eixo X reflete a quantidade de DNA e o eixo Y o valor da fluorescência. O pico característico de apoptose (M1, marker one = sub G1) está apontado na figura.

Na figura 32, aparece um pico sub-G1. Esse pico é indicativo da quantidade de DNA fragmentado. MI é a porcentagem de células com núcleo sub-diplóides, que corresponde ao número de eventos que estão no sub-G1, no caso, 60,5%.

A tabela 4 mostra diferenças na porcentagem de núcleos sub-diplóides entre amostras irradiadas e não irradiadas de células tratadas com AM. Comparando as colunas claro e escuro, pode-se notar uma diferença na capacidade do AM de clivar DNA. Essa capacidade é grande quando o AM é irradiado e pequena quando ele não é irradiado, provando que há maior citotoxicidade quando irradiado. A tabela também permite concluir que a eficiência da geração de núcleos sub-diplóides aumenta conforme aumenta a concentração de AM, até 20 μM .

[AM] micromolar	MI (claro)	MI(Escuro)
1	9.2	4.8
10	31.7	9.05
20	60.3	9.25

Tabela 4 - Porcentagem de núcleos sub-diploides em 2×10^5 células HeLa com diferentes concentrações de AM. Dados para amostras com irradiação fracionada de 350 segundos (claro) ou sem irradiação (escuro). Tempo de incubação de drogas com AM foi de 3 horas.

A capacidade dos outros FS de induzir dano quando irradiados também foi testada, a fim de se obter uma comparação com AM.

Concentração/Corante	TIO	AB
20 irradiado	15.35	89.8
20 não irradiado	10.4	60.7
50 irradiado	30.4	44.6
80 irradiado	36.75	42.9

Tabela 5- MI de diferentes corantes em diferentes concentrações (μM) a partir de uma amostra de 2×10^5 células HeLa no escuro ou após 350 segundos de irradiação fracionada em intervalos de 50 segundos. Dados obtidos a partir da média simples de duas amostras.

A tabela 5 mostra a diferença da capacidade de clivar DNA entre AB e TIO, mostrando que o AB é a fenotiazina dentre as testadas que apresenta melhor eficiência de clivagem de DNA, com uma clivagem de 89.8% na concentração de 20 μM . Isso pode ser devido à citolocalização, geração de espécies reativas de oxigênio ou interação com proteínas. TIO se mostra a menos eficiente quando irradiada. No escuro, na concentração de 20 μM , TIO mostrou MI em torno de 10, enquanto AB mostrou MI em torno de 60, mostrando grande toxicidade do AB mesmo sem irradiação.

A fim de melhor determinar os efeitos desses FSs em HeLa, foram realizados experimentos de microscopia de fluorescência. Células HeLa (2×10^5) foram incubadas por

3 horas com fenotiazinas (AM, TIO, AB) na concentração de 20 μM e sofreram irradiação fracionada de 350 segundos. AM e AB foram irradiadas com laser de 664 nm ($1,27 \text{ J/cm}^2$) e TIO com laser de 532 nm ($1,2 \text{ J/cm}^2$). Elas foram então coradas com EB (brometo de etídio) e AO (acridine orange).

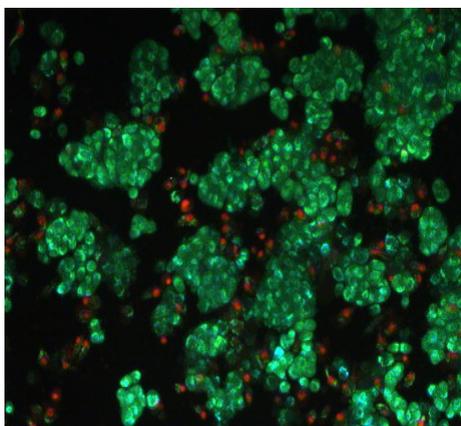
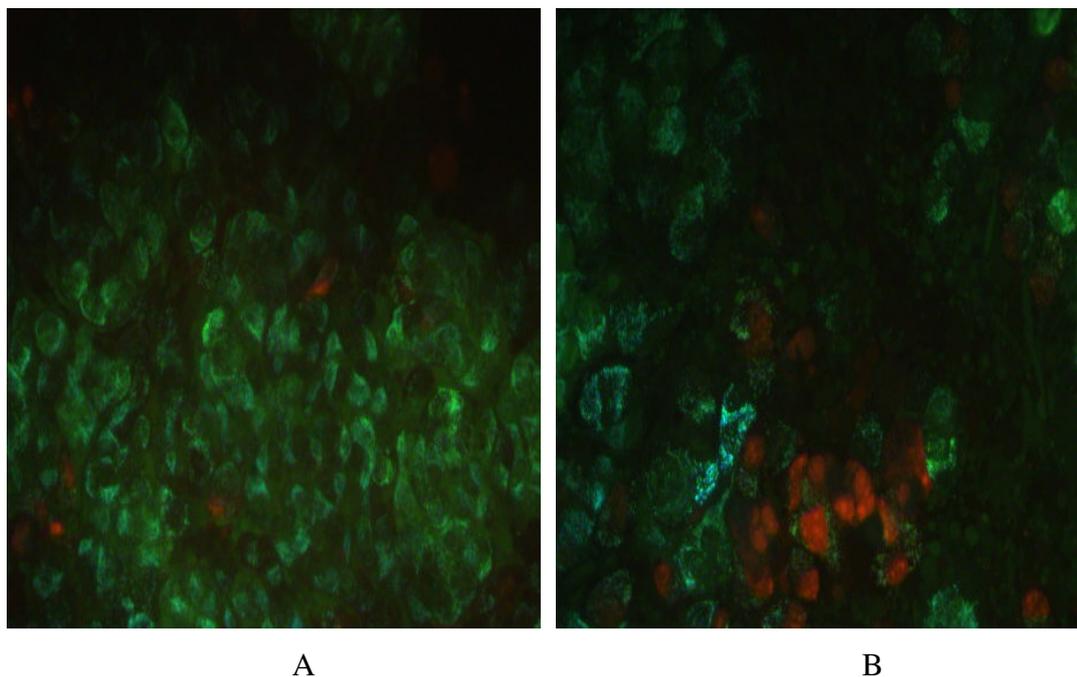


Fig. 33 – Microscopia de fluorescência de células HeLa (grupo controle).



A

B

Fig. 34- Microscopia de fluorescência de células HeLa com TIO A- sem irradiação
B- com irradiação

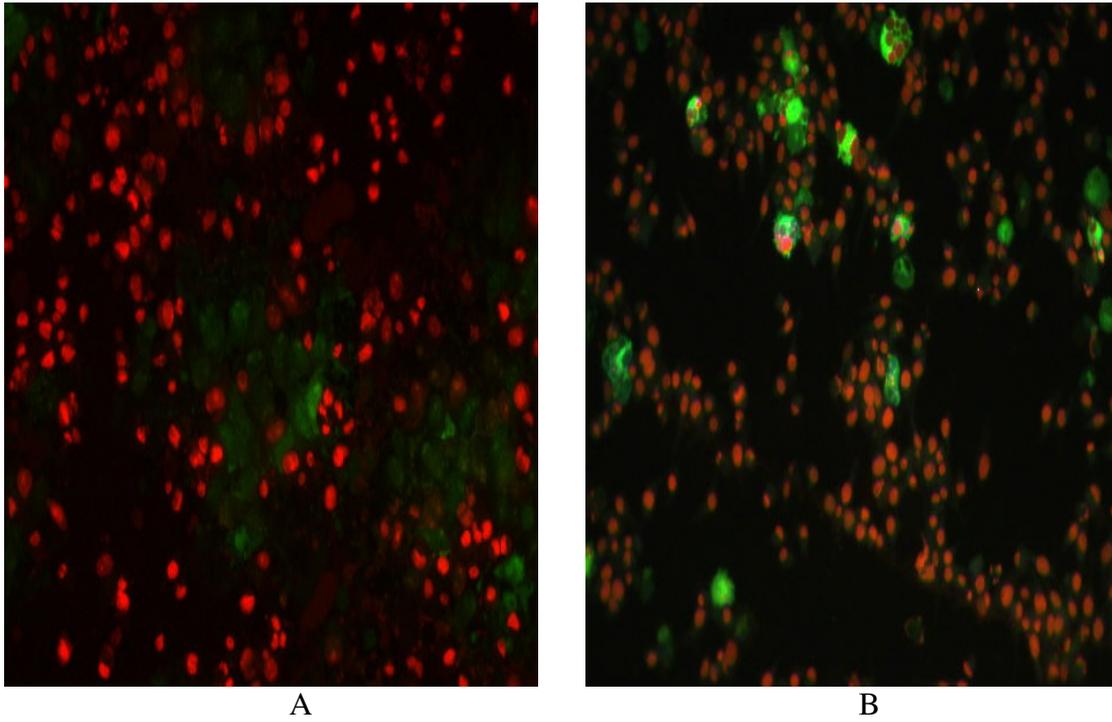


Figura 35- Microscopia de fluorescência de células HeLa com AB A- sem irradiação B- com irradiação

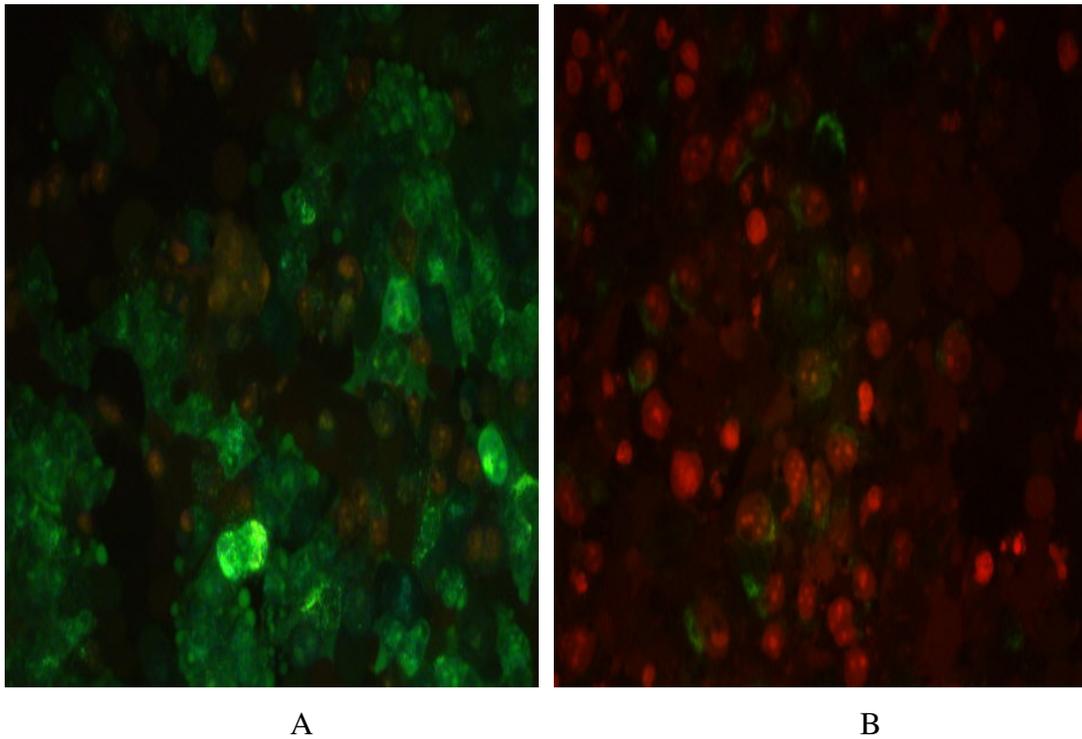


Figura 36- Microscopia de fluorescência de células HeLa com AM A- sem irradiação B- com irradiação

FS	Células viáveis (%)	Células inviáveis (%)
TIO – escuro	95,7	4,3
AB – escuro	24,3	75,7
AM – escuro	83,4	16,6
TIO – irradiado	85,6	14,4
AB – irradiado	8,6	91,4
AM – irradiado	14,6	85,4

Tabela 6 – número de células viáveis (verdes) e inviáveis (laranja) obtidos através de contagem das figuras 34 a 36.

As figuras 34, 35 e 36 mostram um padrão de atuação dessas fenotiazinas em HeLa. AO entra em todas as células, deixando-as verdes. EB entra apenas nas células com membrana comprometida, se liga ao DNA e fluoresce de cor laranja/avermelhada (21). Células verdes são então viáveis e laranjas com membrana comprometida. TIO se mostrou pouco citotóxico, tanto no claro como no escuro. AB se mostrou muito tóxico quando irradiado e quando não irradiado. O único que mostrou uma diferença visível entre as amostras irradiadas e não irradiadas foi AM, que mostrou-se pouco citotóxico no escuro e bem citotóxico no claro. Inclusive, na foto onde se tem células com AM irradiadas, percebem-se vários pontos brilhantes nas células, que podem corresponder à cromatina condensada, indicando apoptose. O número de células inviáveis foi contado nas fotos, o que levou à tabela 6. Há de se ressaltar que na figura 36, equivalente ao AM, existem várias células com diversos pontos brilhantes, indicando uma provável indução de apoptose.

4.2 AM em células HL60

A dose do FS na célula influencia diversos mecanismos foto químicos e foto físicos (8,9), podendo levar a diversas alterações, como no tipo de morte celular (9). O processo apoptótico tende a ocorrer em concentrações de laser e FS mais baixas que o processo necrótico (3). Assim, um estudo da dose de FS e energia utilizados em PDT pode mostrar as doses mais propícias para o mecanismo apoptótico ou necrótico, permitindo fazer

inferências sobre processos fotoquímicos e fotofísicos dificilmente observados *in vitro* ou *in vivo*.

Com a finalidade de observar o comportamento do AM em outra linhagem celular, foram feitos testes em células HL60, células sanguíneas pré-mielocíticas que, ao contrário de Hela, crescem em suspensão. Esse estudo tem como finalidade determinar a dose mais adequada para indução de apoptose em células. A indução de apoptose ou necrose deve-se a vários fatores, entre eles a dose de FS e dose de energia (luz) aplicada.

Primeiramente foi observada a eficiência da ligação de AM nas células, através da diferença de absorção entre o meio no qual as células foram incubadas (3 horas) e esse meio após a incubação, quando foi separado por centrifugação. AM é absorvido por essa linhagem celular até 40% do total de 20 μM de AM nos quais as células foram incubadas. Essa porcentagem é menor do que a apresentada por células Hela, porém essa diferença pode ser explicada pela diferença nas linhagens celulares.

Sabendo que o AM entra nas células, é interessante saber se ele fica nessas células. Nos experimentos com irradiação, essas células são irradiadas em meio (RPMI 1640) sem fenol Red. Se AM reperfundir para o meio, ele pode gerar espécies reativas fora da célula, romper a membrana celular e levar a célula a morte, dando uma falsa impressão de citotoxicidade endógena. Assim, foram realizados experimentos para descobrir se o AM sai da célula.

Células HL60 (10^6) foram incubadas com AM por 3 horas. Foram então separadas do meio por centrifugação e foram re-suspensas em meio sem AM. Após 15, 30 e 60 minutos, as células foram centrifugadas e o meio levado ao espectrofotômetro a fim de se detectar quanto AM saiu das células e foi para o meio.

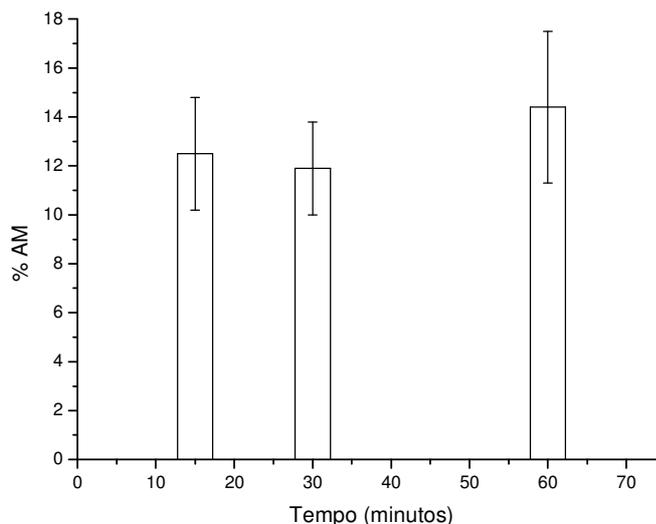


Figura 37- Porcentagem de AM que volta ao meio em células HL60. 10^6 células foram incubadas por 3 horas com AM $20 \mu\text{M}$ e então centrifugadas. A absorbância do sobrenadante foi subtraída da do meio e foi achada a quantidade absorvida. As células foram centrifugadas nos tempos indicados (15, 30 e 60 minutos) e o sobrenadante lido.

A figura 37 mostra que, independentemente do tempo, aproximadamente 10% do AM que entra nas células volta ao meio. Como as irradiações foram feitas imediatamente após a separação, o dano observado em células é proveniente do AM que está absorvido pelas células.

Como AM interage com mitocôndrias e oxida NAD(P)H (9), ele pode se reduzir na célula, se tornando inativo fotodinamicamente. Foi feito então um estudo para observar a proporção de AM reduzido e oxidado em HL60. Para isso, 10^6 células foram incubadas com 5, 10 e $20 \mu\text{M}$ de AM por 3 horas e determinado o AM total e oxidado, conforme explicitado na metodologia.

A absorbância de células HL60 dessas células, quando re-suspendidas com CTAB e CTAB e Ferro, foi medida. As amostras re-suspendidas com Fe^{3+} mostraram maior absorbância. A diferença de absorbância entre as amostras indica a quantidade de AM reduzido. A partir daí, pode-se tirar a porcentagem de AM reduzido.

[AM] μM	% AM reduzido
5	23%
10	20%
20	52%

Tabela 7- Porcentagem de AM reduzido em células HL60.

Observando a tabela 7, percebe-se que a porcentagem de AM reduzido é diferente nas diferentes concentrações de AM. Concentrações até 10 μM apresentam menores porcentagens de AM reduzido, o que pode indicar um melhor rendimento de geração de ROS a partir de AM, já que o AM reduzido é opticamente inativo (9).

Foi então observada a capacidade de utilizar AM como FS nessa linhagem celular. Para isso, foi observada a toxicidade de AM no escuro, ou seja, sem irradiação. Células HL60 (2×10^5) foram incubadas com diferentes concentrações de AM por 3 horas, e a viabilidade dessas células foi verificada através de contagem com azul de trypan (TB).

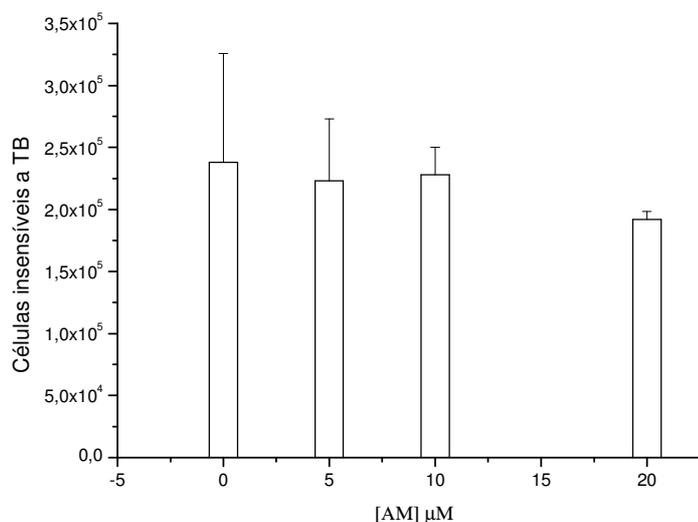


Figura 38- Número de células insensíveis a TB após incubação com diferentes concentrações de AM.

A figura 38 mostra que a adição de AM até 10 μM não causou diferença significativa na viabilidade das células, mostrando que AM tem baixa citotoxicidade quando não é irradiado. Células insensíveis a TB são células que não estão necróticas. Assim, mostra-se que, em determinadas concentrações, AM não é citotóxico. A partir desse dado, foi investigada a toxicidade de AM quando irradiado.

A fim de se entender os experimentos que se seguem, é necessária uma explicação sobre métodos de irradiação em PDT. A irradiação pode ser feita de duas formas: contínua e fracionada. Na forma contínua, o laser é aplicado de maneira uniforme até se atingir a dose desejada. Já na maneira fracionada, são feitos intervalos de irradiação uniforme e de tempo no escuro até se atingir a dose desejada. Em sistemas vivos, a irradiação fracionada é justificada por permitir um intervalo de escuro onde o sistema pode se re-oxigenar, aumentando a citotoxicidade (28). Entretanto, se os intervalos de escuro forem muito grandes, principalmente na irradiação fracionada, pode ocorrer uma diminuição da citotoxicidade (29). Em células em cultura, ainda não está claro se existem diferenças entre a irradiação fracionada e contínua.

Na fig. 39, 2×10^5 células foram incubadas (3 horas) com diferentes concentrações de AM e depois irradiadas.

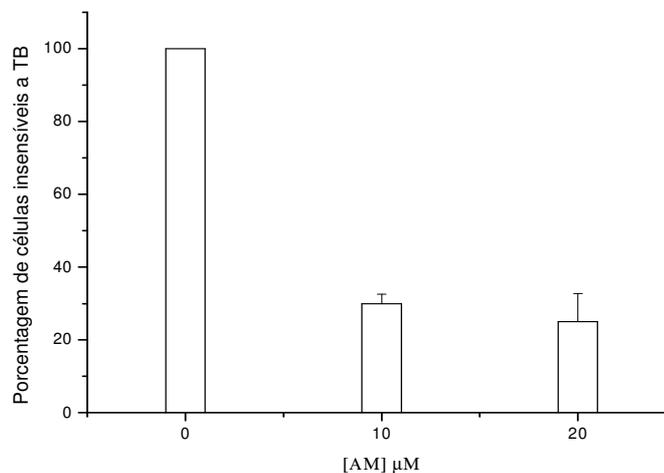


Figura 39- Número de células insensíveis a TB após incubação com AM e irradiação fracionada (1,27 J/cm^2 , 664nm).

O gráfico mostra uma grande diminuição no número de células viáveis, mostrando que AM tem grande citotoxicidade quando irradiado. A capacidade de AM induzir quebra de DNA nas células HL60 foi avaliada através de citometria de fluxo, como mostra a figura 40. As amostras com AM no escuro tiveram MI menor que 10.

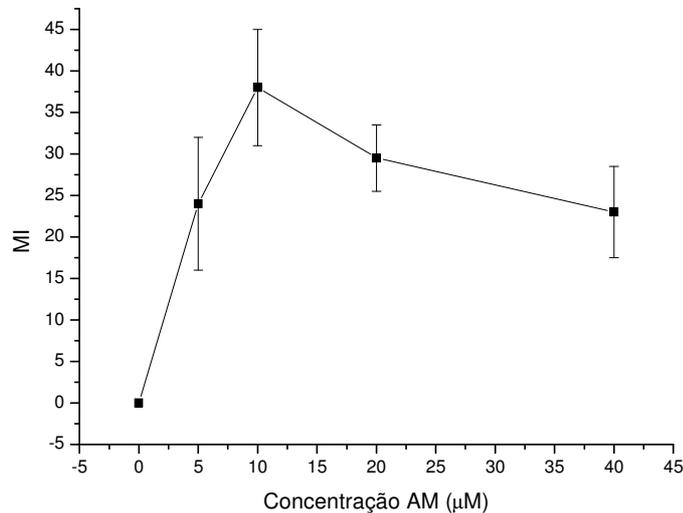


Figura 40- MI de células HL60 (2×10^5) após incubação com diferentes concentrações de AM e irradiação fracionada ($1,27 \text{ J/cm}^2$, 664nm).

A figura 40 mostra que AM induz quebra e a formação de núcleos sub-diplóides em uma maneira dependente de sua concentração, sendo que a dose de $10 \mu\text{M}$ foi a mais eficiente. Analisando-se em conjunto as figuras 39 e 40, percebe-se que a concentração de $10 \mu\text{M}$ é a que apresenta melhores resultados na indução de apoptose.

A irradiação em HL60 foi testada de duas maneiras: contínua e fracionada, onde eram feitos intervalos de 50 segundos sem irradiação a cada 50 segundos irradiados.

Outro fator testado foi o tempo de irradiação. Foram feitas irradiações (664 nm, 35 mW) de maneira pulsada e fracionada por 150 ($0,54 \text{ J/cm}^2$), 350 ($1,27 \text{ J/cm}^2$) e 700 segundos ($2,55 \text{ J/cm}^2$). A indução de dano em membrana foi medida através de coloração com TB.

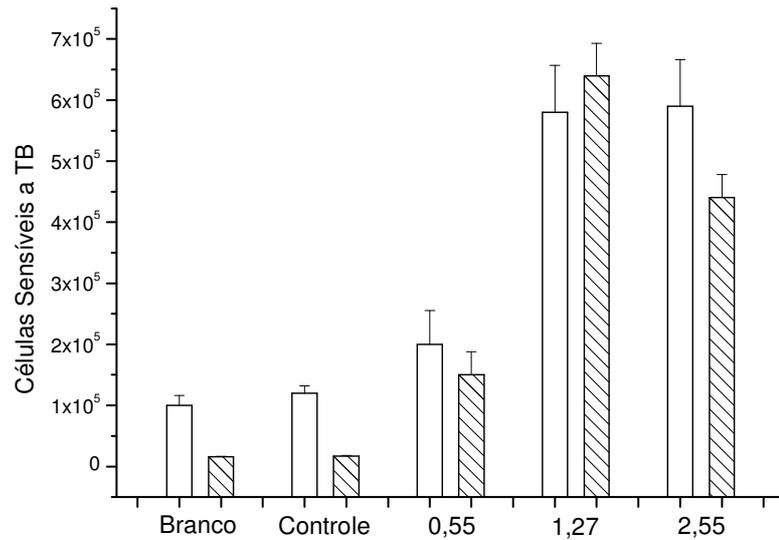


Figura 41- Número de células HL60 sensíveis a TB com diferentes doses (J/cm²) de irradiação, aplicada de maneira contínua (branco) ou fracionada (rachurado). Foram plaqueadas 2×10^5 células, incubadas com 10 μ M de AM por 3 horas.

A figura 41 mostra que o número de células com membrana comprometida aumenta conforme a dose, sendo pequena na dose de 0,55 J/cm² e aumentando em doses maiores. A diferença causada pela forma de irradiação (contínua ou fracionada), embora existente, principalmente na dose de 2,55 J/cm², não segue um padrão claro, não podendo ser apontada uma clara diferença entre essas maneiras de irradiação. A menor dosagem, 0,55 J/cm², mostra um baixo número de células sensíveis a TB. Apesar disso, estas células insensíveis a TB e consideradas viáveis, podem estar em processo apoptótico, processo de morte celular que não compromete a integridade de membrana e não é detectado por essa técnica. Ou seja, esse dado apresentado pela figura 40, mostra uma dosagem que é pouco necrótica e pode ter alta eficiência na indução de apoptose. As outras dosagens se mostram bem citotóxicas, provavelmente induzindo morte celular por necrose.

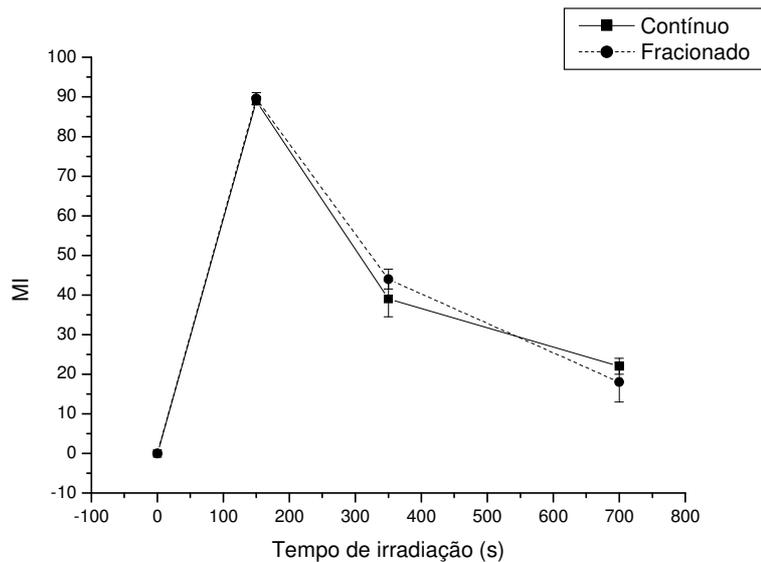


Figura 42 – MI de amostras de células HL60 (2×10^5), incubadas por 3 horas com AM 10 μM , irradiadas por tempos diferentes.

A figura 42 mostra o MI observado para diferentes tempos de irradiação, de maneira contínua ou fracionada. As diferenças observadas entre irradiação fracionada e a irradiação contínua é muito pequena, sugerindo que não há uma diferença significativa na eficiência e no tipo de morte celular. No tempo menor de irradiação, que corresponde à dose mais baixa de luz ($0,54 \text{ J/cm}^2$), observa-se quantidade maior de núcleos sub-diplóides. Conseqüentemente essa dose é, provavelmente, uma dose com alta indução de apoptose. Com o aumento da dose ocorre um maior desbalanço oxidativo, favorecendo a morte por necrose (fig. 41).

5-Conclusões

Os dados apresentados no trabalho permitem concluir que o AM se liga à mitocôndria, de uma maneira dependente da concentração de AM, da concentração de mitocôndria e do $\Delta\Psi$ mitocondrial. O AM entra na mitocôndria, se localizando na matriz mitocondrial, onde reage com NAD(P)H mitocondrial, formando leuco-AM, forma reduzida do AM e opticamente inativa. Elevadas concentrações de AM tendem a formar dímeros, que diminuem a eficiência de formação de $^1\text{O}_2$. A formação de $^1\text{O}_2$ é afetada pelo potencial de membrana, já que a supressão do $\Delta\Psi$ dobra a eficiência da sua formação. Esse aumento de eficiência se deve a diminuição da dimerização induzida pela supressão do $\Delta\Psi$, e não um efeito direto da eliminação do gradiente de prótons.

A carga positiva das fenotiazinas mostrou-se importante para a atração desses FSs às mitocôndrias, porém não é o único fator que influi nessa ligação. A estrutura dos FSs, refletida no Log P, mostrou-se um fator também responsável pela ligação. Essa proporção é diferente para os outros FSs, mostrando que a estrutura interfere na ligação na mitocôndria. Além disso, a supressão do $\Delta\Psi$ também não interfere de maneira uniforme em outras características fotofísicas, como a geração de $^1\text{O}_2$. No caso do AM, ocorre variação nos parâmetros fotofísicos relacionados com a formação de dímeros. Os outros FSs não têm seu estado de agregação alterado pelo $\Delta\Psi$, e a emissão de $^1\text{O}_2$ se mantém inalterada em função do $\Delta\Psi$.

Em células Hela, AM se mostrou tóxico só quando irradiado, enquanto TIO não mostrou grande toxicidade e AB mostrou toxicidade elevada sendo irradiado ou não. Essa diferença de toxicidade está provavelmente relacionada a diferenças estruturais e na citolocalização desses FSs.

Em células HL60, a concentração de 10 μM de AM se mostrou pouco tóxica quando não irradiada, mostrou uma menor redução do FS na célula e um grande potencial para a indução de apoptose, quando irradiada com dose de 0,55 J/cm^2 . Doses maiores, tanto de energia quanto de FS, são tóxicas as células, porém parecem favorecer o mecanismo necrótico de morte celular.

Com base nesses dados, é possível concluir que a estrutura do FS fenotiazínico é tão ou mais importante que sua carga para seus efeitos em células e mitocôndrias. Essa estrutura influi na localização do FS, alterando sua capacidade de induzir dano celular devido ao pequeno raio de difusão do $^1\text{O}_2$, influenciando no mecanismo de morte celular. Aparentemente, o Log P tem influência direta na ligação dos FSs tanto em mitocôndrias quanto em células. A supressão do $\Delta\Psi$ mostrou um efeito em todas as características estudadas para o AM, tanto em células quanto em mitocôndrias. Essa característica pode estar relacionada com uma citolocalização mitocondrial favorecida, sendo necessários experimentos para confirmar esta hipótese.

A simetria/assimetria desses corantes também parece influir na toxicidade. O AB, assimétrico, mostrou toxicidade muito maior que os outros corantes, além de uma maior capacidade de induzir a formação de núcleos sub-diplóides. Sua lipofilicidade é intermediária entre os outros dois FSs testados, sendo que sua única característica exclusiva é a assimetria. Esse fato pode ser a razão de sua toxicidade, devido a uma citolocalização ou interação diferenciada.

Este estudo atesta para um grande potencial do uso de AM em PDT *in vitro*, a relativamente baixas concentrações e doses de luz, como indutor de apoptose tóxica apenas quando irradiado. Obviamente, este trabalho é apenas um indicativo deste potencial, sendo necessários estudos adicionais para a compreensão e caracterização do uso de AM e outras fenotiazinas em PDT. As outras fenotiazinas testadas mostram dificuldades adicionais, como a falta de toxicidade de TIO e a alta toxicidade no escuro de AB.

6. Perspectivas

O atual trabalho deixa uma série de possibilidades de estudos a fim de uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à foto e citotoxicidade das fenotiazinas. Uma abordagem estrutural, relacionando os diferentes grupos radicais das fenotiazinas com sua citolocalização, sem dúvida ajudaria a esclarecer as diferenças de comportamento aqui observadas. Alterações estruturais nos FSs, como adição de caudas hidrofóbicas ou grupos carregados positivamente, poderiam esclarecer ainda mais esse mecanismo, bem como o estudo comparado com um FS que tivesse Log P negativo.

A adição de “caudas” na fenotiazinas poderia levar a formação de FSs com diferentes graus de assimetria e Log P, favorecendo o mecanismo de ligação desses FSs a membranas. Um possível direcionamento maior na membrana interna mitocondrial poderia dar um grande estímulo apoptótico.

As fenotiazinas se caracterizam por produzirem $^1\text{O}_2$, espécie reativa que tem sido relacionada com destruição de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (30,31). Assim, esses FSs se tornam muito interessantes para testes em tumores que super-expressam essas proteínas (Bcl-2 e Bcl-X_L), conhecidos por sua grande resistência a tratamentos. Uma comparação de toxicidade em células normais, células tumorais e células tumorais que super-expressam essas proteínas revelaria dados interessantes sobre esse mecanismo de morte celular induzido por fenotiazinas irradiadas.

7-Bibliografia

1. Brown S. B., Brown E. A., Walker I. (2004) *The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment* – *Lancet Oncology* 5: 497-508.
2. Gomer C. J., Ferrario A., Fisher A. M. R. (2001) *Photodynamic Therapy: basic mechanisms and molecular applications* – *Photobiology for the 21st century*. Overland Park Kansas: Valdenmar Publishing Company: 143-147.
3. Agostinis P., Buytaert E., Breyskens H., Hendrickx N. (2004) *Regulatory pathways in photodynamic induced apoptosis* – *Photochemistry Photobiology Sciences*, 3: 721-729.
4. Gollnick S. O., Vaughan L., Henderson B. W. (2002) *Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy* – *Cancer Research*, 65: 1604-1608.
5. Bonnett, R. (2000) *Chemical aspects of photodynamic therapy* – *Advanced Chemistry texts*: Gordon and Breach Science Publishers.
6. Mellish K. J., Cox R. D., Vernon D. I., Griffiths J., Brown S. B. (2002) *In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues* – *Photochemistry and Photobiology* 75: 392-397.
7. Bellin J. S., Mohos S. C., Oster G. (1961) *Dye-sensitized photoinactivation of tumor cells in vitro* – *Cancer Research* 21: 1365-1371.
8. Severino D., Junqueira H. C., Gugliotti M., Gabrielli D. S., Baptista M. S. (2003) *Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue* – *Photochemistry and Photobiology*, 77: 459-468.
9. Gabrielli D. S., Belisle E., Divinomar S., Kowaltowski A. J., Baptista M. S. (2003) *Binding, Aggregation and Photochemical properties of Methylene Blue in mitochondrial suspensions* – *Photochemistry and Photobiology*, 79: 227–232.
10. Tardivo, J. P., Del Gigilo A, Paschoal L. H. C., Ito A. S., Baptista M. S. (2005) *Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source* – *Photodyagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 175-191.

11. Orth K., Beck G., Genze F., Ruck A. (2000) *Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice* - Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 57: 186-192.
12. Luo Y., Kessel D., Griffiths J., Brown S. B., Vernon D. I. (1997) *The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative* - Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 42: 159-163.
13. Tuite, E. M., Kelly J. M. (1993) *Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates* - Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 21: 103-124.
14. Plaetzer K., Kiesslich T., Obberdaner C. B., Krammer B. (2005) *Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection*. Current Pharmaceutical Design 11: 1151-1165.
15. Almeida R. D., Manadas B. J., Carvalho A P., Duarte C. B. (2004) *Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy*- Biochimica et Biophysica Acta 1704: 59-86.
16. Nicholls D. G., Ferguson S. J. (1992) *Bioenergetics 2* - Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
17. Keene J. P., Kessel D., Land E. J., Redmond R. W., Truscott T. G. (1986) *Direct detection of singlet oxygen sensitized by haematoporphyrin and related compounds* - Photochemistry and Photobiology, 43: 117-120.
18. Annis M. G., Yethon J. A., Leber B. Andrews D. W. (2004) *There is more to life or death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum* - Biochimica et Biophysica Acta 1644: 115-123.
19. Kessel D., Luo Y., Deng Y., Chang C. K. (1997) *The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy* - Photochemistry and Photobiology 65: 422-426.
20. Castano, A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. (2004) *Mechanisms in photodynamic therapy part one: photosensitizers, photochemistry and subcellular localization* - Photodiagnosis and photodynamic therapy 1: 279-293

21. Spector D. L., Goldman R. D., Leinwand L. A. (1998) *Cells: a laboratory manual, vol 1: culture and biochemical analysis of cells* – Spring Harbor Laboratory press, cap 15.
22. Facundo H. T., Carreira R. S., de Paula J. G., Ferranti R., Laurindo F. R., Kowaltowski A. J. (2006) – *Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K⁺ channel activity* - Free Radical Biol. Med. 40: 469-479.
23. Julliard M., Chanon M. (1983) *Photoelectron-transfer catalysis: its connections with thermal and electrochemical analogues* – Chem. Rev. 83: 425-506.
24. Kikuchi K., Kokubun H., Kikuchi M. (1975) *Electron transfer reaction in the triplet state. Role of Ferrocene as an Electron Donor* – Bull. Chem. Soc. Jpn. 48: 1378-1381.
25. Engelmann F. M., Mayer I., Gabrielli D. S., Toma H. E., Kowaltowski A. J., Baptista M. S. (2007) *Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes* – Journal Bioenerg Biomembr, DOI 10.1007/s10863-007-9075-0.
26. Oliveira C. S. (2006) – *Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristal violeta e azul de metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura* – Tese de doutorado apresentada ao IQ/USP em 20/12/2006.
27. Sacková V., Kuliková L., Mikes J., Kleban J., Fedorocko P. (2005) *Hypericin-mediated photocytotoxic effect on HT-29 adenocarcinoma cells is reduced by light fractionation with longer dark pause between two unequal light doses* – Photochemistry and Photobiology 81: 1411-1416.
28. Oberdanner CB, Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B. (2005) – *Photodynamic treatment with fractionated light decreases production of reactive oxygen species and cytotoxicity in vitro via regeneration of glutathione* – Photochem Photobiol 81(3):609-13
29. Xue, L., Chiu S., Oleinick N. L. (2001) *Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4*. – Oncogene 20, 3420-3427

30. Xue L., Chiu S., Fiebig A., Andrews D. W., Oleinick N. L. (2003) *Photodamage to multiple Bcl-xL isoforms by photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4* – *Oncogene*, 22: 9197-9204.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)