

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

MAÍRA MAFTOUM COSTA

**ALTERAÇÃO DO POTENCIAL METASTÁSICO DE CÉLULAS HEp-2  
SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA**

São José dos Campos, SP  
2008

Maíra Maftoum Costa

**ALTERAÇÃO DO POTENCIAL METASTÁSICO DE CÉLULAS HEP-2  
SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

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

São José dos Campos, SP  
2008

C874a

Costa, Maíra Maftoum

Alteração do potencial metastático de células HEP-2 submetidas à terapia fotodinâmica / Maíra Maftoum Costa. São José dos Campos: Univap, 2008.

1 Disco laser: il.; color.

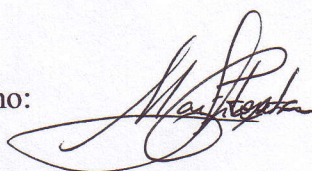
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

1. Fotoquimioterapia 2. Neoplasia Laríngeas 3. Metástase neoplásica I. Soares, Cristina Pacheco Orient. II Título

CDU: 616-006.6

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Aluno:



Data: 07/03/08

**MAÍRA MAFTOUM COSTA**

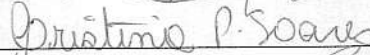
**“ALTERAÇÃO DO POTENCIAL METASTÁSICO DE CÉLULAS HEP-2  
SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

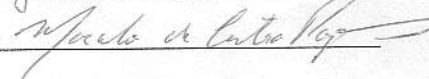
Profª. Dra. **KAREN C. MARTINEZ DE MORAES** (UNIVAP)



Profª. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP)



Prof. Dr. **MARCELO DE CASTRO PAZOS** (UNIFESP)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 07 de março de 2008.

*Dedico este trabalho aos meus pais e meus amigos.*

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família por me apoiar tanto, aos meus queridos professores, principalmente minhas orientadoras, por tudo que me ensinaram e da melhor forma possível.

Aos meus colegas de laboratório pelas conversas às 7 da manhã, às 7 da noite, aos sábados, domingos e feriados.

A todos os meus amigos responsáveis pela minha felicidade na maior parte do tempo.

E ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

*“A melhor maneira de prever o futuro é criá-lo”*  
Peter F. Drucker

## ALTERAÇÃO DO POTENCIAL METASTÁTICO DE CÉLULAS HEP-2 SUBMETIDAS A TERAPIA FOTODINÂMICA

### Resumo

A terapia fotodinâmica (PDT) é baseada na administração de um fotossensibilizante com afinidade a células neoplásicas, seguida da exposição da região tumoral a luz. Essa combinação de agente fotossensibilizante e luz, com comprimento de onda adequado, geram espécies reativas do oxigênio incluindo o oxigênio singleto, que podem interagir com inúmeros componentes biológicos levando a morte celular. O tratamento fotodinâmico também demonstra alterar a expressão de estruturas de adesão celular e a integridade de proteínas do citoesqueleto, elementos chaves na determinação do potencial metastático tumoral. O objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações do potencial metastático de células HEP-2 (carcinoma de laringe humano) após a PDT com AIPcS<sub>4</sub>. Para isso, as células foram incubadas com o agente fotossensibilizante AIPcS<sub>4</sub> (10µM/ 60 minutos), e então irradiadas com laser de Diodo (? 660nm; densidade de energia de 4,5J/cm<sup>2</sup> e potência de 30mW). Para observar a distribuição dos filamentos de actina, as células foram marcadas com faloidina-TRITC. A terapia mostrou causar alterações no citoesqueleto de actina, reduzindo as fibras de estresse na região central, presentes em maior concentração na região periférica das células. Os filamentos de actina são extremamente importantes para a manutenção da adesão celular e as observações após o tratamento revelaram que a adesão celular na linhagem HEP-2 sofreu alterações após a PDT, reduzindo o número de células aderidas ao substrato. A suscetibilidade das células ao rompimento da adesão com o substrato posterior à PDT, foi avaliada utilizando tripsina. O grupo PDT apresentou uma resistência à tripsinização, mantendo uma adesão mais estável com o substrato. Esses resultados são extremamente significativos, considerando que a metástase tumoral inclui o desprendimento das células malignas do tumor primário e a adesão destas a um tecido afastado. Nosso trabalho demonstrou que a capacidade de segregação e adesão das células foi modificada pela terapia, sugerindo uma redução do potencial metastático da cultura HEP-2 submetida à PDT com AIPcS<sub>4</sub>.

**Palavras chaves:** Terapia Fotodinâmica, Adesão Celular, Filamentos de Actina.



## **METASTATIC POTENTIAL ALTERATION OF HEP-2 CELLS SUBMITTED TO PHOTODYNAMIC THERAPY**

### **Abstract**

Photodynamic therapy (PDT) is based on the administration of tumor - localizing photosensitizers, followed by the exposure of the tumor region to light. Irradiation of the photosensitizer with a specific wavelength generates reactive oxygen species including singlet oxygen, which is able to interact with many biological compounds and lead the cell to death. Previous studies has demonstrated that PDT revealed to direct changes in the expression of cellular adhesion structure and cytoskeleton integrity which are considered key factors in the determining tumor metastatic potential. The aim of this work was to evaluate alteration of the metastatic potential of the human carcinoma HEp-2 cells after PDT with AIPcS<sub>4</sub>. For the treatment the cells were incubated with the AIPcS<sub>4</sub> (10µM) for 1h, and then they were irradiated with a diode laser (working at 660 nm; energy density of 4.5 J/cm<sup>2</sup> and power of 35mW). To visualize the distribution of the actin filaments the cells were stained with phalloidin-TRICT. The therapy conducted the alteration of the actin filaments distribution, reducing the stress fiber in the central region and presenting them at high concentration in the periphery of the cell. The actin filaments are extremely important for the sustaining of the cellular adhesion and the observations after the treatment revealed that the cell adhesion of HEp-2 has changed after the PDT, decreasing the number of cells that adhere to the substrate. Trypsin solution was used to evaluate the resistance of cellular detachment and attachment after PDT. The therapy has shown to inhibit cell detachment, indicating a stable connection with the substrate. This result is extremely significative considering that cancer metastases include detachment of malignant cells from the main tumor and attachment to remote tissues. Our work demonstrated that the therapy leads to alteration in the attachment of the cells to a substratum, suggesting a reduction of the metastatic potential after PDT with AIPcS<sub>4</sub> in HEp-2 cells.

**Keywords:** Photodynamic Therapy, Cellular Adhesion, Actin Filaments.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1:</b> Fotossensibilizantes com aprovação para aplicação clínica.	05
<b>Figura 2:</b> Estrutura do fotossensibilizante Alumínio(III) Fatlocianina Tetrassufonada.	06
<b>Figura 3:</b> Ilustração gráfica dos mecanismos fotoquímicos e fotofísicos da Terapia Fotodinâmica.	07
<b>Figura 4:</b> Famílias de moléculas de adesão celular (CAMs) e receptores de adesão.	09
<b>Figura 5:</b> Organização de uma junção aderente composta por E-caderina.	11
<b>Figura 6:</b> Células HEP-2 marcadas com faloidina-TRICT tempo 0h.	19
<b>Figura 7:</b> Células HEP-2, 0 hora após TFD com AlPcS <sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC.	19
<b>Figura 8:</b> Células HEP-2 marcadas com faloidina-TRICT tempo 6h.	20
<b>Figura 9:</b> Células HEP-2, 6 horas após TFD com AlPcS <sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC.	20
<b>Figura 10:</b> Células HEP-2 marcadas com faloidina-TRICT tempo 12h.	21
<b>Figura 11:</b> Células HEP-2, 12 horas após TFD com AlPcS <sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC.	21
<b>Figura 12:</b> Células HEP-2 marcadas com faloidina-TRICT tempo 24h.	22
<b>Figura 13:</b> Células HEP-2, 24 horas após TFD com AlPcS <sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC.	22
<b>Figura 14:</b> Células HEP-2 marcadas com faloidina-TRICT tempo 48h.	23
<b>Figura 15:</b> Células HEP-2, 48 horas após TFD com AlPcS <sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC.	23
<b>Figura 16:</b> Gráfico do número de células com citoesqueleto de actina anormal.	24
<b>Figura 17:</b> Gráfico da densidade óptica das amostras após 2 minutos de tratamento com tripsina.	26
<b>Figura 18:</b> Gráfico da densidade óptica das amostras após 6 minutos de tratamento com tripsina.	26
<b>Figura 19:</b> Gráfico da densidade óptica das amostras após 9 minutos de tratamento com tripsina.	27
<b>Figura 20:</b> Gráfico da densidade óptica das amostras após 2, 6 e 9 minutos de tratamento com tripsina.	27

<b>Figura 21:</b> Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 6 horas após os tratamentos.	29
<b>Figura 22:</b> Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 12 horas após os tratamentos.	29
<b>Figura 23:</b> Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 24 horas após os tratamentos.	30
<b>Figura 24:</b> Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 48 horas após os tratamentos.	30
<b>Figura 25:</b> Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos.	31
<b>Figura 26:</b> Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 6 horas após os tratamentos.	33
<b>Figura 27:</b> Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 12 horas após os tratamentos.	33
<b>Figura 28:</b> Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 24 horas após os tratamentos.	34
<b>Figura 29:</b> Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 48 horas após os tratamentos.	34
<b>Figura 30:</b> Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos.	35

## Lista de abreviaturas e siglas

ATP- Adenosina Trifosfato  
BaP - Benzo[a]pirene  
BSA - Albumina Bovina Sérica  
Calceína AM - Calceína Acetoximetil  
CAMs - Moléculas de adesão celular  
DHP - Derivados de hematoporfirina  
DMSO - Dimetilssulfóxido  
ECM - Matriz extracelular  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
FAK - Quinase de Adesão Focal  
FS - Fotossensibilizante  
HEp-2 - Carcinoma de laringe humano  
Ig - Imunoglobulina  
LED - *Light Emitting Diode*  
MEM - Meio Mínimo Essencial  
PDT - Photodynamic therapy  
PBS - Solução salina tampão fosfato  
SFB - Soro Fetal Bovino  
TFD - Terapia fotodinâmica  
Tris - Tris(hidroximetil)aminometano  
TRITC - Tetrametil Rodamina Isotiocianato  
? - Comprimento de onda  
°C - Grau centígrado  
µg - Micrograma  
µL - Microlitro  
µm - Micrometro  
µM - Micromolar  
cm<sup>2</sup> - Centímetro quadrado  
g - Grama  
L - Litro  
J - Joule  
mg - Milligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

mW - Miliwatts

nm - Nanometro

p - Peso

rpm - Rotações por minuto

v - Volume

## Sumário

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	02
2.1 <i>Objetivos Específicos</i>	02
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
3.1 <i>Terapia Fotodinâmica</i>	03
3.2 <i>Adesão Celular</i>	08
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 <i>Material e reagentes</i>	13
4.2 <i>Linhagem Celular</i>	13
4.3 <i>Preparação do Meio de Cultura</i>	13
4.4 <i>Solução salina tampão fosfato (PBS- “Phosphate buffer solution”)</i>	14
4.5 <i>Meio de montagem para Microscopia de Fluorescência</i>	14
4.6 <i>Manutenção da Cultura</i>	14
4.7 <i>Fotossensibilizante</i>	14
4.8 <i>Experimento</i>	14
4.9 <i>Incubação e Irradiação</i>	15
4.10 <i>Preparação de Placas com Colágeno</i>	15
4.11 <i>Microscopia de Fluorescência</i>	16
4.12 <i>Ensaio de Adesão Colorimétrico Célula-Matriz</i>	16
4.13 <i>Ensaio de Adesão Célula-Célula</i>	16
4.14 <i>Ensaio de resistência a tratamento com tripsina</i>	17
4.15 <i>Análises estatísticas</i>	17
5 RESULTADOS	18
5.1 <i>Estrutura e distribuição dos filamentos de actina</i>	18
5.2 <i>Resistência a Tripsinização</i>	25
5.3 <i>Ensaio Células-Matriz</i>	28
5.4 <i>Ensaio adesão célula-célula</i>	32
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

## 1 INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica para o tratamento de doenças neoplásicas e não-neoplásicas caracterizadas pelo crescimento exagerado de células não desejadas ou anormais (MOOR, 2000; OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002). Esta terapia envolve ativação pela luz, na presença de oxigênio molecular, de certos corantes (fotossensibilizantes) que são de algum modo seletivamente absorvidos pelo tecido alvo. Esse processo tem sido utilizado como uma técnica paliativa no tratamento do câncer em seu estado avançado, quando outras opções não apresentaram resultados satisfatórios, porém sua aplicação vem se mostrando apropriada a pequenas lesões e/ou lesões superficiais devido a baixa penetração da luz (HASSAN; MOOR; ORTEL, 2000).

É sabido que as células podem responder aos danos desencadeados pela TFD iniciando uma resposta de resgate ou ativando o processo de morte celular, seja por apoptose ou necrose (MOOR, 2000). A alteração na adesão das células de câncer a um substrato ou a células é uma outra consequência importante da TFD (CASTANO *et al.*, 2004). Inúmeras moléculas de adesão estão envolvidas nesse processo e a expressão anormal dessas moléculas pode levar ao aumento ou decréscimo do potencial metastático.

No presente trabalho serão feitas investigações do processo de adesão de células da linhagem HEP-2 (carcinoma de laringe humano) submetidas a TFD com o fotossensibilizante Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS<sub>4</sub>). Uma variedade de ensaios serão realizadas de forma a ajudar a compreender alterações na adesão célula-célula, célula matriz e da resistência a tratamento com tripsina. Devido a grande importância que possui o citoesqueleto possui, responsável pela estabilidade da célula (UZDENKY *et al.*, 2005), será observado o comportamento do citoesqueleto das culturas, especificamente dos filamentos de actina, através da técnica de microscopia de fluorescência.

Esses dados juntos nos darão informações sobre possíveis alterações no potencial metastático da cultura submetida ao tratamento fotodinâmico e a importância do citoesqueleto no processo.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações no potencial metastásico de células HEP-2 (carcinoma de laringe humano) submetidas à Terapia Fotodinâmica com o agente fotossensibilizador Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada.

### *2.1 Objetivos Específicos*

Para efetuar o estudo da modificação do potencial metastásico as células tratadas com o fotossensibilizante Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada e subsequentemente irradiadas foram analisadas nos seguintes pontos:

- Variações na adesão da cultura a uma monocamada confluyente de células;
- Alteração da adesão das células a matriz extracelular, representada pelo colágeno do tipo IV;
- Organização dos filamentos de actina e sua participação na adesão celular;
- Modificações na resistência de células submetidas a tratamento com tripsina após o tratamento fotodinâmico.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Terapia Fotodinâmica

O princípio da Terapia Fotodinâmica (TFD) foi proposto inicialmente há mais de um século. Originalmente desenvolvida para o tratamento de tumores, seus resultados mais promissores vêm sendo observados quando a aplicação é feita em doenças não-malignas (CASTANO, *et al.*, 2005). O fato de ser uma metodologia pouco invasiva (NOWIS *et al.*, 2005), possuir uma grande seletividade e não apresentar toxicidade para os locais não almejados (HASSAN; MOOR; ORTEL, 2000) são vantagens que justificam o grande interesse na pesquisa dessa linha de tratamento.

A TFD teve seu desenvolvimento para a aplicação clínica apenas recentemente (HASSAN; MOOR; ORTEL, 2000), sendo o conceito foi fundamentado no início do século XX quando Oscar Raab em 1900 notou que a luz, em certo comprimento de onda, era letal ao Paramécio exposto à acridina e outros corantes. Essa observação foi seguida pelos trabalhos de von Tappeiner (1903 e 1907) sobre o uso tópico desses corantes para o tratamento de lesões da pele. Em 1913 Meyer-Betz investigou o acúmulo de hematoporfirina e seus derivados (DHP) em tumores de ratos e o efeito da TFD após a administração sistêmica. Posteriormente as porfirinas se tornaram a classe mais estudada de agentes fotossensibilizantes. A fluorescência desses compostos foi pesquisada para o diagnóstico e delimitação das margens de tumores no final da década de 40 e década de 50 por Figge e colaboradores. A era moderna da TFD teve início após a descoberta, por Lipson e Blades (1960), de que era uma impureza da hematoporfirina o agente com afinidade as células tumorais, este trabalho foi seguido por estudos de ciência básica e aplicação clínica por Dougherty e colaboradores (1978, 1979 e 1986).

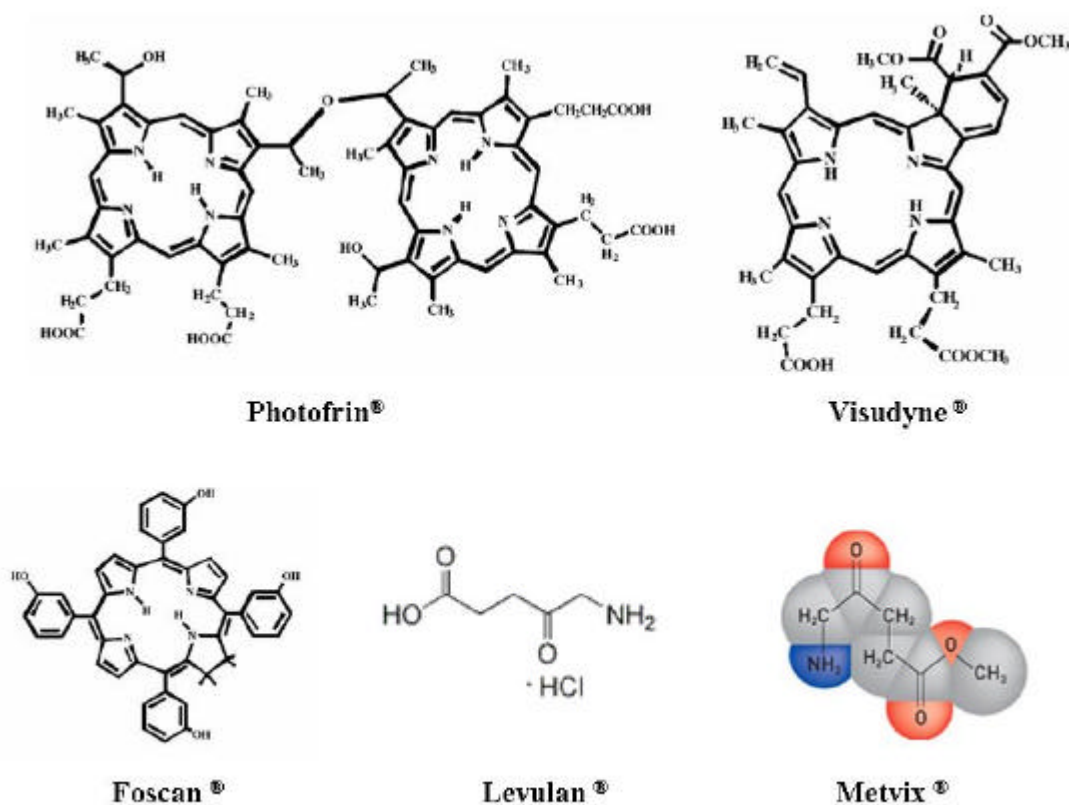
A técnica requer a exposição das células, ou tecidos, a um composto sensível à luz denominado fotossensibilizante (FS), oxigênio molecular e luz visível com o comprimento de onda compatível com o espectro de absorção da droga. Esses elementos quando combinados criam uma reação fotodinâmica (DOUGHERTY *et al.*, 1998; MOOR, 2000, ALLISON, *et al.*, 2004). O FS é normalmente administrado por injeção intravenosa e inicialmente absorvido por todos os tecidos do organismo; a liberação rápida pelos tecidos saudáveis cria uma diferença de concentração da droga nas células normais comparada com as células neoplásicas, porém

essa diferença não é suficiente para criar um efeito seletivo da terapia e desse modo danos ao tecido normal tornam-se inevitáveis (MILLER, *et al.*, 2007).

A primeira fonte de luz utilizada na TFD foi de fontes não coerentes (p.e., lâmpadas de arco convencionais). Fontes de luz não coerentes são seguras, de fácil utilização, mais baratas e podem produzir um espectro de onda capaz de excitar vários fotossensibilizantes. As desvantagens das lâmpadas comuns incluem efeito termal significativo, baixa intensidade luminosa e dificuldade no controle da dose de luz (MANG, 2004).

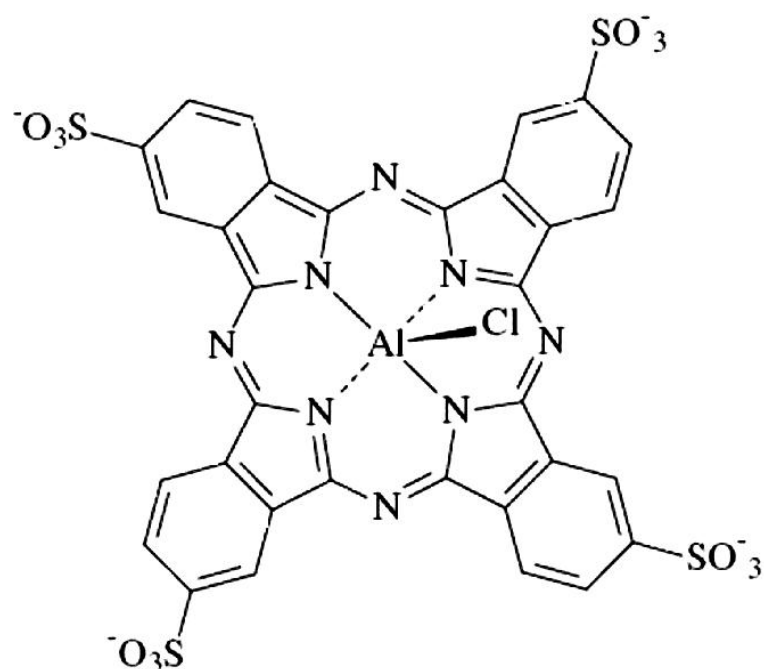
*Light Emitting Diode* (LED) é uma fonte de luz emergente para TFD que é capaz de gerar luz com alta densidade de energia e no comprimento de onda desejado. Contudo a fonte de energia mais utilizada na TFD são os *Laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), capazes de produzir luz monocromática altamente energética de um comprimento de onda específico (HUANG, 2005).

Além da fonte de luz utilizada, um importante fator para assegurar o sucesso da terapia é o FS. Clínicos e químicos possuem opiniões divergentes quanto ao ideal de um FS (HUANG, 2005). Enquanto químicos priorizam o alto coeficiente de extinção e alto rendimento quântico do oxigênio singleto, clínicos enfatizam a importância da baixa toxicidade e alta seletividade. Apesar dessas considerações, ambas as partes concordam que para a TFD clínica o FS ideal deve possuir pelo menos alguns dos seguintes critérios: disponibilidade comercial na forma quimicamente pura, baixa toxicidade no escuro mas com alta fototoxicidade, afinidade com as células alvo, absorção em longos comprimentos de onda, rápida eliminação do organismo e fácil administração por diferentes formas. Alguns FS satisfazem todos ou apenas alguns desses critérios, com isso há poucos FS que receberam a aprovação oficial para uso no mundo. Dentre estes está incluso o Photofrin<sup>®</sup> (Porfímero de sódio, Axcan Pharma, Inc.), Foscan<sup>®</sup> (temoporfina, meta-tetrahidroxifenilclorina, mTHPC; Biolitec AG), Visudyne<sup>®</sup> (verteporfina, benzoporfirina derivada de anel monoácido A, BPD-MA; Novartis Pharmaceuticals), Levulan<sup>®</sup> (ácido 5-aminolevulínico, ALA; DUSA Pharmaceuticals, Inc.) e o mais recente Metvix<sup>®</sup> (metil aminolevulinato, MLA ou M-ALA; PhotoCure ASA.) (Fig. 1) (HUANG, 2005).



**Figura 1: Fotossensibilizantes com aprovação para aplicação clínica** (adaptado de CASTANO *et al.*, 2004; ALLISON *et al.*, 2004).

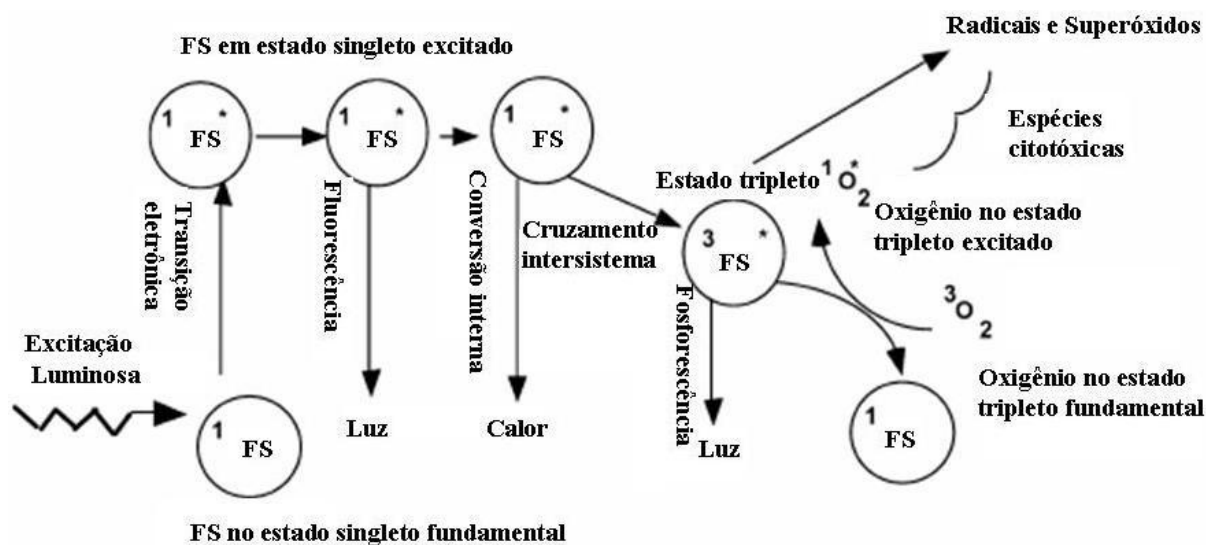
Almejando destacar o potencial e estender a aplicação clínica, uma segunda geração de FSs, dentre eles as ftalocianinas, tem sido requerida para a terapia do câncer. Algumas dessas ftalocianinas obtiveram a aprovação para seu uso no tratamento de vários tipos de cânceres na Europa e no Japão (ACKROYD *et al.*, 2001). O interesse crescente por essa nova classe de FSs é justificado pelo alto coeficiente de absorção (630-750nm) permitindo uma maior penetração da luz em tecidos biológicos (CAHN *et al.*, 2001). As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente dependentes do metal central (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004). Entre as ftalocianinas metálicas destacam-se os complexos Zn(II) e Al(III) por apresentarem propriedades fotoquímicas favoráveis à aplicação na TFD (URIZZI *et al.*, 2001), p.e., relativa longa-vida do estado singleto do oxigênio e longa-vida do estado tripleto que possui alto rendimento quântico de produção (RUCH *et al.*, 1996). Porém a presença de 4 grupos fenil causa problemas de solubilidade e agregação. Para contornar este problema ftalocianinas são frequentemente preparadas com grupos de ácido sulfônico (p.e. AlPcS<sub>4</sub>) (Fig.2), responsáveis pelo aumento da hidrossolubilidade (CASTANO *et al.*, 2004).



**Figura 2: Estrutura do fotossensibilizante Alumínio(III) Ftalocianina Tetrassulfonada.** Típica estrutura de uma ftalocianina com Alumínio (Al) como metal central e sulfonação em suas cadeias laterais (SOUZA, 2002).

O processo fotodinâmico é iniciado quando o fotossensibilizante (FS) absorve um fóton e sofre uma decadência simultânea ou sequencial resultando em reações de transferência de energia intramolecular (SIBATA *et al.*, 2000). O FS excitado no estado dito singleto pode passar pelo processo conhecido como cruzamento de intersistemas tendo como consequência a formação do FS no estado excitado tripleto, que possui uma meia-vida relativamente longa (Fig. 3) (CASTANO *et al.*, 2004).

O FS no estado tripleto pode sofrer dois tipos de reações. Primeiramente, na reação do Tipo 1, o FS tripleto reage diretamente com um substrato, como membranas celulares ou moléculas, transferindo um próton ou um elétron para formar um radical aniônico ou catiônico respectivamente. Esses radicais podem futuramente reagir com oxigênio produzindo espécies reativas do oxigênio. Alternativamente na reação do Tipo 2, o FS tripleto transfere energia diretamente para oxigênio molecular, originando a forma excitada do oxigênio, dita singleto. Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente, a relação entre os processos é dependente do tipo do FS usado, da concentração do substrato e do oxigênio (CASTANO *et al.*, 2004).



**Figura 3: Ilustração gráfica dos mecanismos fotoquímicos e fotofísicos da Terapia Fotodinâmica.** Após a absorção da luz (fótons) o fotossensibilizante (FS) passa do estado singleto fundamental para o estado singleto excitado, essas espécies podem perder energia emitindo luz (fluorescência) ou por conversão interna em calor. O estado singleto excitado pode ainda passar por um processo denominado cruzamento de intersistemas, onde o spin do elétron excitado se inverte dando origem a um estado dito excitado tripleto, que possui uma meia-vida relativamente longa (microsegundos), podendo reagir com o oxigênio molecular ou outras moléculas, originando as espécies citotóxicas (CASTANO *et al.*, 2004).

As espécies reativas do oxigênio junto com oxigênio singleto são agentes oxidantes que podem reagir diretamente com inúmeras biomoléculas, onde são importantes alvos os resíduos de aminoácidos das proteínas (GRUNE *et al.*, 2001) e ácidos nucleicos (OLEINICK, EVANS, 1998).

A resposta das células decorrente da aplicação da TFD é dependente da localização subcelular do fotossensibilizante (KESSEL; LUGUYA; VICENTE, 2003; TIJERINA; KOPECKOYA; KOPECEK, 2003; FEOFANOV *et al.*, 2004). Devido à alta reatividade e curta meia-vida do oxigênio singleto (MOAN; KERK, 1991), principal agente tóxico gerado pela terapia (MARCHAL; BEZDETNAYA; GUILLEMIN, 2004; KRISCA; KORYTOWSKI; GIROTTI, 2005), apenas moléculas e estruturas próximas aos sítios de geração deste serão diretamente afetadas pelo tratamento (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002).

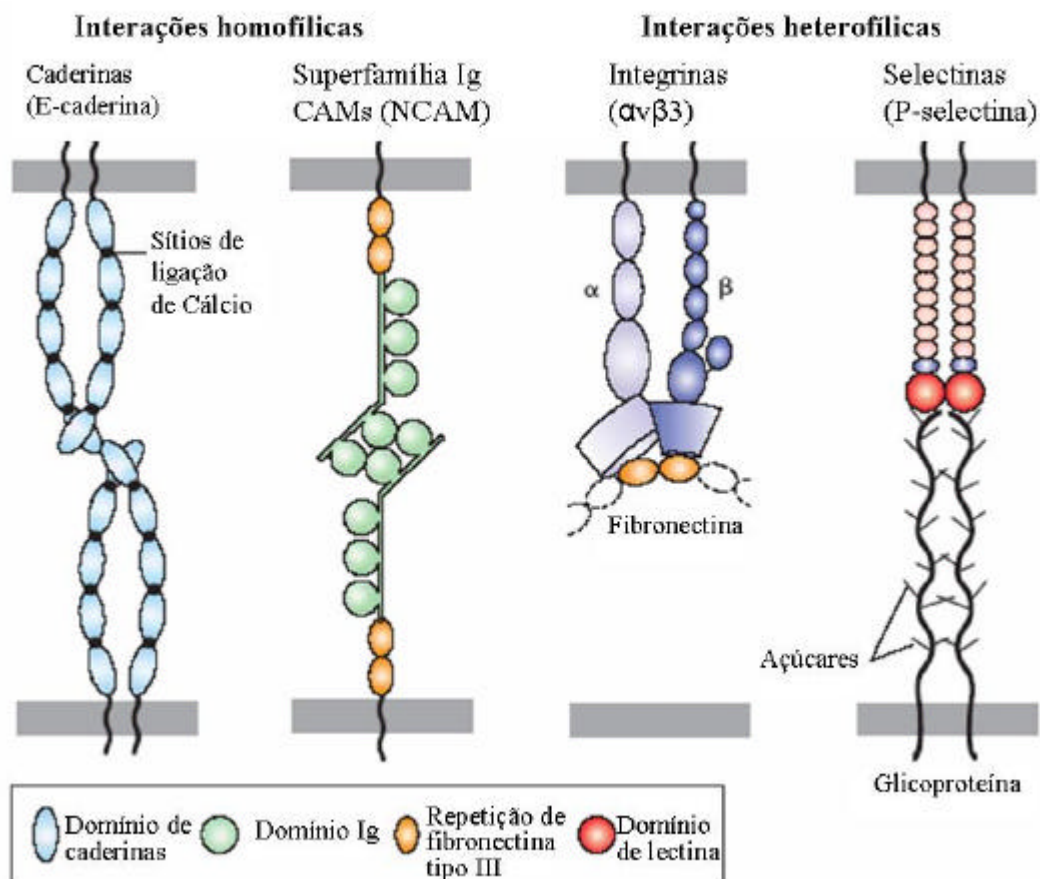
Embora TFD possa mediar a sinalização de inúmeros eventos, tem sido proposto que geralmente o tratamento resulte em morte celular (necrótica ou apoptótica). Inúmeros trabalhos apontam a mitocôndria como um importante alvo na TFD, onde a localização dos fotossensibilizantes nessa organela mostra ser mais eficiente no desencadeamento da morte celular (KESSEL *et al.*, 1997; KESSEL; LUO, 1998; FERREIRA *et al.*, 2004; MARCHAL; BEZDETNAYA; GUILLEMIN, 2004).

Outro fato interessante a ser considerado é a capacidade de a TFD desencadear uma resposta imunológica do organismo. A união entre o FS e luz pode provocar uma combinação incomum de células necróticas e apoptóticas (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002), o que diferencia a TFD dos agentes citotóxicos mais comuns, que normalmente apenas originam células apoptóticas (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006). A destruição do tumor por um processo que pode gerar células necróticas e expressão de proteínas de estresse faz com que a TFD produza uma resposta inflamatória, o que atrai leucócitos a região tumoral tratada. A terapia ainda cria e expõem novos antígenos tumorais e induz ativação de proteínas de choque térmico que aumentam a formação da ligação de apresentação de antígenos o que torna mais eficaz a citotoxicidade tumor-específica por células T (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

### **3.2 Adesão Celular**

O termo adesão celular descreve todas as formas de comunicação de contato direto entre as células ou entre as células e uma matriz extracelular (ECM). A adesão celular tem atuado como elemento chave durante a evolução dos seres vivos, sendo essencial para o desenvolvimento de organismos multicelulares, regulação celular, embriogênese, morfogênese, fisiologia e regeneração tecidual (LÖSTER; HORTKORTE, 2000).

A variedade de tecidos e sua organização em um órgão são determinadas por interações moleculares e não seriam possíveis sem a regulação da expressão temporária e específica de inúmeras moléculas adesivas. As células no tecido podem aderir diretamente umas nas outras (adesão célula-célula) através de proteínas integrais de membrana especiais chamadas moléculas de adesão celular (CAMs) que normalmente agrupam-se em junções características. As células animais também aderem de forma indireta (adesão célula-matriz) através da ligação de receptores especializados da membrana plasmática a componentes da ECM (Fig. 4) (LODISH *et al.*, 2003).



**Figura 4: Famílias de moléculas de adesão celular (CAMs) e receptores de adesão.** Dímeros de E-caderina formam mais comumente ligações homofílicas. A superfamília das imunoglobulinas (Ig) pode formar ligações homofílicas (mostrada na figura) e heterofílicas. As selectinas, mostradas na forma de dímero, contêm um domínio de lectina responsável por ligações a carboidratos que reconhecem estruturas especializadas de açúcares em glicoproteínas (mostrado na figura) e glicolípídios de células adjacentes. Integrinas heterodiméricas (por exemplo, cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ ) funcionam como CAMs ou receptores de adesão (mostrada na figura) que se ligam a longas, multiadesivas proteínas de matriz. Muitas moléculas de adesão contêm múltiplos domínios distintos, alguns são encontrados em mais de um tipo de CAM. O domínio citoplasmático dessas proteínas é normalmente associado com proteínas adaptadoras que são responsáveis pela ligação das CAM com o citoesqueleto ou vias de sinalização celular (LODISH *et al.*, 2003).

A maioria das CAMs é classificada dentro dos seguintes grupos: selectinas, superfamília das imunoglobulinas, integrinas e caderinas (HYNES, 2002; LODISH *et al.*, 2003).

As selectinas são proteínas de superfície celular que participam de ligações, dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a carboidratos. São mediadoras da interação transitória entre leucócitos e células endoteliais ou plaquetas sanguíneas. Existem 3 membros da família das selectinas: I-selectina, expressa em leucócitos; E-selectina, expressa nas células endoteliais; e P-selectinas, que são expressas em plaquetas. Uma das suas funções principais é

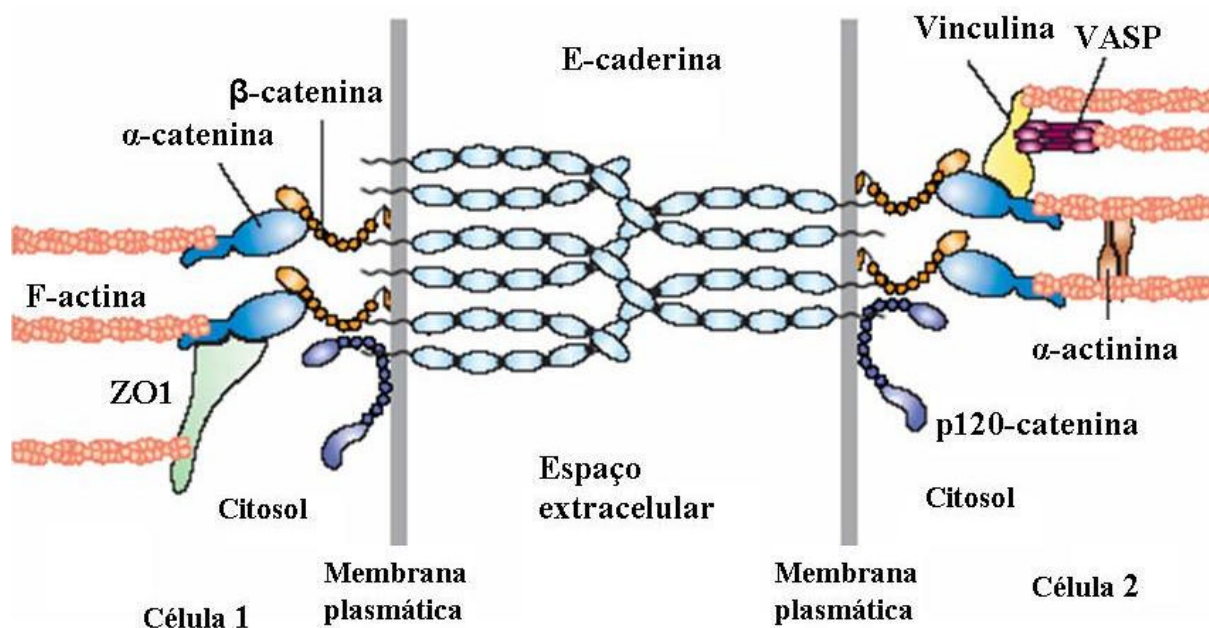
iniciar a interação entre as células endoteliais e os leucócitos durante sua migração da circulação para tecidos inflamados (PATEL; CUVELIER; WIEHLER, 2002; ALBERTS *et al.*, 2004).

As moléculas responsáveis pela adesão célula-célula independentes do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pertencem a uma grande família de proteínas, a superfamília das imunoglobulinas (Ig-CAM) (ALBERTS *et al.*, 2004). Um dos mais importantes contextos da participação das Ig-CAM é no desenvolvimento do sistema nervoso, onde membros variados da família das Ig direcionam os axônios e estão envolvidos no estabelecimento e manutenção da conexão neural (APLIN *et al.*, 1998). Outra função crucial da Ig-CAM está relacionada ao sistema imune, onde essas moléculas irão permitir uma ligação mais forte entre os leucócitos e as células endoteliais (APLIN *et al.*, 1998; CASTANO *et al.*, 2005).

As caderinas compreendem uma larga família dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , são responsáveis por ligações homofílicas célula-célula (LODISH *et al.*, 2003) e, normalmente, divididas em 3 subtipos: N (neural), E (epitelial) e P (placentar) (MACGARY; LEV; BAR-ELI, 2002). Essas moléculas aparecem no início do desenvolvimento e mudanças na expressão de seus subtipos são essenciais na segregação de células para a formação de tecidos distintos, além de terem papel chave na manutenção da integridade tecidual em organismos adultos (STEINHUSEN *et al.*, 2001; MACGARY; LEV; BAR-ELI, 2002).

Cada caderina clássica possui um domínio transmembrana, um pequeno domínio citosólico e um grande domínio extracelular, o domínio extracelular necessita da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  para interagir com outra molécula de caderina, de mesmo tipo, da célula anexa. Já o domínio citosólico se liga aos filamentos de actina através de inúmeras proteínas celulares (Fig. 5) (LODISH *et al.*, 2003).





**Figura 5: Organização de uma junção aderente composta por E-caderina.** Os domínios extracelulares dos dímeros de E-caderina se agrupam com os da célula anexa formando uma interação homofílica cálcio dependente. O domínio citosólico da E-caderina se liga direta ou indiretamente a múltiplas proteínas adaptadoras que conectam a junção aos filamentos de actina (F-actina) do citoesqueleto e participam de vias de sinalização intracelular (ex p120-catenina) (LODISH *et al.*, 2003).

Alterações, transitórias ou permanentes, na expressão de E-caderina tem demonstrado grande importância no processo de metástase tumoral (HARINGTON; SYRINGOS, 2000). Na progressão de tumores uma diminuição ou perda da expressão de E-caderina nas células neoplásicas levaria a redução da aderência dessas células entre suas vizinhas resultando na migração da mesma (BEAVON, 1999). Essa perda na expressão de E-caderina tem sido documentada ocorrer em vários tipos de câncer (BEAVON, 1999) incluindo os da região do pescoço (MATTIJSEN, *et al.*, 1993; ANDREWS *et al.*, 1997).

O quarto grupo de CAMs é denominado integrinas estas constituem a maior classe de glicoproteínas transmembrana responsáveis pela adesão célula-matriz. Essas glicoproteínas, compostas pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , tem a função de receptores de membrana para a formação de contatos de adesão focal com inúmeros constituintes da ECM (colágeno, fibronectina, laminina etc.), onde o domínio  $\beta$  citoplasmático interage com proteínas associadas com o citoesqueleto, permitindo a ligação indireta das integrinas com filamentos de actina (MIZEJEWSKI, 1999). O domínio citoplasmático  $\beta$  também é importante na transdução de sinais, particularmente, o do tipo  $\beta_1$ , na ativação da quinase de Adesão Focal (FAK) mediada por integrina (APLIN *et al.*, 1998).

A interação das integrinas com suas proteínas ligantes aumenta a ativação da FAK, resultando na reunião de proteínas do citoesqueleto em junções membrana-matriz, chamadas de região de adesão focal (YASUDA *et al.*, 2001).

Na adesão focal, grupamentos de integrinas ligam-se externamente a ECM e internamente a inúmeras proteínas citoplasmáticas que se conectam aos filamentos de actina. Inicialmente, várias pequenas estruturas são formadas nos sítios de ligação célula-substrato. Com a maturação do contato focal, filamentos de actina estendem-se e empacotam-se para formar estruturas proeminentes denominadas fibras de estresse (APLIN *et al.*, 1998). A actina é um componente essencial do citoesqueleto e tem um papel crucial nas células eucariontes. O citoesqueleto de actina está envolvido na geração e manutenção da morfologia e polarização celular, na endocitose e no tráfego intracelular, na contratilidade, motilidade e divisão da célula (WINDER; AYSCOUNGH, 2005).

Os componentes do citoesqueleto estão envolvidos com a regulação da adesão celular a vários compostos da ECM, incluindo nas interações adesivas durante a formação de tumores secundários (KORB *et al.*, 2004), assim como as integrinas. A maioria das células (exceto as células sanguíneas) requer a adesão a ECM para crescer, exercer sua função e sobreviver, logo o papel das integrinas no processo metastático é óbvio, sem a ligação das células neoplásicas a uma ECM não será possível a sobrevivência das mesmas (MIZEJEWSKI, 1999), já que a estabilidade da adesão celular de tumores a ECM e a órgão adjacentes é crucial para a formação de tumor secundário (KORB *et al.*, 2004).

Os mecanismos básicos dos efeitos da TFD na adesão celular não estão completamente elucidados. As porfirinas são as mais exploradas (CHRISTENSEN *et al.*, 1985; GOMER; FERRARIO; MURPHEE, 1987; VONARX *et al.*, 1995; MARGARON; SORRENTI; LEVY, 1997; ROUSSET *et al.*, 1999; UZDENSKY *et al.*, 2004a; UZDENSKY *et al.*, 2004b; UZDENSKY *et al.*, 2005), entretanto quase não há informações sobre o papel das ftalocianinas (CANTI *et al.*, 1994; BALL *et al.*, 2001) na adesão celular. Visto que a TFD é indicada principalmente em carcinomas precoces, nos quais não foi detectada metástase, é essencial que a influência da terapia no processo metastático seja esclarecida, garantindo um procedimento seguro (ROUSSET *et al.*, 1999).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material e reagentes

O Meio de Cultura MEM (Meio Mínimo Essencial), Bicarbonato de Sódio, L-glutamina (Fluka), Cloreto de Sódio (NaCl), Calceína AM (Fluka), Dimetilssulfóxido (DMSO), Albumina Bovina Sérica (BSA), Colágeno de Placenta Humana tipo IV, Paraformaldeído, Triton X-100, Faloidina conjugada a TRITC, N-propil galato, Cristal Violeta foram adquiridos da Sigma (USA).

Soro Fetal Bovino (SFB) e Tripsina foram comprados da Gibco BRL. Etanol e Glicerol foram obtidos da Synth e o Vermelho de Fenol da Merk. A solução de penicilina (10.000U/mL) e estreptomicina (20mg/mL) com antimicótico (2mg/L de anfotericina B), as garrafas e placas de cultura TPP (Suíça) foram compradas da Cultlab.

O Fosfato Biácido de Sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e o Fosfato Monoácido de Sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) foram adquiridos da Fisher Scientific. Por fim o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi obtido da Analyticals, o Cloreto de Amônia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) da Dinâmica e o tris(hidroximetil)aminometano (Tris) da Invitrogen.

### 4.2 Linhagem Celular

A linhagem HEP<sub>2</sub>, carcinoma epidermóide de laringe humana (CCL-23 ATCC-USA), utilizada nos experimentos, foi obtida do Instituto Adolfo Lutz/Seção de Cultura Celulares (São Paulo-SP). Essa linhagem celular tem sido amplamente utilizada quando se faz necessário um modelo de sistema neoplásico (CORBIERE *et al.*, 2004; MAGGIORELLA *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2006), incluindo estudos da resposta celular frente a TFD (LIU; XU; ZHANG, 2004; MILANESIO *et al.*, 2005) e estudos de adesão celular (LO; KEESE; GIAEVER, 1999; MAZUROV *et al.*, 2003). Nosso grupo de pesquisa faz uso dessa linhagem celular como sistema modelo no estudo da aplicação de TFD *in vitro*, manter o tipo celular permite estabelecer comparativos entre a resposta das células frente a TFD com agentes fotossensibilizante variados e o comportamento da expressão de proteínas e compartimentos celulares distintos.

### 4.3 Preparação do Meio de Cultura

O meio de cultura MEM foi dissolvido em aproximadamente 950mL de água destilada a temperatura ambiente. Ao meio, sob agitação magnética, foi acrescentado 2,2g de bicarbonato de sódio, 292 mg de L- glutamina e 10 mg de indicador de pH vermelho de fenol. O pH foi ajustado para 7,2. Após completar o volume para um litro, a solução foi filtrada em filtro com poro de 0,22 $\mu$ m de diâmetro no fluxo laminar e colocada em estufa a 37°C por 24 horas para o teste de esterilidade. Posteriormente o meio MEM foi armazenado a 4°C até o momento do uso, quando foi suplementado com 1% (v/v) da solução de penicilina e estreptomicina com antimicótico e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB).

#### ***4.4 Solução salina tampão fosfato (PBS- “Phosphate buffer solution”)***

A solução salina tampão fosfato (PBS) foi preparada utilizando-se água ultrapura, 140mM de NaCl, 2,6mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, com o pH ajustado para 7,2. O tampão foi esterilizado por calor úmido (autoclave) e mantido a 4°C até sua utilização.

#### ***4.5 Meio de montagem para Microscopia de Fluorescência***

Para evitar a queima da fluorescência durante as análises foi utilizado um meio de montagem de lamina com n-propil galato como *antifading*. Foi adicionado 6g/L de n-propil galato em glicerol a 50% em TBS 2x (40mM de Tris e 308mM de NaCl, pH 8,0).

#### ***4.6 Manutenção da Cultura***

As células foram rotineiramente cultivadas em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> em meio MEM e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura foi subcultivada com tripsina 0,025% em ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 0,02% em uma taxa de diluição de 1:3 em intervalos de 72 horas, de forma a manter a fase de crescimento exponencial da cultura.

#### ***4.7 Fotossensibilizante***

O fotossensibilizante utilizado foi a Cloroalumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AlPcS<sub>4</sub>), obtida da Frontier Scientific Porphyrin. A droga foi inicialmente diluída em PBS na concentração de 1mM e estocada a 4°C protegida da luz. Para sua utilização em cultura, a

solução estoque de 1mM foi esterelizada por calor úmido (autoclave) e então diluída na concentração final de 10 $\mu$ M em meio MEM sem SFB.

#### ***4.8 Experimento***

Para a avaliação da resposta celular frente a TFD as células foram divididas em 4 grupos:

1. Controle: grupo isento de qualquer tratamento.
2. AIPcS<sub>4</sub>: grupo incubado com AIPcS<sub>4</sub> e mantido na ausência de luz.
3. *Laser*: grupo submetido apenas à irradiação.
4. TFD: grupo incubado com AIPcS<sub>4</sub> e posteriormente irradiado, caracterizando a Terapia Fotodinâmica.

Para o ensaio de fluorescência 0, 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos as células foram submetidas ao tratamento para análise dos filamentos de actina e microscópio de fluorescência. Os ensaios de adesão célula-célula e matriz-célula, foram realizados 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos para avaliar modificações na capacidade de adesão ao longo dos períodos analisados. Para avaliar alterações no comportamento das células tratadas com tripsina o ensaio de resistência foi realizado logo após a exposição das células a luz. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### ***4.9 Incubação e Irradiação***

Culturas de células HEp<sub>2</sub> foram incubadas com 300 $\mu$ L de fotossensibilizante AIPcS<sub>4</sub> a 10 $\mu$ M em meio de cultura MEM sem SFB por 60 minutos a 37°C. Após o período de incubação a cultura foi lavada 2 vezes com PBS, para a retirada do fotossensibilizante excedente, e adicionada 300 $\mu$ L de meio MEM sem SFB e se vermelho de fenol. A irradiação foi procedida no escuro com um aparelho clínico portátil de *Laser* semiconductor Kondortech Bio Wave LLLT Dual com meio ativo de InGaAlP (Fosfeto de índio-gálio-alumínio) operando no modo contínuo em comprimento de onda (?) de 660nm, potência de 30mW, densidade de energia de 4,5J/cm<sup>2</sup> e densidade de potência de 30mW/cm<sup>2</sup>.

#### ***4.10 Ensaio de Adesão Célula-Célula***

Para o ensaio de adesão célula-célula foi utilizado o marcador de viabilidade celular Calceína AM. A preparação da solução estoque foi feita diluindo o corante em DMSO até a

concentração de 1mM e mantida a -20°C, para uso a solução estoque foi diluída em meio sem soro na concentração de 2µM e utilizada no prazo de 24 horas.

A cultura foi tratada com solução de tripsina/EDTA por aproximadamente 5 minutos, a reação foi neutralizada com meio MEM com 10% de SFB e as células foram centrifugadas por 3 minutos a 2500rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se uma solução de Calceína AM (2µM), a amostra foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Para a retirada do corante a amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com meio MEM sem SFB, esse procedimento foi repetido por mais 2 vezes sendo a última ressuspensão feita com meio MEM com 2% de SFB. Subseqüentemente 10<sup>5</sup> células foram depositadas em cada poço, de uma placa de 96 poços, contendo uma monocamada confluyente de células HEP<sub>2</sub> e então incubadas por 2 horas a 37°C para permitir a adesão. A cultura foi lavada gentilmente 3 vezes com meio sem soro para a retirada das células não aderidas e a contagem das células viáveis aderidas realizada com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica DMLB). Foram contados 3 campos em cada poço.

#### ***4.11 Preparação de Placas com Colágeno***

O colágeno de placenta humana tipo IV (Sigma) foi reconstituído em 0,25% (vol/vol) de ácido acético na concentração de 1mg/mL e refrigerado a 4°C. Para cobrir superfícies as placas foram incubadas com 272µL/poço da solução de colágeno na concentração de 10µg/mL, em PBS, *overnight* a 4°C. Posteriormente a solução protéica foi retirada e os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com uma solução de BSA a 1% (peso/vol) por 30 minutos a temperatura ambiente. Retirada a solução de BSA, as placas foram gentilmente lavadas 3x com PBS e mantidas a 4°C e úmidas com PBS até suas utilizações.

#### ***4.12 Microscopia de Fluorescência***

Células na concentração de 10<sup>5</sup> células/poço foram cultivadas em lamínulas cobertas com colágeno humano tipo IV e então submetidas aos tratamentos. Após o período de incubação a cultura foi fixada por 15 minutos a 37°C com paraformaldeído a 4%. Para eliminar os grupos aldeído livres, resultantes da fixação, as lamínulas foram tratadas com uma solução a 50mM de NH<sub>4</sub>Cl por 10 minutos. As células foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos, bloqueadas por 30 minutos com solução BSA 1% em

PBS e incubadas por 1 hora com faloidina-TRITC a 500µg/mL em solução de BSA 1%. Para a retirada do excesso de corante as células foram lavadas 3x, sendo de 10 minutos cada lavagem, com PBS a 37°C. As lamínulas foram montadas em lamínulas contendo meio de montagem com N-propil-galato. As amostras foram analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência modelo Leica DMLB acoplado ao sistema fotográfico Leica MPS-30. Foram contadas 1000 células por lamínula.

#### ***4.13 Ensaio de Adesão Colorimétrico Célula-Matriz***

A cultura submetida aos tratamentos, após os períodos de incubação, foram plaqueadas na concentração de  $10^5$  células/poço em placas cobertas de colágeno humano tipo IV e incubadas a 37°C em meio MEM com 2% de SFB por 2 horas para permitir a adesão. Após este período as células foram gentilmente lavadas 3 vezes com PBS, para a retirada das células não aderidas, e fixadas com etanol 96% por 10 minutos a temperatura ambiente. A cultura fixada foi marcada com cristal violeta a 0,1% em etanol 70% por 30 minutos. A placa foi lavada com água destilada, para a retirada do excesso do corante, e então adicionou-se 300µL de DMSO para a extração do marcador. A densidade óptica das placas foi lida em leitor de ELISA Spectra Count, operando no comprimento de onda de 570nm. O *background* foi determinado usando a absorvância de 3 poços cobertos com colágeno tipo IV e bloqueados com BSA submetidos a todos os tratamentos descritos acima, o valor da absorvância desses poços foi subtraído dos resultados obtidos.

#### ***4.14 Ensaio de resistência a tratamento com tripsina***

As células foram plaqueadas na concentração de  $10^5$  células por poço e incubadas *overnight* para adesão. Imediatamente após os tratamentos as células foram lavadas com PBS e incubadas com 300µL de solução tripsina/EDTA a 37°C. A reação foi neutralizada com meio MEM com 10% de SFB 2, 6 e 9 minutos após o início da tripsinização. As células tripsinizadas foram removidas lavando-se gentilmente 2 vezes com PBS. As células que permaneceram aderidas foram fixadas com etanol 96% por 10 minutos a temperatura ambiente. A cultura foi marcada com cristal violeta a 0,1% em etanol 70% por 30 minutos e o excesso de corante retirado com água destilada. Para a solubilização do marcador foi adicionado 300µL de DMSO para a extração do marcador. A densidade óptica das placas foi

determinada em leitor de ELISA Spectra Count, operando no comprimento de onda de 570nm. A absorvância de 300 $\mu$ L de DMSO foi subtraído de todos os valores obtidos.

#### ***4.15 Análises estatísticas***

Os dados foram apresentados na forma de média com desvio padrão. Todos os resultados apresentaram uma distribuição normal gaussiana permitindo a utilização do teste ANOVA na comparação de dois grupos. A significância estatística foi admitida com  $P < 0,05$  sendo  $P < 0,1$ ;  $p < 0,01$  e  $P < 0,001$  considerados significante, muito significante e extremamente significante respectivamente. Para realização das análises estatísticas e gráficos foram utilizando os softwares GraphPad InStat<sup>®</sup> e Microcal Origin<sup>®</sup> 6.0 respectivamente.



## 5 RESULTADOS

### *5.1 Estrutura e distribuição dos filamentos de actina*

A distribuição e estrutura dos filamentos de actina, após o tratamento fotodinâmico, foram acompanhadas através da técnica de microscopia de fluorescência, utilizando Faloidina-TRITC como marcador.

A distribuição e organização dos filamentos de grande parte das células dos grupos Controle, AIPcS<sub>4</sub> e *Laser* nos tempos de 0 hora (Fig.6), 6 horas (Fig.8), 12 horas (Fig.10), 24 horas (Fig.12) e 48 horas (Fig.14) obedeceram a um mesmo padrão. Em todas as amostras é possível observar uma distribuição homogênea dos filamentos por todo o citoplasma celular, formando inúmeras fibras de estresse. O padrão encontrado nesses grupos indica uma conexão estável das células ao substrato, portanto, a exposição da cultura somente com a droga AIPcS<sub>4</sub> a 10 $\mu$ M sem o contato com luz, ou somente com *Laser* nos parâmetros utilizados, não acarreta nenhuma alteração nos filamentos de actina da linhagem HEP-2.

Em contrapartida as células submetidas ao tratamento com fotossensibilizante e subsequentemente com a irradiação *Laser* demonstraram alterações significativas nos filamentos de actina.

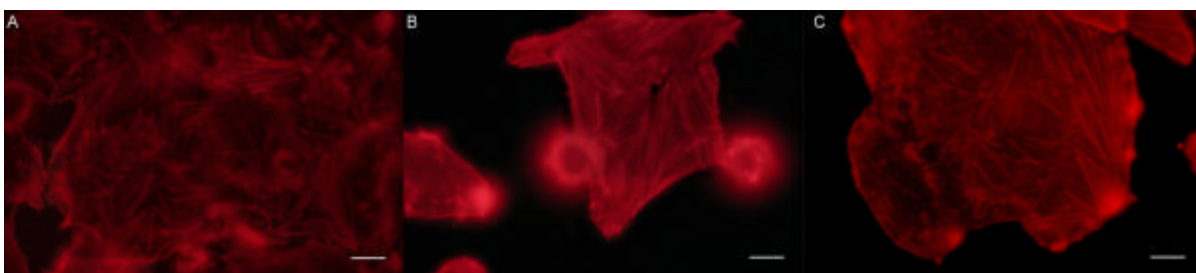
Posterior a aplicação da TFD, caracterizando o tempo 0 hora (Fig. 7), observou-se uma redução dos filamentos de actina na região central da célula. Esses filamentos aparecem mais concentrados nas regiões de contato com o substrato. 90% das células aparentam ter sofrido retração e é possível notar a presença de inúmeras expansões filamentosas semelhantes a filopódios contendo filamentos de actina orientados paralelamente.

No período de 6 horas após a terapia (Fig. 9) 55% das células apresentaram marcação reduzida, principalmente na região central, isso se deve ao decréscimo do número de actina em forma de filamentos. Nessas células as fibras de estresse são encontradas na periferia celular e a coloração da faloidina-TRITC se apresenta pontuada na região central. Do mesmo modo, 42,6% das células incubadas por 12 horas após a TFD (Fig.11), demonstraram uma desorganização do citoesqueleto, porém acompanhada de retração celular com forte marcação na região cortical. Este grupo apresentou um número reduzido, quando comparado ao grupo de 6 horas, de células com o citoesqueleto desorganizado.

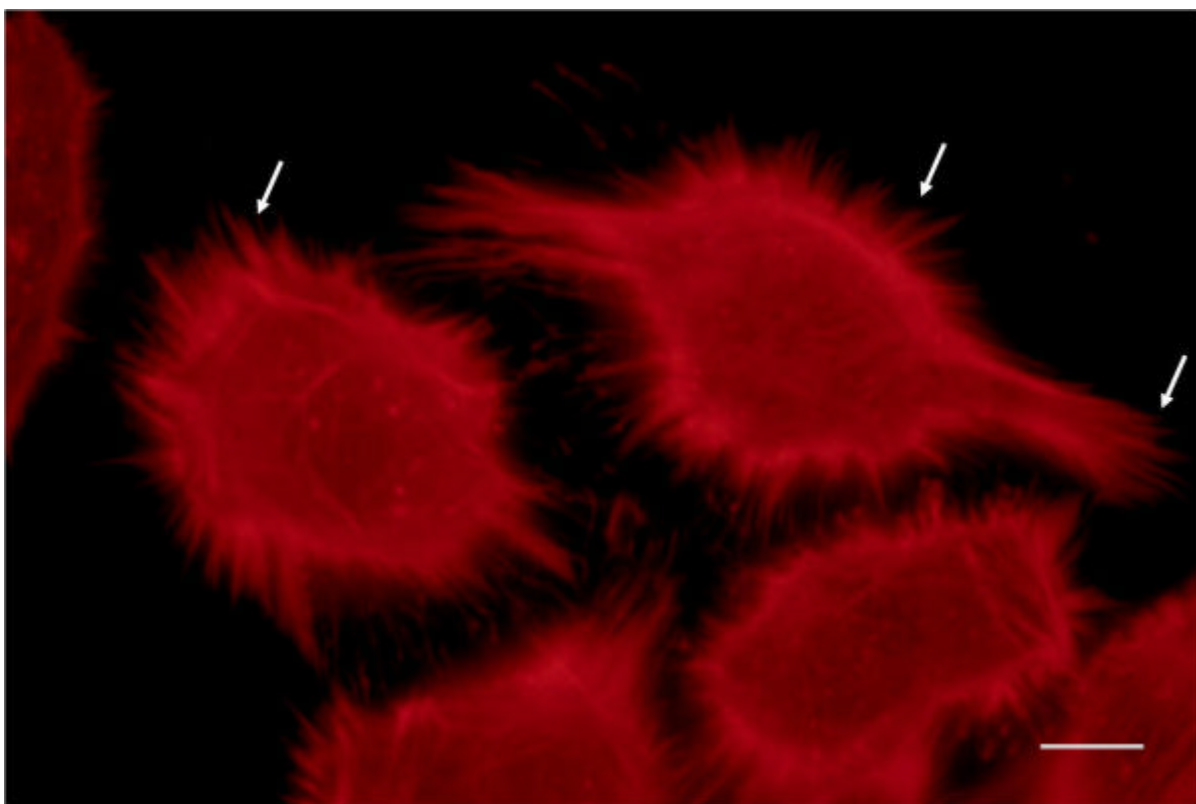
Ao analisar os grupos de 24 horas (Fig.13) e 48 horas (Fig.15) foi perceptível o aumento crescente do número de células com o arranjo dos filamentos de actina semelhantes

aos do grupo controle, 72% e 78% respectivamente (Fig. 16). O restante da população apresentou retração celular avançada com coloração intensa na região periférica do citoplasma.

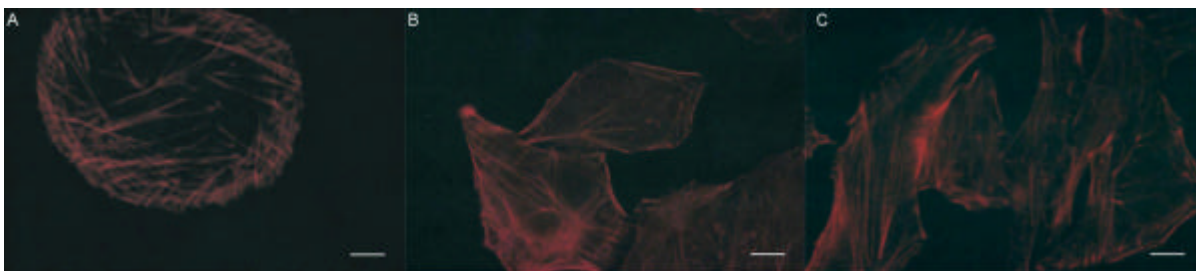
Os dados obtidos evidenciam o citoesqueleto como sendo alvo da TFD, causando alterações severas na estrutura e distribuição dos filamentos de actina de células HEp-2, além da retração celular. Consequentemente acarreta danos à organização interna, estabilidade estrutural e mecânica das células.



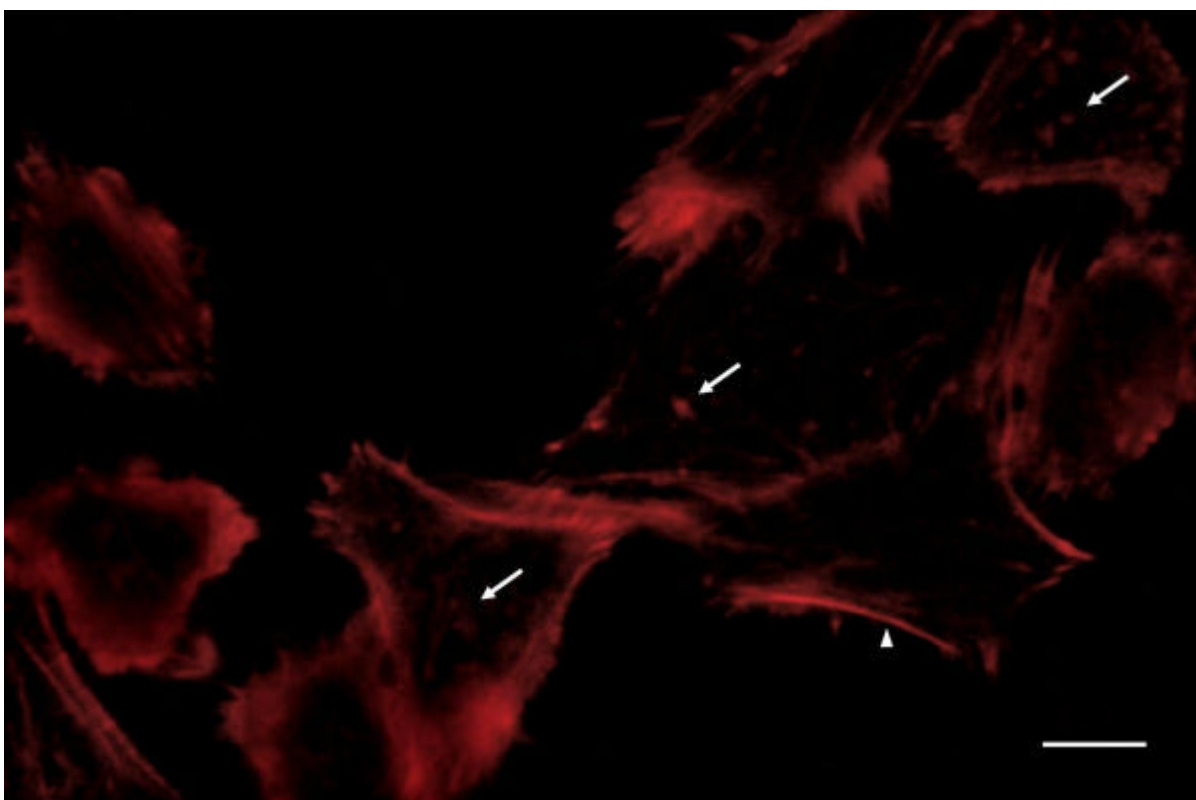
**Figura 6:** Células HEp-2 marcadas com faloidina-TRITC tempo 0h. Os grupos (A) Controle; (B) AlPcS<sub>4</sub> e (C) Laser apresentaram uma distribuição homogênea dos filamentos de actina por todo o citoplasma celular, formando inúmeras fibras de estresse. Barra=10µm.



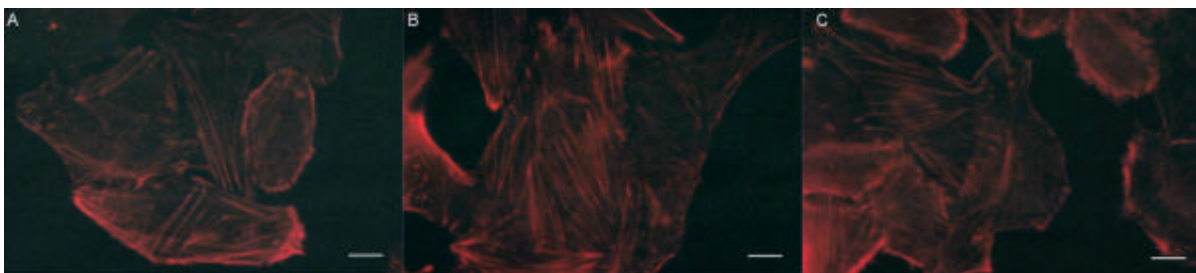
**Figura 7:** Células HEp-2, 0 hora após TFD com AlPcS<sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC. A rede de filamentos está presente nas células, porém há uma concentração maior nas regiões de contato com o substrato. As fibras de estresse aparecem orientadas paralelamente assemelhando-se a filopódios (setas). Barra=10µm.



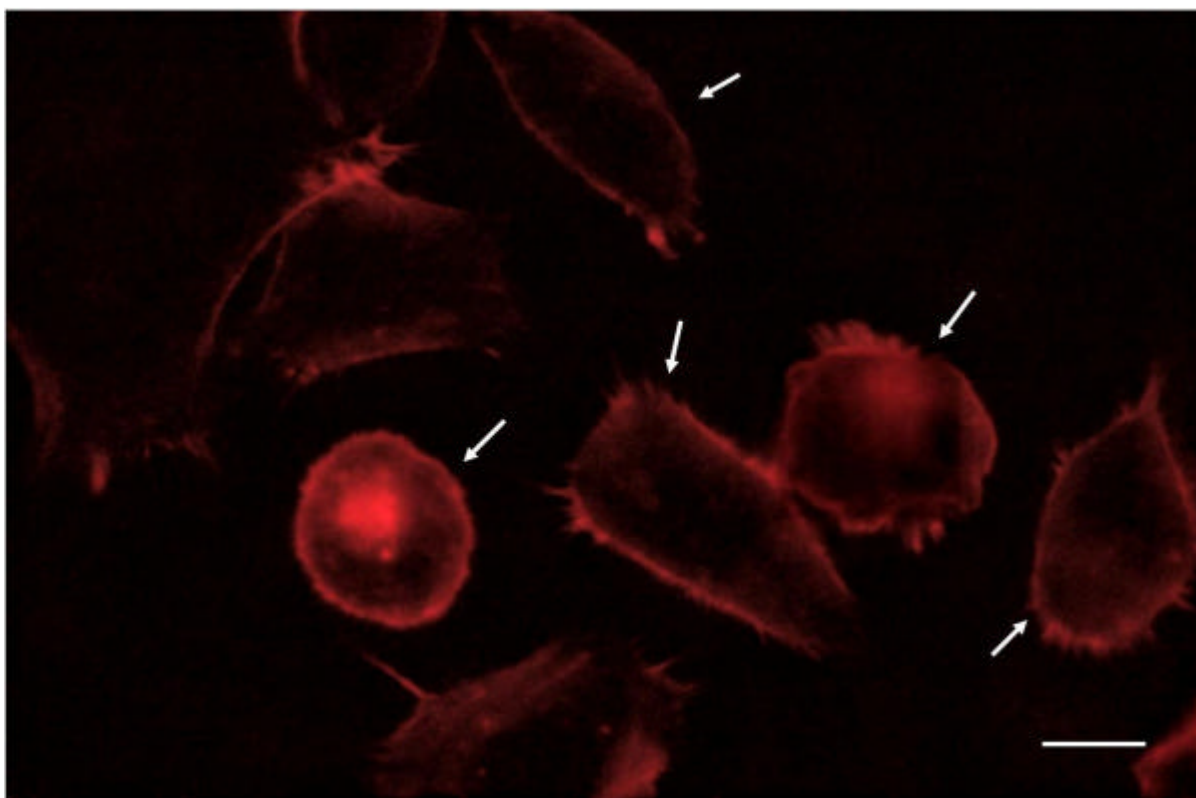
**Figura 8:** Células HEp-2 marcadas com faloidina-TRITC tempo 6h. Os grupos (A) Controle; (B) AlPcS<sub>4</sub> e (C) Laser apresentaram uma distribuição homogênea dos filamentos de actina por todo o citoplasma celular, formando inúmeras fibras de estresse. Barra=10µm.



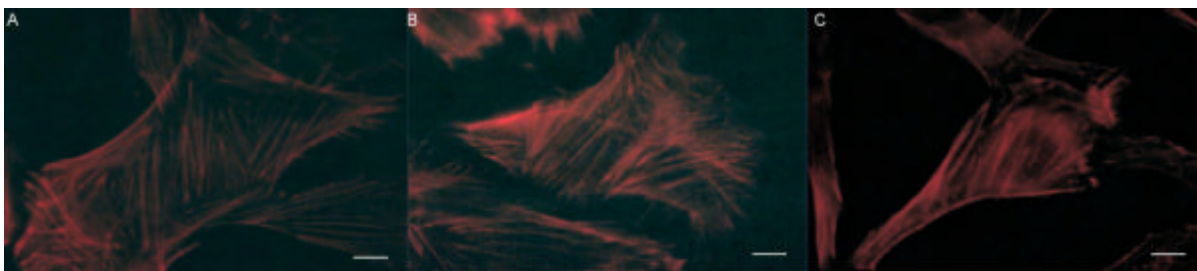
**Figura 9:** Células HEp-2, 6 horas após TFD com AlPcS<sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC. A rede de filamentos não se encontra distribuída por todo citoplasma, é possível notar a ausência de F-actina na região central das células e a presença de marcações pontuadas (setas). As fibras de estresse são vistas apenas na periferia das células (cabeça de seta). Barra=10µm.



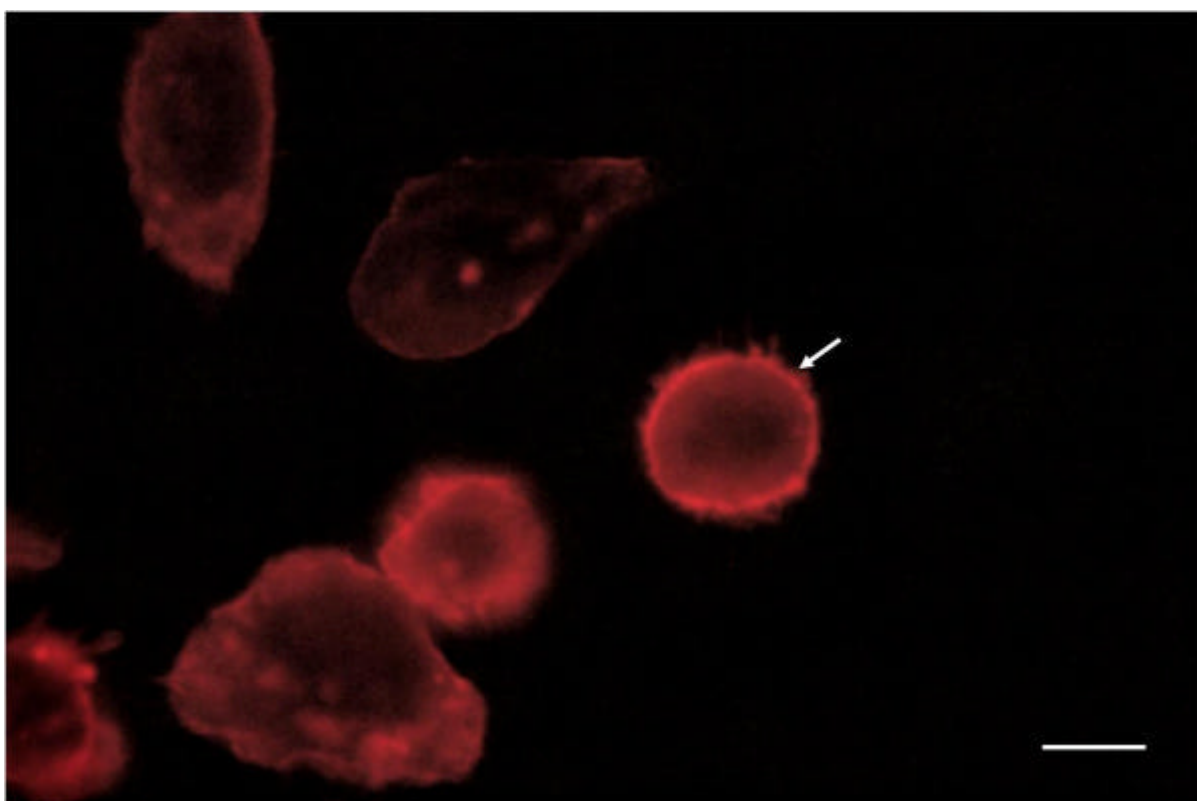
**Figura 10:** Células HEp-2 marcadas com faloidina-TRITC tempo 12h. Os grupos (A) Controle; (B) AlPcS<sub>4</sub> e (C) Laser apresentaram uma distribuição homogênia dos filamentos de actina por todo o citoplasma celular, formando inúmeras fibras de estresse. Barra=10µm.



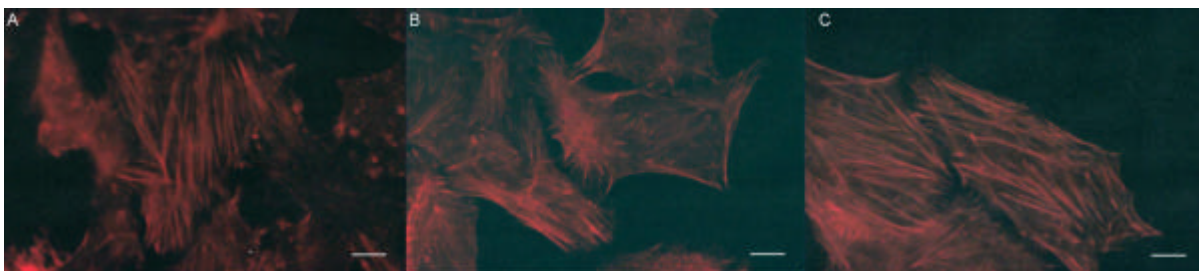
**Figura 11:** Células HEp-2, 12 horas após TFD com AlPcS<sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC. O citoesqueleto de actina se mantém desorganizado e as células retraídas (setas). Barra=10µm.



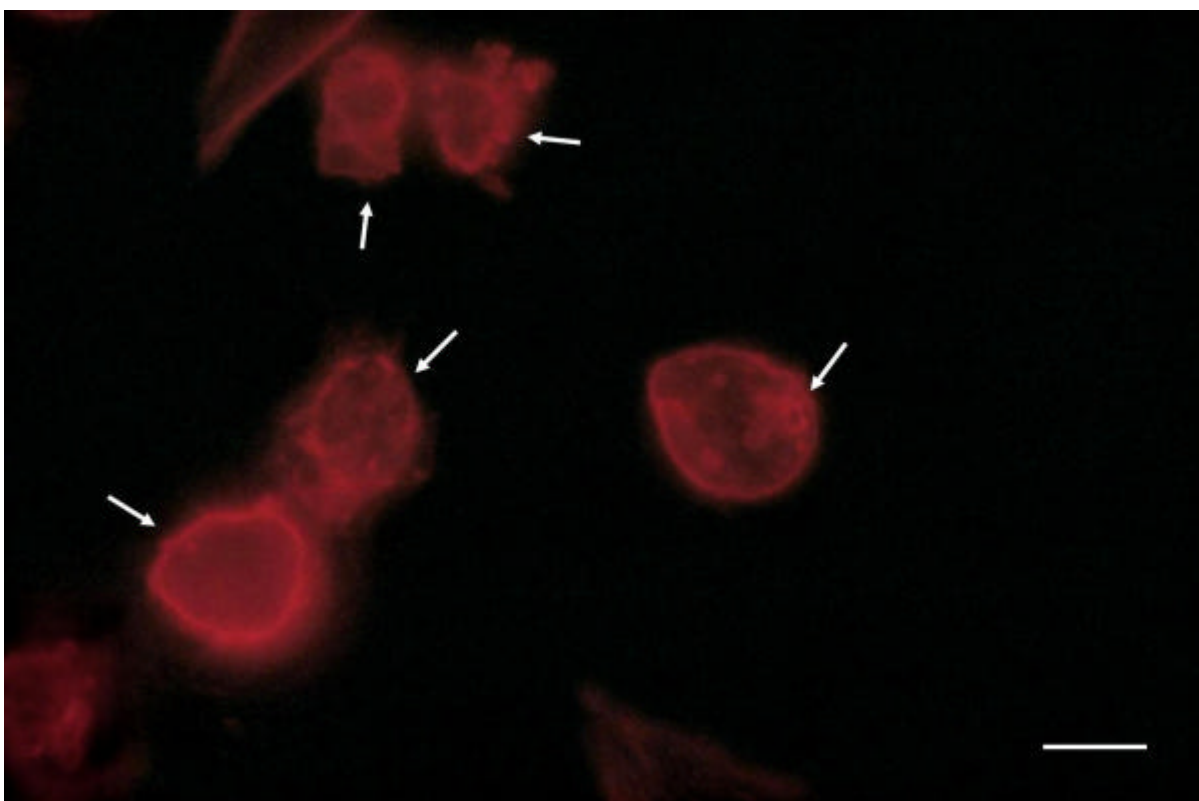
**Figura 12:** Células HEp-2 marcadas com faloidina-TRITC tempo 24h. Os grupos (A) Controle; (B) AIPcS<sub>4</sub> e (C) *Laser* apresentaram uma distribuição homogênia dos filamentos de actina por todo o citoplasma celular, formando inúmeras fibras de estresse. Barra=10µm.



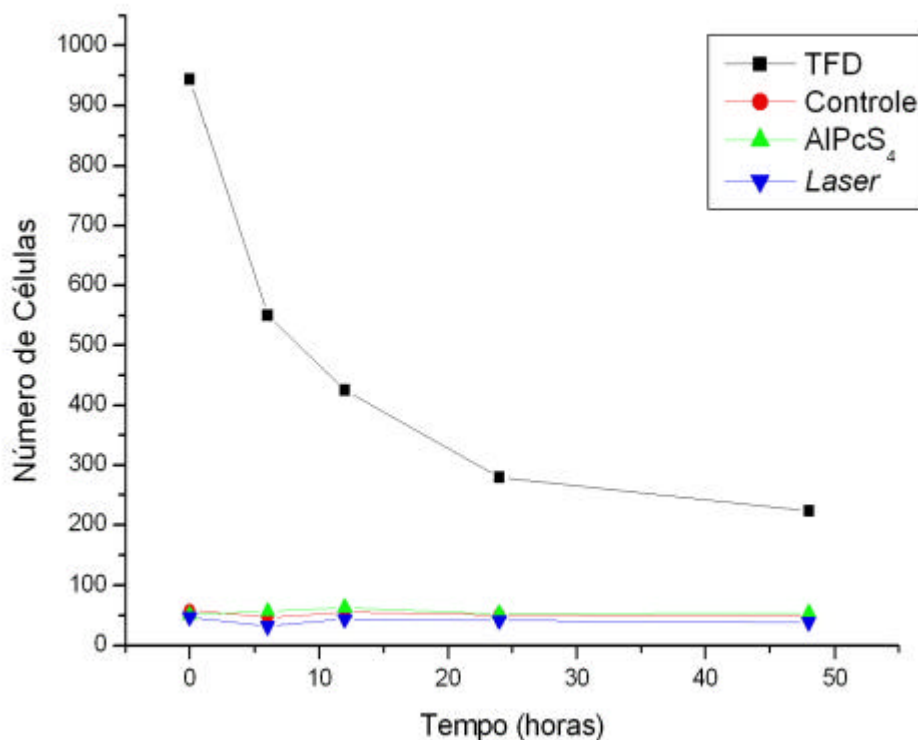
**Figura 13:** Células HEp-2, 24 horas após TFD com AIPcS<sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC. A retração celular é avançada com coloração intensa na região periférica do citoplasma (setas). Barra=10µm.



**Figura 14:** Células HEp-2 marcadas com faloidina-TRITC tempo 48h. Os grupos (A) Controle; (B) AlPcS<sub>4</sub> e (C) *Laser* apresentaram uma distribuição homogênea dos filamentos de actina por todo o citoplasma celular, formando inúmeras fibras de estresse. Barra=10µm.



**Figura 15:** Células HEp-2, 48 horas após TFD com AlPcS<sub>4</sub> a 10µM marcadas com faloidina-TRITC. A retração celular é avançada com coloração intensa na região periférica do citoplasma (setas). Barra=10µm.



**Figura 16: Gráfico do número de células com citoesqueleto de actina anormal.** Os grupos Controle AlPcS<sub>4</sub> e Laser permaneceram com um reduzido número de células com Factina anormal, porém o grupo TFD apresentou um alto numero de células com o citoesqueleto comprometido que foi decaindo com o passar dos tempos analisados.

### 5.2 Resistência a Tripsinização

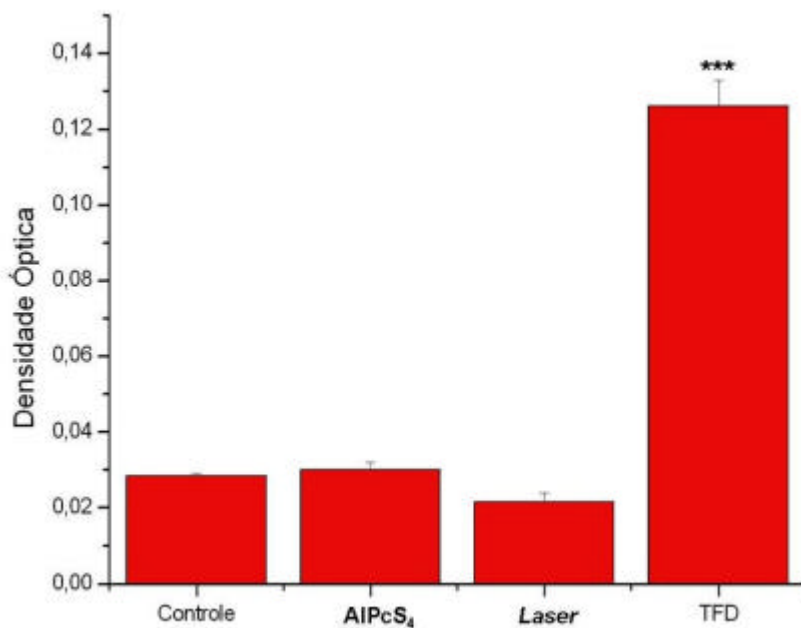
Para avaliar a capacidade das células de se soltarem de um substrato plástico imediatamente após os tratamentos, foi realizado o teste de resistência à tripsina.

As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser mantiveram o padrão esperado, a maioria não permaneceu aderida ao substrato após 2 minutos de tratamento com tripsina, o que foi mantido após 6 e 9 minutos (Fig. 20), os dados não demonstraram apresentar diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0.05$ ). Os resultados indicam a ausência de danos diretos que começam a suspensão das células dos grupos AlPcS<sub>4</sub> e Laser, demonstrando que, quando usados isoladamente, a luz Laser nos parâmetros utilizados, e o fotossensibilizante a 10 $\mu$ M, não influenciam a tripsinização celular.

As células submetidas à irradiação após incubação com o agente fotossensibilizante, ao contrário dos grupos anteriores, permaneceram em maior quantidade aderidas a placa de

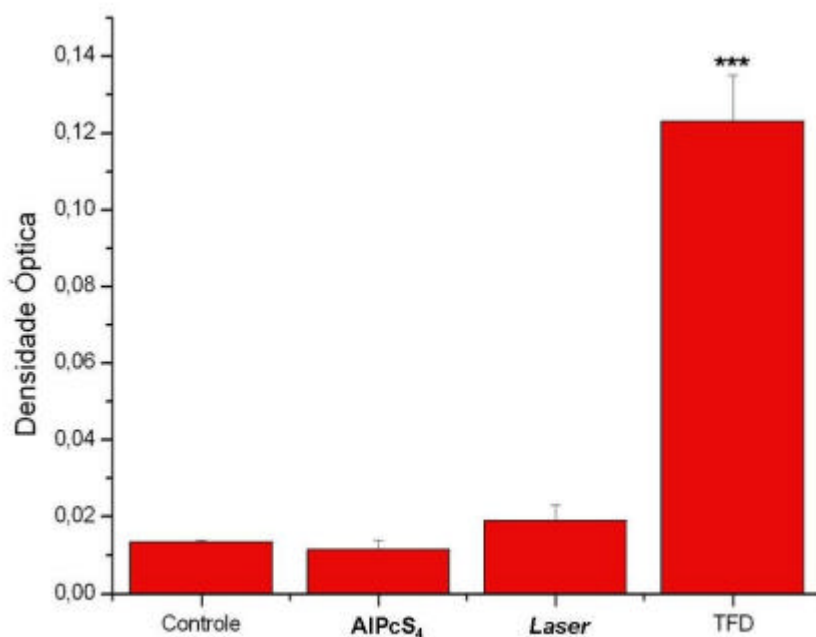
cultura. Após tratamento com tripsina por 2 minutos (Gráfico), 6 minutos (gráfico) e 9 minutos (gráficos) os dados obtidos pela leitura da densidade óptica das culturas marcadas com cristal violeta, apresentaram variações extremamente significativas ( $P < 0.001$ ).

Esses resultados mostram a influência da TFD nas células HEP-2 nas estruturas responsáveis pela adesão celular, os danos causados pela terapia impediriam a ação eficaz da tripsina na cultura.

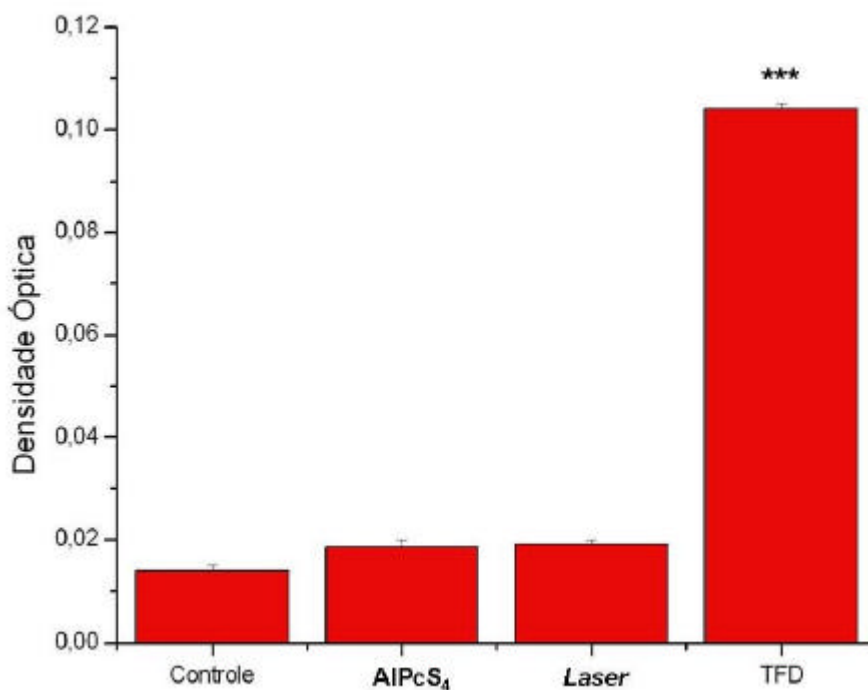


**Figura 17:** Gráfico da densidade óptica das amostras após 2 minutos de tratamento com tripsina. As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é extremamente significante (\*\*\*) ,  $P < 0,001$ , quando comparados com o grupo controle.





**Figura 18:** Gráfico da densidade óptica das amostras após 6 minutos de tratamento com tripsina. As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é extremamente significante (\*\*\*),  $P < 0,001$ , quando comparados com o grupo controle.



**Figura 19:** Gráfico da densidade óptica das amostras após 9 minutos de tratamento com tripsina. As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é extremamente significante (\*\*\*),  $P < 0,001$ , quando comparados com o grupo controle.

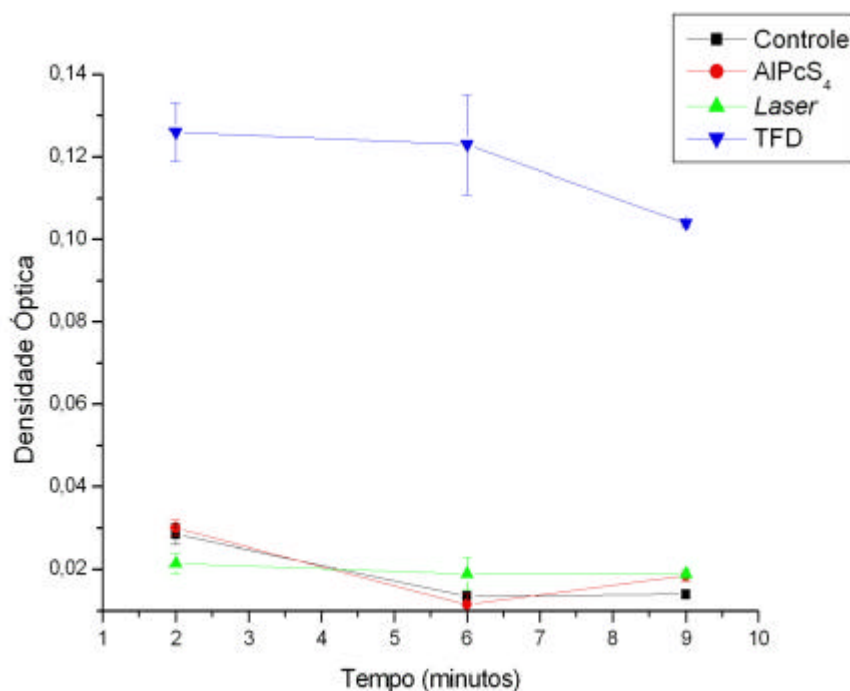


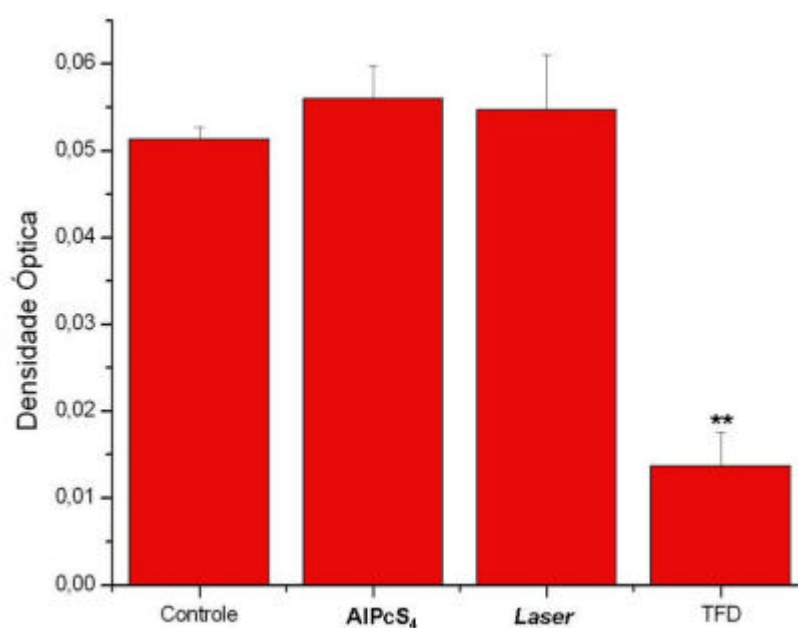
Figura 20: Gráfico da densidade óptica das amostras após 2, 6 e 9 minutos de tratamento com tripsina.

### 5.3 Ensaio Células-Matriz

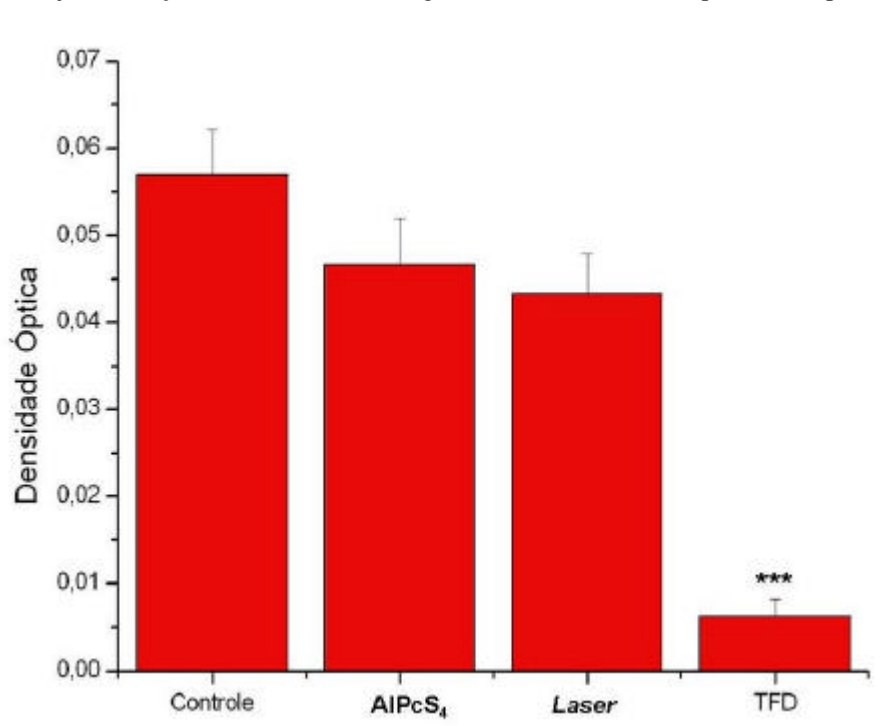
Para observar alterações referentes a adesão das células a um componente da ECM foi utilizado o teste colorimétrico, permitindo o estudo da quantidade de células que permanecem com a capacidade adesiva intacta após os tratamentos.

Após 6 (Fig.21), 12 (Fig.22), 24(Fig.23) e 48horas (Fig.24) as culturas dos grupos AlPcS<sub>4</sub> e *Laser* não apresentaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) na adesão a matriz quando comparadas ao grupo Controle. Porém foi possível observar um aumento da adesão celular ao decorrer do tempo nesses grupos, principalmente após 24 horas (Fig.25), resultado esperado considerando a taxa de crescimento da cultura HEP-2.

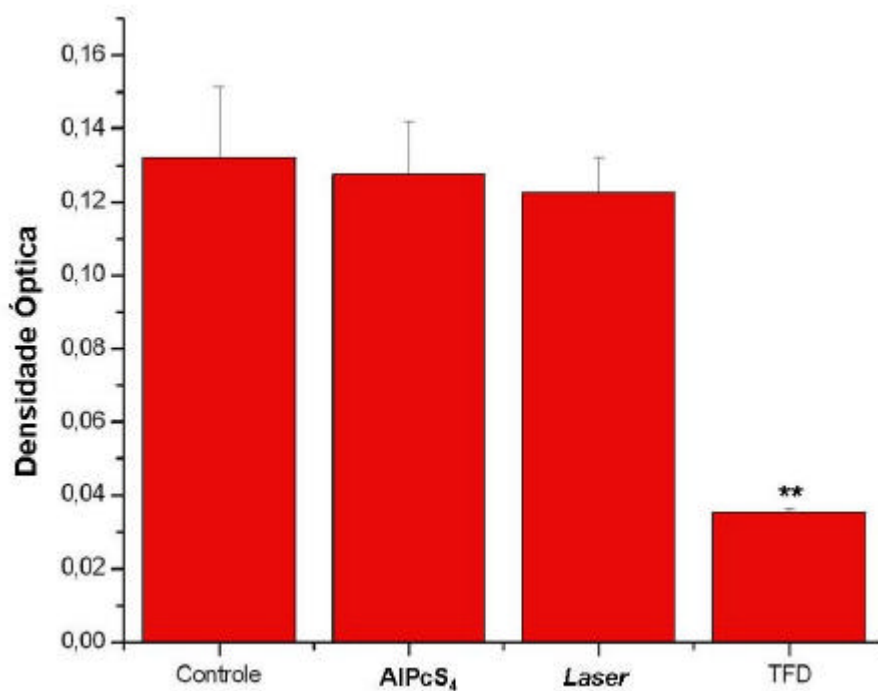
Ao avaliar o grupo TFD 6 horas (Fig.21), encontramos uma diferença muito significativa ( $P<0,01$ ) comparado ao grupo controle, indicando uma diminuição na taxa de adesão ao colágeno. Essa queda da quantidade de células aderidas aumenta após 12 horas (Fig.22), dando um valor extremamente significativo ( $P<0,001$ ). Passadas 24 horas (Fig.23) e 48 horas (Fig.24) o valor da densidade óptica torna a subir assumindo uma variância muito significativa ( $P<0,01$ ) quando comparados com o grupo controle do mesmo tempo. Portanto a TFD, nos parâmetros utilizados, influencia negativamente a adesão das células da linhagem HEP-2 ao colágeno tipo IV.



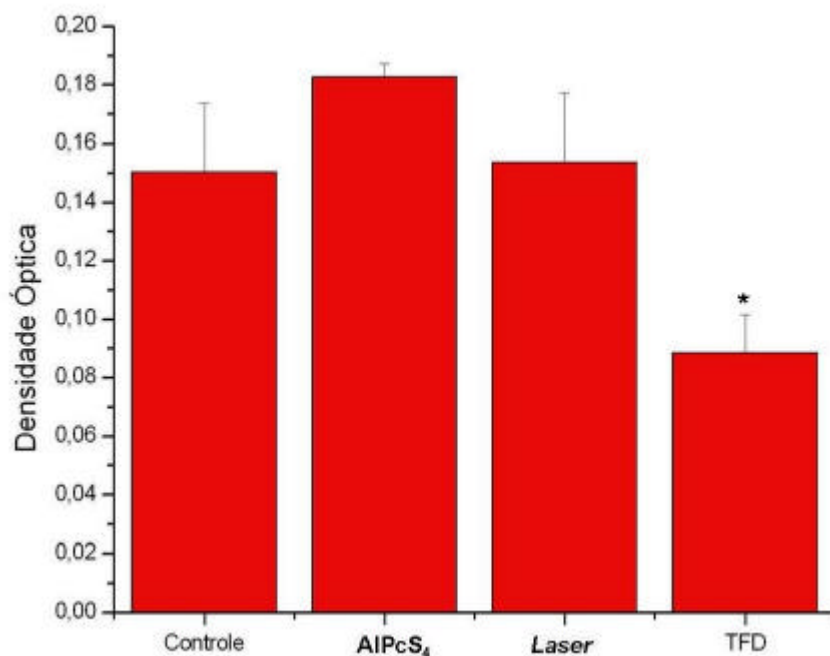
**Figura 21:** Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 6 horas após os tratamentos. As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é muito significante (\*\*),  $P < 0,01$ , quando comparados com o grupo controle.



**Figura 22:** Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 12 horas após os tratamentos. As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é muito significante (\*\*\*),  $P < 0,001$ , quando comparados com o grupo controle.



**Figura 23: Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 24 horas após os tratamentos.** As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é muito significante (\*\*),  $P < 0,01$ , quando comparados com o grupo controle.



**Figura 24: Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 48 horas após os tratamentos.** As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é significativa (\*),  $P < 0,1$ , quando comparados com o grupo controle.

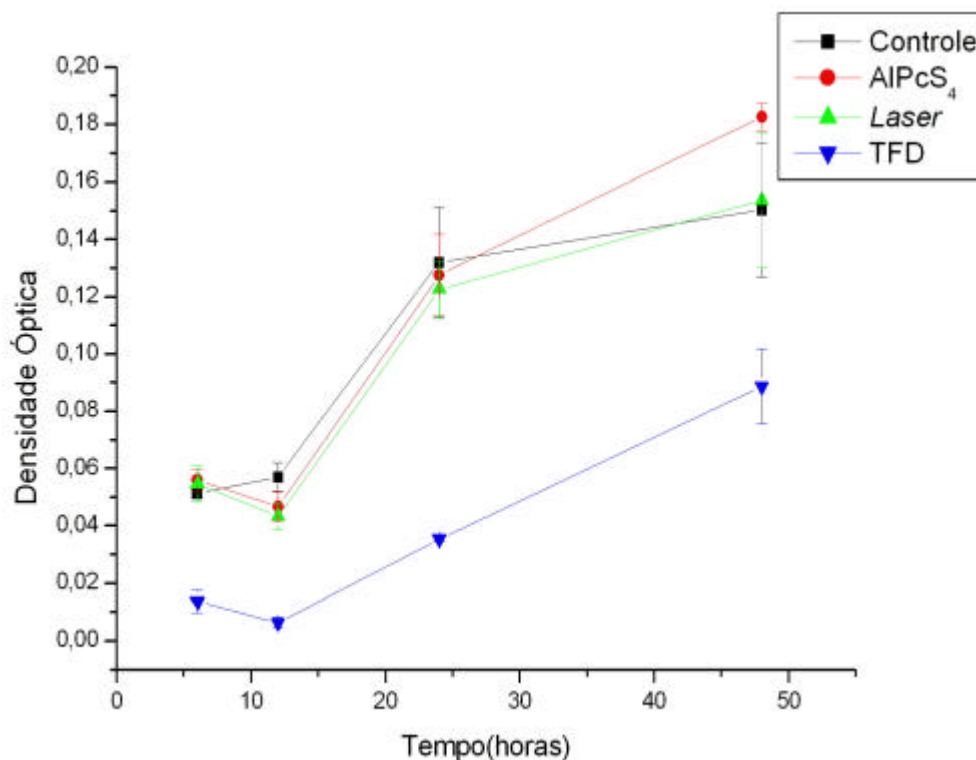


Figura 25: Gráfico do ensaio célula-matriz das amostras 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos.

#### 5.4 Ensaio adesão célula-célula

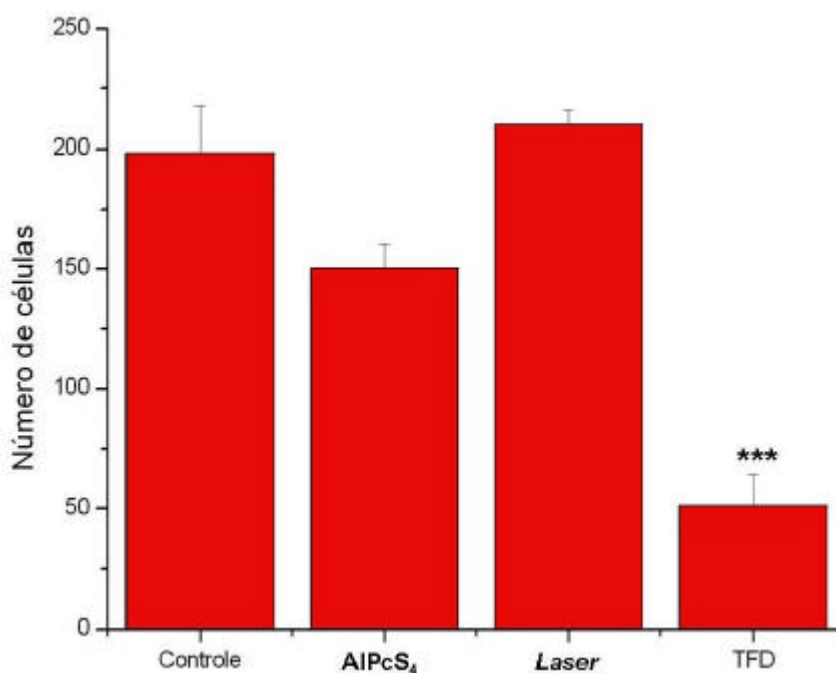
Para o estudo da interação entre células submetidas aos tratamentos e uma cultura de células HEP-2 em monocamada fez-se uso do indicador de viabilidade celular Calceína AM. Após os tratamentos as células foram incubadas por 6, 12, 24 e 48 horas para, então, o ensaio de adesão célula-célula ser realizado.

O grupo AIPcS<sub>4</sub> não apresentou resultados com diferenças significativas quando comparados com o grupo controle nos períodos estudados. Já o grupo Laser apresentou uma diferença muito significativa ( $P < 0,01$ ) após 24 horas (Fig.28), porém a variância dos dados comparados com o grupo controle não foi significativa nos tempos de 6 horas (Fig.26), 12 horas (Fig.27) e 48 horas (Fig.29).

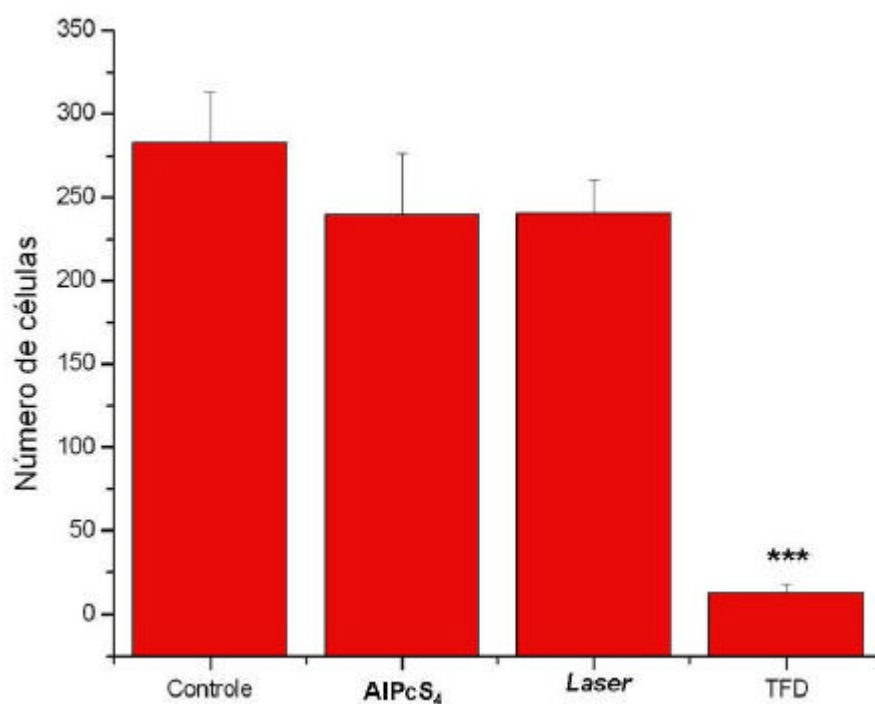
As culturas submetidas ao tratamento fotodinâmico após 6 (Fig.26), 12 (Fig.27) e 24 horas (Fig.28) tiveram o número de células aderidas à monocamada reduzido comparado às células do grupo controle, dando um valor extremamente significativo ( $P < 0,001$ ). Passadas 48 horas (Fig.29) a quantidade de células contadas foi maior que as dos grupos de tempo anteriores, mas ainda assim com valores muito significantes ( $P < 0,01$ ).

O comportamento dos grupos controle, AlPcS<sub>4</sub> e *Laser* em todos os tempos demonstra um aumento crescente de células aderidas ao decorrer dos tempos estudados. O mesmo não é observado no grupo TFD onde as taxas de adesão iniciam-se baixas, decrescem no tempo 12 horas e então, a partir de 24 horas, aumentam gradativamente (Fig. 30).

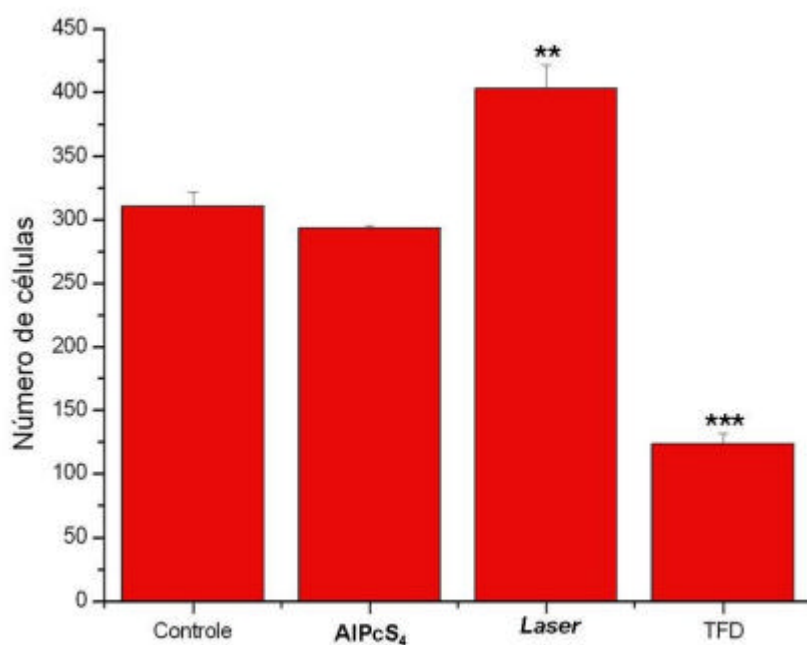
O ensaio de adesão célula-célula nos mostra que o agente fotossensibilizante e a fonte de luz nos parâmetros utilizados não exercem efeitos sobre a adesão entre células, ao contrário da TFD, que provoca alterações celulares que tem como consequência a redução da capacidade de interação com uma cultura em monocamada.



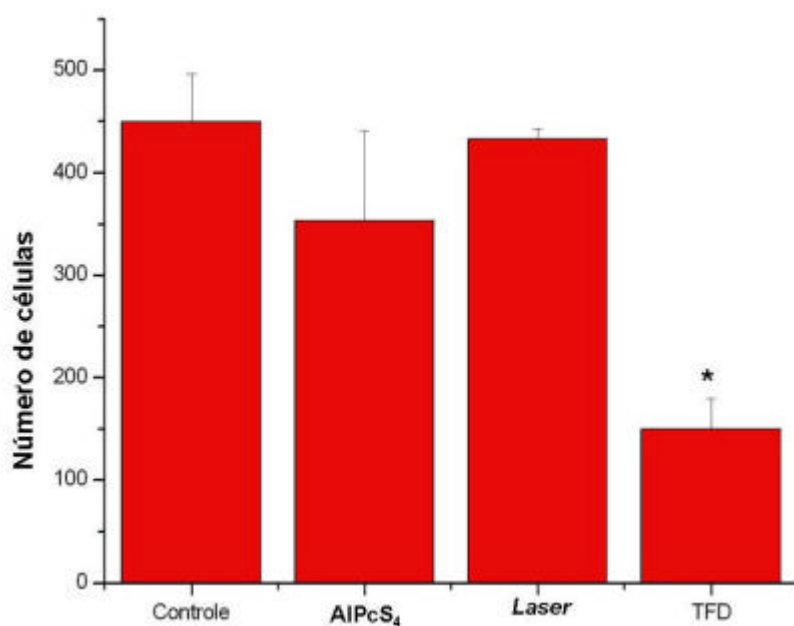
**Figura 26:** Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 6 horas após os tratamentos. As células dos grupos Controle, AlPcS<sub>4</sub> e *Laser* não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é extremamente significante (\*\*\*),  $P < 0,001$ , quando comparados com o grupo controle.



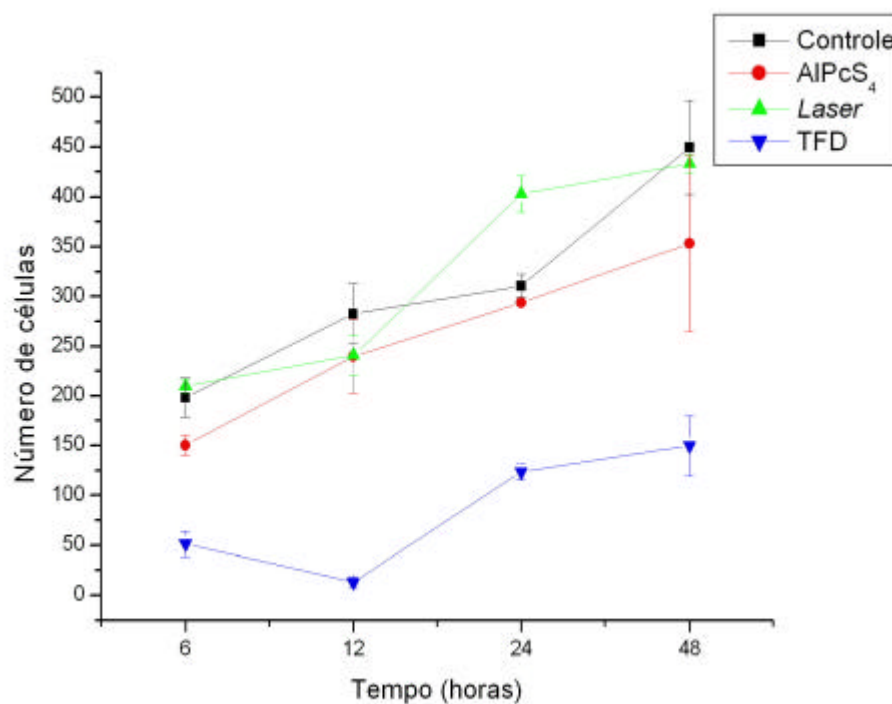
**Figura 27:** Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 12 horas após os tratamentos. As células dos grupos Controle, AIPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é extremamente significante (\*\*\*),  $P < 0,001$ , quando comparados com o grupo controle.



**Figura 28:** Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 24 horas após os tratamentos. As células dos grupos Controle, AIPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é extremamente significante (\*\*\*),  $P < 0,001$ , quando comparados com o grupo controle.



**Figura 29:** Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 48 horas após os tratamentos. As células dos grupos Controle, AIPcS<sub>4</sub> e Laser não apresentaram valores estatisticamente diferentes, ao contrário do grupo TFD cuja diferença dos valores é significante (\*),  $P < 0,1$ , quando comparados com o grupo controle.



**Figura 30:** Gráfico do número de células viáveis aderidas em uma monocamada 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos.



## 6 DISCUSSÃO

Desde a sua introdução até cerca de duas décadas, a TFD tem se tornado progressivamente uma técnica estabelecida para o tratamento de cânceres e, mais recentemente, outras doenças (PLATZER *et al.*, 2002). Três mecanismos que levam a destruição tumoral primária *in vivo* tem sido propostos: a fotoinativação direta da célula tumoral, a destruição vascular e a ativação do sistema imunológico (HASSAN *et al.*, 2000).

Nos dias atuais, com a aprovação de inúmeros fotossensibilizantes, a nova fase de desenvolvimento da TFD se concentrará no entendimento dos mecanismos da resposta de células e tecidos ao tratamento (MILLER *et al.*, 2007), ou seja, na fotoinativação direta das células. A procura dos alvos moleculares da terapia é intrinsecamente complexa. A variação do tipo celular, do fotossensibilizante e suas condições de incubação, e dos parâmetros utilizados para a iluminação podem alterar significativamente a resposta frente à TFD (CASTANO *et al.*, 2005).

Estudos referente à consequência da terapia nas funções celulares revelaram que a resposta ao estresse pode levar a uma mudança na sinalização por cálcio, no metabolismo de lipídios, na produção de citocinas e proteínas de estresse (NOWIS *et al.*, 2005). As enzimas, particularmente as proteínas quinases, são ativadas e fatores de transcrição são expressos (CASTANO *et al.*, 2005). Porém pouca atenção tem sido dada para os efeitos da TFD nas propriedades adesivas das células. A habilidade de células tumorais invadirem tecidos adjacentes e se disseminarem tem sido considerada um fator biológico para determinar a malignidade do tumor (BEAVON, 1999).

As moléculas de adesão celular, que compreendem as caderinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas, são importantes para o crescimento e metástase de muitos cânceres (MCGARY *et al.*, 2002). A sinalização, mediada por essas moléculas, influencia diversos processos celulares incluindo expressão gênica, ciclo celular e a morte celular programada (APLIN *et al.*, 1998).

O citoesqueleto das células desempenha papel crucial na sustentação celular e alterações em sua estrutura podem influenciar interações adesivas das células (KORB *et al.*, 2004). Esta rede é composta por filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários que por sua vez são formados por subunidades quimicamente distintas, actina, tubulina e proteínas classificadas como proteínas de filamentos intermediários (JANMEY, 1995). Este complexo de elementos fibrilares tem sido reconhecido como importante fator na

mediação da sinalização dependente e independente de adesão (MOJIMA et al., 1995; CAZAUBON et al., 1997). Em particular, mudanças na organização do citoesqueleto de actina resultam em alterações na fosforilação de resíduos de tirosina de inúmeras proteínas sinalizadoras localizadas na região de adesão focal (THAMILSELVAN; BASSON, 2005).

O fato da estrutura celular de actina ser apontada como crucial para a manutenção da adesão celular e um dos alvos da TFD (FERREIRA, 2004; UZDENSKY *et al.*, 2005; TSAI, 2005; JUARRANZ *et al.*, 2001) nos impulsionou a investigar os efeitos da terapia com AIPcS<sub>4</sub> aos filamentos de actina.

Os estudos foram realizados utilizando a sonda fluorescente faloidina-TRITC. As falotoxinas são um grupo de heptapeptídios bicíclicos derivados de cogumelos venenosos. O maior representante desse grupo, a faloidina, interage com filamentos de actina de maneira mais estável comparada com a interação com monômeros de actina (COOPER, 1987). A faloidina utilizada no trabalho foi isolada do cogumelo *Amanita phalloides* e se encontra conjugada com o fluoróforo TRITC, o que permite a marcação dos filamentos de actina de cultura de células fixadas.

A aplicação da TFD demonstrou modificar a estrutura dos filamentos de actina a partir de 0 horas. Outros fotossensibilizantes tem demonstrado remodelar o citoesqueleto de actina após irradiação, Seagrave e Burchiel (2000) observaram um reorganização do citoesqueleto após a terapia com benzo[a]pirene (BaP) e luz UVA. Os resultados por eles obtidos foram atribuídos ao estresse oxidativo desencadeado pela TFD e alterações na homeostase do Ca<sup>+</sup>. A exposição de células incubadas com BaP a UVA causou uma drástica depleção dos níveis celulares de adenosina trifosfato (ATP) acompanhado com a inibição da glicólise e da função mitocondrial.

Di Stefano e colaboradores (2001) relataram que após a TFD com o fotossensibilizante Purpurin-18 (Pu-18), ocorreu um aumento da geração de espécies reativas do oxigênio, depleção da glutatona, mudanças no potencial de membrana mitocondrial e carboxilação de proteínas específicas. Subsequentemente o mesmo grupo observou que a β-actina é uma das principais proteínas que sofrem oxidação, o que afetaria a arquitetura dos filamentos de actina levando a desorganização do citoesqueleto (MAGI et al., 2004).

Em células WiDr (adenocarcinoma humano) o citoesqueleto de actina se apresentou alterado e o marcador concentrado na região periférica das células, logo após o tratamento TFD-ALA em uma dose sub-letal (UZDENSKY *et al.*, 2005). Os autores ainda observaram um aumento das fibras de estresse nas regiões de contato com o substrato, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho. O ALA é um metabólico precursor do

fotossensibilizante protoporfirina IX que ao ser sintetizado se acumula na mitocôndria (CASTANO et al., 2004), dessa maneira a mitocôndria tem sido apontada como um alvo importante na TFD com ALA (GAD et al., 2001), assim como com BaP (SEAGRAVE; BURCHIEL, 2000) e PU-18 (DI ESTEFANO et al., 2001).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a TFD com AIPcS<sub>4</sub> é capaz de causar danos a mitocôndrias no mesmo modelo celular utilizado no presente trabalho (TAMIETTI et al., 2007), desse modo é possível sugerir um envolvimento da mitocôndria na remodelação do citoesqueleto de actina mediada por TFD-AIPcS<sub>4</sub>.

As alterações mitocôndrias observadas após a TFD-AIPcS<sub>4</sub> incluem redução do potencial de membrana mitocondrial e redução da cardiolipina (TAMIETI et al., 2007), sugerindo a peroxidação desse lipídio encontrado na membrana interna da mitocôndria associado ao citocromo c (KRISKA, *et al*, 2005). A consequência direta dessas perturbações mitocondriais é a liberação do citocromo c, evento crucial do mecanismo de morte celular por apoptose (CHIU; OLEINICK, 2001; KRISKA, *et al*, 2005)

Durante a apoptose o citocromo *c* liberado da mitocôndria interage com um fator pró-apoptótico (Apaf-1), que em presença de ATP, leva a formação de um complexo protéico nomeado apoptossomo. Subseqüentemente esse complexo associa-se com a caspase 9 em sua forma inativa (pro-caspase-9) induzindo sua auto-ativação por clivagem (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999; NOWIS, *et al.*, 2005; YAN; SHI, 2005). A caspase-9 é responsável pela ativação das caspases efetoras, dentre elas a caspase-3, iniciando uma cascata proteolítica própria da apoptose (KUZELOVA, *et al.*, 2004). A ativação dessas enzimas hidrolíticas levam a quebra de múltiplas proteínas celulares, fragmentação do DNA e consequente morte celular (ALMEIDA, *et al.*, 2004).

A TFD com o agente fotossensibilizante AIPcS<sub>4</sub> já demonstrou ser capaz de induzir a apoptose em células HEP-2 utilizando a mesma concentração e tempo de incubação do fotossensibilizante, e os mesmos parâmetros de irradiação usados por nós (SOUSA, 2005; OLIVEIRA, 2007). Sousa (2005) observou alterações na morfologia nuclear típicas do processo apoptótico. A fragmentação do DNA e a ativação da protease apoptótica caspase-3 foi relatada por Oliveira (2007) confirmando o tipo de morte células desencadeada pelo tratamento fotodinâmico com AIPcS<sub>4</sub>.

A cascata proteolítica tem como principal protease a caspase-3, no entanto outras caspases efetoras são ativadas (caspases 6 e 7) (SHI, 2004), essas caspases clivam e inativam inúmeras proteínas, incluindo as do citoesqueleto (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO,

2002), a quinase de adesão focal (FAK) (CARTHY, *et al.*, 1999) e a E-caderina (STEINHUSEN *et al.*, 2001).

Steinhusen e colaboradores (2001) reportaram a E-caderina como sendo um dos substratos da caspase-3 durante a apoptose, segundo os autores a protease é responsável pela clivagem do domínio citosólico da proteína, impedindo a formação do complexo caderina/catenina e comprometendo a adesão célula-célula.

Para o estudo do comportamento da cultura após a TFD na interação com outras células utilizamos o éster Calceína-AM. Este marcador atravessa a membrana de células vivas passivamente e é clivado por esterases intracelulares originando um derivado polar fluorescente (calceína) que permanece recluso no citoplasma celular (MONETTE *et al.*, 1998). A calceína tem demonstrado maior sensibilidade, comparada com a Anexina V, para a detecção de apoptose nas fases iniciais (GATTI *et al.*, 1998).

A redução da capacidade de adesão com outras células foi um dos resultados obtidos após a TFD com AIPcS<sub>4</sub> (Fig. 30). Esse comportamento frente à terapia foi observado por Foultier e colaboradores (1994) utilizando um derivado de hematoporfirina, os autores relataram uma diminuição na adesividade de células de câncer de cólon a uma monocamada de células endoteliais. Galaz e colaboradores (2005) demonstraram que a TFD com a Zn(II) ftalocianina foi responsável pela redução na expressão de E-caderina em cultura de queratinócitos primário.

É sabido que células epiteliais dependem dos contactos apropriados de adesão célula-célula e célula-matriz para o crescimento e sobrevivência (METCALFE; STREULI, 1997). A TFD demonstrou interferir negativamente na adesão célula-célula. Para avaliar alterações da adesão entre células submetidas à terapia e à matriz extracelular utilizamos superfícies cobertas com colágeno do tipo IV.

A alteração da adesão entre célula e ECM foi extremamente influenciada pela TFD. Foi possível observar uma queda acentuada do número de células aderidas após o tratamento fotodinâmico. Runnels e colaboradores (1999) ao realizar o mesmo ensaio para avaliar a adesão em colágeno IV, fibronectina, laminina e vitronectina (componentes da ECM) obteve os mesmo resultados observados com TFD- AIPcS<sub>4</sub>. A redução da adesão de células OVCAR 3 (carcinoma de ovário humano) submetidas ao tratamento com BPD-MA foi atribuída ao alto índice de morte celular observado na cultura, porém, mesmo com as taxas decrescentes de integrina- $\beta_1$  nas placas de adesão focal, não ocorreram diferenças na expressão dessa proteína.

As interações das células com proteínas da ECM geram uma cascata de sinalização importante para o crescimento, sobrevivência e migração. As integrinas compõe uma família

de receptores transmembrana que tem sido reconhecido pelo seu papel em conectar a ECM ao citoesqueleto de actina, na regulação da morfologia celular e arquitetura do tecido (SCHLAEPFER *et al.*, 1999). As integrinas expressas pelo epitélio incluem diversas integrinas- $\beta_1$  ( $\alpha_1 \beta_1$ ,  $\alpha_2 \beta_1$ ,  $\alpha_3 \beta_1$ ,  $\alpha_5 \beta_1$ ,  $\alpha_6 \beta_1$ , e  $\alpha_9 \beta_1$ ),  $\alpha_6 \beta_4$ ,  $\alpha_v \beta_5$  e  $\alpha_v \beta_6$  (GILCREASE, 2007).

A sinalização celular via integrina pode levar a fosforilação de inúmeras proteínas, porém a FAK possui um papel fundamental nessa cascata de sinalização. A ativação da integrina induz a fosforilação e ativação da FAK (BURRIDGE *et al.*, 2006), que por sua vez é responsável pela regulação de vários eventos importantes para a célula, podendo promover a migração celular, proliferação e prevenção da apoptose (CARY; GUAN, 1999).

A TFD demonstra não apenas destruir as células tumorais (DOUGHERTY *et al.*, 1998; OCSHNER, 1997; FERREIRA *et al.*, 2004) como também reduz a metástase do câncer (GOMER *et al.*, 1987; ROUSSET *et al.*, 1999).

A formação de metástase inclui a separação das células malignas do tumor primário, penetração nos vasos sanguíneos, o deslocamento na corrente sanguínea e a adesão a um tecido onde será estabelecida a metástase (UZDENSKY *et al.*, 2004a). Os processos de perda de adesão e adesão são igualmente importantes nesse processo.

Para avaliar a capacidade de desprendimento da cultura de células após a TFD com AIPcS<sub>4</sub> foi realizado o ensaio de resistência à tripsinização. A tripsinização é um procedimento que leva células aderidas a ficarem em suspensão, e é comumente utilizado em experimentos com cultura de células (UZDENSKY *et al.*, 2004a).

As células HEp-2 tratadas com TFD permaneceram fortemente aderidas ao substrato após 2, 6 e 9 minutos de tratamento com tripsina, ao contrário das células do grupo controle, AIPcS<sub>4</sub> e Laser (Fig.20). Uzdensky e colaboradores (2004a) obtiveram resultados semelhantes quando avaliaram o aumento da adesão de células tratadas com TFD-ALA, relacionando o evento a danos diretos a moléculas de adesão. Denstman e colaboradores (1986) sugeriram que o processo fotodinâmico seria responsável pela inacessibilidade da tripsina aos seus sítios de clivagem próximos a lisina e arginina pela fotoindução de alterações na morfologia celular. Seagrave e Burchiel (2000) explicaram os efeitos combinados da BaP e UVA na resistência a tripsinização como sendo consequência da disfunção mitocondrial, que levaria a reorganização dos componentes do citoesqueleto de actina para a região periférica, assim como o observado nas células estudadas.

Danos diretos ao tumor primário podem causar um aumento no número de células tumorais liberadas na circulação (HILL; DENEKAMP, 1982), porém este processo nem

sempre induz a metástase (SALISBURY, 1975), já que para isso é necessário que as células mantenham a eficácia relacionada com a adesão celular.

Apesar de o fotossensibilizante AIPcS<sub>4</sub> induzir danos que influenciam a sobrevivência das células (TAMIETTI *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2007; SOUSA, 2005; FERREIRA *et al.* 2004), a pesquisa realizada com a células HEP-2 demonstrou que a terapia também induz danos que comprometem a adesão celular, o que reduz o potencial metastásico das células.

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho nos forneceu importantes informações referentes à adesão celular posterior a Terapia Fotodinâmica. Os dados obtidos nos permitiram concluir que:

- A TFD com o fotossensibilizador AlPcS<sub>4</sub> altera negativamente a adesão células-célula;
- Células da linhagem HEp-2 submetidas ao tratamento fotodinâmico não foram capazes de aderir de modo eficaz na superfície coberta por colágeno tipo IV;
- A organização dos filamentos de actina se mostrou comprometida posteriormente à aplicação da terapia;
- Células tratadas com o fotossensibilizante e posteriormente irradiadas demonstraram um aumento da resistência ao tratamento com tripsina;

Junto esses dados sugerem uma redução do potencial metastásico de células HEp-2 submetidas a TFD com o agente fotossensibilizante AlPcS<sub>4</sub>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.** v.74, p.656-669, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell.** 4. ed. Taylor and Francis Books, 2004.

ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU X-H; CHILDS, C.J.; SIBATA, C.H. Photossensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and photodynamic therapy.** v.1, p.27-42, 2004.

ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1704, p. 59-86, 2004.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Br. J. of Med. And Biol. Resc.** v.32, p.1053-1061, 1999.

ANDREWS, N.A.; JONES, A.S.; HELLIWELL, T.R., *et al.* Expression of the E-cadherin-catenin adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. **Br. J. Cancer.** v.75, n. p.1474-1480, 1997.

APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K.; JULIANO, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrin, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacological Rev.** v.50, n.2, p.197-263, 1998.

BALL, D.J.; MAYHEW, S.; VERNON, D.I.; GRIFFIN, M.; BROWN, S.B. Decreased efficiency of trypsinization of cells following photodynamic therapy: Evaluation of a role for tissue transglutaminase. **Photochem. Photobiol.** v.73, n.1, p.47-53, 2001.

BEAVON, I.R.G. Regulation of E-cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade?. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.** v.52, p.179-188, 1999.

BURRIDGE K.; SARITA K.S.; SALLE J.L. Regulation of cell adhesion by protein tyrosine phosphatases 1. cell-matrix adhesion. **JBC.** n. v. p. 2006.

CAHN, W.S.; BRASSEUR, N.; LA MADALEINE, C.; QUELLET, R.; VAN LIER, J.E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **European J. of Cancer.** v.33, p.1855-1860, 2001.

CANTI, G.; LATTUADA, D.; NICOLIN, A.; TARONI, P.; VALENTINI, G.; CUBEDDU, R. Antitumour immunity induced by photodynamic therapy with aluminium disulfonated phthalocyanine and laser light. **Anti-cancer Drugs.** v.5, p.443-447, 1994.

CARY L.A.; GUAN J.L. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. **Frontier in Biosc.** v.4, p.102-112, 1999.



CARTHY, C.M.; GRANVILLE, D.J.; JIANG, H.; LEVY, J.G.; RUDIN, C.M.; THOMPSON, C.B.; MCMANUS, B.M.; HUNT, D.W. Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a porphyrin-derived photosensitizer: Bcl-2 and Bcl-xL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. **Lab. Invest.** v.79, p.953-965, 1999.

CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N. AND HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy.** v.1, p.279-293, 2004.

CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N. AND HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic therapy.** v.2, p.1-23, 2005.

CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumours immunity. **Nature Reviews.** v.6, p.535-543, 2006.

CAZAUBON S.; CHAVEROT N.; ROMERO A.; GIRAULT J.A.; ADAMSON P.; STRSBERG A.D.; COURAUND P.O. Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and –independent pathway. **J. Neurosci.** v.17, p.6203-6212, 1997.

CHIU, SM.; OLEINICK, N.L. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. **Br. J. Cancer.** v.84, p.1099-1106, 2001.

COOPER, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **The J Cell Biol.** v.105, p. 1473-1478, 1987.

CORBIERE, C.; LIAGRE, B.; TERRO, F.; BENEYTOU J.L. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. **Cell Res.** v.14, n 3, p.188-196, 2004.

CHRISTENSEN, T.; MOAN, J.; SMEDSHAMMER, L.; WESTERN, A.; RIMINGTON, C. Influence of hematoporphyrin derivative (Hpd) and light on attachment of cells to the substratum. **Photochem. Photobiophys.** v.10, p.53-59, 1985.

DENSTMAN, S.C.; DILLEHAY, L.E.; WILLIAMS, J.R. Enhanced susceptibility to Hpd-sensitized phototoxicity and correlated resistance to trypsin detachment in SV40 transformed IMR-90 cells. **Photochem. Photobiol.** v.43, p.145-147, 1986.

DI STEFANO A., ETTORRE A., SBRANAS., GIOVANE C., NERI, P. Purpurin-18 in combination with light leads to apoptosis or necrosis in HL60 leukemia cells. **Photochem. Potobiol.** v.73, n.?, p.290-296, 2001.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy: Review. **J. Natl. Cancer Inst.** v.90, p. 889-902, 1998.

DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A., *et al.* Photoradiation therapy for treatment of malignant tumors. **Cancer Res.** v.38, p.2628-2635, 1978.

DOUGHERTY, T.J.; LAWRENCE, G.; KAUFMAN, J.E., *et al.* Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. **J. Natl Cancer Inst.** v.62, p. 231-237, 1979.

DOUGHERTY, T.J. Photosensitization of malignant tumors. **Semin Surg Oncol.** v.2, p.24-37, 1986.

FEOFANOV, A.; SHARONOV, G.; GRICHINE, A.; KARMAKOVA, T.; PLJUTINSKAYA, A.; LEBEDEVA, V.; RUZIYEV, R.; YAKUBOVSKAYA, R.; MIRONOV, A.; REFREGIER, M.; MAURIZOT, J.C.; VIGNY, P. Comparative study of photodynamic properties of 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6. **Photochem. Photobiol.** v.79, p.172-188, 2004.

FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA G.; ZÂNGARO, R.A.; SILVA, N.S.; PACHECO, M.T.T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament after PDT with ALPsS4. **Lasers in Medical Science.** v.18, p. 207-212, 2004.

FIGGE, F.J.; WIELAND, G.S.; MANGANIELLEO, L.O.J. Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissue for porphyrins and metalloporphyrin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.68, 1948.

FOULTIER, M.T.; VONARX-COINSMAN, V.; CORDEL, S.; COMBRE, A.; PATRICE, T. Modulation of colonic cancer cell adhesiveness by hematoporphyrin derivative photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v.23, p.9-17, 1994.

GAD F.; VIAU G.; BOUSHIRA M.; BERTRAND R.; BISSONNETTE R. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells. **J Cutaneous Med and Surg.** p.8-13, 2001.

GALAZ S.; ESPADA J. STOCKERT J.C.; PACHECO M.; SANZ-RODRIGUEZ F.; ARRANZ R.; RELLO S.; CANETE A.; VILLANUEVA A.; ESTELLES M.; JUARRANZ A. Looss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatment. **J. Cellular Physiol.** v.205, p.86-96, 2005.

GATTI R.; BELLETTI S.; ORLANDINI G.; BUSSOLATI O.; DALLÁSTA V.; GAZZOLA G.C. Comparison of annexin V and calcein-am as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. **J. Histochem. Cytochem** v.46, p.895-900, 1998.

GILGREASE M.Z. Integrin signaling in epithelial cells. **Cancer Letters.** v.247, p.1-25, 2007.

GOMER. C.J.; FERRARIO, A.; MURPHREE, A.L. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumor metastasis. **Br. L. Cancer.** v.56, p.27-32, 1987.

GRUNE, T.; KLOTZ, L.O.; GIECHE, J.; RUDECK, .; SIES, H. Protein oxidation and proteolysis by nonradical oxidants singlet oxygen or peroxyntirite. **Free Radic. Biol. Med.** v.30, p.1243-1253, 2001.

HARINGTON, K.J.; SYRIGOS, K.S. The role of E-cadherin-catenin complex: more than an intracellular glue? **Annals of Surgical Oncology**. v.7, n.10, p.783-788, 2000.

HASSAN, T.; MOOR, A.C.E.; ORTEL, B. Photodynamic Therapy of cancer. In: WEICHSELBAUM, R.R. **Cancer Medicine**. Ontario, 2000. p.489-502.

HILL S.A.; DENEKAMO J.; Does local tumor heating in mice influence metastatic spread? **Br. J. Radiol.** v.55, n.444, 1982.

HUANG, Z. A review of progress in clinical Photodynamic Therapy. **Technol Cancer Res Treat.** v.4, n.3, p.283-293, 2005.

HYNES, R.O. Integrins: biodirectinal, allosteric signaling machines. **Cell.** v.110, p.673-687, 2002.

JANMEY, P.A. The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. **Physiological Reviews**. v.78, n.3, p.763-781, 1998.

JUARRANZ, A.; ESPADA, J.; STOCKERT, J.C.; VILLANUEVA, A.; POLO, S.; DOMÍNGUEZ, V.; CAÑETE, M. Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, -actinin and keratin of Hela cells. **Photochem Photobiol.** v.73, n.3, p.283-289, 2001.

KESSEL, D.; LUO, Y.; DENG, Y.; CHANG, C.K. The hole of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.** v.65, p.422-426, 1997.

KESSEL, D.; LUO, Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. **J. Photochem and Photobiol.** v.42, p. 89-95, 1998.

KESSEL, D.; LUGUYA, R.; VICENTE, M.G. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distribution. **Photochem. Photobiol.** v.78, p.431-435, 2003.

KORB, T.; SCHLÜTER, K.; ENNS, A.; SPIEGEL, H-U.; SENNINGER, N.; NICOLSOM, G.L.; HAIER, J. Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. **Exp. Cell Res.** v.299, p.236-247, 2004.

KRISKA, T.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A.W. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic-acid-treatment tumor cells. **Arc. of Biochem. and Biophysics.** v.433, p.435-446, 2005.

KUZELOVA, K.; PLUSKALOVA, D.; MARRINOW, I.; HRKAL, Z. Early apoptosis features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol B.** v.73, p.67-78, 2004.

- LIPSON, R.L.; BLADES, E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **Arch Dermatol.** v.82, p.508-516, 1960.
- LIU HF, XU SZ, ZHANG CR. Influence of CaNa<sub>2</sub> EDTA on topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **Chin Med J.** v.117, n.3, p.922-926, 2004.
- LO C.M., KEESE C.R., GIAEVER I. Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. **Exp Cell Res.** v.250, n.2, p.576-580, 1999.
- LÖSTER, K.; HORSTKORTE, R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. **Micron.** v.31, p.41-53, 2000.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; DARNELL, J. E. **Molecular Cell Biology.** 5. ed. W.H. Freeman e Co, 2003.
- MACGARY, E.C.; LEV, D.C.; BAR-ELI, M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. **Cancer Biology and Therapy.** v.1, n.5, p.459-465, 2002.
- MAGI B.; ETTORRE A.; LIBERATORI, S.; BINI L.; ANDREASSI M.; FROSALI S.; NERI P.; DI STEFANO A. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. **Cell death and Differentiation.** v.11, p.842-852, 2004.
- MANG, T.S. Laser Light source for PDT: Past, Present and Future. **Photodiag. Photodyn. Therapy.** v.1, p.43-48, 2004.
- MARCHAL, S.; BEZDETNAYA, L.; GUILLEMIN, F. Modality of cell death induced by Foscan – Based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29. **Biochemistry (Moscow).** v.69, n.1, p.45-49, 2004.
- MAGGIORELLA, L.; WEN, B.; FRASCOGNA, V.; OPOLON, P.; BOURHIS, J.; DEUTSCH, E. Combined radiation sensitizing and anti-angiogenic effects of ionizing radiation and the protease inhibitor ritonavir in a head and neck carcinoma model. **Anticancer Res.** v.25, n.6, p.4357-4362, 2005.
- MARGARON, P.; SORRENTI, R.; LEVY, J.G. Photodynamic therapy inhibits cell adhesion without altering integrin expression. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1359, p.200-210, 1997.
- MATTIJSEN, V.; PETERS, H.M.; SCHALKWIJK, L., et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. **Int. J. Cancer.** v.55, p.580-585, 1993.
- MAZUROV V.V., SOLOVIEVA M.E., LESHCHENKO V.V., KRUGLOV A.G., EDELWEISS E.F., YAKUBOVSKAYA R.I., AKATOV V.S. Small heat shock protein hsp27 as a possible mediator of intercellular adhesion-induced drug resistance in human larynx carcinoma HEP-2 cells. **Biosci Rep.** v.23, n.4, p.187-197, 2003.

MEYER-BETZ, F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des hämatoporphyrins und anderer derivate des blut- und Gallenfarbstoffs. **Dtsch Arch Klin Med.** v.112, p.476-503, 1913.

MILLER, J.D.; BARON, E.D.; SCULL, H.; HSIA, A.; BERLIN, J.C.; McCORMICK, T.; COLUSSI, V.; KENNEY, M.E.; COOPER, K.D.; OLEINICK, N.L. Photodynamic therapy with phthalocyanine photosensitizer Pc 4. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.224, n.3, p.290-299, 2007.

MILANESIO M.E., ALVAREZ M.G., RIVAROLA V., SILBER J.J., DURANTINI E.N. Porphyrin-fullerene C60 dyads with high ability to form photoinduced charge-separated state as novel sensitizers for photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.** v.81, n.4, p.891-897, 2005.

MOAN, J.; KERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem. Photobiol.** v.53, p.549-553, 1991.

NOJIMA Y., MORINO N., MINURA T. et al. Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs, **J. Biol. Chem.** v.270, p.15398-15402, 1995.

MONETTE R.; SMALL D.L.; ME; MEALING G.; BRAIN P. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. **Res. Brain Res. Protoc.** v.2, p.99-108, 1998.

MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J. of Photochem. and Photobiol.** v.57, p.1-13, 2000.

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

NUNES, S.M.T.; SGUILLA, F.S.; TEDESCO, A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Bras. J. of Med. and Biol. Res.** v.37, p.273-284, 2004.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy. **J. of Photochem. and Photobiol.** v.39, p.1-18, 1997.

OLEINICK, N.L.; EVANS, H.H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. **Radiat. Res.** v.150, p.146-156, 1998.

OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochem. Photobiol. Sci.** v.1, p.1-21, 2002.

OLIVEIRA A.L.. **Estudos dos eventos apoptóticos após Terapia Fotodinâmica com aLumpinio Ftalocianina Tetrassulfonada (AlPcS4).** 2007. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007.

PATEL, K.D.; CUVELIER, S.L.; WIEHLER, S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. **Semin immunol.** v.14, p.73-81, 2002.

PLATZER, K.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; HAMMERT, P. Characterization of the cell death modes and associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS<sub>4</sub>-PDT. **Photochem. Photobiol. Sci.** v.1, p.172-177, 2002.

RAAB, C. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. **Z. Biol.** v.39, p.524-526, 1900.

ROUSSET, N.; VONARX, V.; ELÉOUET, S.; CARRÉ, J.; KERNINON, E.; LAJAT, Y. AND PATRICE, T. Effects of photodynamic therapy on adhesion molecules and metastasis. **J. Photochem. Photobiol.** V.52, p.65-73, 1999.

RUCH, A.; BECK, G.; BACHOR, R.; AKGUN, N.; GSCHWENCE, M.H.; STERINER, R. Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy *in vivo* and *in vitro* of hydrophilic Al(III) phthalocyanine tetrasulphonated and lipophilic Zn(II) phthalocyanine administered in liposomes. **J Photochem. Photobiol.** v.36, p.127-134, 1996.

RUNNELS, J.M; CHEN, N.; ORTEL, B.; KATO, D.; HASAN, T. BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and  $\beta_1$ -integrin expression in ovarian cancer cells. **British Journal of the Cancer.** v.80, n.7, p.946-953, 1999.

SALISBURY A.J. The significant of the circulating cancer cell. **Cancer Treat. Rev.** v.2, 1985.

SCHLAEPFER D.D.; HAUCK C.R.; SIEG D.J. Signaling through focal adhesin kinase. **Bioph. Mol. Biol.** v.71, p.435-478, 1999.

SEAGRAVE J.C.; BURCHIEL S.W. Interaction between benzo[a]pyrene and UVA light affecting ATP levels, cytoskeletal organization, and resistance to trypsinization. **Toxicology Letters.** v.117, p.11-23, 2000.

SOUSA, G. **Avaliação do efeito da Terapia Fotodinâmica sobre estruturas celulares.** 2002. 52 f. Trabalho de Graduação (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2002.

SOUSA, G. **Terapia Fotodinâmica em células HEp-2: desencadeamento e monitoramento do processo apoptótico.** 2005. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2005.

SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L. AND KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Bras. Jour. Of Medical and Biological Research.** V.33, p.869-880, 2000.

STEINHUSEN, U.; WEISKES, J.; BADDOCK, V.; TAUBER, R.; BOMMERT, K.; HUBERT, O. Cleavage and shedding of E-caderin after induction of apoptosis. **J. of Biol Chem** v.276, n.7, p.4972-4980, 2001.

SUN, Y.; XIE, M.; LIU, M.; JIN, D.; LI, P. Growth suppression of human laryngeal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene 2. **Laryngoscope**. v.116, n.4, p.596-601, 2006.

TAMIETTI, B.F.P.; MACHADO A.H.A.; MAFTOUM-COSTA M.; DA SILVA N.; TEDESCO A.C.; PACHECO-SOARES C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AlPcS4. **Photomed. Laser Surg.** v.25, n.3, p.175-179, 2007.

TIJERINA, M.; KOPECKOVA, P.; KOPECEK, J. Mechanisms of cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells exposed to free Mce6 or HPMA copolymer-Mce6 conjugates. **Photochem. Photobiol.** v.77, p. 645-652, 2003.

THAMILSELVAN, V.; BASSON, A.D. The role of the cytoskeleton in differentially regulating pressure-mediated effects on malignant colonocyte focal adhesion signaling and cell adhesion. **Carcinogenesis**. v.26, n. 10, p.1687-1697, 2005.

TSAI, J-C.; WU, C-L.; CHIEN, H-F; CHEN, C-T. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. **Laser in Surg. and Med.** v. 36, p. 398-408, 2005.

URIZZI, P.; ALLEN, C.M.; LANGLOIS, R.; LA MADALEINE, C.; QUELLET, R.; VAN LIER, J.E. Low density lipoprotein-bound aluminium sulphophthalocyanine: targeting tumor cells for photodynamic therapy. **J. of Potphyrins and Phtalocyanines**. v.5, p.154-160, 2001.

UZDENSKY, A.; JUZENIENE, A.; MA, L.-W.; MOAN, J. Photodynamic inhibition of enzymatic detachment of human cancer cells from a substratum. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1670, p.1-11, 2004a.

UZDENSKY, A.; JUZENIENE, A.; KOLPAKOVA, E.; HJORTLAND, G.O.; JUZENAS, P; MOAN, J. Photosensitization with protoporphyrin IX inhibits attachment of cancer cells to a substratum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.322, p.452-457, 2004b.

UZDENSKY, A.; KOLPAKOVA, E.; JUZENIENE, A.; JUZENAS, P; MOAN, J. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1722, p.43-50, 2005.

WINDER, S.J.; AYSCOUGH, K.R. Actin-binding proteins. **J. Cell Scien** v.118, p.651-654, 2005.

VONARX, V.; FOUTIER, M.T.; XAVIER DE BRITO, L.; ANASAGASTI, L.; MORLET, L. AND PATRICE, T. Photodynamic therapy decreases cancer colonic cell adhesiveness and metastatic potencial. **Res. Exp. Med. (Berl)**. v.195, p.101-116, 1995.

VON TAPPEINER, H.A.; JENSIONEK, A. Therapeutische Versuche mit fluorescierenden Stoffen. **Münch Med Wochenschr**. v.47, p. 2042-2044, 1903.

VON TAPPEINER, H.A.; JODLBAUER, A. **Die sensibilisierende wirkung fluorescierender substanzen: gesammelte untersuchungen ubre die photodynamische erscheinung.** Leipzig Germany: Vogel, 1907.

YAN; N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annn. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 21, p. 35-56, 2005.