

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento**

ALINE HELENA ARAUJO MACHADO

***ANÁLISE DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA QUANDO SE UTILIZAM
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES, FOTOSSENSIBILIZANTES E FONTES
DE LUZ***

São José dos Campos, SP.
2008

ALINE HELENA ARAUJO MACHADO

***“ANÁLISE DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA QUANDO SE UTILIZAM
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES, FOTOSSENSIBILIZANTES E FONTES
DE LUZ”***

Tese de Doutorado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof. Dr. Newton Soares da Silva
Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

São José dos Campos, SP.

2008

M129e.

Machado, Aline Helena Araujo

Análise dos efeitos da Terapia Fotodinâmica quando se utilizam diferentes linhagens celulares, fotossensibilizantes e fontes de luz /Aline Helena Araujo Machado. São José dos Campos, 2008.

1 disco laser: color.

Tese de Doutorado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

1. Fotoquimioterapia 2. Agentes fotossensibilizantes 3. Células em Cultura 4. Morte celular 5. Microscopia de Fluorescência 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão. I. Silva, Newton Soares da, Orient. II. Pacheco, Marcos Tadeu Tavares, Co-orient. III. Título

CDU: 615.831

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

Assinatura: 

Data: 02/12/2008.

ALINE HELENA ARAUJO MACHADO

**“ANÁLISE DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA QUANDO SE UTILIZAM
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES, FOTOSENSIBILIZANTES E FONTES DE
LUZ”**

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

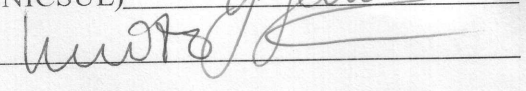
Prof^a. Dra. **MARICÍLIA SILVA COSTA** (UNIVAP) 

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

Prof. Dr. **MARCOS TADEU TAVARES PACHECO** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **FERNANDO COSTA E SILVA FILHO** (UFRJ) 

Prof. Dr. **WALTER JOÃO GENOVESE** (UNICSUL) 

Prof. Dr. **LÚCIO FRIGO** (UNICSUL) 

Prof^a. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretora do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 02 de dezembro de 2008.

Dedico este trabalho aos meus queridos avós, José de Alencar Araujo e Waldet Vanny Martins Araujo, que, desde os primeiros instantes da minha vida sempre torceram para que eu seguisse o melhor caminho possível, batalhando ao meu lado pelos meus ideais, me transmitindo amor, fé, dignidade, coragem e perseverança.

Estes que para mim representam a razão do meu viver, os quais eu amarei acima de todas as coisas, até o último segundo da minha vida.

Obrigada por todos os instantes maravilhosos que vocês proporcionaram na minha vida, por acreditarem e permitirem a realização de todos os meus sonhos.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me proporcionado vida e saúde.

Agradeço aos meus eternos orientadores, Prof. Dr. Newton Soares da Silva e Prof^a. Dr^a. Cristina Pacheco Soares, pelos ensinamentos, carinho, respeito, atenção e amizade que me proporcionaram durante todos esses anos em que estive presente no Laboratório. Obrigado por ensinar-me a ser uma pessoa melhor e permitir a concretização de meus ideais.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, Luisa Helena Martins Araujo, por toda paciência e ajuda durante este meu caminhar.

Ao meu noivo, Junior, por estar ao meu lado não só nos momentos maravilhosos que passamos juntos, mas também nos momentos de dificuldade pelos quais passei.

A todos os meus amigos, pessoas que participaram desta fase da minha vida, tanto nos experimentos, quanto com uma simples palavra de incentivo. Em especial Kátia, Fernanda, Leandro, Maíra, Deise, Rodrigo, Natália, Davi, Renata, Quênia, Juliana, Andreza, Cristiano, e outros que por ventura deixei de citar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, órgão responsável por conceder minha bolsa de estudo.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Fonseca da Costa, diretora do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento por sua valiosa ajuda.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento e da Biblioteca da Universidade do Vale do Paraíba. Em especial, Valéria, Vanessa, D^a. Ivone, D^a. Neuza, Rúbia, Rosângela e aos Professores (as) Doutores (as), Milton Beltrame, Karen Moraes, Renata Amadei, Renato Zângaro, Airton Martin e Maricília Costa.

Pegadas na areia

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.



“Margareth Fishback Powers”

Resumo

Análise dos efeitos Terapia Fotodinâmica quando se utilizam diferentes linhagens celulares, fotossensibilizantes e fontes de luz

Terapia Fotodinâmica (TFD) é um caminho promissor para o tratamento do câncer e determinadas doenças não-oncológicas que emprega a combinação de um fotossensibilizante e luz na presença de oxigênio molecular. Atualmente, sabe-se que o aperfeiçoamento da TFD está estabilizado entre o desenvolvimento de novos fotossensibilizantes, fontes de luz e métodos de tratamento. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a eficiência da TFD utilizando-se diferentes linhagens celulares, fotossensibilizantes e fontes de luz. A primeira parte deste estudo, teve como foco principal, investigar a citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada ($ZnPcBr_8$) antes e após irradiação com LASER e analisar os efeitos da TFD no núcleo de células L929. Células L929 foram incubadas com $ZnPcBr_8$ (0.25, 0.5 ou $1\mu M$) por 1h, irradiadas com LASER (685nm, 35mW, $4.5J/cm^2$), incubadas em MEM por 1, 12, ou 24h e analisadas através das técnicas MTT e Microscopia de Fluorescência. Os resultados demonstraram que $1\mu M$ da $ZnPcBr_8$ foi à concentração mais efetiva para TFD, que a $ZnPcBr_8$ localiza-se na região perinuclear 1h após incubação e que 24h após TFD observou-se retração citoplasmática, vacuolização ao longo do citoplasma e fragmentação nuclear. Tais resultados sugerem morte celular apoptótica via mitocondrial. A segunda parte, teve como foco principal, investigar a citotoxicidade da $ZnPcBr_8$ após irradiação com diferentes fontes de luz. Células HEP-2 foram incubadas com $ZnPcBr_8$ (0.25, 0.5 ou $1\mu M$) por 1h, irradiadas com LASER (660nm, 30mW, $4.5J/cm^2$) ou LED (640nm, 70mW, $4.5J/cm^2$), incubadas em MEM por 1 ou 24h e analisadas através dos testes MTT e Exclusão com Azul de Tripán. Os resultados demonstram que $1\mu M$ da $ZnPcBr_8$ foi à concentração mais efetiva após irradiação com ambas as fontes de luz. Portanto, tanto LASER quanto LED podem ser utilizados para TFD “in vitro”, uma vez que ambos apresentaram excelente eficiência fotodinâmica. A terceira parte, teve como foco principal, avaliar as possíveis alterações morfológicas ocasionadas as células HEP-2 após TFD com $ZnPcBr_8$. Células HEP-2 foram incubadas com $ZnPcBr_8$ ($1\mu M$) por 1h, irradiadas com LASER (660nm, 30mW, $4.5J/cm^2$), incubadas em MEM por 1 ou 24h e analisadas através da Microscopia de Fluorescência utilizando-se marcadores fluorescentes específicos para núcleo, mitocôndria e citoesqueleto. De acordo com os resultados podemos concluir que a TFD com $ZnPcBr_8$ promoveu significativas alterações morfológicas em células HEP-2, bem como, formação de corpos apoptóticos, despolimerização da cardiolipina e retração celular com perda de adesão. A quarta parte, teve como foco principal, reportar que a TFD com LASER e Cloro-Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada ($AlPcS_4$) ocasiona significantes alterações na mitocôndria de células HEP-2. Células HEP-2 foram incubadas com $AlPcS_4$ ($10\mu M$) por 1h, irradiadas com LASER (670nm, 45mW, $4.5J/cm^2$), incubadas em MEM por 24, 48 ou 72h e analisadas através de Microscopia de Fluorescência utilizando-se marcadores específicos para mitocôndria (MitoTracker e NAO) e de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). De acordo com os resultados foi possível observar que a TFD com $AlPcS_4$ ocasiona significantes alterações na mitocôndria, causando perda do potencial de membrana, alteração na distribuição da cardiolipina e morte celular. Permitindo concluir que, as marcações com MitoTracker e NAO demonstraram migração mitocondrial para a região perinuclear, confirmada através da MET, sugerindo que mitocôndrias intactas foram solicitadas para uma possível fragmentação de DNA.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, ftalocianinas, LASER, LED, morte celular.

Abstract

Analyzes of Photodynamic Therapy effects when different cellular lineages, photosensitizers and light sources are used

Photodynamic Therapy (PDT) is a procedure potentially useful in the treatment of the cancer and some non-oncological diseases that includes the combination of a photosensitizer and light in the presence of molecular oxygen. Actually, it is known that improvement of the PDT is stabilized between the development of new photosensitizers, light sources and treatment methods. The present work has to objectively evaluate the efficiency of the PDT using different cell lineages, photosensitizers and light sources. The first part of this study, had like principal focus, investigate the cytotoxicity of Octal-bromide Zinc Phthalocyanine (ZnPcBr_8) before and after irradiation with LASER and analyze the effects of PDT on the nucleus of L929 cells. L929 cells were incubated with ZnPcBr_8 (0.25, 0.5 or $1\mu\text{M}$) for 1h, irradiated with LASER (685nm, 35mW, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$), incubated in MEM for 1, 12, or 24h and analyzed through MTT and Fluorescence Microscopy techniques. The results demonstrated that ZnPcBr_8 at $1\mu\text{M}$ was the most effective concentration for PDT, that ZnPcBr_8 was localized in the perinuclear region 1h after incubation and that 24h after PDT it was possible to observe cytoplasm retraction, vacuoles along the cytoplasm and nuclear fragmentation. Such results, suggest apoptotic cell death mediated by the mitochondria. The second part, had like principal focus, investigates the cytotoxicity of ZnPcBr_8 after irradiation with different light sources. HEp-2 cells were incubated with ZnPcBr_8 (0.25, 0.5, or $1\mu\text{M}$) for 1h, irradiated with LASER (660nm, 30mW, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$) or LED (640nm, 70mW, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$), incubated in MEM for 1 or 24h and analyzed through MTT and Trypan blue dye exclusion tests. The results showed that ZnPcBr_8 $1\mu\text{M}$ concentration was the more effective after irradiation with both light sources. Thereby, both LASER as LED can be used to “in vitro” PDT, a time that both showed excellent photodynamic efficiency. The third part, had like principal focus, evaluate the possible morphological alterations occasioned at the HEp-2 cells after PDT with ZnPcBr_8 . HEp-2 cells were incubated with ZnPcBr_8 ($1\mu\text{M}$) for 1h, irradiated with LASER (660nm, 30mW, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$), incubated in MEM for 1 or 24h and analyzed through Fluorescence Microscopy using specific fluorescent staining to nucleus, mitochondria and cytoskeleton. In accord to the results we can conclude that PDT with ZnPcBr_8 promotes significant morphologic alterations in HEp-2 cells culture, like, apoptotic bodies formation, cardiolipin depolymerization and cellular retraction with lost of adhesion. The fourth part had like principal focus, report that PDT with LASER and Tetrasulfonated Chloro-Aluminum Phthalocyanine (AlPcS_4) occasion's significant alterations at the HEp-2 cells mitochondria. HEp-2 cells were incubated with AlPcS_4 ($10\mu\text{M}$) for 1h, irradiated with LASER (670nm, 45mW, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$), incubated in MEM for 24, 48 or 72h and analyzed through of the Fluorescence Microscopy using specific staining to mitochondria (MitoTracker and NAO) and Transmission Electronic Microscopy (MET). In accord to the results it was possible to observe that PDT with AlPcS_4 occasioned significant alterations at the mitochondria, causing lost of the membrane potential, alterations at the cardiolipin distribution and cell death. Can be concluded that, the MitoTracker and NAO staining showed mitochondrial migration to the perinuclear region, confirmed through of the MET, suggesting that intact mitochondria were solicited to a possible DNA fragmentation.

Key-words: Photodynamic Therapy, phthalocyanines, LASER, LED, cell death.

Figuras

Figura 01: Esquema ilustrativo do processo de TFD.....	16
Figura 02: Mecanismos (Tipo I e II) de geração de EROs após TFD.....	18
Figura 03: Estrutura química básica da ftalocianina.....	21
Figura 04: Estrutura química da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada.....	21
Figura 05: Estrutura química da Zinco Ftalocianina.....	22
Figura 06: Estrutura química da Zinco Ftalocianina Octa-bromada.....	23
Figura 07: Janela óptica.....	25
Figura 08: Caminho intrínseco e extrínseco.....	29

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivo geral.....	14
1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Terapia Fotodinâmica.....	15
2.1.1 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica.....	16
2.2 Agentes Fotosensibilizantes.....	18
2.2.1 Ftalocianinas.....	20
2.3 Localização subcelular.....	23
2.4 Fontes de luz.....	24
2.4.1 Laseres.....	25
2.4.2 LEDs.....	26
2.5 Mecanismo de morte celular.....	27
2.5.1 Apoptose.....	27
2.5.2 Autofagia.....	29
2.5.3 Necrose.....	30
3 ARTIGOS.....	32
3.1 Artigo 1: Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent.....	32
3.2 Artigo 2: Cytotoxicity of Octa-bromide Zinc Phthalocyanine after Photodynamic Therapy with different light sources.....	33
3.3 Artigo 3: Analyses of nucleus, mitochondria and cytoskeleton of HEP-2 cells after PDT with ZnPcBr ₈	34
3.4 Artigo 4: Analysis of Mitochondrial Activity Related to Cell Death after PDT with AlPcS ₄	35
4 DISCUSSÃO.....	36
5 CONCLUSÃO.....	44

REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE.....	55
ANEXO A: Artigos em colaboração relacionados ao tema da Tese.....	57
Artigo 5: Ultrastructural changes in <i>Tritrichomonas foetus</i> after treatments with AlPcS ₄ and Photodynamic Therapy.....	57
Artigo 6: Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica.....	57
ANEXO B: Artigo em colaboração relacionado à aplicação de Ultra-Som em cultura de células.....	58
Artigo 7: Assessment of fibroblast cells submitted to ultrasonic irradiation.....	58
ANEXO C: Artigo em colaboração relacionado à interação de Biomateriais e cultura de células.....	59
Artigo 8: Cell viability and adhesion on as grown multi-wall carbon nanotube films.....	59

1 INTRODUÇÃO

Terapia Fotodinâmica (TFD) é um caminho promissor para o tratamento do câncer e determinadas doenças benignas [MOLNÁR et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; SACZKO et al., 2007; ZHANG et al., 2008].

Esta terapia emprega a combinação de um fármaco fotossensibilizante e luz na presença de oxigênio molecular [TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003; ATILLA et al., 2007].

Atualmente, sabe-se que o aperfeiçoamento desta técnica está estabilizado entre o descobrimento e o desenvolvimento de novos fotossensibilizantes, fontes de luz [XU, 2007] e métodos de tratamento [NAKAGAWA et al., 2007].

A incorporação de metais não-transicionários como o Zinco e o Alumínio no anel central do fotossensibilizante resultam em complexos com alto rendimento no estado tripleto quantum e longo tempo de vida no estado tripleto, os quais são requeridos para uma fotossensibilização eficiente. Acredita-se que durante a TFD, o fotossensibilizante é excitado ao seu estado tripleto, e então transfere a energia para o oxigênio no estado fundamental, $O_2(^3S_g)$, gerando o oxigênio no estado excitado, $^1O_2(^1D_g)$, sendo este a espécie citotóxica principal [IDOWU; NYOKONG, 2007].

Existem três mecanismos principais pelos quais a TFD pode ocasionar a destruição tumoral. Primeiro, as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) podem matar as células tumorais diretamente. Segundo, a TFD pode danificar a vascularização associada ao tumor, levando à formação de trombos e subseqüentemente ao infarto tumoral. Terceiro, a TFD também pode ativar uma resposta imunológica contra as células tumorais [CHEN et al., 2007; YU et al., 2008].

A morte celular pode ocorrer através de duas vias principais, apoptose e/ou necrose. O mecanismo de morte vai depender da linhagem celular, do alvo para fotossensibilização, da concentração intracelular, da localização do fotossensibilizante, dos protocolos de incubação e doses de luz [YSLAS; DURANTINI; RIVAROLA, 2007].

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica *in vitro* utilizando-se diferentes linhagens celulares, fotossensibilizantes e fontes de luz, monitorando a citotoxicidade, alterações morfológicas e indução de morte celular.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada antes e após irradiação com LASER AsGaAl (685nm, 35mW, 4.5J/cm²) e analisar os efeitos da Terapia Fotodinâmica no núcleo de Células Clone L929 (derivadas de Células de Tecido Conjuntivo de Camundongo).
- Investigar a citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada após irradiação em cultura de Células HEp-2 (derivadas de Células de Carcinoma de Laringe Humana) utilizando-se diferentes concentrações (0.25, 0.5 e 1μM) e fontes de luz (LASER - 660nm, 30mW, 4.5J/cm² ou LED - 640nm, 70mW, 4.5J/cm²).
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas de Células HEp-2 (derivadas de Células de Carcinoma de Laringe Humana), em relação ao núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e citoesqueleto, ocasionadas pela Zinco Ftalocianina Octa-bromada após irradiação LASER (660nm, 30mW, 4.5J/cm²).
- Avaliar a morfologia mitocondrial de células HEp-2 (derivadas de Células de Carcinoma de Laringe Humana) após Terapia Fotodinâmica com LASER AsGaAl (685nm, 35mW, 4.5J/cm²) e Cloro-Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade emergente de tratamento para diversos tipos de cânceres. Bem como em pele, pulmão, esôfago, laringe, estômago, bexiga, dentre outros. Esta, também se apresenta viável para utilização em determinadas doenças não-neoplásicas. Dentre as quais podemos citar, degeneração macular relacionada à idade, artrite, psoríase, aterosclerose e restenose (tanto em veias como em artérias), diversas infecções microbianas, entre outras [MILLER et al., 2007; PAZOS; NADER, 2007; PERUSSI, 2007; VAUCHER et al., 2007; WEYERGANG; SELBO; BERG, 2007; KE et al., 2008; MOREIRA et al., 2008].

A TFD vem apresentando bons resultados contra tumores resistentes a uma grande variedade de fármacos convencionais [PERUSSI, 2007].

O conceito científico da TFD é conhecido desde o início do século XX [BACKHAUS et al., 2007], quando Oscar Raab, um estudante de medicina do Departamento de Farmacologia da Universidade de Ludwig-Maximilian em Munique, Alemanha, observou que baixas concentrações do corante laranja de acridina na presença de luz solar poderia ser letal ao protozoário do gênero *Paramecium caudatum* [CHRISTIE; KOMPELLA, 2008; MAHMOUD et al., 2008].

Baseando-se nessa descoberta, Hereon Hermann von Tappeiner, professor de Raab e diretor do Departamento de Farmacologia da Universidade de Munique demonstrou que o fenômeno era dependente do oxigênio. A partir dessas observações, Tappeiner e colaboradores realizaram estudos utilizando o corante Eosina como fotossensibilizador para o tratamento de neoplasias cutâneas. Subseqüentemente, o termo “ação fotodinâmica” foi empregado para descrever esta reação fotossensitiva dependente do oxigênio [ALEXIADES-ARMENAKAS, 2006].

O procedimento da TFD envolve a administração de um agente fotossensibilizante, seguida por iluminação local do tumor com luz de um apropriado comprimento de onda, para ativar um fotossensibilizante específico [TRIESSCHEIJN et al., 2006] (figura 01).

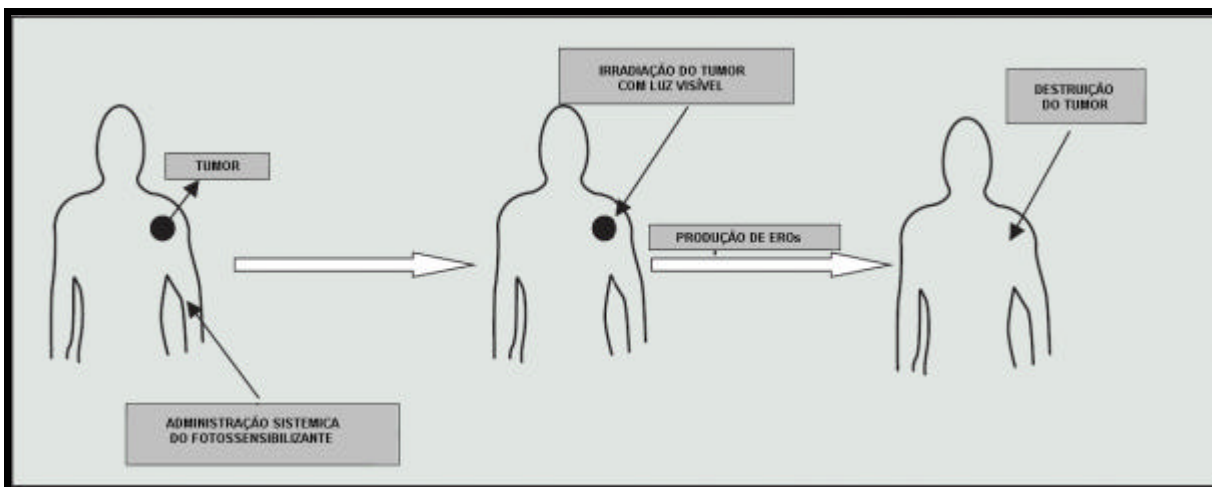


Figura 01: Esquema ilustrativo do processo de TFD [modificado de RIBEIRO; SILVA; JORGE, 2004].

O fotossensibilizante excitado, seletivamente acumulado no tumor, ativa a geração de espécies reativas de oxigênio, os quais irão causar a morte da célula cancerígena via necrose e/ou apoptose [ZAWACKA-PANKAU et al., 2007].

Este tipo de tratamento apresenta diversas vantagens, incluindo sua natureza minimamente invasiva, tolerância de doses repetidas e alta especificidade, a qual pode ser obtida através de uma aplicação precisa da luz [LIU et al., 2008].

2.1.1 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

Na presença de oxigênio molecular, a iluminação do fotossensibilizante pode levar a uma série de reações fotoquímicas e, conseqüentemente, gerar uma variedade de espécies instáveis [QIANG et al., 2006], como por exemplo, oxigênio singleto citotóxico e outros radicais livres, como peróxido, radical hidroxila e íon superóxido [KOLAROVÁ et al., 2003]. Os possíveis alvos das EROs incluem DNA, RNA, lipídios insaturados e determinados resíduos de proteínas [LIU et al., 2008].

O primeiro passo no processo de fotossensitização ocorre após a absorção de um fóton de luz pelo agente fotossensibilizante no seu estado fundamental. Este então, passa do seu estado fundamental (S_0), para um estado excitado de vida curta denominado, estado singleto (S_1). Neste estado, o fotossensibilizante pode retornar ao seu estado fundamental, via processos radioativos, como fluorescência ou fosforescência, ou pode realizar um cruzamento

intersistema (ϕ_{isc}), passando a um estado intermediário mais estável, denominado estado excitado tripleto (T_1) [NYMAN; HYNINEN, 2004; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007; RIBEIRO et al., 2007].

É de grande interesse no processo da TFD, que o fotossensibilizante realize o cruzamento intersistema, pois neste estado (T_1), o fotossensibilizante pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, localizadas próximas à região irradiada, gerando assim, espécies reativas (EROs) que oxidam biomoléculas e danificam o tecido irradiado [RIBEIRO et al., 2007].

As EROs podem ser geradas através de dois processos principais:

Processo tipo I: reações de transferência de elétron ou hidrogênio entre o fotossensibilizante no estado tripleto e outras moléculas. Esses processos produzem reativos intermediários que são prejudiciais às células, bem como radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), hidroperóxidos (HO_2^-) e hidroxilas ($\bullet OH$), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [ALEXANDRATOU; YOVA; LOUKAS, 2005; ALVAREZ et al., 2006; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007].

Processo tipo II: o fotossensibilizante no estado tripleto reage com o oxigênio via um processo de transferência de energia gerando o oxigênio singleto molecular (1O_2) [ALEXANDRATOU; YOVA; LOUKAS, 2005; ALVAREZ et al., 2006; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007], podendo reagir com lipídeos insaturados (incluindo colesterol), aminoácidos (como o triptofano, histidina e metionina) e ácidos nucleicos. [RIBEIRO et al., 2007].

Ambos os mecanismos (Tipo I e/ou II), podem ocorrer simultaneamente e a proporção entre esses dois processos depende principalmente do fotossensibilizante, do substrato e da natureza do meio [SPESIA et al., 2005; ALVAREZ et al., 2006].

Estas espécies reativas de oxigênio geradas via mecanismos tipo I ou/e II são responsáveis por danos irreversíveis aos componentes celulares causando morte celular via apoptose e necrose [ALEXANDRATOU; YOVA; LOUKAS, 2005] (figura 02).

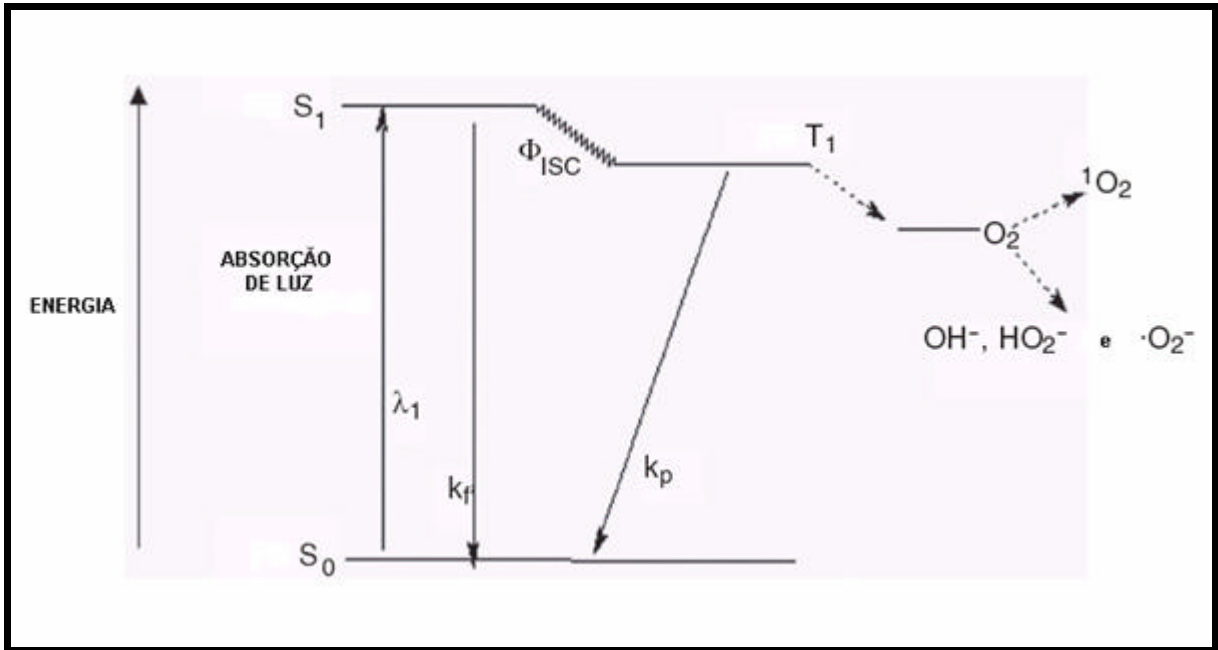


Figura 02: Mecanismos (Tipo I e II) de geração de EROs após TFD [modificado de PAZOS; NADER, 2007]. S_0 : fotossensibilizante no estado fundamental singleto; S_1 : fotossensibilizante no estado excitado singleto de vida curta; T_1 : fotossensibilizante no estado tripleto de vida longa; k_f : fluorescência; k_p : fosforescência; Φ_{ISC} : cruzamento intersistema; O_2 : oxigênio; 1O_2 : oxigênio singlete. $OH\cdot$: radicais livres; $\cdot O_2^-$: ânion-radical superóxido; $HO_2\cdot$: radical hidroperoxila.

2.2 Agentes Fotossensibilizantes

O uso de agentes fotossensibilizantes para inativação de diversas células cancerígenas está sendo comumente estudado [ATILLA et al., 2007].

Uma grande parte dos fotossensibilizantes clínicos aprovados atualmente pertencem à família das porfirinas. Os fotossensibilizantes desenvolvidos em 1970 e início de 1980 são chamados fotossensibilizantes de primeira geração [MAHMOUD et al., 2008]. Dentre esses, o primeiro a ser aprovado pela “US Food and Drug Administration” para o tratamento de câncer foi um derivado de hematoporfirina (Photofrin®) [RIBEIRO et al., 2007].

O uso de fotossensibilizantes de primeira geração é limitado [CHRISTIE; KOMPELLA, 2008] principalmente devido aos pequenos efeitos colaterais. Existem também, algumas desvantagens a serem citadas, como: pequena absorção na região da “janela terapêutica”, excreção lenta pelo organismo. Além disso, este tipo de fotossensibilizante é constituído por misturas complexas de derivados de hematoporfirinas, de maneira que a

purificação da droga não é um procedimento simples nem barato, sendo, portanto, pouco acessível economicamente [RIBEIRO et al., 2007].

A segunda geração de fotossensibilizantes surgiu da necessidade de se desenvolver compostos que apresentavam uma absorção da luz acima de 630nm, aumentando conseqüentemente a penetração tecidual e obtendo, portanto, um efeito fotodinâmico mais profundo e com maior velocidade de eliminação do tecido [ARIAS et al., 2007].

Os fotossensibilizantes de segunda geração evoluíram das estruturas de porfirinas, clorinas e purpurinas [CHRISTIE; KOMPELLA, 2008].

A ligação de quatro anéis benzenos ou naftalenos às posições β -pirólicas das porfirinas e a substituição dos carbonos da ponte de metino por nitrogênio, produzem as ftalocianinas e as naftalocianinas. A presença do alumínio, zinco(II), silicone(IV) e outros íons permitem uma hexa-coordenação e garantem um rendimento satisfatório da geração de oxigênio singlete [CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007].

Alguns requisitos de um fotossensibilizante ideal para a TFD: a) apresentar baixa toxicidade na ausência de irradiação; b) apresentar uma potente fotocitotoxicidade; c) ser quimicamente puro e de composição conhecida; d) distribuição homogênea na lesão; e) ter alta afinidade para localização no tecido alvo; f) ser rapidamente excretado pelo corpo para minimizar a toxicidade sistêmica; g) ser facilmente administrado através de várias rotas; h) ser hábil na geração do estado excitado tripleto; i) evitar agregação, a qual pode afetar sua farmacocinética e farmacodinâmica; j) apresentar forte absorbância na faixa de 600 a 800nm [AL-MUTAIRI et al., 2006; CHRISTIE; KOMPELLA, 2008; MAHMOUD et al., 2008; STRITT et al., 2008].

Alguns trabalhos vêm demonstrando que a retenção de fotossensibilizadores em células tumorais aumenta com a diminuição da polaridade da molécula, fato que eleva a eficiência do fotossensibilizante [RIBEIRO et al., 2007].

Devido à maior concentração de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nas células neoplásicas (em comparação com as normais), há o acúmulo preferencial dos fotossensibilizadores sobre este tecido, de modo que a seletividade tumoral aumenta com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizante [RIBEIRO et al., 2007].

Vem sendo demonstrado que, fotossensibilizantes anfifílicos, geralmente, são mais ativos fotodinamicamente, do que as moléculas hidrofóbicas ou hidrofílicas. Fotossensibilizantes anfifílicos apresentam características hidrofílicas e hidrofóbicas em diferentes segmentos dentro da mesma molécula. Tais características estruturais permitem que estas porções distintas interajam diferentemente com seu ambiente biológico, enquanto

conferem um aumento na solubilidade, modulando a agregação e melhorando a captação celular e alvo intracelular [ALLEN et al., 2002].

2.2.1 Ftalocianinas

O desenvolvimento de fotossensibilizantes de nova geração para aperfeiçoar a TFD representa atualmente uma extensa área de pesquisa [ALI; OLIVO, 2002; SCHASTAK et al., 2005]. Sendo assim, as ftalocianinas vêm recebendo consideráveis atenções em relação a sua possível utilização no tratamento fotodinâmico de diversas doenças [YSLAS; DURANTINI; RIVAROLA, 2007].

As ftalocianinas (figura 03) são fotossensibilizantes de segunda geração, com sistemas conjugados macrocíclicos p-elétron, os quais atraem grande interesse devido às suas diversas aplicações na medicina e na química dos materiais [AL-RAQA, 2008].

Elas apresentam estabilidade química excepcional e uma multidão de variações químicas, as quais permitem a engenharia molecular das propriedades físicas e ópticas do material [YAGLIOGLU et al., 2008]. A natureza dos substituintes é importante não somente em termos de solubilidade das ftalocianinas, mas também no contexto do estado de sua agregação em soluções [AL-RAQA, 2008].

As propriedades de agregação das ftalocianinas são extremamente importantes para o desenvolvimento de novos fotossensibilizantes [ATILLA et al., 2007].

Esses fármacos exibem alto coeficiente de excitação na região vermelha do espectro (630 - 750nm) [ALLISON et al., 2004; FERREIRA et al., 2004; NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004], fotoestabilidade, longo tempo de vida no estado fotoexcitado tripleto, apresentando ainda propriedades fotofísicas fortemente dependente do íon metal central [ATILLA et al., 2007; CORMICK; ROVERA; DURANTINI, 2008; PAZOS et al., 2007].

As rotas de síntese relativamente diretas de ftalocianinas (em comparação com porfirinas) fornecem uma larga gama de compostos em termos do átomo de metal/semimetal central (Al, Ga, Si, Zn) e funcionalidade da cadeia lateral. Como fotossensibilizante, as ftalocianinas fornecem alto rendimento de produção de oxigênio singleto [PERUSSI, 2007]. Dentre essas, os derivados de Zinco e Alumínio, são os mais comumente estudados [HUANG et al., 2008].

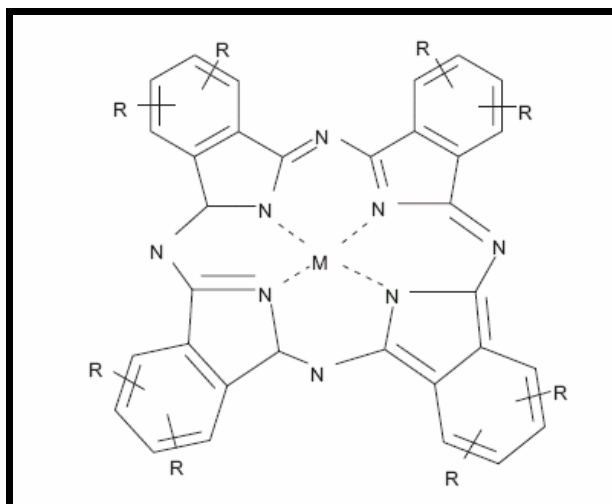


Figura 03: Estrutura química básica da ftalocianina [DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008].

O ácido Cloro-Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄) é um agente fotossensibilizante hidrofílico [RUCK et al., 1996] cuja fórmula molecular é C₃₂H₁₆AlClN₈O₁₂S₄ [FRONTIER SCIENTIFIC]. Este fotossensibilizante apresenta um pico máximo de absorção na faixa de 675 nm do espectro.

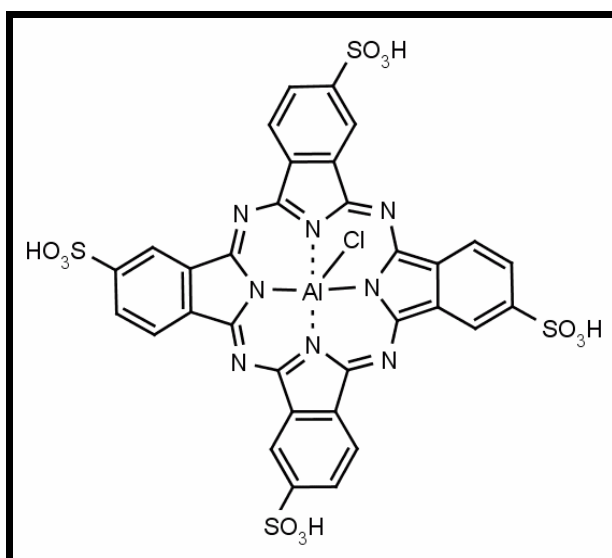


Figura 04: Estrutura química da Cloro-Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada [FRONTIER SCIENTIFIC].

O sal Zinco Ftalocianina (ZnPc), é um agente fotossensibilizante hidrofóbico [RUCK et al., 1996] cuja fórmula molecular é, C₃₂H₁₆N₈Zn. Este fotossensibilizante apresenta um pico máximo de absorção na faixa de 701 nm do espectro [SIGMA ALDRICH].

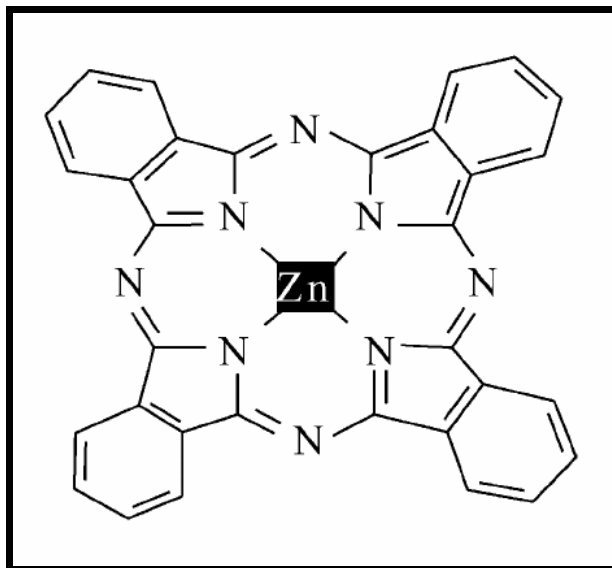


Figura 05: Estrutura química da Zinco Ftalocianina [SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004].

A Zinco Ftalocianina Octa-bromada ($ZnPcBr_8$) é um agente fotossensibilizante de segunda geração, recentemente desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, Brasil (figura 06). Seu pico máximo de absorção localiza-se na faixa de 676nm do espectro [MACHADO et al., 2007].

Machado e colaboradores, em 2007, iniciaram os estudos utilizando-se este agente fotossensibilizante em cultura de células. A partir de então, uma série de experimentos *in vitro* vêm sendo realizados com o intuito de se verificar a eficácia desse novo agente fotossensibilizante para utilização no processo de Terapia Fotodinâmica *in vivo* [MACHADO et al., 2007; 2008].

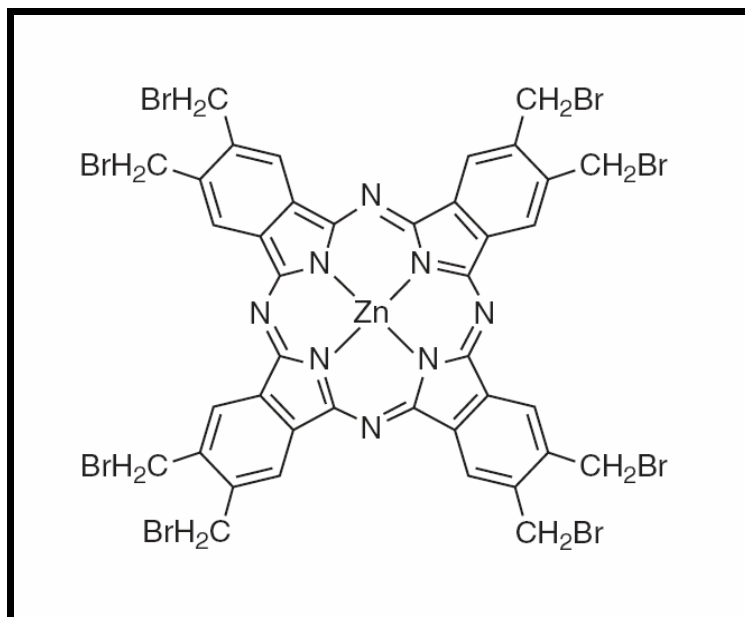


Figura 06: Estrutura química da Zinco Ftalocianina Octa-bromada [MACHADO et al., 2007].

2.3 Localização subcelular

A acumulação intracelular do fotossensibilizante é um dos mais importantes fatores para se determinar a eficiência da TFD [LAM; OLEINICK; NIEMINEN, 2001].

Dependendo da linhagem celular, das propriedades físicoquímicas e do mecanismo de captação dos fotossensibilizantes, estes podem alcançar diferentes concentrações intracelulares e localizar-se em diferentes compartimentos [CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007; SACKZO et al., 2007].

Dentre os alvos celulares podemos citar, membranas, mitocôndria, aparelho de Golgi, lisossomos e estruturas do citoesqueleto, sendo estes, os principais alvos do processo oxidativo foto-induzido [CAUCHON et al., 2005; ATILLA et al., 2007].

Os fotossensibilizantes lipofílicos são preferencialmente captados através da membrana plasmática e sua penetração usualmente aumenta em uma relação direta a lipofilicidade. Como a difusão constante nas células é perto daquelas dos lipídios, esses fotossensibilizantes (ex.: HpD, Photofrin® e diversas ftalocianinas) penetram nas membranas celulares e se localizam em alvos subcelulares, isto é, mitocôndria e membranas. A maioria dos fotossensibilizantes hidrofílicos (ex.: TPPSn e algumas ftalocianinas polares) são captados por através do mecanismo de pinocitose e se localizam preferencialmente nos

grânulos extranucleares, principalmente nos lisossomos [CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007].

2.4 Fontes de luz

A luz é considerada parte do espectro da energia eletromagnética. Este espectro inclui comprimentos de onda de energia que variam consideravelmente em comprimento de ondas desde muito curtas no final do espectro ultravioleta (gama e raio-X) às ondas muito longas na extremidade infra-vermelha do espectro [HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007].

Esta vem sendo utilizada sozinha ou em combinação com componentes químicos por um longo tempo para induzir efeitos terapêuticos [PERVAIZ; OLIVO, 2006].

Atualmente, uma das mais promissoras aplicações da luz está na TFD, a qual é uma estratégia inovativa para o tratamento de câncer [YOU; GIBSON; DETTY, 2006].

As fontes de luz disponíveis para a TFD pertencem a três grupos: lâmpadas com vasta banda (“broadband”), lâmpadas de diodo e lasers. Sendo essas atividades dependentes principalmente de algumas características fotofísicas: como o espectro de emissão, irradiância, distribuição espacial e constância de saída (“output”) [CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007; MAHMOUD et al., 2008].

Para o procedimento da TFD, utiliza-se uma fonte de luz na região do vermelho ou infravermelho próximo (600 à 800nm), denominada “janela terapêutica” [SIBATA et al., 2000] (figura 07), a fim de que a radiação penetre efetivamente no tecido neoplásico, já que emissões abaixo de 600 nm são absorvidas por cromóforos bioendogênicos, como exemplo a hemoglobina, e/ou espalhadas pelos tecidos, o que torna a foto-oxidação apenas superficial [RIBEIRO et al., 2007]. Outro fato que deve ser levado em conta é que os comprimentos de onda acima de 900nm não são suficientes para a geração de radicais livres [CHRISTIE; KOMPELLA, 2008; BACKHAUS et al., 2007].

O comprimento de onda da fonte de luz deve ser baseado no espectro de absorção do fotossensibilizante, o qual determina a profundidade da penetração da luz no tecido [CHRISTIE; KOMPELLA, 2008].

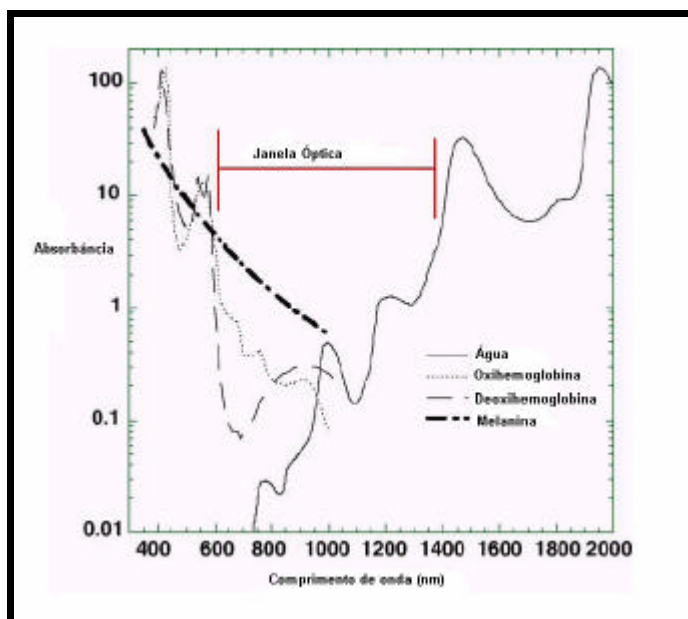


Figura 07: Janela óptica [modificado de CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004].

2.4.1 Laseres

LASER é um acrônimo da palavra “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ou seja, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação [SHOKROLLAHI; RAYMOND; MURISON, 2004]. É uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou não, dependendo da matéria que produz este tipo de radiação [GENOVESE, 2000].

O primeiro laser foi desenvolvido por Theodore Maiman, em 1959, usando um cristal de rubi para produzir luz vermelha com um comprimento de onda de 694nm [MAHMOUD et al., 2008].

A partir de então, uma infinidade de tipos de laseres vem sendo construída a fim de se sanar as necessidades de cada área, como por exemplo, Argônio, Hélio-Neônio, Dióxido de Carbono, Excimer, Titânio-Safira, Diodos, dentre outros [SHOKROLLAHI; RAYMOND; MURISON, 2004].

A luz laser apresenta algumas características que a difere de outras fontes luminosas, bem como, colimação (sentido que a irradiação viaja em uma única direção sem divergência sob uma longa distância com uma alta intensidade), monocromaticidade (todas as ondas apresentam o mesmo comprimento de onda ou frequência) e coerência (todas as ondas em

fase, e os picos de cada onda são sincronizados no espaço) [HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007].

Independentemente do tamanho, apresentam as seguintes partes: uma fonte de energia (suplemento da potência), um “Lasing” ou meio amplificador (sólido, líquido ou gasoso), e uma cavidade ressonante (espelhos) [HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007].

Os lasers apresentam diversas vantagens, incluindo a habilidade de se acoplar às fibras ópticas para acessar tumores internos, para selecionar um específico comprimento de onda, deste modo, maximizando a profundidade de penetração, e alcançar maiores irradiâncias, diminuindo assim o tempo de exposição [ALEXIADES-ARMENAKAS, 2006]. Estes produzem uma luz monocromática de alta energia de um específico comprimento de onda. Eles provem uma seleção exata do comprimento de onda em relação ao pico de absorção do fotossensibilizante e difusão de luz altamente homogênea, mas com um campo de tratamento limitado [MAHMOUD et al., 2008].

Uma vasta gama de estudos vem demonstrando que a luz laser pode interferir de diversas maneiras no metabolismo celular [CASTRO e SILVA et al., 2007].

A terapia laser é comumente associada com a proliferação celular, como a luz laser é absorvida por cromóforos, produzindo efeitos fotofísicos ou fotoquímicos que, juntos ou isoladamente, aumentam a estimulação celular em nível de membrana mitocondrial, levando a um aumento de ambos, o potencial de membrana e o gradiente fotônico, e conseqüentemente trocando propriedades ópticas da mitocôndria. Essas trocas resultam em uma maior atividade do NADH, o qual resulta em um aumento da produção de ATP, RNA e síntese protéica pela mitocôndria [KARU, 1999; CASTRO et al., 2005]. A irradiação laser pode também ocasionar um aumento na quantidade de retículo endoplasmático e complexo de golgi, assim como ocasionar a geração de oxigênio singlete e estimular a síntese de DNA, dentre outros [CARNEVALLI et al., 2003].

2.4.2 LEDs

O LED (diodo emissor de luz) vem sendo considerado uma fonte de luz emergente para a aplicação na TFD, podendo gerar luz de alta energia, com desejáveis comprimentos de onda. Constitui-se de um diodo semiconductor (junção P-N), que quando energizado emite luz visível. Este então se encontra fixado em uma cúpula clara de epoxi que atua como uma lente.

Podendo dessa forma, apresentar uma vasta gama de geometrias e tipos [MAVROPOULOS et al., 2005; PERVAIZ; OLIVO, 2006].

O modo de geração de luz de um aparelho LED ocorre através da relaxação bem definida de elétrons excitados [OBERHOLZER; PREEZ; KIDD, 2005]. A luz é monocromática, produzida pelas interações energéticas do elétron e emite uma faixa de radiação eletromagnética que varia de comprimentos de onda que vão do ultravioleta ao visível e infravermelho [POSTEN et al., 2005]. Desta forma é capaz de prover uma densidade de potência acima de $150\text{mW}/\text{cm}^2$ em comprimentos de onda na faixa de 350 a 1.100nm [TRIESSCHEIJN et al., 2006].

Este tipo de fonte de luz vem apresentando vantagens em relação à luz laser, uma vez que se apresenta mais economicamente viável, pode irradiar uma maior área de superfície, requer menos energia, é menos restritivo para operação. Além do mais, os LEDs permitem a construção de aparelhos anatomicamente adaptados para o ponto de aplicação [BRANDON et al., 2008; CASTRO e SILVA et al., 2007].

2.5 Mecanismo de morte celular

Historicamente, três tipos de morte celular vêm sendo distinguidos em células de mamíferos de acordo com os critérios morfológicos:

Morte celular tipo I: melhor conhecida como apoptose.

Morte celular tipo II: caracterizada por uma acumulação massiva de vacúolos autofágicos nas duas membranas do citoplasma.

Morte celular tipo III: melhor conhecida como necrose, é geralmente definida de maneira negativa como morte por falta das características dos processos tipo I e II [GOLSTEIN; KROEMER, 2006].

2.5.1 Apoptose

Apoptose é um modo fisiológico de morte celular [MILLER et al., 2007], o qual representa um processo fundamental no desenvolvimento e manutenção homeostásica de sistemas biológicos. Este é um processo altamente regulado que é iniciado normalmente pela eliminação de células não desejadas nos organismos multicelulares. Aberrações na regulação

deste processo estão envolvidas em várias condições patológicas, bem como, cânceres, doenças neurodegenerativas, desordens autoimunes e infecções virais [ALVAREZ et al., 2006].

Apoptose é caracterizada por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas [MILLER et al., 2007], bem como na morfologia nuclear, incluindo condensação da cromatina (picnose) e fragmentação (“karyorrhexis”); mudanças secundárias nas organelas citoplasmáticas e encolhimento celular geral, formação de bolhas (“blebbing”) na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos que contém material nuclear ou citoplasmático. Todas essas mudanças ocorrem antes que a integridade da membrana plasmática seja perdida [GOLSTEIN; KROEMER, 2006].

A cascata de reações que leva a morte celular apoptótica pode ser iniciada através de dois mecanismos principais (figura 08):

- Caminho intrínseco ou mitocondrial: apoptose resulta de uma cascata de eventos intracelulares, no qual a permeabilização da membrana mitocondrial representa um caminho crucial [KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007]. Este processo é disparado pela interrupção da função mitocondrial, causando assim, a liberação do citocromo C para o citosol. O citocromo C liberado se liga ao Apaf-1 e induz sua oligomerização, na presença de dATP. Este complexo, denominado apoptossomo, recruta e ativa a caspase-9 iniciadora. A ativação da caspase-9 iniciadora leva a ativação das caspases efetoras (caspase-3, -6, e -7) [ALMEIDA et al., 2004].

- Caminho extrínseco ou receptor de morte: a apoptose é disparada pela ativação do ligante de indução de receptores de morte na superfície celular. Tais receptores de morte incluem o receptor-1 de fator de necrose tumoral (TNF), CD95/Fas (o receptor do CD95L/FasL), bem como os receptores -1 e -2 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) [KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007]. Quando os receptores de superfície dos genes da família do fator de necrose tumoral (TNF) são estimulados, estes ativam a caspase-8 iniciadora via adaptador e proteínas "scaffolding" (conjunto de proteínas que ativam a via de sinalização) [ALMEIDA et al., 2004].

Sob ativação de ambos os caminhos, caspases, bem como a caspase-8,-9, ou -3, são ativadas para executar a morte celular [LORENZO; SUSIN, 2007].

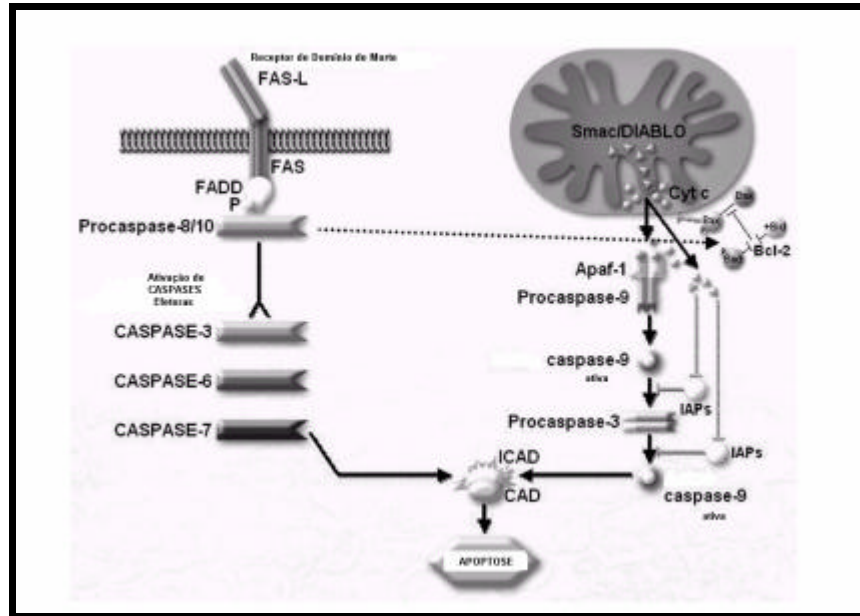


Figura 08: Caminho intrínseco e extrínseco [modificado de GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005].

2.5.2 Autofagia

Macroautofagia (também denominada “autofagia”) é ativada em resposta à privação de nutrientes, diferenciação, e ativação do desenvolvimento. Este é um processo adaptativo em resposta ao estresse metabólico que resulta na degradação de proteínas intracelulares e organelas [RICCI; ZONG, 2006]. Representando assim, um processo pelo qual o citosol e as organelas começam a se incluir nas estruturas da dupla membrana, denominadas autofagossomos. A última fusão com lisossomos é um processo proteolítico subsequente que permite o “envolvimento” do material para se tornar disponível para reciclagem [KESSEL; REINERS-JR, 2007a], sendo este digerido por hidrolases lisossomais [KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007].

As características deste tipo de morte celular são: aparecimento de vacúolos inclusos nas duplas ou múltiplas membranas, dilatação mitocondrial, bem como amplificação do retículo endoplasmático (ER) e aparelho de Golgi. Vacúolos, os quais apresentam porções envolvidas de citoplasma e organelas (ex.: mitocôndria ou retículo endoplasmático), se fundem com lisossomos. Então, as enzimas lisossomais desintegram o material intravacuolar. Trocas morfológicas, bem como condensação da cromatina ou formação de bolhas na

membrana, também podem ocorrer na morte celular autofágica. Porém, não ocorre fragmentação de DNA e nem formação de corpos apoptóticos [LORENZO; SUSIN, 2007].

Em alguns casos, este tipo de morte celular parece ser independente das caspases, sendo controlada por proteínas, como Atg5 ou Atg6/Becn1 [LORENZO; SUSIN, 2007].

Embora originalmente descrita como uma resposta de sobrevivência evocada por privação de nutrientes, agora está claro que a autofagia pode também servir como um caminho de morte celular [KESSEL; REINERS-JR, 2007a].

Kessel et al. 2007 e outros pesquisadores, recentemente reportaram que a autofagia ocorre durante os protocolos da TFD que envolve fotossensibilizantes que se localizam no retículo endoplasmático [KESSEL; REINERS-JR, 2007b].

A relação funcional entre apoptose e autofagia é complexa, e a autofagia pode tanto contribuir para a morte celular quanto constituir uma defesa celular contra o stress agudo, particularmente induzido por privação de nutrientes ou comprometimento de fatores de crescimento. As células que são privadas de fontes de energia exógenas que catabolizam parte de seu citoplasma para gerar ATP e outros metabólitos intermediários que permitem a eles satisfazer sua demanda energética essencial. Além disso, a autofagia permite o “turnover” de regiões citoplasmáticas incluindo agregados de proteínas e organelas danificadas. A autofagia previne a acumulação de proteínas agrupadas em corpos inclusos, uma função que pode exercer efeitos neuroprotetores [KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007].

2.5.3 Necrose

Necrose é considerada um tipo de morte celular acidental causada por danos físicos ou químicos através de um processo não-programado [CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; MOREIRA et al., 2008]. Ela é caracterizada por inchaço (“swelling”) do citoplasma, destruição de organelas, e, ruptura da membrana plasmática, deste modo, levando a liberação dos conteúdos intracelulares e inflamação.

A necrose não é pré-determinada geneticamente e ocorre normalmente entre um curto período seguindo a ativação do insulto (2 a 4 horas). A aparência fenotípica das células necróticas é altamente dependente da severidade da injúria [KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007].

A distinção entre os tipos de morte celular é importante, particularmente porque a necrose geralmente está associada com perda de célula não-desejada em patologias humanas e

pode levar a uma inflamação local, presumidamente através da liberação de fatores de morte celular que alertam o sistema imune inato [GOLSTEIN; KROEMER, 2006].

Baseando-se na modalidade aparente de destruição celular, a necrose foi subdividida em dois tipos, onde, o núcleo é destruído por fragmentação e o núcleo apresenta cariólises.

Em alguns casos de necrose pode ocorrer um inchaço inicial das organelas intracelulares, seguida por perda da integridade da membrana plasmática. Novos estudos descrevem que este tipo de morte celular, independente de caspase, é fortemente regulado e, dependendo do sistema de morte celular e/ou insulto da morte celular, implica diferentes proteínas, como, TRAIL, TRADD, RIP1, TRAF2, JNK1, XRCC1, PARP-1, calpaínas, Bax, AIF, ou Drp1 [LORENZO; SUSIN, 2007].

Estudos recentes vêm demonstrando que, a RIP quinase (proteína que interagem com o receptor), a qual é essencial para a necrose induzida pelo TNF, pode inibir a troca ATP/ADP na membrana mitocondrial através de uma interação direta com a translocase adenina nucleotídeo (ANT), causando assim uma disfunção mitocondrial e a morte celular [KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007].

3 RESULTADOS

3.1 Artigo 1: Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent. *Photomedicine & Laser Surgery*. v.25, n.3, p.220-228, 2007.

3.2 Artigo 2: Cytotoxicity of Octal-bromide Zinc Phthalocyanine after Photodynamic Therapy with different light sources. *Photomedicine & Laser Surgery*. v.26, n.5, p.455-459, 2008.

3.3 Artigo 3: Analyses of nucleus, mitochondria and cytoskeleton of HEp-2 cells after PDT with ZnPcBr₈. Cell Biology International. "SUBMETIDO".

3.4 Artigo 4: Analysis of Mitochondrial Activity Related to Cell Death after PDT with AlPcS₄. Photomedicine & Laser Surgery. v.25, n.3, p.175-179, 2007.

4 DISCUSSÃO

Diversos fotossensibilizantes e fontes de luz vêm sendo estudados com o intuito de se tratar doenças humanas [ALEXIADES-ARMENAKAS, 2006]. Baseando-se nestes estudos, foi proposto um estudo entre diferentes linhagens celulares, fotossensibilizantes e fontes de luz.

A partir dessas considerações é que se obteve o intuito de se elucidar o efeito fotodinâmico de um novo agente fotossensibilizante não-comercial, a Zinco Ftalocianina Octa-bromada, recentemente desenvolvida por um grupo de Pesquisadores do Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

Bem como a Zinco Ftalocianina Octa-bromada, uma extensa gama de fotossensibilizantes de segunda geração, vêm sendo produzidos com o intuito de se aprimorar a técnica de Terapia Fotodinâmica, como por exemplo, a Zinco Ftalocianina Anfífila (ZnPcLTs) [WEI et al., 2006] e a Zinco Ftalocianina Tetrasulfonada (ZnPcS₄) [HUANG et al., 2007].

Inicialmente foram utilizadas células de tecido conjuntivo de camundongo (Clone L929; ATCC CCL-1 NCTC), uma vez que, esta linhagem celular é recomendada pela ISO 10993-5 para testes de toxicidade *in vitro*.

As células L929 foram incubadas com a ZnPcBr₈ por 1 hora em diferentes concentrações. Este período de incubação está de acordo com outros estudos previamente desenvolvidos, bem como os que foram realizados por Pazos et al., (2003), que utilizou o mesmo tempo de incubação para a AlPc e a AlPcS₄, e Ferreira et al., (2004) utilizando a AlPcS₄ [PAZOS et al., 2003; FERREIRA et al., 2004].

O espectro de absorção da ZnPcBr₈ demonstrou que o pico máximo de absorção está localizado na faixa de 676nm. Este comprimento de onda localiza-se na mesma banda espectral de outras ftalocianinas, as quais apresentam seu coeficiente de excitação na região vermelha do espectro (630 à 750nm), apresentando excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência fotossensibilizante [FERREIRA et al., 2004]. Tais características foram previamente descritas em outras ftalocianinas, como ZnPc lipossomal, [YSLAS;

RIVAROLA; DURANTINI, 2005] ZnPcS₂, ZnPcS₃, [CAUCHON et al., 2005] e AlPcS₄ [PAZOS et al., 2003].

Como ponto de partida, objetivou-se avaliar a citotoxicidade da ZnPcBr₈, uma vez que este fotossensibilizante não havia passado por nenhum outro teste biológico. Havendo assim, a necessidade de se encontrar o equilíbrio entre uma concentração não tóxica na ausência de luz, porém, extremamente eficaz no tratamento fotodinâmico.

Para tal avaliação, foi realizado o teste de MTT. Esta técnica é particularmente apreciada devido ao seu baixo custo e rapidez [COLLIER; PRITSOS, 2003].

A redução do MTT é considerada ser um indicativo da atividade metabólica celular e sua medida é comumente utilizada para avaliar proliferação celular e viabilidade [COLLIER; PRITSOS, 2003; TREVISI et al., 2006].

Diversos pesquisadores vêm modificando este teste desde que ele foi primeiramente desenvolvido por Mosmann em 1983 [HAMID et al., 2004].

O teste MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) quantifica a atividade mitocondrial através da medida da formação de um produto de formazan de cor azul escura resultado da redução do anel tetrazolium MTT. A redução do MTT é conhecida por ocorrer principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase, portanto provindo uma medida de função mitocondrial. Existem trabalhos indicando que a redução do MTT também poderia ocorrer fora da mitocôndria, [LOBNER, 2000] bem como em endossomos e lisossomos [VELLONEN; HONKAKOSKI; URTTI, 2004].

O Dimetil Sulfóxido (DMSO) utilizado na primeira diluição da ZnPcBr₈ é considerado tóxico para as células. Porém, em baixas concentrações, como as que foram utilizadas nos experimentos, esta toxicidade é quase que insignificante, conforme demonstrado por Martines e colaboradores em 2007 [MARTINES et al., 2007].

De acordo com os resultados do MTT, todas as concentrações da ZnPcBr₈ apresentaram efeitos toleráveis no escuro, apresentando uma viabilidade celular de 94% em 0.25 *nM*, 87% em 0.5 *nM*, e 82% em 1 *nM*. Nestas concentrações, pode-se observar que a de 1 *nM* foi a mais eficiente após TFD, com uma diminuição de células viáveis de 63% após 1 hora, 99% após 12 horas, e 100% após 24 horas em relação às células do grupo controle.

Esta mesma concentração (1 *nM*) foi previamente utilizada por Fabris et al., (2001) com o intuito de se analisar o tipo de morte celular ocasionada pela ZnPc após a irradiação da mesma [FABRIS et al., 2001].

Tudo indica que a diminuição da viabilidade celular causada pela TFD com a ZnPcBr₈ na concentração 1 **mM** é mediada pela reação do tipo II, conforme a maioria dos fotossensibilizantes atualmente estudados para a TFD. Este tipo de reação envolve a produção de oxigênio singlete. Esta espécie reativa é extremamente eficiente na produção de formas oxidadas das biomoléculas, deste modo iniciando a maioria dos tipos de danos ocasionados pela TFD [RIBEIRO et al., 2005].

As propriedades fluorescentes dos agentes fotossensibilizantes podem ser utilizadas para avaliar sua localização intracelular e os efeitos do tratamento [BERG et al., 2005].

De acordo com esses princípios, a técnica de microscopia de fluorescência foi realizada para avaliar a localização intracelular e os fotodanos causados pela TFD com a ZnPcBr₈ em cultura de células L929.

Resultados observados através da técnica de Microscopia de Fluorescência demonstram que a ZnPcBr₈, uma ftalocianina hidrofílica, localiza-se na região perinuclear, quando esta foi analisada 1 hora após incubação. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Pazos et al., o qual descreveu que a ALPcS₄, um fotossensibilizante solúvel em água, como a ZnPcBr₈, localiza-se em endossomos e lisossomos [PAZOS et al., 2003].

DAPI (4', 6' - diamidino, 2' phenylindole) é um marcador fluorescente específico para núcleo. Sendo assim foi possível observar que, o grupo controle, fotossensibilizante e laser de todos os tempos (1, 12 e 24 horas) não sofreram alterações no formato nuclear. Tais características também foram observadas no grupo de células marcadas com DAPI 1 e 12 horas após a Terapia Fotodinâmica. Porém, no grupo de células marcadas com DAPI 24 horas após a TFD pode-se observar fragmentação nuclear.

Embora a marcação com DAPI seja específica para núcleo, esta também facilitou a visualização da disposição citoplasmática. Podendo ser observado uma retração citoplasmática no grupo marcado 1 hora após a TFD. Já nos grupos analisados 12 e 24 horas após a TFD, além da retração pode ser observada a presença de vacúolos ao longo do citoplasma, os quais não foram observados nos demais grupos, onde a disposição e a integridade citoplasmática permaneceram normais.

De acordo com a literatura, as características morfológicas visualizadas através da microscopia de fluorescência com DAPI após a TFD (como fragmentação nuclear, retração da membrana plasmática e conseqüente perda de adesão celular) são características de morte celular através do mecanismo de apoptose [RIBEIRO; SILVA; JORGE, 2004], possivelmente provocada pela via mitocondrial, onde as características morfológicas de apoptose resultam da ativação de caspases (cisteínas proteases) [EDINGER; THOMPSON, 2004]. Além das

características observadas, outros dois fatos, como a diminuição da viabilidade celular e a localização subcelular, reforçam a sugestão de que a morte celular ocorrida foi mediada por apoptose via mitocondrial.

Este caminho apoptótico mediado pela mitocôndria está de acordo com o mecanismo de morte celular (apoptose) descrito por Chiu et al. após a TFD de células L5178Y-R utilizando-se a SiPcS₄ [CHIU et al., 2001; DONGEN; VISSER; VROUENRAETS, 2004] e com células HCT116 [CHIU et al., 2005].

Após uma avaliação inicial dos efeitos da TFD com a ZnPcBr₈ em cultura de células de tecido conjuntivo de camundongo (L929), foram realizados experimentos objetivando-se finalmente avaliar a citotoxicidade deste novo agente fotossensibilizante após TFD em cultura de células cancerígenas humanas (HEp-2), uma vez que, este tratamento se destina intensamente ao tratamento de câncer. Esses experimentos foram realizados utilizando-se diferentes fontes de luz.

Para a avaliação da citotoxicidade da ZnPcBr₈ além do teste de MTT anteriormente descrito, foi utilizado o teste de Exclusão com o corante Azul de Tripán, frequentemente utilizado para medir morte celular. Assim, este método representa uma medida direta de danos na membrana e vazamento [KELLEY; BUETTNER; BURNS, 1997].

O corante azul de Tripán não consegue penetrar na membrana plasmática intacta de células viáveis (brancas), somente atravessando a membrana plasmática de células mortas (azul) [KARMAKAR et al., 2007].

De acordo com os resultados do MTT, todas as concentrações da ZnPcBr₈ (0.25, 0.5 e 1µM) apresentam efeitos toleráveis no escuro. Dentre essas concentrações foi possível observar que 1µM foi a mais eficiente após a TFD com ambas as fontes de luz.

As células HEp-2 apresentaram os seguintes resultados de viabilidade celular: uma diminuição de 97.96% após 1 hora e de 99.87% após 24 horas de irradiação com LASER, e uma diminuição de 94.03% após 1 hora e de 99.21% 24 horas após irradiação com LED. Esta diminuição foi obtida em comparação com o grupo controle, onde as células apresentaram uma viabilidade de 100%.

O teste de exclusão com o corante azul de Tripán foi realizado com o intuito de se validar os resultados obtidos com o teste de MTT.

Resultados obtidos através deste teste confirmam a eficiência fotodinâmica da ZnPcBr₈ empregada com ambas às fontes de luz. Novamente, a concentração 1µM foi a mais eficiente após a TFD com ambas as fontes de luz, onde as células HEp-2 apresentaram os

seguintes resultados de viabilidade celular: uma diminuição de 98.73% 1 hora após e de 99.49% 24 horas após irradiação com LASER, e uma diminuição de 98.76% 1 hora após e de 99.23% 24 horas após irradiação com LED.

Estes resultados estão de acordo com os achados de Machado et al. (2007), onde foi previamente observado que 1 μ M foi a concentração mais eficiente para a Terapia Fotodinâmica com ZnPcBr₈ utilizando-se um Laser de Diodo, cujo comprimento de onda foi de 685nm, em células Clone L929 [MACHADO et al., 2007].

Pode ser observada uma ligeira diferença, na porcentagem de viabilidade celular entre esses dois testes (MTT e exclusão com o corante azul de Tripan).

Esta diferença pode ser devido ao fato que, o prejuízo metabólico (detectado pelo MTT) e o dano celular irreversível (detectado pelo azul de Tripan) possam ocorrer em tempos diferentes. Outro fator que pode estar relacionado a esta ligeira diferença é que a resposta baseada nos dados do azul de Tripan foi aditivo e os baseados nos dados do MTT foi quase-sinérgico. Em ambos os casos, a TFD utilizando a ZnPcBr₈ e Laser ou LED resultaram no reforço mútuo da eficiência destrutiva [CRESCENZI et al., 2004].

Neste estudo, a TFD com LED apresentou efeito fotodinâmico similar a TFD com Laser. Ambas as fontes de luz provocaram uma expressiva diminuição na viabilidade de células HEp-2 incubadas com ZnPcBr₈.

Devido ao fato de se utilizar diferentes potências do Laser e do LED, os parâmetros de irradiação de ambas as fontes de luz foram ajustados para que a quantidade de densidade de energia entregue fosse a mesma, em ambos os experimentos. Este ajuste explica porque os resultados obtidos neste estudo foram similares.

Estes achados são extremamente atrativos, uma vez que a TFD com LED apresenta vantagens em relação a TFD com Laser, devido ao fato de que o LED apresenta uma vasta gama de comprimentos de onda, representa uma terapia de baixo custo e é facilmente manipulado.

Estes resultados poderiam contribuir para tornar a TFD uma terapia economicamente viável. Porém, novos estudos “*in vivo*” seriam necessários para investigar a possibilidade de que o LED provê resultados similares ao laser na TFD.

Após a constatação de uma redução substancial do número de células viáveis depois da TFD com a ZnPcBr₈ foram realizados experimentos objetivando-se analisar as possíveis alterações morfológicas decorrentes do tratamento.

Empregando-se o marcador fluorescente DAPI, condensação da cromatina, retração celular e corpos apoptóticos podem ser observados através de Microscopia de Fluorescência

[CANDAL et al., 2005]. Conforme mencionado anteriormente, esse marcador é específico para núcleo. Dessa forma, podemos observar, em ambos os tempos (1 e 24 horas) fragmentação nuclear nas células submetidas a TFD com a $ZnPcBr_8$. É importante enfatizar que as células do grupo controle, fotossensibilizante e laser, de ambos os tempos, não demonstraram trocas morfológicas significantes.

É verdade que a TFD leva às células a morte e na maioria dos casos, a morte é conduzida por apoptose. A mitocôndria representa um caminho crucial na apoptose pela liberação de fatores apoptóticos, bem como o citocromo c e o fator indutor de apoptose do espaço intermembranar para o citoplasma. Esses componentes podem interromper a homeostase celular pela desregulação de diversas cascatas de sinalização molecular, as quais ocasionam a morte celular. Porém, a liberação dos fatores apoptóticos ocorre como um resultado da peroxidação da cardiolipina, um fosfolípido da membrana interna da mitocôndria [PERRIN-TAMIETTI et al., 2007], que é altamente ligado a muitas proteínas mitocondriais cruciais, como aquelas relacionadas com o canal do complexo respiratório, citocromo c, e componentes do poro de transição [MORRIS et al., 2003]. Diversos estudos vêm sugerindo o envolvimento da cardiolipina na formação do poro mediada pela interação com proteínas pró-apoptóticas, bem como t-Bid e Bax [FERNANDEZ et al., 2002; ZAMZAMI; KROEMER, 2003; PERRIN-TAMIETTI et al., 2007].

Com o intuito de se investigar a dano mitocondrial, mediado pela TFD com $ZnPcBr_8$, foi utilizado o marcador fluorescente NAO (Nonyl-Acridine Orange) que é um marcador específico para o fosfolípido cardiolipina. Este marcador vem sendo utilizado para medir a massa mitocondrial e a quantidade de cardiolipina na membrana mitocondrial interna [MORRIS et al., 2003]. Utilizando-se o marcador fluorescente NAO, após TFD com $ZnPcBr_8$ foi possível observar uma hiperpolarização mitocondrial na região perinuclear. Peroxidação da cardiolipina e alterações na morfologia mitocondrial sugerem uma diminuição na massa dessa organela. Estas observações foram realizadas tanto 1 hora quanto 24 horas após tratamento, revelando basicamente os mesmos resultados. Essas alterações não foram observadas nos outros grupos (controle, fotossensibilizante e laser), onde a mitocôndria apresentou uma distribuição homogênea de sua massa.

Considerando todas as trocas morfológicas a uma célula submetida à fototerapia, os elementos do citoesqueleto não podem ser ignorados. Diferentes autores vêm demonstrando que estes elementos também representam alvos para a TFD [BERG; MOAN, 1997; JUARRANZ et al., 2001; CAÑETE et al., 2004].

Microtúbulos e microfilamentos de actina vêm demonstrando ser danificados após fotossensibilização celular, e alguns dados sugerem que a lesão no citoesqueleto poderia ser um fator relevante envolvido na morte celular induzida pelo tratamento fotodinâmico [BUÑO et al., 1998]. Despolimerização ou clivagem de actina, citoqueratina, lamininas e outras proteínas do citoesqueleto vêm sendo descritas como possuir uma função significativa em todos os passos relacionados a apoptose [BURSCH et al., 2000].

Em nossos experimentos, a TFD com ZnPcBr₈ em células HEp-2 ocasionou uma completa desorganização dos filamentos de actina e perda de adesão celular com o substrato. Tais características não foram observadas nos demais grupos.

Baseando-se nestes resultados, podemos sugerir que as alterações na disposição do citoesqueleto poderia ser resultante da interação do fotossensibilizante ZnPcBr₈ com proteínas que de muitas maneiras se conectam com o citoesqueleto. Alterações morfofisiológicas da mitocôndria, mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio, após as células terem sido expostas à luz pode ser outra causa da alteração sofrida pelo citoesqueleto [FERREIRA et al., 2004].

Com o intuito de se avaliar outros agentes fotossensibilizantes de segunda geração foram realizados experimentos utilizando-se a Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄). Estes experimentos foram realizados objetivando-se avaliar a atividade mitocondrial de células HEp-2 após TFD com AlPcS₄.

Técnicas de fluorescência foram utilizadas para detecção de danos induzidos na mitocôndria de células HEp-2, empregando-se específicos marcadores fluorescente, como o Nonyl Acridine Orange (NAO), e MitoTracker Orange. Sendo assim, o foco do experimento foi observar os efeitos ocasionados na membrana mitocondrial, principalmente no potencial de membrana e na peroxidação da cardiolipina, e a participação desses constituintes no processo de morte celular.

A dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$) e a liberação do citocromo C parecem representar os eventos fundamentais que ocorrem durante a apoptose [ASSUNCAO-GUIMARATES; LINDEN, 2004].

O marcador fluorescente MitoTracker Orange CMTMRos mede o potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$), independente da massa mitocondrial, e da fotossensibilização [BUCKMAN et al., 2001; CREGAN et al., 2002]. Este marcador é seletivamente incorporado pelas mitocôndrias que apresentam potencial transmembranar intacto e, portanto, funcionam como indicadores de despolarização mitocondrial [CREGAN et al., 2002]

De acordo com os resultados, pode ser observado que as células do grupo controle apresentaram uma distribuição homogênea da mitocôndria. No grupo de células analisadas 24 horas após TFD foi observado uma migração mitocondrial para a região perinuclear. Esta migração foi demonstrada anteriormente por Ferreira et al. (2004), quando foi observado o efeito da AIPcS₄ em cultura de células HeLa após TFD [FERREIRA et al., 2004]. 48 horas após TFD, as células perderam a forma e a adesão, podendo ser observado uma clara redução do $m\Delta\psi$, indicando uma despolarização mitocondrial, quando comparado com o tempo de 24 horas. As análises realizadas 72 horas após a TFD demonstram que as células sofreram uma completa perda de forma, sendo possível observar apenas uma pequena fração de mitocôndria com alto $m\Delta\psi$.

A análise dos resultados indica uma heterogeneidade na marcação observada em todos os grupos após a TFD, devido à provável ausência de atividade mitocondrial. Embora seja possível inferir que parte da mitocôndria apresente sua membrana despolarizada. A despolarização mitocondrial ocorre de uma maneira heterogênea, sugerindo que algumas mitocôndrias devam permanecer intactas uma vez que o ATP é requerido para completar a cascata apoptótica [KRYSKO et al., 2001; FERREIRA et al., 2004].

Para avaliar a distribuição da cardiolipina na mitocôndria de células HEP-2 após TFD com AIPcS₄ estas foram incubadas com NAO, onde foi possível observar que as células que sofreram o tratamento apresentaram uma marcação heterogênea e pontual, bem como perda de adesão celular em todos os tempos após a TFD (24, 48, e 72 horas).

Utilizando-se de técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão foi possível observar alterações na distribuição citoplasmática, evidenciando condensação da cromatina em adição à membrana nuclear intacta. Outra alteração observada após a TFD foi perda da crista mitocondrial. Os resultados da TFD em células HEP-2 apresentados neste estudo sugerem uma despolarização progressiva observada nos tempos de 48 e 72 horas.

Portanto, ambos os marcadores demonstraram uma migração mitocondrial para a região perinuclear, confirmada através da Microscopia Eletrônica, sugerindo que a mitocôndria intacta foi solicitada para uma possível fragmentação de DNA.

5 CONCLUSÃO

- A morte de Células Clone L929 ocasionada pela TFD com ZnPcBr₈ apresenta características de apoptose mediada pela mitocôndria, devido à diminuição da viabilidade celular, a localização subcelular e os fotodanos encontrados.
- Tanto o LED quanto o LASER podem ser utilizados na Terapia Fotodinâmica *in vitro*, uma vez que ambas as fontes de luz apresentaram excelente eficiência fotodinâmica após TFD com ZnPcBr₈ em cultura de Células HEp-2.
- Terapia Fotodinâmica com ZnPcBr₈ e LASER ocasionou significantes alterações morfológicas em cultura de Células HEp-2, bem como, formação de corpos apoptóticos, despolimerização da cardiolipina e retração celular com perda de adesão das células, sugerindo que tenha ocorrido morte celular por apoptose.
- Após TFD com AlPcS₄ e LASER, em cultura de Células HEp-2, ocorreu migração mitocondrial para a região perinuclear, sugerindo que a presença de mitocôndrias intactas seja solicitada para uma possível fragmentação de DNA.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; LOUKAS, S. A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. **Free Rad. Biol. Med.** v.39, p.1119-1127, 2005.
- ALEXIADES-ARMENAKAS, M. Laser-mediated photodynamic therapy. **Clin. Dermatol.** v.24, p.16-25, 2006.
- ALI, S.M.; OLIVO, M. Bio-distribution and subcellular localization of hypericin and its role in PDT-induced apoptosis in cancer cells. **Int. J. Oncol.** v.21, p.531-540, 2002.
- ALLEN, C.M.; LANGLOIS, R.; SHARMAN, W.M.; MADELEINE, C.; VAN-LIER, J.E. Photodynamic Properties of Amphiphilic Derivatives of Aluminum Tetrasulfophthalocyanine. **Photochem. Photobiol.** v.76, n.2, p.208-216, 2002.
- ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU, X.H.; CHILDS, C.J.H.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiag. Photodyn. Ther.** v.1, p.27-42, 2004.
- ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUART, C.B. Review: Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1704, p.59-86, 2004.
- AL-MUTAIRI, D.A.; CRAIK, J.D.; BATINIC-HABERLE, I.; BENOVA, L.T. Photosensitizing action of isomeric zinc N-methylpyridylporphyrins in human carcinoma cells. **Free Radical Res.** v.40, n.5, p.477-483, 2006.
- AL-RAQA, S.Y. The synthesis and photophysical properties of novel, symmetrical, hexadecasubstituted Zn phthalocyanines and related unsymmetrical derivatives. **Dyes Pigm.** v.77, p.259-265, 2008.
- ALVAREZ, M.G.; PRUCCA, C.; MILANESIO, M.E.; DURANTINI, E.N.; RIVAROLA, V. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C60 dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v.38, p.2092-2101, 2006.
- ARIAS, G.A.M.; LUNA, A.E.; DELGADILLO, A.A.; CAMPS-FRESNEDA, A. Terapia fotodinámica. **Med. Cutan. Iber. Lat. Am.** v.35, n.6, p.255-268, 2007.
- ASSUNCAO-GUIMARATES, C.; LINDEN, R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. **Eur. J. Biochem.** v.271, p.1638-1650, 2004.
- ATILLA, D.; SAYDAN, N.; DURMUS, M.; GUREK, A.G.; KHAN, T.; RUCK, A.; WALT, H.; NYOKONG, T.; AHSEN, V. Synthesis and photodynamic potential of tetra- and octa-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanines. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.** v.186, p.298-307, 2007.

BACKHAUS, M.R.; VILLA, M.T.; DONOSO, C.D.V.; CRUZ, J.F.C. Terapia fotodinámica en el cáncer de próstata localizado. **Actas Urol. Esp.** v.31, n.6, p. 633-641, 2007.

BERG, K.; MOAN, J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. **Photochem. Photobiol.** v.65, p.403-409, 1997.

BERG, K.; SELBO, P.K.; WEYERANG, A.; DIETZE, A.; PRASMICKAITE, L.; BONSTED, A.; ENGESAETER, B.O.; ANGELLPETERSEN, E.; WARLOE, T.; FRANDSEN, N.; HOGSET, A. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. **J. Microsc.** v.218, p.133-147, 2005.

BRANDON, J.; ERDLE, B.S.; BROUXHON, S.; KAPLAN, M.; VANBUSKIRK, J.; PENTLAND, A.P. Effects of Continuous-Wave (670-nm) Red Light on Wound Healing. **Dermatol. Surg.** v.34, p.320-325, 2008.

BUCKMAN, J.F.; HERNANDEZ, H.; KRESS, G.J.; VOTYAKOVA, T.V.; PAL, S.; REYNOLDS, I.J. Mito-Tracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. **J. Neurosci. Met.** v.104, p.165-176, 2001.

BUÑO, I.; JUARRANZ, A.; CAÑETE, M.; VILLANUEVA, A.; GOSALVEZ, J.; STOCKERT, J.C. Image Processing and Analysis of Fluorescent Labelled Cytoskeleton. **Micron.** v.29, n.6, p.445-449, 1998.

BURSCH, W.; HOCHEGGER, K.; TÖRÖK, L.; MARIAN, B.; ELLINGER, A.; HERMANN, R.S. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. **J. Cell Sci.** v.113, p.1189-1198, 2000.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. **Eur. Ac. Dermatol. Venereol.** v.21, p.293-302, 2007.

CANDAL, E.; ANADÓN, R.; DEGRIP, W.J.; RODRÍGUEZ-MOLDES, I. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. **Develop. Brain Res.** v.154, p.101-119, 2005.

CAÑETE, M.; ORTEGA, C.; GAVALDÁ, A.; CRISTOBAL, J.; JUARRANZ, A.; NONELL, S.; TEIXIDÓ, J.; BORRELL, J.I.; VILLANUEVA, A.; RELLO, S.; STOCKERT, J.C. Necrotic cell death induced by photodynamic treatment of human lung adenocarcinoma A-549 cells with palladium(II)-tetraphenylporphycene. **Int. J. Oncol.** v.24, p.1221-1228, 2004.

CARNEVALLI, C.M.M.; PACHECO-SOARES, C.; ZÂNGARO, R.A.; PINHEIRO, A.L.B.; DA-SILVA, N.S. Laser light prevents apoptosis on CHO-K1 cell line. **J. Clin. Laser Med. Surg.** v.21, n.4, p. 193-196, 2003.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag. Photodyn. Ther.** v.1, p.279-293, 2004.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Review: Mechanisms in photodynamic therapy. Part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiag. Photodyn. Ther.** v.2, p.1-23, 2005.

CASTRO, J.L.F.; PINHEIRO, A.L.B.; WERNECK, C.E.; PACHECO-SOARES, C. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. **Photomed. Laser Surg.** v.23, n.6, p.586-589- 2005.

CASTRO-E-SILVA, T.; CASTRO-E-SILVA, O.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; ZUCOLOTO, S.; BAGNATO, V.S. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.40, p.1065-1069, 2007.

CAUCHON, N.; TIAN, H.; LANGLOIS, R.; LA MADELIENE, R.; MARTIN, S.; ALI, H.; HUNTING, D.; VAN LIER, J.E. Structure–photodynamic activity relationships of substituted zinc trisulfophthalocyanines. **Bioconjug. Chem.** v.16, p.80-89, 2005.

CHEN, H.M.; YU, C.H.; TSAI, T.; HSU, Y.C.; KUO, R.C.; CHIANG, C.P. Topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for oral verrucous hyperplasia, oral leukoplakia and oral erythroleukoplakia. **Photodiag. Photod. Therapy.** v.4, p.44-52, 2007.

CHIU, S.; EVANS, H.H.; LAM, M.; NIEMINEN, A.L.; OLEINICK, N.L. Phthalocyanine 4 photodynamic therapy-induced apoptosis of mouse L5178Y-R cells results from a delayed but extensive release of cytochrome *c* from mitochondria. **Cancer Lett.** v.165, p.51-58, 2001.

CHIU, S.M.; XUE, L.Y.; AZIZUDDIN, K.; OLEINICK N. L. Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: apoptosis with or without Bax expression. **Apopt.** v.10, p.1357-1368, 2005.

CHRISTIE, J.G.; KOMPELLA, U.B. Ophthalmic light sensitive nanocarrier systems. **Drug Disc. Today.** v.13, p.124-134, 2008.

COLLIER, A.C.; PRITSOS, C.A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochem. Pharmacol.** v.66, p.281-287, 2003.

CORMICK, M.P.; ROVERA, M.; DURANTINI, E.N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.** v.194, p.220-229, 2008.

CREGAN, S.P.; FORTIN, A.; MACLAURIN, J.G.; CALLAGHAN, S.M.; CECCONI, F.; YU, S.W.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; PARK, D.S.; KROEMER, G.; SLACK, R.S. Apoptosis inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **J. Cell Biol.** v.158, p.507-517, 2002.

CRESCENZI, E.; VARRIALE, L.; IOVINO, M.; CHIAVIELLO, A.; VENEZIANI, B.M.; PALUMBO, G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. **Mol.Cancer Ther.** v.3, n.5, p.537-544, 2004.

DONGEN, G.A.M.S.; VISSER, G.W.M.; VROUENRAETS, M.B. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.56, p.31-52, 2004.

DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiolog. Res.** v.163, p.1-12, 2008.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.16, p.663-669, 2004.

FABRIS, C.; VALDUGA, G.; MIOTTO, G.; BORSETTO, L.; JORI, G.; GARBISA, S.; REDDI, E. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **Cancer Res.** v.61, p.7495-7500, 2001.

FERNANDEZ, M.G.; TROIANO, L.; MORETTI, L.; NASI, M.; PINTI, M.; SALVIOLI, S.; DOBRUCKI, J.; COSSARIZZA, A. Early changes in intra-mitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. **Cell Growth Differ.** v.13, p.449-455, 2002.

FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA, G.; ZÂNGARO, R.A.; DA-SILVA, N. S.; PACHECO, M.T.T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmatic reticule and actin filaments after PDT with AlPcS₄. **Lasers Med. Sci.** v.18, p.207-212, 2004.

FRONTIER SCIENTIFIC CORPORATION. Disponível em: <http://www.frontiersci.com>. Acesso em: 31 agosto 2008.

GENOVESE, W.J. **Laser de Baixa Intensidade. Aplicações Terapêuticas em Odontologia.** 7. ed. São Paulo: Lovise, 2000. 163p.

GHOBRIAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **C.A. Cancer J. Clin.** v.55, p.178-194, 2005.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **TRENDS Biochem. Sci.** v.32, n.1, p.37-43, 2006.

HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicol. in Vitro.** v.18, p.703-710, 2004.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Changes in Cell Viability of Wounded Fibroblasts following Laser Irradiation in Broad-Spectrum or Infrared Light. **Laser Chem.** 10 p, 2007.

HUANG, Y.; XU, G.; PENG, Y.; LIN, H.; ZHENG, X.; XIE, M. Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate (ZnPcS₄): A New Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Choroidal Neovascularization. **J. Ocular Pharmacol. Therapeut.**, v.23, n.4, p.377-386, 2007.

HUANG, Z.; HUANG, J.; CHEN, N.; HUANG, J. The syntheses, characterization and properties of some metallophthalocyanine complexes substituted by (N-(2-hydroxyethyl)piperazine)-N0-2-ethane sulfonic acid (HEPES). **Dyes Pig.** v.77, p.584-589, 2008.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.** v.188, p.200-206, 2007.

INTERNATIONAL STANDARD - ISO 10993-5, second edition 1999-05-15. **Biological evaluation of medical devices.** Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.

JUARRANZ, A.; ESPADA, J.; STOCKERT, J.C.; VILLANUEVA, A.; POLO, A.; DOMINGUEZ, V.; CANETE, M. Photodamage Induced by Zinc(II)-phthalocyanine to Microtubules, Actin, α -Actinin and Keratin of HeLa Cells. **Photochem. Photobiol.** v.73, n.3, p.283-289, 2001.

KARMAKAR, S.; BANIK, N.L.; PATEL, S.J.; RAY, S.K. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. **Neurosc. Lett.** v.415, p.242-247, 2007.

KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v.49, p.1-17, 1999.

KE, M.S.; XUE, L.Y.; FEYES, D.K.; AZIZUDDIN, K.; BARON, E.D.; MCCORMICK, T.S.; MUKHTAR, H.; PANNEERSELVAM, A.; SCHLUCHTER, M.D.; COOPER, K.D.; OLEINICK, N.L.; STEVENS, S.R. Apoptosis Mechanisms Related to the Increased Sensitivity of Jurkat T-cells vs A431 Epidermoid Cells to Photodynamic Therapy with the Phthalocyanine Pc 4. **Photochem. Photobiol.** v.84, p.407-414, 2008.

KELLEY, E.E.; BUETTNER, G.R.; BURNS, C.P. Production of Lipid-Derived Free Radicals in L1210 Murine Leukemia Cells. Is an Early Oxidative Event in the Photodynamic Action of Photofrin. **Photochem. Photobiol.** v.65, n.3, p.576-580, 1997.

KESSEL, D.; REINERS-JR, J.J. Initiation of apoptosis and autophagy by the Bcl-2 antagonist HA14-1. **Cancer Lett.** v.249, p.294-299, 2007a.

KESSEL, D.; REINERS-JR, J.J. Apoptosis and Autophagy After Mitochondrial or Endoplasmic Reticulum Photodamage. **Photochem. Photobiol.** v.83, p.1-5, 2007b.

KOLAROVÁ, H.; MOSINGER, J.; LENOBEL, R.; KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; STRNAD, M. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicol. in Vitro.** v.17, p.775-778, 2003.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiol. Rev.** v.87, p.99-163, 2007.

KRYSKO, D.V.; ROELS, F.; LEYBAERT, L.; D'HERDE, K. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.** v.49, p.1277-1284, 2001.

- LAM, M.; OLEINICK, N.L.; NIEMINEN, A.L. Photodynamic Therapy-induced Apoptosis in Epidermoid Carcinoma Cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. **J. Biol. Chem.** v.276, n.50, p.47379-47386, 2001.
- LIU, Y.Y.; XIA, S.Q.; ZENG, Z.H.; QIAO, R.; WANG, X.S.; ZHANG, B.W. Synthesis of a hypocrellin B-polyamide conjugate as DNA-targeting photosensitizer. **Chin. Chem. Lett.** v.19, p.157-160, 2008.
- LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J. Neurosc. Met.** v.96, p.147-152, 2000.
- LORENZO, H.K.; SUSIN, S.A. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death **Drug Resist. Up.** v.10, p.235-255, 2007.
- MACHADO, A.H.A.; BRAGA, F.M.P.; PACHECO-SOARES, C.; PELISSON, M.M.M.; BELTRAME-JUNIOR, M.; DA-SILVA, N.S. Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent. **Photomed. Laser Surg.** v.25, n.3, p.220-228, 2007.
- MACHADO, A.H.A.; PACHECO-SOARES, C.; BELTRAME-JUNIOR, M.; PACHECO, M.T.T.; DA-SILVA, N.S. Cytotoxicity of Octal-Bromide Zinc Phthalocyanine after Photodynamic Therapy with different Light Sources. **Photomed. Laser Surg.** v.26, n.5, p.455-459, 2008.
- MAHMOUD, B.H.; HEXSEL, C.L.; HAMZAVI, I.H.; LIM, H.W. Review: Effects of Visible Light on the Skin. **Photochem. Photobiol.** v.84, p.450-462, 2008.
- MARTINES, N.S.; MACHADO, A.H.A.; DA-SILVA, N.S.; TEDESCO, A.C.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO-SOARES, C. Avaliação de células neoplásicas após Terapia Fotodinâmica. **Arq. Catarin. Med.** v.36, n.1, p. 59-64, 2007.
- MAVROPOULOS, A.; STAUDT, C.B.; KILIARIDIS, S.; KREJCI, I. Light curing time reduction: in vitro evaluation of new intensive light-emitting diode curing units. **Eur. J. Orthod.** v.27, p.408-412, 2005.
- 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. Review. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.224, n.3, p.290-299, 2007.
- MOLNÁR, A.; DEDIC, R.; SVOBODA, A.; HALA, J. Singlet oxygen production by lipophilic photosensitizers in liposomes studied by time and spectral resolved phosphorescence. **J. Molecular Struct.** p.834-836, 2007.
- MOREIRA, L.M.; SANTOS, F.V.; LYON, J.P.; MAFTOUM-COSTA, M.; PACHECO-SOARES, C.; DA-SILVA, N.S. Photodynamic Therapy: Porphyrins and Phthalocyanines as Photosensitizers. **Aust. J. Chem.** v.61, p.1-14, 2008.

MORRIS, R.L.; AZIZUDDIN, K.; LAM, M.; BERLIN, J.; NIEMINEN, A.L.; KENNEY, M.E.; SAMIA, A.C.S.; BURDA, C.; OLEINICK, N.L. Fluorescence resonance energy transfer reveals a binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy. **Cancer Res.** v.63, p.5194-5197, 2003.

NAKAGAWA, H.; MATSUMIYA, T.; SAKAKI, H.; IMAIZUMI, T.; KUBOTA, K.; KUSUMI, A.; KOBAYASHI, W.; KIMURA, H. Expression of vascular endothelial growth factor by photodynamic therapy with mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** v.43, p.544-550, 2007.

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. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.37, p.273-284, 2004.

NYMAN, E.S.; HYNINEN, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** v.73, p.1-28, 2004.

OBERHOLZER, T.G.; PREEZ, I.C.D.; KIDD, M. Effect of LED curing on the microleakage, shear bond strength and surface hardness of a resin-based composite restoration. **Biomater.** v.26, p.3981-3986, 2005.

PAZOS, M.C., PACHECO-SOARES, C., DA-SILVA, N.S., DA-MATTA, R.A.; PACHECO, M.T.T. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell.** v.27, p.301-309, 2003.

PAZOS, M.C.; NADER, H.B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.40, p.1025-1035, 2007.

PAZOS, M.C.; RICCI, R.; SIMIONI, A.R.; LOPES, C.C.; TEDESCO, A.C.; NADER, H.B. Putative role of heparan sulfate proteoglycan expression and shedding on the proliferation and survival of cells after photodynamic therapy. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.39, n.6, p.1130-1141, 2007.

PERRIN-TAMIETTI, B.F.; MACHADO, A.H.A.; MAFTOUM-COSTA, M.; DA-SILVA, N.S.; 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.

PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quim. Nova.** v.30, n.4, p.988-994, 2007.

PERVAIZ, S.; OLIVO, M. Frontiers in Research Review: Cutting-Edge Molecular Approaches to Therapeutics Art and Science of Photodynamic Therapy. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v.33, p.551-556, 2006.

POSTEN, W.; WRONE, D.A.; DOVER, J.S.; ARNDT, K.A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy. **Dermatol. Surg.** v.31, p.334-340, 2005.

QIANG, Y.G.; ZHANG, X.P.; LI, J.; HUANG, Z. Medical progress Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. **Chin. Med. J.** v.119, n.10, p.845-857, 2006.

RIBEIRO, J.N.; SILVA, A.R.; JORGE, R.A. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.40, p.383-390, 2004.

RIBEIRO, J.N.; SILVA, A.R.; PELEGRINO, A.C.; TEDESCO, A.C.; JORGE, R.A. Evaluation of photodynamic activity of octaethylporphyrin and vanadyl octaethylporphyrin. **Appl. Cancer Res.** v.25, p.142-150, 2005.

RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A.; SILVA, A.R.; FLORES, A.V.; RONCHI, L.M.; TEDESCO, A.C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Ecl. Quím.** v.32, n.1, p.7-14, 2007.

RICCI, M.S.; ZONG, W.X. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **Oncolog.** v.11, p.342-357, 2006.

RUCK, A.; BECK, G.; BACHOR, R.; AKGUN, N.; GSCHWEND, M.H.; STEINER, R. Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy in vivo and in vitro of hydrophilic Al(III) phthalocyanine tetrasulphonate and lipophilic Zn (II) phthalocyanine administered in liposomes. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v.36, p.127-133, 1996.

SACZKO, J.; MAZURKIEWICZ, M.; CHWILKOWSKA, A.; KULBACKA, J.; KRAMER, G.; LUGOWSKI, M.; SNIETURA, M.; BANAS, T. Intracellular Distribution of Photofrin® in Malignant and Normal Endothelial Cell Lines. **Folia Biol. (Praha)** v.53, p.7-12, 2007.

SCHASTAK, S.; JEAN, B.; HANDZEL, R.; KOSTENICH, G.; HERMANN, R.; SACK, U.; ORENSTEIN, A.; WANG, Y.; WIEDEMANN, P. Improved pharmacokinetics, biodistribution and necrosis *in vivo* using a new near infra-red photosensitizer: tetrahydroporphyrin tetratosylat. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** v.78, p.203-213, 2005.

SHOKROLLAHI, K.; RAYMOND, E.; MURISON, M.S.C. Lasers: Principles and Surgical Applications. **J. Surg.** v.2, n.1, p.28-34, 2004.

SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biolog. Res.** v.33, p. 869-880, 2000.

SIBATA, M.N.; TEDESCO, A.C.; MARCHETTI, J.M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use. **Europ. J. Pharm. Sci.** v.23, p.131-138, 2004.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acesso em: 15 maio de 2008.

SPESIA, M.B.; LAZZERI, D.; PASCUAL, L.; ROVERA, M.; DURANTINI, E.N. Photoinactivation of Escherichia coli using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.44, p.289-295, 2005.

- STRITT, A.; MERK, H.F.; BRAATHEN, L.R.; VON-FELBERT, V. Review: Photodynamic Therapy in the Treatment of Actinic Keratosis. **Photochem. Photobiol.** v.84, p.388-398, 2008.
- TEDESCO, A.C.; ROTTA, J.C.G.; LUNARDI, C.N. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy. **Curr. Org. Chem.** v.7, p.187-196, 2003.
- TREVISI, L.; PIGHIN, I.; BAZZAN, S.; LUCIANI, S. Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. **FEBS Let.** v.580, p.2769-2773, 2006.
- TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENSA, J.H.M.; STEWARTA, F.A. Photodynamic Therapy in Oncology. **The Oncol.** v.11, p.1034-1044, 2006.
- VAUCHER, L.; JICHLINSKI, P.; LANGE, N.; RITTER-SCHENK, C.; VAN-DEN-BERGH, H.; KUCERA, P. Hexyl- Aminolevulinate-Mediated Photodynamic Therapy: How to Spare Normal Urothelium. An In Vitro Approach **Lasers Surg. Med.** v.39, p.67-75, 2007.
- VELLONEN, K.S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.23, p.181-188, 2004.
- XU, D.Y. Research and development of photodynamic therapy photosensitizers in China. **Photodiag. Photodyn. Ther.** v.4, p.13-25, 2007.
- YAGLIOGLU, H.G.; ARSLAN, M.; ABDURRAHMANOGLU, S.; ÜNVER, H.; ELMALI, A.; BEKAROGLU, O. The nonlinear refraction and nonlinear absorption in 4-(4,6-diaminopyrimidin-2-ylthio) substituted double-decker Lu(III) phthalocyanine. **J. Phys. Chem. Solids.** v.69, p.161-167, 2008.
- YOU, Y.; GIBSON, S.L.; DETTY, M.R. Phototoxicity of a core-modified porphyrin and induction of apoptosis. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v.85, p.155-162, 2006.
- YSLAS, E.; RIVAROLA, V.; DURANTINI, E.N. Synthesis and photodynamic activity of zinc (II) phthalocyanine derivatives bearing methoxy and trifluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media. **Bioorg. Med. Chem.** v.13, p.39-46, 2005.
- YSLAS, E.I.; DURANTINI, E.N.; RIVAROLA, V.A. Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro. **Bioorg. Med. Chem.** v.15, p.4651-4660, 2007.
- YU, C.H.; CHEN, H.M.; HUNG, H.Y.; CHENG, S.J.; TSAI, T.; CHIANG, C.P. Photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. **Oral Oncol.** v.44, n.6, p.595-600, 2008.

WEI, S.; ZHOU, J.; HUANG, D.; WANG, X.; ZHANG, B.; SHEN, J. Synthesis and Type I/Type II photosensitizing properties of a novel amphiphilic zinc phthalocyanine. **Dyes Pigment.** v.71, n.1, p.61-67, 2006.

WEYERGANG, A.; SELBO, K.; BERG, K. Y1068 phosphorylation is the most sensitive target of disulfonated tetraphenylporphyrin-based photodynamic therapy on epidermal growth factor receptor. **Biochem. Pharmacol.** v.74, p.226-235, 2007.

ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization-the (w)hole story? **Curr. Biol.** v.13, R71–R73, 2003.

ZAWACKA-PANKAU, J.; ISSAEVA, N.; HOSSAIN, S.; PRAMANIK, A.; SELIVANOVA, G.; PODHAJSKA, A.J. Protoporphyrin IX Interacts with Wild-type p53 Protein in Vitro and Induces Cell Death of Human Colon Cancer Cells in a p53-dependent and -independent Manner. **J. Biol. Chem.** v.282, n.4, p.2466-2472, 2007.

ZHANG, Y.; ASLAN, K.; PREVITE, M.J.R.; GEDDES, C.D. Plasmonic engineering of singlet oxygen generation. **PNAS.** v.105, n.6, p.1798-1802, 2008.

APÊNDICE

Cálculo do Número de Moléculas:

$$1\text{M} = 6,02 \times 10^{23} \text{ Moléculas/Litro}$$

Zinco Ftalocianina Octa-bromada – concentração utilizada $1\mu\text{M}$

$$1\mu\text{M} = 6,02 \times 10^{14} \text{ moléculas/mL}$$

Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada – concentração utilizada $10\mu\text{M}$

$$10\mu\text{M} = 6,02 \times 10^{15} \text{ moléculas/mL}$$

Zinco Ftalocianina – concentração utilizada $10\mu\text{M}$

$$10\mu\text{M} = 6,02 \times 10^{15} \text{ moléculas/mL}$$

Cálculo do Número de Fótons:

ν = frequência

c = velocidade da luz no vácuo

λ = comprimento de onda

N = número de fótons

$D.E.$ = densidade de energia

h = constante de Planck

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

$$N = \frac{D.E.}{h \cdot \nu}$$

$$\nu = \frac{3 \times 10^8 \text{ m/s}}{640 \times 10^{-9} \text{ m}} = 4,69 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$$

$$N = \frac{4,5 \text{ J/cm}^2}{6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s} \cdot 4,69 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}} = 1,44 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$$

$$\nu = \frac{3 \times 10^8 \text{ m/s}}{660 \times 10^{-9} \text{ m}} = 4,54 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$$

$$N = \frac{4,5 \text{ J/cm}^2}{6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s} \cdot 4,54 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}} = 1,5 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$$

$$\nu = \frac{3 \times 10^8 \text{ m/s}}{685 \times 10^{-9} \text{ m}} = 4,38 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$$

$$N = \frac{4,5 \text{ J/cm}^2}{6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s} \cdot 4,38 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}} = 1,55 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$$

Portanto:

Número de fótons

$$1,44 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$$

$$1,5 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$$

$$1,55 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$$

Número de moléculas

$$6,02 \times 10^{14} \text{ moléculas/mL}$$

$$6,02 \times 10^{15} \text{ moléculas/mL}$$

Número de células

$$5 \times 10^4 \text{ células/mL}$$

$$5 \times 10^5 \text{ células/mL}$$

$$5 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

$$5 \times 10^7 \text{ células/mL}$$

ANEXO A: Artigos em colaboração relacionados ao tema da Tese

Artigo 5: Ultrastructural changes in *Tritrichomonas foetus* after treatments with AlPcS₄ and Photodynamic Therapy. *Veterinary Parasitology*. 146, 175-181, 2007.

Artigo 6: Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. v.36, n.1, p.59-64, 2007.

ANEXO B: Artigo em colaboração relacionado à aplicação de Ultra-som em cultura de células

Artigo 7: Assessment of fibroblast cells submitted to ultrasonic irradiation. Cell Biology International. v.32, p.1329-1335, 2008.

ANEXO C: Artigo em colaboração relacionado à interação de Biomateriais e cultura de células

Artigo 8: Cell viability and adhesion on as grown multi-wall carbon nanotube films. Materials Science and Engineering: C. v.28, p.264-269, 2008.