

Itajaí Oliveira de Albuquerque

**Citotoxicidade *In Vitro* da Terapia Fotodinâmica com Alumínio-
Cloro-Ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino (B16F10)**

Brasília

2008

Itajaí Oliveira de Albuquerque

**Citotoxicidade *In Vitro* da Terapia Fotodinâmica com Alumínio-
Cloro-Ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino (B16F10)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Doutor Ricardo Bentes de Azevedo

**Brasília
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

de Albuquerque, Itajaí Oliveira
Citotoxicidade In Vitro da Terapia Fotodinâmica com
Alumínio-Cloro-Ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino
(B16F10)/ Itajaí Oliveira de Albuquerque; Ricardo Bentes de
Azevedo, orientador. Brasília, 2008.

ix, 54 p., 297 mm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília.
Faculdade de Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências da
Saúde, 2008.

1. Terapia Fotodinâmica 2. Ftalocianinas 3. Cancer
experimental 4. Melanoma B16. Azevedo, Ricardo Bentes
(orient.) II. Título.

All substances are poisons: there is none which is not a poison.

The right dose differentiates a poison and a remedy.

Paracelsus (1493-1541)

All the things must pass.

George Harrison (1970)

Em memória de José e Lindoca, meus pais

Em memória dos amigos Alberto Paes e Haroldo Maranhão

A Helena, sogra e amiga de raro valor

A Esther, companheira maior desta e doutras aventuras

Ao Rômulo Paes, incentivador intelectual, por nossa longa amizade

DEDICO.

Meus agradecimentos

Ao Professor Doutor Ricardo Bentes de Azevedo do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, orientador desta dissertação de Mestrado;

Ao Professor Doutor Moisés Goldbaum (Universidade de São Paulo), titular da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (2005 a 2007);

Ao Professor Reinaldo Guimarães (Universidade Estadual do Rio de Janeiro), atual titular da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (SCTIE/MS);

A Professora Doutora Suzanne Jacob Serruya (Universidade do Estado do Pará), diretora do Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) da SCTIE do Ministério da Saúde;

A Mestra em Saúde Pública Flávia Tavares Elias, Coordenadora Geral de Avaliação de Tecnologias em Saúde (CG-ATS) do DECIT/SCTIE;

Aos colegas do Laboratório de Morfologia e Morfogênese do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília: Graziella Joanitti, Jaqueline Rodrigues, João Paulo Longo, Caroline Valois, Larissa Naves e Maitê Cevallos;

Que contribuíram com GENEROSIDADE e CONHECIMENTO CIENTÍFICO para o progresso do trabalho aqui apresentado.

Resumo

O ensaio apresentado avaliou a citotoxicidade da Terapia Fotodinâmica com Alumínio-Cloro-Ftalocianina Lipossomal (AICIFc) aplicada à cultura de melanoma murino, linhagem B16F10 em diferentes concentrações. Foram estabelecidos oito grupos experimentais: um controle (linhagem B16F10 não exposta a Terapia Fotodinâmica, ao fotossensibilizador e ao laser); três grupos expostos a diferentes concentrações do fotossensibilizador; três grupos submetidos à Terapia Fotodinâmica, combinada com diferentes concentrações do fotossensibilizador, e um grupo exposto ao laser. Os resultados de citotoxicidade com AICIFc na concentração de 5 μM foi citotóxica tanto para a cultura de células exposta ao fármaco, quanto para os grupos submetidos à Terapia Fotodinâmica. As concentrações de AICIFc a 0,5 μM e 0,25 μM apresentaram citotoxicidade mínima para os grupos experimentais não submetidos ao tratamento, e máxima quando submetidos a terapia fotodinâmica. A citotoxicidade no grupo experimental submetido ao laser foi comparável ao grupo controle. As lesões morfológicas observadas no grupo submetido à Terapia Fotodinâmica foram sugestivas de necrose.

Abstract

The assay evaluated the cytotoxicity of photodynamic therapy linked to different concentrations of Liposomal Chlorine-Aluminum-Phthalocyanine (CIAIPc) on B16F10 murine melanoma ancestry. Eight experimental groups were established: one was a control group (ancestry B16F10 culture); three groups exposed to different photosensitizing agent concentrations; three groups exposed to photodynamic therapy with different photosensitizing agent concentrations and one group exposed to laser radiation. The cytotoxicity results with CIAIPc in concentration of 5 μM were both cytotoxic for the culture of cells exposed only to photosensitizing agent and for the groups submitted to the Photodynamic Therapy. The 0,5 μM and 0,25 μM AICIFc concentrations presented minimum cytotoxicity for experimental groups not submitted to treatment, and important cellular unfeasibility when the experimental groups were treated with photodynamic therapy. The cytotoxicity in experimental group exposed to laser radiation was comparable to the control group. The observed morphologic injuries associated to photodynamic therapy with AlClPc were suggestive of cellular death by necrosis mechanism.

Lista de ilustrações

Figura 1: Mecanismo Fotoquímico da Terapia Fotodinâmica. Página 12.

Figura 2: Fotomicrografias de células de melanoma murino (B16F10) após 24 horas de Terapia Fotodinâmica com AICIFc Lipossomal. Página 42.

Lista de Gráficos e Tabelas

Gráfico 1: Viabilidade Celular – Teste Azul Tripán. Página 40.

Gráfico 2: Viabilidade Celular - Teste MTT. Página 41.

Tabela 1: Categorias de Intensidade de Radiação UV. Página 20.

Tabela 2: Incidência de Melanoma em Capitais Brasileiras. Página 23.

Sumário

1.	Introdução	
1.1.	Conceito	p.1
1.2.	Aspectos Históricos	p.2
1.3.	Mecanismo de Ação	p.7
1.4.	Efeitos Celulares da Terapia Fotodinâmica	p.14
1.5.	Aspectos Epidemiológicos do Melanoma Humano	p.18
2.	Objetivos	p. 25
3.	Materiais e Métodos	p.26
4.	Resultados	p.39
5.	Discussão'	p.43
6.	Conclusão e Perspectivas	p.47
7.	Referências Bibliográficas	p.49

1. Introdução

1.1 Conceito

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma tecnologia de saúde minimamente invasiva, utilizada no tratamento do câncer e de outras doenças não malignas, assim como para a inativação de vírus, bactérias e fungos. Consiste na administração tópica ou sistêmica de fotossensibilizador, ativado por exposição à radiação visível e não térmica de comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do fotossensibilizador, situado em geral na faixa entre 400 – 760 nm. A foto-ativação do fármaco terá por consequência a produção intracelular de formas reativas de oxigênio, que mediarão o dano celular e tecidual.

1.2 Aspectos históricos

A fotossensibilização foi descoberta em 1888, a partir da declaração de Marcacci, que, sem apresentar dados, informou que a toxicidade do quinino e da cinchonamina em plantas e ovos de sapos era maior quando esses fármacos ficavam expostos à luz.

Contudo, a primeira evidência experimental do potencial da fotossensibilização nas ciências da saúde foi obtida em 1898, no laboratório do Professor Hermann Von Tappeiner, na Universidade de Munique, Alemanha, quando o estudante de doutorado Oscar Raab observou que a letalidade da acridina para o protozoário *Paramecium* era mais dependente da exposição à luz ambiente do que de variações controladas na concentração do corante. Posteriormente, em 1904, Von Tappeiner e Jodlbauer consideraram que a dinâmica das reações fotobiológicas era dependente da presença de oxigênio, distinguindo-a do processo de fotossensibilização observado na revelação de filmes fotográficos por certos cromóforos. Com base nessa hipótese cunharam o termo *ação fotodinâmica (photodynamic wirkung)*.

Entretanto, aparentemente, Von Tappeiner não estava muito confiante quanto ao termo que havia cunhado, conforme registra no prefácio de seu livro *Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen*: “se o termo será posteriormente adotado, ou cairá em esquecimento, fica a critério de meus colegas” (MOAN et col., 2003).

A primeira evidência clínica da eficácia da TFD foi obtida em 1903 por Dreyer, em Copenhague, e Jesionek e Von Tappeiner, em Munique, quando aplicaram eosina ou eritrosina tópica, seguido de exposição à luz, em pacientes portadores de pitíriase versicolor, psoríase, carcinoma basocelular, lúpus vulgar, sífilis, condiloma acuminado e molusco contagioso. As pesquisas prosseguiram até 1905, com a experimentação de novos fotossensibilizadores como dicloroantraceno e o vermelho madalena de Grubler.

Apesar dos pesquisadores terem obtido alguns desfechos clínicos favoráveis, falhas metodológicas relacionadas ao *follow up* dos pacientes, a concorrência de efeitos adversos importantes e os resultados favoráveis advindos do uso de radiação ionizante no tratamento de neoplasias determinaram a suspensão desses experimentos pioneiros (BABILAS et cols., 2005).

Em 1908, Haussman realiza estudos em camundongos para avaliar as propriedades biológicas da hematoporfirina. Cinco anos depois, Meyer-Betz auto-injetou 200 mg de hematoporfirina e permaneceu fotossensibilizado por dois meses, quando investigava a importância da estrutura molecular da porfirina para a TFD.

A localização seletiva das porfirinas nos tecidos foi observada por primeiro em 1924, com os resultados dos estudos de Polycard sobre a emissão de fluorescência em tumores submetidos à radiação ultravioleta, atribuindo o fato à acumulação local daquela substância (ACKROYD et cols., 2001).

A retenção seletiva seria confirmada em 1948, nos trabalhos de Figge, que também confirmou que as hematoporfirinas derivadas constituíam importante grupo de fotossensibilizadores a serem utilizados no diagnóstico do câncer.

Apesar das evidências disponíveis, o uso da TFD em Oncologia foi retomado a partir da década de 60, com os estudos pioneiros de Lipson e Schwartz na Mayo Clínic, Estados Unidos. Lipson realizou investigações sobre o tratamento do câncer de mama com TFD e adaptou equipamentos endoscópicos que permitissem visualizar a fluorescência em órgãos internos. Schwartz, por sua vez, descobriu que a hematoporfirina tratada com ácidos acético e sulfúrico constituía-se em excelente localizador de tecidos neoplásicos.

Essa nova hematoporfirina derivada, depois de purificada, estabeleceu as bases para a síntese do Photofrin®, um dos primeiros fotossensibilizadores a serem lançados no mercado. Posteriormente, a prolongada fototoxicidade cutânea do Photofrin® e o seu poder limitado de penetração tornaram necessário o desenvolvimento de novos fármacos que possibilitassem maior segurança e efetividade terapêutica no processo de fotossensibilização de tecidos neoplásicos. Ainda hoje, porém, na prática clínica, a maior parte dos fotossensibilizadores empregados em TFD são porfirinas ou compostos porfirina-relacionados.

Também nos anos 60, Gollnick e colaboradores estabeleceram a primeira evidência causal entre radicais livres e a ação citotóxica

da terapia fotodinâmica, fato que se confirmaria com as investigações de Weishaupt e colaboradores na década seguinte.

A partir da década de 70 vários grupos de pesquisa clínica se dedicaram a investigar o potencial da terapia fotodinâmica na saúde humana. Em 1976, Kelly e colaboradores iniciaram os primeiros ensaios clínicos para diagnóstico do câncer de bexiga com derivado de hematoporfirina, tratando um paciente que apresentava recidiva pós-cirúrgica da doença e resistência a radio e a quimioterapia. Neste relato de caso, foram observados necrose e redução do crescimento tumoral nas áreas submetidas à terapia fotodinâmica.

Por essa época, Dougherty e colaboradores conduzem pesquisa com Photophrin® em 25 pacientes com neoplasia de pele. De um total de 113 tumores primários e secundários estudados, foram observadas 98 remissões completas, 13 remissões parciais e 2 resistências a TFD.

Pelo pioneirismo na condução do ensaio clínico, Dougherty e colaboradores são considerados os fundadores da era moderna da Terapia Fotodinâmica (MOAN et col.,2003). A partir dos resultados obtidos por esse grupo de pesquisadores do Roswell Park Memorial Cancer Institute, em Buffalo (Ohio), a pesquisa com terapia fotodinâmica se estendeu para os mais diferentes campos da Medicina, com resultados mais ou menos eficazes em razão de limitações técnicas e metodológicas dos estudos conduzidos.

Hoje seu uso é aprovado nos Estados Unidos da América, Canadá e Japão para o tratamento de alguns tipos precoces de neoplasias (bexiga, câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas), de lesões pré-neoplásicas (Esôfago de Barrett) e para a degeneração macular associada à idade.

A TFD constitui campo de pesquisa em permanente expansão. No *Clinical Trials.gov*, plataforma para registro de ensaios clínicos do *National Institute of Health* do governo norte-americano, e no *International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP)* da Organização Mundial da Saúde estão registrados respectivamente 134 e 124 ensaios clínicos (*Clinical Trials.gov, 2007; ICTRP, 2007*), interessando às especialidades médicas como Gastroenterologia, Pneumologia, Neurologia, Angiologia, Urologia, entre outros exemplos representativos do potencial inovador da tecnologia no tratamento das mais diversas patologias humanas.

1.3 Mecanismos de ação

Três são os elementos fundamentais para a realização da terapia fotodinâmica: a molécula fotossensibilizadora, a fonte de luz e o oxigênio molecular.

Os fotossensibilizadores são moléculas que apresentam a capacidade de absorver energia luminosa e ativar reações químicas em nível celular e tecidual. Para otimizar sua função na terapia fotodinâmica, um bom fotossensibilizador deve reunir as seguintes características (WÖHRLE et cols., 1998):

1. Ser quimicamente puro e de composição conhecida;
2. Apresentar citotoxicidade apenas quando exposto à luz;
3. Ser preferencial e rapidamente captado, absorvido e acumulado pelo tecido alvo;
4. Ser rapidamente eliminado dos tecidos para garantir baixa toxicidade sistêmica;
5. Gerar quantidade elevada (*quantum yield*) de espécies reativas de oxigênio (ROS);
6. Apresentar forte absorbância na faixa de 600 – 800 nm, quando a penetração tissular da luz é máxima e com energia suficiente para produção de oxigênio singlete;
7. Apresentar nível ótimo de *photobleaching* que lhe impeça a destruição fotoquímica durante a TFD, e, secundariamente, permita adequada amplificação do efeito terapêutico, isto é, na medida em

que interage com os fótons, o fotossensibilizador deve gerar de forma sustentada novas moléculas de oxigênio citotóxicas.

Em termos bioquímicos os fotossensibilizadores são classificados em três grupos ou famílias.

1. Fotossensibilizadores de primeira geração
2. Fotossensibilizadores de segunda geração
3. Fotossensibilizadores de terceira geração

Os fotossensibilizadores de primeira geração são representados pelos derivados da hematoporfirina. As principais desvantagens dessa classe de fotossensibilizadores são representadas (i) pela superficialidade do efeito terapêutico, restrito a aproximadamente 5 mm de profundidade, devido a banda mais profunda de absorção do fotossensibilizador situar-se em 630 nm; (ii) pela retenção prolongada no tecido cutâneo, obrigando o paciente a ficar protegido da radiação luminosa por até 3 meses e (iii) ausência de acumulação seletiva nos tecidos tumorais.

Os fotossensibilizadores de segunda geração, agrupados na plataforma clorofil e corantes, apresentam absorção luminosa na faixa entre 675 e 800 nm, o que permite estender o efeito terapêutico a 2 – 3 cm de profundidade. Diferenciam-se da família de primeira geração em razão de não serem mistura de compostos, o que permite ensaios controlados de dose-resposta.

Os fotossensibilizadores de terceira geração, além das características já descritas para os de segunda, pela possibilidade

de serem acoplados a biomoléculas, apresentam propriedades que permitem captação seletiva em tecidos, explorando especificidades com frequência observadas em células neoplásicas, como a maior expressão de antígenos específicos de superfície e a superexpressão de receptores para lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O potencial de associação com anticorpos monoclonais específicos para antígenos de células neoplásicas e a encapsulação em lipossomas garantem aos fotossensibilizadores de terceira geração um campo de aplicação ampliado tanto para fins diagnósticos, quanto para fins terapêuticos.

As Ftalocianinas (Fc) são fotossensibilizadores pertencentes a família dos corantes. Compostos de estrutura química bem definida, as FC apresentam coeficiente de absorvância na faixa de 650-680 nm e são ativadas com energia em torno de 100 J/cm². Por serem hidrofóbicas, necessário é associá-las a sistemas baseados em fosfolípedes, ora por meio de emulsão, ora por envelopamento em lipossomos, para lhes garantir eficaz absorção celular. Apresentam rápido *clearance*, níveis baixos de acumulação tecidual e toxicidade insignificante quando não fotoativadas. A associação das Ftalocianinas com metais – Alumínio, Cloro, Zinco e Silício – e o grau de sulfonação permitem a melhoria da eficácia de fotossensibilização do fármaco (TOMAZINI et cols., 2007).

Os lipossomos, utilizados em conjugação com vários fotossensibilizadores, são estruturas esféricas coloidais compostas de dupla cadeia lipídica que delimitam um espaço central que

recebe conteúdo aquoso. Constituem-se na formulação mais estudada para o transporte e liberação de fármacos. Em Oncologia, o desenvolvimento de sistemas fosfolipídeos de distribuição tem agregado melhorias na farmacocinética e na farmacodinâmica do agente terapêutico a eles associados.

Fotossensibilizadores conjugados a lipossomos apresentam maior eficiência fotodinâmica e seletividade para tecidos neoplásicos quando comparados a soluções aquosas homogêneas. Embora o diâmetro dessas nanopartículas possa variar de 90 a 200 nm, existem evidências que diâmetro médio de 100 nm não só melhora a efetividade da transferência do fotossensibilizador, mas permite retenção mais prolongada nos tecidos neoplásicos. Por outro lado, a adequada dimensão lipossomal permite que a nanopartícula escape à vigilância das opsoninas e, conseqüentemente, não sejam fagocitadas pelas células mononucleares da corrente sanguínea (KONAN et cols., 2002) .

As fontes de luz empregadas em terapia fotodinâmica são os lasers e lâmpadas halógenas, caracterizados por emitirem luz de comprimento de onda superior a 500 nm, com potência de 100 μ W. Entre os lasers disponíveis no mercado destacam-se os *soft lasers*, assim representados: hel-neon-laser (comprimento de onda de 632 nm) e os lasers a vapor de ouro (comprimento de onda 628 nm), ambos utilizados em terapia fotodinâmica com derivados da hematoporfirina; laser de argônio (comprimento de onda de 510 nm) empregado para ativar o fotossensibilizador Photofrin II e o

laser de criptônio (comprimento de onda de 647 nm), utilizado na ativação de Ftalocianinas. Os chamados lasers pigmentados apresentam comprimento de onda entre 360-800 nm e se constituem numa fonte luminosa de uso universal em terapia fotodinâmica, ativando praticamente todos os fotossensibilizadores em uso (SACZKO et cols., 2004).

O desenvolvimento de lasers equipados com fibras ópticas além de permitir a seleção de comprimentos de onda adequados, possibilitou um ganho incremental na aplicação da terapia fotodinâmica em medicina humana, ao tornar possível o tratamento de órgãos internos por meio endoscópico. Atualmente a tecnologia laser evolui para o desenvolvimento de sistemas portáteis, de baixo custo de manutenção e compatíveis com as propriedades de ativação dos novos fotossensibilizadores, de que é exemplo o laser gálio-alumínio-arsênico (comprimento de onda 770 e 850 nm).

Dois mecanismos fotoquímicos simultâneos e de rápida duração são iniciados após o fotossensibilizador ser exposto aos fótons de energia (Figura 1):

1. Mecanismo tipo I ou de transferência de elétrons

O fotossensibilizador em estado triplete excitado cede átomo de hidrogênio para moléculas do substrato celular (membrana plasmática, mitocôndria, lisossomas), originando íons radicais e radicais superóxidos. A reação desses radicais com o oxigênio molecular em estado fundamental (O_2) originará a espécie reativa

oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que apresenta propriedades oxidativas altamente citotóxicas.

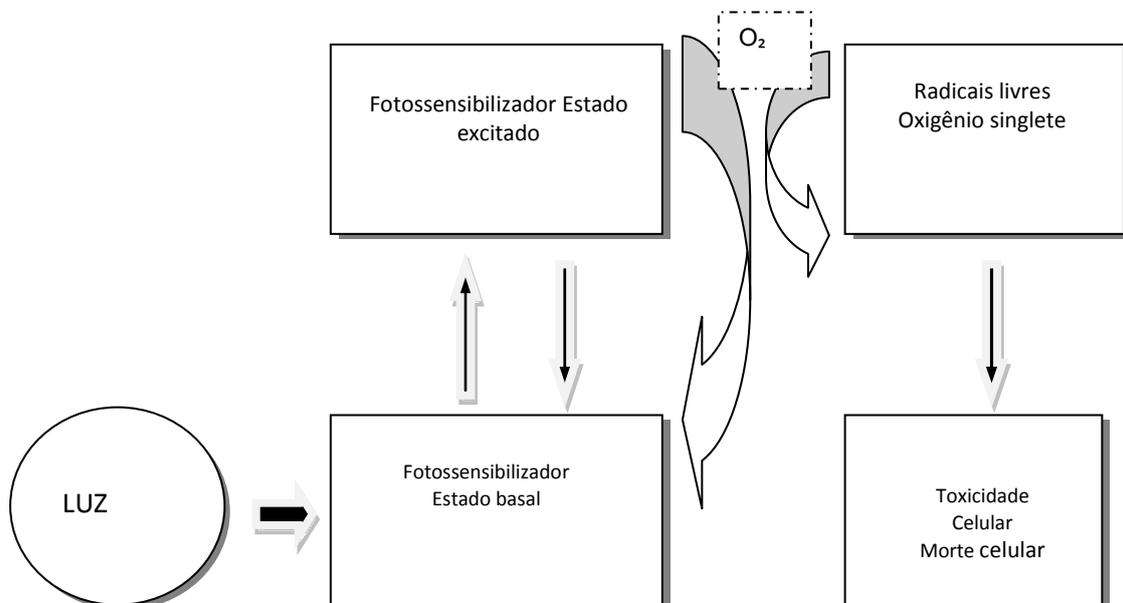
2. Mecanismo tipo II ou de transferência de energia

É mediado pela transferência de energia do fotossensibilizador diretamente para a molécula de O_2 em estado fundamental, originando a espécie reativa $^1\text{O}_2$.

Nos sistemas biológicos o oxigênio singlete apresenta meia vida muito curta, inferior a $0,05 \mu\text{seg}$. Por essa razão seu raio de ação no microambiente celular é inferior a $0,02 \mu\text{m}$. A efetividade dessas reações é mediada por difusão, mas de alcance limitado aonde as reações tipo I e II ocorrem.

Figura 1

Mecanismo fotoquímico da terapia fotodinâmica



Apud Dolmans et cols. Nature. 2003; 3 (modificado)

Organelas com maior densidade estrutural de elétrons e *locus* para ligação do fotossensibilizador - como a membrana plasmática, membrana mitocondrial e lisossomos -, ao conterem em sua estrutura cadeias aromáticas e sulfonadas de aminoácidos, ligações duplas de esteróides e lipídeos insaturados, tendem a se constituírem em alvos preferenciais para o transcurso das reações, que ao fim comprometerão a viabilidade celular.

Além da ação dos radicais livres de oxigênio (ROS), a terapia fotodinâmica também inviabiliza tecidos neoplásicos por meio de danos à vasculatura do tumor e por ativação da resposta imune contra as células que o constituem (KALKA et cols, 2000).

Ainda que esses três mecanismos interajam no processo de TFD, a importância relativa de cada um para a destruição e o controle do crescimento tumoral em longo prazo não está bem estabelecida. Nesse sentido, aspecto importante a destacar é que o processo de terapia fotodinâmica para ser eficaz depende de Oxigênio molecular em concentrações adequadas nos tecidos.

Para superar obstáculos relacionados ao uso da TFD em tecidos hipóxicos buscou-se administrar, previamente a terapia fotodinâmica, substâncias que aumentassem a disponibilidade de Oxigênio tecidual, sem, entretanto, obter-se resultados satisfatórios.

Por outro lado, observou-se que em situações onde há deficiência de reposição do Oxigênio tissular, a redução da frequência da radiação luminosa, ou o fracionamento da exposição à luz,

aumentariam a efetividade da terapia fotodinâmica em razão de permitirem a reoxigenação tecidual (DETTY et cols., 2004).

Logo a eficácia da terapia fotodinâmica *in vivo* e *in vitro* depende dos seguintes fatores:

1. Concentrações adequadas do fotossensibilizador nas células;
2. Da disponibilidade de oxigênio molecular durante todo o processo
3. Da localização celular do fotossensibilizador;
4. De radiação luminosa compatível com as características bioquímicas do fotossensibilizador;
5. De a radiação luminosa ser disponibilizada em frequência que possibilite o equilíbrio entre a produção de ($^1\text{O}_2$) e a reposição de suprimento de Oxigênio molecular;
6. Das características anatômicas do tumor e da linhagem celular tumoral.

1.4 Efeitos celulares da terapia fotodinâmica

Devido à distância de difusão do $^1\text{O}_2$ ser na ordem de 0,1 μm os sítios iniciais de lesão estão diretamente relacionados com a localização da droga no momento da fotoativação. Logo, a localização da lesão primária depende necessariamente da distribuição do fotossensibilizador no espaço intracelular, que por sua vez é determinada pelo caráter lipofílico ou hidrofílico da molécula ou do seu carreador.

No caso de fotossensibilizadores lipofílicos, após a endocitose, as moléculas se acumulam preferencialmente em sítios como a membrana plasmática, membrana mitocondrial, retículo endoplasmático, membrana nuclear e membranas lisossomais (HOEBECKE, 1995).

A localização em lisossomos é de importância crítica para a Terapia Fotodinâmica em razão de neles ocorrer a degradação das lipoproteínas e, conseqüentemente, a liberação de fotossensibilizadores contidos em sistemas fosfolípidos de distribuição.

As reações de peroxidação desencadeadas com a fotoativação inativam enzimas, afetam a despolarização e promovem aumento da permeabilidade das membranas celulares. Em termos bioquímicos, o processo além de inibir o transporte de aminoácidos, de nucleosídeos e açúcares, inviabilizando vias metabólicas vitais para célula, permite que ocorra maior absorção dos fotossensibilizadores. Do ponto de vista morfológico, após a TFD, observa-se edema celular, a parada da divisão celular e a lise celular com extravasamento de debris (DOUGHERTY et cols.,1998).

A Terapia Fotodinâmica é considerada tecnologia de baixo potencial mutagênico. Estudos para avaliação de genotoxicidade relacionada à TFD, comparando células normais com fibroblastos deficitários no reparo de DNA, demonstraram não existirem diferenças significativas nos dois grupos celulares avaliados,

sugerindo que danos ao DNA não representam fator de importância no processo de morte celular relacionado ao tratamento (MOORE et cols.,1997).

Além do dano direto às células, estudos pré-clínicos *in vivo* demonstram que o dano microvascular desempenha função importante na destruição dos tecidos neoplásicos. As ROS determinam a quebra das junções endoteliais e expõem a lâmina basal vascular levando a ativação de plaquetas, a migração de polimorfonucleares neutrófilos e a liberação de fatores da coagulação.

Em consequência, ocorre vasoconstrição na microvasculatura neoplásica, formação de trombo, hipóxia e redução no aporte de nutrientes. Estudos têm demonstrado que potentes fatores angiogênicos, como o fator endotelial de crescimento (VEGF) e a cicloxigenase 2 (COX-2), têm a sua expressão gênica aumentada durante a TFD, sugerindo uma resposta adaptativa orgânica à severidade da lesão endotelial provocada (DOLMANS et cols 2003).

A TFD também promove a expressão de proteínas de choque térmico, heme-oxigenase, proteínas reguladoras da glicose, que podem ser relacionadas com a modulação da sensibilidade da célula ao tratamento e ou servir de marcadores de citotoxicidade.

As lesões provocadas pela TFD estão relacionadas com acúmulo importante de células efectoras do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos. A degranulação de neutrófilos, a

liberação de enzimas lisossomais, de agentes quimiotáticos, a produção de proteínas de *stress*, especialmente a proteína extracelular de choque térmico (HSP70) e a exposição maciça de antígenos, ou a criação de novos antígenos, contribuem para o estímulo de mecanismos imunológicos, incluindo ativação de células T citotóxicas (CASTANO et cols., 2006; CANTI et cols.,2002).

1.5 Aspectos epidemiológicos do melanoma humano

Células de metazoários possuem a habilidade de proliferar para manter a morfologia e a função dos tecidos durante toda a vida. Se por um lado essa capacidade confere autonomia evolutiva ao ser vivo, por outro o expõe a riscos relacionados ao processo permanente de divisão celular, especialmente aqueles relacionados à ocorrência de mutações no genoma, e que levam a aquisição de características fenotípicas não fisiológicas e a padrões de crescimento celular inapropriados.

Segundo WEINBERG (2007), enquanto células normais são cuidadosamente programadas para construir tecidos necessários à sobrevivência do ser vivo que integram, as neoplásicas parecem orientadas para somente produzirem clones de si próprias, o que permite inferir que o câncer é uma doença de células disfuncionais em decorrência de lesões promovidas na matriz genética.

A grande maioria dos cânceres que afetam a espécie humana tem origem epitelial. Denominados de carcinomas são responsáveis por 80% das mortes relacionadas com as neoplasias no hemisfério ocidental.

Os carcinomas são categorizados em dois grupos principais - carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas -, que refletem as duas principais funções biológicas do epitélio: revestimento e de secreção de substâncias para a proteção epitelial. Nesses dois grupos estão classificados duas das três

principais neoplasias malignas da pele, o carcinoma epidermóide e o carcinoma basocelular, enquanto o melanoma, em razão dos melanócitos terem origem neuroectodérmica, compõe grupo histopatológico específico.

O principal fator causal relacionado a qualquer tipo de câncer de pele é a radiação solar ultravioleta (UV). A intensidade da radiação UV varia com a localização geográfica (latitude), a hora do dia, a estação do ano, a condição climática e representa 5% da radiação solar incidente na superfície do planeta.

Considerando seu espectro de onda, pode ser diferenciada em três subtipos: a radiação UV-A, com comprimento de onda entre 320 e 400 nanômetros (nm); a radiação UV-B, de comprimento de onda entre 280 e 320 nm; e a radiação UV-C, que possui comprimento de onda menor que os anteriormente descritos e é praticamente toda absorvida na atmosfera terrestre.

Tanto a UV-A e a UV-B apresentam efeitos nocivos sobre a pele. A exposição excessiva UV-B é o fator mais relacionado ao surgimento do câncer de pele, ainda que chegue à superfície terrestre em pequenas quantidades em condição de integridade da camada de ozônio, na estratosfera. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 4,5 mil casos novos de melanoma surgiriam a cada 10% de redução da camada de ozônio.

A relação entre a exposição à radiação UV e o surgimento do câncer de pele é complexa e depende tanto de características individuais quanto de fatores ambientais, tais como tipo de pele,

fenótipo, história familiar para câncer de pele e, especialmente, da exposição cumulativa ao sol ao longo da vida. São considerados também fatores predisponentes a concorrência de doenças imunossupressoras e a exposição ocupacional. Considera-se que a exposição excessiva e cumulativa ao Sol, nas duas primeiras décadas de vida, e particularmente na infância, é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele (INCA, 2006).

A medida da incidência de radiação UV na superfície da Terra é calculada pelo Índice Ultravioleta, representando a intensidade máxima de radiação ao meio dia, quando a região se encontra com céu claro e sem nuvens (Tabela 1):

Tabela 1

Categorias de intensidade de radiação UV segundo a Organização Mundial da Saúde	
CATEGORIA	ÍNDICE
Baixo	≤ 2
Moderado	3 a 5
Alto	6 a 7
Muito alto	8 a 10
Extremo	≥ 11

Fonte: Brasil. Instituto Nacional do Câncer – INCA.

A cada ano, segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 2 milhões de pessoas são acometidas de câncer de pele, dos quais 200 mil são do tipo melanoma.

O mais freqüente tipo de câncer no Brasil para ambos os sexos é o de pele não-melanoma. Sob essa denominação estão classificados o carcinoma epidermóide e o carcinoma basocelular, ambos com baixa letalidade e índices de cura cirúrgica elevados. Estima-se que para o ano de 2008 surgirão cerca de 115.010 casos novos dessas neoplasias no país.

Melanomas são neoplasias malignas que se originam de melanócitos derivados da crista neural, presentes normalmente na epiderme e ocasionalmente na derme. O tumor acomete aproximadamente 54.200 norte-americanos por ano, resultando em 8.200 mortes, e é considerado de baixa incidência quando comparado com os cânceres de pele não-melanoma. Contudo, as séries estatísticas mundiais descrevem um aumento de 300% nos últimos quarenta anos. Se a incidência prosseguir nesse ritmo, na próxima década o risco de adquirir-se melanoma será $\geq 1\%$.

As causas da progressão são incertas, mas envolvem modificações na atmosfera do planeta, com a redução da camada de Ozônio, e a exposição excessiva e contínua a luz solar, principalmente na infância. Foi demonstrado que pessoas com perfil étnico semelhante, que migram para regiões ou países com elevada incidência solar depois dos dez anos de idade, possuem menor risco de adquirir melanoma do que aqueles nasceram ou migraram para o país antes de completarem uma década de vida.

O melanoma é mais freqüente entre pessoas com o fenótipo de pele clara, cabelos louros ou ruivos, olhos azuis, com sardas e que

rapidamente se queimam quando expostas ao Sol. Outro fator importante de risco é a existência de história familiar de melanoma, pois aproximadamente 1 em cada 10 portadores da doença tem relato de caso semelhante na família. Indivíduos com nevos atípicos e com registro de pelo menos dois casos de melanoma na família têm 50 vezes mais chances de desenvolver a doença (KASPER et cols., 2005).

O tipo étnico, por sua vez, representa um risco intermediário, embora a doença seja cerca de 10 a 20 vezes menos freqüente em pessoas afrodescendentes e asiáticas. Apenas 30% dos melanomas se originam em nevo, mas alterações persistentes na forma, espessura, sensibilidade e coloração dos sinais cutâneos e a existência de nevos em número superior a 50 com espessura ≥ 2 mm elevam o risco de melanoma em 50 vezes.

No Brasil, para o ano de 2008, é estimado que surjam 5920 casos novos de melanoma. Quando se considera a grande extensão territorial e a diversidade de fenótipos brasileiros, é observado que o melanoma possui distribuição e taxas de incidências diferenciadas para ambos os sexos (Tabela 2):

Tabela 2:

Incidência de Melanoma nas Capitais Brasileiras

Cidades (ano da série histórica)	Nº de casos / 100 mil	
	Masculino	Feminino
São Paulo (1997-1999)	6,7	5,9
Porto Alegre (1994-1998)	5,5	4,5
Goiânia (1996-2000)	5,3	3,9
Palmas (2000)	5,1	3,5
Belo Horizonte (2000)	4,2	4,3
Distrito Federal (1996-1998)	4,1	3,6
Campinas (1991-1995)	3,3	2,8
Aracajú (1996)	2,0	1,7
Natal (1999-2000)	1,9	2,8
Salvador (1997-2001)	1,9	1,2
Cuiabá (2000-2001)	1,6	1,4
Fortaleza (1996)	1,4	0,6
João Pessoa (1999-2000)	1,2	0,7
Vitória (1999-2000)	1,2	0,9
Belém (1996-1998)	0,7	0,2
Recife (1995-1999)	0,7	0,9
Manaus (1999)	0,3	0,3

Fonte: Brasil. Instituto Nacional do Câncer – INCA

Apesar de ser considerada a mais agressiva neoplasia maligna da pele, quando diagnosticado precocemente e tratado corretamente os índices de controle e de sobrevida ao melanoma são considerados bons. A média mundial de sobrevida geral é de 69% em cinco anos, mas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento a sobrevida em cinco anos de pacientes com melanoma é estimada em 73 e 56% respectivamente.

A modalidade terapêutica de escolha para tratar o melanoma, em qualquer nível de estadiamento, é a excisão cirúrgica da lesão, com o cuidado de fazê-lo com margens cirúrgicas ampliadas. Nos casos com comprometimento da cadeia ganglionar regional, o

esvaziamento está indicado. Outras modalidades terapêuticas são consideradas adjuvantes e apenas deverão ser utilizadas em casos selecionados (interferon 2b, radioterapia, etc.).

A Terapia Fotodinâmica no tratamento do melanoma humano é considerada experimental. Desde 2000 é conduzido nas Universidades do Colorado, Flórida, Michigan, Missouri e Pennsylvania ensaio clínico, fase I e II *open label*, para avaliar a terapia fotodinâmica em 30 pacientes nos estágios III e IV da doença. Os objetivos são determinar a segurança da terapia fotodinâmica com verteporfin e Detox-B-adjuvante; determinar a resposta clínica em pacientes tratados com esse protocolo; determinar se essa modalidade terapêutica induz resposta humoral e celular a antígenos de melanoma e determinar o grau de destruição tumoral obtida com esses fármacos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da alumínio-cloro-flatocianina (AICIFc) em cultura de células de melanoma murino (B16F10), quando submetida à Terapia Fotodinâmica.

2.2 Objetivo Específico

2.2.1 Em uma linhagem de melanoma murino (B16F10) avaliar a citotoxicidade relacionada à Terapia Fotodinâmica com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIFc) lipossomal em condições de ausência de luminosidade, verificando em paralelo:

2.2.2 A citotoxicidade relacionada à exposição ao laser per si (Laser BWF light source [Tech in] - comprimento de onda de emissão 670 nm);

2.2.3 A citotoxicidade relacionada à exposição a diferentes concentrações de AICIFc lipossomal (5 μM (padrão); 0,5 μM e 0,25 μM).

2.2.4 A morfologia das alterações observadas na Terapia Fotodinâmica.

3. Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Morfologia e Morfogênese do Departamento de Genética e Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3.1 Materiais

3.1.1 Alumínio-Cloro-Ftalocianina lipossomal

A Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AlClF_c) lipossomal foi fornecida gentilmente pelo Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, na concentração padrão de 5 µM, encapsulada em lipossomos com diâmetro de 50 – 70 nm, utilizando etanol como diluente.

3.1.2 Linhagem celular

Linhagem de melanoma murino B16F10 (CR010), lote 19/09/02, foi adquirida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (<http://www.nce.ufrj.br/bcrj>), em garrafa de 25 cm² e preservada para fins de transporte em meio RPMI + 10 % soro fetal bovino.

3.1.3 Meio de cultivo

Meio Dulbecco Modificado (DMEM ou Dulbecco's Modified Eagles Medium, HyClone, Logan, Utah, USA), tamponado com bicarbonato de sódio, sendo o pH 7.4, esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco,

USA) e Penicilina e Estreptomicina a 10.000 µg/mL (Gibco, USA), na proporção de 1 mL do antibiótico para cada 100 mL de meio.

3.1.4 Meio de Congelamento

Meio Dulbecco Modificado (DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium, HyClone, Logan, Utah, USA) esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e acrescido de 5% de SFB (Gibco, USA) e 1% de DMSO (di- metil-sulfóxido).

3.1.5 Material Plástico

Todo material plástico utilizado nos experimentos: placas (6, 12 e 96 poços), garrafas (25 cm³ e 75cm³) para cultura de células, tubos *falcon* e *ependorffs* (TPP, Suíça).

3.1.6 Reagentes e Corantes

Tripsina-EDTA (0,125% de tripsina e 0.02% de EDTA - Gibco, USA); azul tripan (Sigma); PBS (Phosphate Buffer Solution - Solução de Tampão Fosfato - Sigma); solução de MTT (3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 diphenil tetrazolium brometo), DMSO, poli-l-lisina, cristal violeta, paraformaldeído.

3.2 Métodos

3.2.1 Manutenção da cultura da linhagem B16F10

Passagem e crescimento

Os procedimentos abaixo descritos foram realizados em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 30 a 40

minutos antes do uso, de forma a garantir a esterilidade do ambiente.

A partir de uma garrafa para cultura de células de 25 cm³, contendo monocamada de células confluentes, outras garrafas foram preparadas com a retirada do meio Dulbecco Modificado e a adição de 2ml de solução de Tripsina - EDTA. Em seguida a garrafa retornou para a estufa e permaneceu em repouso por tempo padronizado de três minutos. Após esse tempo avaliou-se em microscópio invertido se as células estavam soltas.

A suspensão celular obtida em seguida foi recolhida em tubo *falcon* de 15 mL e centrifugada por 5 minutos a 1000 r.p.m. a fim de colher-se um *pellet* de células. O sobrenadante foi então removido, o precipitado de células ressuspendido em 1 mL de meio Dulbecco modificado e alíquotas da suspensão celular foram distribuídas para as garrafas com igual meio de cultura. As garrafas de cultura retornaram para incubação em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e 70% de umidade (Tecmed – TE 399). Estas condições foram padronizadas para o cultivo das células durante todo o ensaio.

As garrafas foram supervisionadas diariamente em microscópio invertido (ASR Scientific, model 102) e a troca do meio de cultura ocorreu a cada dois dias. O número de garrafas preparadas variou de acordo com o tipo e concomitância de experimentos realizados.

Criopreservação

Para serem preservadas as células congeladas foram removidas da garrafa de cultura, seguindo os passos descritos para tripsinização. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em meio de congelamento. A alíquota em seguida foi transferida para criotubos rotulados com informação da data e linhagem celular, para estocagem em garrafões de Nitrogênio líquido a - 70° C.

Na etapa de descongelamento, a ampola foi mantida em banho maria a 37°C. Imediatamente após a liquefação o conteúdo foi rapidamente transferido para tubo *falcon*, contendo 5 ml de meio de cultura e em seguida centrifugado. Após desprezar o sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de meio Dulbecco Modificado e distribuído em garrafas para cultura de células, que foram encubadas em estufa.

Plaqueamento das Células

Para cada experimento realizado, as células foram cultivadas em placas de poliestireno contendo 12 ou 96 poços. O número de placas variou de acordo com o tipo e o número de experimentos a serem realizados em triplicata.

Para cada duas placas, uma garrafa de cultura celular com células confluentes em monocamada foi tripsinizada e seu conteúdo centrifugado. O número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, a partir de alíquota de 10 µl procedente

da ressuspensão de 10µl de solução de meio de cultura e células em 40 µl de corante azul *tripan* (fator de diluição 5).

Em placas de 12 poços foram transferidas 1×10^5 células / poço. Para placas de 96 poços transferiram-se 5×10^4 células / poço. Ambos os valores amostrais foram mantidos como padrão para toda a pesquisa. As placas em seguida foram incubadas em estufa nas condições padronizadas para a pesquisa.

O método de cultivo descrito foi comum a todos os experimentos realizados. Nas placas para análise de morfologia por microscopia de luz, antes da passagem das células para os poços, uma lamínula de vidro (18 X 18 mm), estéril, foi colocada no fundo de cada poço das placas de 12 poços, para que as células crescessem na superfície.

3.2.2 Ensaios *In Vitro*

3.2.2.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

No dia anterior a realização do procedimento, procedeu-se a passagem de células em número compatível com as dimensões dos poços da placa, para que em estufa crescessem em monocamada e confluentes, conforme padronizado para o ensaio.

Todos os experimentos com TFD foram estandardizados para realização com iluminação no escuro ou utilizando radiação de espectro vermelho, para controlar a foto-ativação da Ftalocianina lipossomal.

Para realização da Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal em cultura de melanoma murino (B16F10) foram constituídos oito grupos experimentais, submetidos à intervenções em triplicata (Quadro 1):

Quadro 1 – Grupos Experimentais

Grupos experimentais	Intervenção	
	Laser	Terapia Fotodinâmica
1. Controle (B16f10)	Não	Não
2. AICIFc-5 lipossomal		
3. AICIFc-0,5 lipossomal		
4. AICIFc-0,25 lipossomal		
5. Laser	5 min.	Sim
6. TFD-Fc-5 lipossomal	5 min.	
7. TFD-Fc-0,5 lipossomal		
8. TFD-Fc-0,25 lipossomal		

Descritivo dos grupos experimentais

1. Grupo controle (B16F10): constituído de cultura de células da linhagem B16F10, em que o meio DMEM foi substituído por PBS (300 µL para placa de 12 poços e 150 µL para placa de 96 poços), seguido de incubação em estufa por 30 minutos, em condições padronizadas para o experimento.

2. Grupo AICIFc lipossomal em concentração 5 µM (AICIFc-5): constituído de cultura de células da linhagem B16F10, em que o meio DMEM foi substituído pela Ftalocianina lipossomal em

concentração de 5 μM (300 μL para placa de 12 poços e 150 μL para placa de 96 poços), seguido de incubação em estufa por 30 minutos em estufa, conforme padronização do ensaio.

3. Grupo AICIFc lipossomal em concentração 0,5 μM (AICIFc-0,5): constituído de cultura de células da linhagem B16F19, em que o meio DMEM foi substituído por Ftalocianina lipossomal a 10% (300 μL para placa de 12 poços e 150 μL para placa de 96 poços), seguido de incubação em estufa por 30 minutos, em condições padronizadas para o ensaio.

4. Grupo AICIFc lipossomal em concentração diluída 0,25 μM (AIFc-0,25): constituído de cultura de células da linhagem B16F10, em que o meio DMEM é substituído por Ftalocianina lipossomal a 0,25 μM (300 μL para placa de 12 poços e 150 μL para placa de 96 poços), seguido de incubação em estufa por 30 minutos, nas condições previstas para o ensaio.

5. Grupo Laser: constituído de cultura de células da linhagem de B16F10, encubadas em estufa com meio DMEM, seguida de irradiação de todos os poços com laser acoplado a fibra ótica (BWF-670-300, Bwtec Inc., USA.), com onda de emissão de 670 nm, potencia de 73 mW / cm^2 , em área iluminada de 2,5 cm de diâmetro por 5 minutos, à distância de 3,5 cm. As características físicas do laser foram padronizadas para todos os grupos experimentais.

6. Grupo Laser + AICIFc lipossomal em concentração 5 μM (TFD-FC-5): constituído de cultura de células da linhagem B16F10,

encubadas com AICIFc lipossomal (300 μ L para placa de 12 poços e 150 μ L para placa de 96 poços), por trinta minutos, em condições padrão para o ensaio. Passado esse tempo a Ftalocianina lipossomal foi substituída por PBS, em volume adequado à placa, e todos os poços submetidos à radiação laser por 5 minutos.

7. Grupo Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal em concentração 0,5 μ M (TFD-Fc-0,5): constituído de cultura de células da linhagem B16F10, encubadas com AICIFc lipossomal a 0,5 μ M (300 μ L para placa de 12 poços e 150 μ L para placa de 96 poços), por trinta minutos, em condições padrão para o ensaio. Decorrido esse tempo a Ftalocianina lipossomal é substituída por PBS, em volume adequado à placa, e os poços são irradiados com laser por 5 minutos.

8. Grupo Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal na concentração 0,25 μ M: constituído de cultura de células da linhagem de B16F10, encubadas com AICIFc lipossomal 0,25 μ M (300 μ L para placa de 12 poços e 150 μ L para placa de 96 poços), por trinta minutos, em condições padrão para o ensaio. Passado esse tempo a Ftalocianina lipossomal é substituída por PBS, em volume adequado à placa, e os poços irradiados com laser por 5 minutos.

Após as intervenções acima descritas serem realizadas, os conteúdos líquidos dos poços são substituídos por meio de cultura DMEM (500 μ L para a placa de 12 poços e 200 μ L para a de 96

poços) e novamente encubados em estufa por 24 horas, nas condições padrões.

Devemos observar que, para a realização do Teste MTT, é adicionado apenas 200 µL de PBS nos poços.

3.2.3 Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade da AICIFc lipossomal foram considerados os grupos experimentais antes descritos. Os testes foram realizados 24 horas após a terapia fotodinâmica.

3.2.3.1 Teste de azul tripan

O corante azul tripan ou azul Niágara é um corante aniônico, sintetizado por Paul Erlich em 1904, do grupo diazo em razão de apresentar duas ligações N=N na molécula. A denominação tripan está relacionada ao fato do corante apresentar propriedades parasiticidas *in vitro* para protozoários do gênero *Trypanosoma*.

O teste do azul tripan avalia o grau de comprometimento estrutural da membrana plasmática. Em razão de o corante ser macromolecular, não há possibilidade de ser absorvido pelos poros da membrana plasmática de células viáveis. Contudo, quando a membrana plasmática sofre alterações estruturais e se torna permeável ao corante, as células são coradas em azul.

Como a evidência da viabilidade celular é indireta, existem fatores que podem influir na sub ou superestimação dos resultados. Por exemplo, em caso de comprometimento da capacidade de crescimento ou da função celular, ainda que insuficiente para

comprometer a integridade da membrana celular, haverá risco de concluir-se por um falso positivo quanto à viabilidade da célula.

Do mesmo modo, resultados falsos negativos podem acontecer quando a membrana estiver comprometida e a célula ainda mantiver a capacidade de auto-reparação, apresentando-se como viável no momento do exame. Um aspecto importante a ser considerado a respeito dos agentes citotóxicos está no fato de que em geral esses agentes atuam em estruturas e processos que antecedem o dano irreversível da membrana plasmática (STROBER, 1997).

Para o presente ensaio, decorrido o tempo de incubação pós-intervenções (QUADRO – 1), 200 µl de meio DMEM de cada poço foi retirado e reservado em tubos *ependorfs*, devidamente numerados e identificados com o nome do grupo experimental.

A tripsinização foi realizada com a adição de 200 µl de tripsina-EDTA por poço. Após incubação de 3 minutos, o conteúdo foi pipetado e transferido para os tubos *ependorfs*, obedecendo ao pareamento dos grupos experimentais. Todo o conteúdo foi então centrifugado por 5 minutos, a 1000 r.p.m.

Com o objetivo de manter a integridade do pequeno precipitado formado, o sobrenadante foi pipetado até que restasse em cada *ependorf* o volume de 10 µl. O *pelette* de células foi dissolvido nesse volume e ressuspenso em 40 µl do corante azul tripan, constituindo uma solução de 1:4, com fator de diluição 5.

Após homogeneizar a solução, transferiram-se 10 µl para a câmara de Neubauer. Os números de células viáveis (não coradas) e as não viáveis (coradas em azul) foram contados em microscópio de luz, no tempo máximo de 5 minutos para evitar a evaporação do líquido e a morte celular por exposição prolongada ao corante.

Para o cálculo do número de células na câmara de Neubauer, aplica-se a fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de } \frac{\text{células}}{\square} \text{ mL} = \frac{\Delta \text{ de células nos 4 quadrantes}}{4} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Calcula-se o fator de diluição:

$$\text{fator de diluição} = \frac{\text{volume de azul tripan} + 10 \mu\text{L de suspensão de células}}{10 \mu\text{L de suspensão de células}}$$

Para determinação do percentual de viabilidade de cada grupo, divide-se o número de células viáveis contadas pelo total de células contadas (viáveis e não viáveis) do grupo experimental.

Ou seja:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{\text{número de células viáveis contadas}}{\Delta \text{ de células contadas}} \times 100$$

3.2.3.2 Teste de MTT

O fundamento do Teste de MTT é a capacidade que as células viáveis possuem de clivar o sal tetrazólico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico) em um produto de cor azul denominado formazan. Esta reação ocorre na mitocôndria e é mediada pela enzima intracelular succinato-desidrogenase. O

resultado do teste é dependente, portanto, da população celular viável, capaz de metabolizar o formazan (DENIZOT et col., 1986).

Após realizar a TFD em placa de 96 poços, todo o volume de DMEM foi retirado de cada poço e substituído por solução estoque de MTT, na proporção de 15 μ L para cada 135 μ L de meio de cultura, retornando a placa para a estufa onde permaneceu por 3 horas conforme padronizado para o presente ensaio. Após esse tempo de incubação removeu-se o meio de cultura com MTT de todos os poços e foram adicionados 100 a 200 μ L de DMSO. A introdução do DMSO, além de permitir que os cristais de formazan sejam diluídos, melhora o espectro de absorvância da solução. Após esperarem-se alguns minutos para os cristais de formazan se dissolverem no DMSO, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro digital (*Bio-Rad Model 3550 – UV microplate reader*) no comprimento de onda de 595 nm, padronizada para o presente ensaio. Os resultados obtidos foram registrados, considerando os grupos experimentais presentes na placa.

Para a interpretação dos resultados, as médias de viabilidade celular dos grupos experimentais foram subtraídas do valor médio de absorvância do grupo branco (só DMSO), sendo expressas em percentuais e comparadas com o grupo controle não tratado. Absorvância menor que a lida no grupo controle é indicativa de proliferação celular reduzida ou morte celular.

Fatores que interferem na acurácia do método estão relacionados à contaminação do reagente com substâncias redutoras, células ou

microorganismos; a exposição da placa à luz; aos erros relacionados ao cálculo do número de células por poço ou ao volume pipetado; a diminuição do tempo de incubação da cultura com a solução de MTT, a diminuição do tempo de incubação necessário para solubilização e a técnicas de cultura inadequadas que comprometam o crescimento celular (ATCC, 2001).

3.2.3.3 Microscopia de luz

Para a realização da microscopia de luz é necessário montar com lamínulas esterilizadas em autoclave as placas de 6 poços, visto que sobre elas crescerão as células de B16F10. Nessa etapa, sobre cada lamínula, depositada no poço, foi aplicado poli-L-lisina de modo a cobrir toda a extensão do vidro. Após secagem em estufa, fez-se a passagem de células (10^5 /poço) e depositou-se 500 μ L de meio de cultura DMEM. A placa permaneceu encubada por três dias antes de ser realizada a Terapia fotodinâmica, e nesse período supervisionou-se a qualidade do meio e a evolução da cultura.

Após 24 horas da realização da TFD, as placas foram retiradas da estufa para a realização das etapas de coloração e fixação. Substituiu-se o meio DMEM de todos os poços, lavando-os três vezes com solução salina a 0,9%, de modo a evitar alterações na osmolaridade e a conseqüente interferência em processos vitais e na morfologia das células. Aplicou-se o paraformaldeído a 2% com PBS estéril, deixando em seguida a placa em repouso por 10 minutos. Após esse tempo os poços foram lavados com água

nanopura. O corante violeta cristal (0,02 gr/15 mL de etanol a 20%) foi aplicado e o conjunto ficou em repouso por 2,5 minutos. As lamínulas foram então retiradas cuidadosamente e iniciado o processo de desidratação, constituído de três mergulhos em álcool a 70%, 80%, 90% e 100% e, depois, em Xileno¹, 2 e 3. Ao final, as lamínulas foram retiradas dos poços com uma pinça, colocadas sobre uma lâmina de vidro, seladas com verniz e levadas a estufa para secagem. Em seguida foram analisadas em microscópio de luz (Karl Zeiss Axioscope 20, Germany).

4. Resultados

4.1 Teste do Azul Tripán

Nos grupos controle e laser não houve indícios de citototoxicidade, observando-se percentuais de viabilidade celular próximas a 100%. No grupo experimental de células B16F10 expostas a AICIFc lipossomal na concentração 5 μM e no grupo submetido à terapia fotodinâmica com AICIFc lipossomal em igual concentração foram observados altos níveis de citotoxicidade, demonstrados pelos respectivos percentuais de viabilidade celular de 53% e 0%.

Nos grupos experimentais expostos a AICIFc lipossomal nas concentrações 0,5 μM e 0,25 μM não foram evidenciadas citotoxicidades expressivas, observando-se viabilidade celular próxima de 100%. Os grupos experimentais Terapia fotodinâmica nas concentrações 05 μM e 0,25 μM apresentaram citotoxicidade importante, com percentuais de viabilidade celular de 25% e 22 %.

A análise dos percentuais de viabilidade celulares permitiu a construção de uma curva dose-resposta que distinguisse os efeitos do fármaco em diferentes diluições per si ou quando combinado com TFD. A avaliação da dose-resposta permite estabelecer para uma população a relação entre a exposição a uma ou mais variáveis e os efeitos a elas correlacionados (Gráfico 1).

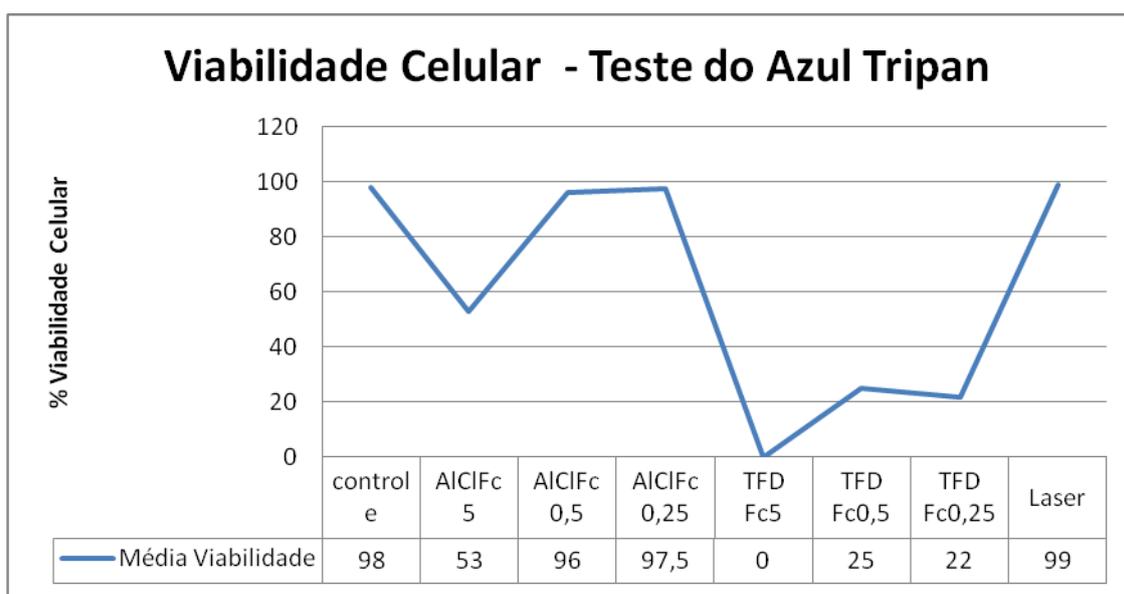


Gráfico 1: Resultados do Teste do Azul Tripán por grupos experimentais: controle (B16F10); expostos a diferentes concentrações de AICIFc lipossomal; submetidos a Terapia Fotodinâmica com diferentes concentrações de AICIFc lipossomal e à radiação laser.

4.2 Teste do MTT

Os grupos experimentais expostos a AICIFc lipossomal e a Terapia Fotodinâmica nas concentrações de 5 μ M apresentaram citotoxicidade elevada, registrando-se viabilidade celular de 51% e 8,5% respectivamente. Nos grupos controle e laser não houve citotoxicidade expressiva, situando-se os valores de viabilidade celular próximos a 100%. Nos grupos experimentais expostos a

AICIFc lipossomal e a Terapia Fotodinâmica nas concentrações 0,5 μ M e 0,25 μ M a viabilidade celular apresentou-se reduzida a 20,5 e 26 % respectivamente (Gráfico 2).

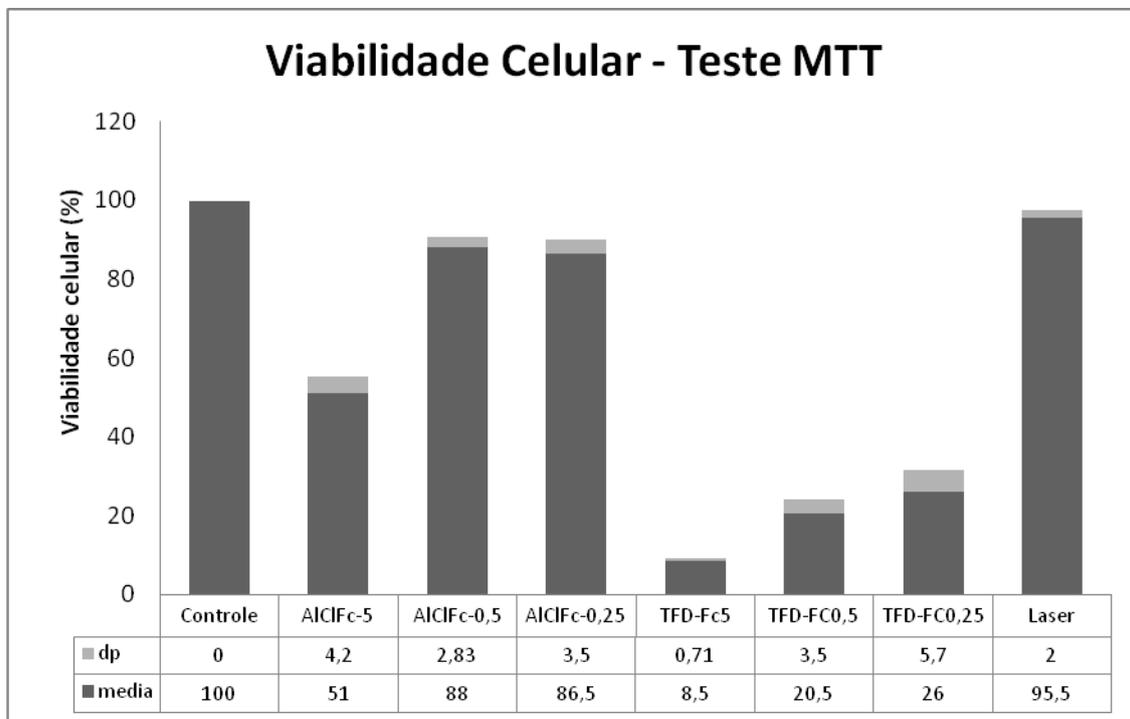


Gráfico 2: Resultados do Teste MTT por grupos experimentais: controle (B16F10); expostos a diferentes concentrações de AICIFc lipossomal; submetidos a Terapia Fotodinâmica com diferentes concentrações de AICIFc lipossomal e à radiação laser. Dp = desvio padrão

4.3 Análise estatística dos testes de viabilidade celular

Para avaliar diferenças estatisticamente significantes entre as médias de viabilidade celular verificadas pelos Testes de Azul Tripán e MTT foi realizada análise de variância (ANOVA – One Way, complementada com Teste de Scheffe), com o programa StatPlus® 2007, Professional Build 4.7.0.0 (versão de avaliação). A avaliação rejeitou a hipótese de haver contrastes entre pares de

média de viabilidade celular nos grupos experimentais (valor de 2,45 comparado a valor crítico de 5%).

4.4 Morfologia por microscopia de luz

Quando comparada aos grupos controle B16F10 e Laser, os grupos de Terapia Fotodinâmica apresentaram aspectos morfológicos caracterizados por redução ou aumento do volume celular, acentuada perda de material citoplasmático, perda de contato entre as células, presença de núcleos picnóticos, vacuolização citoplasmática e debris (Figura 2). Não foram observados corpos apoptóticos.

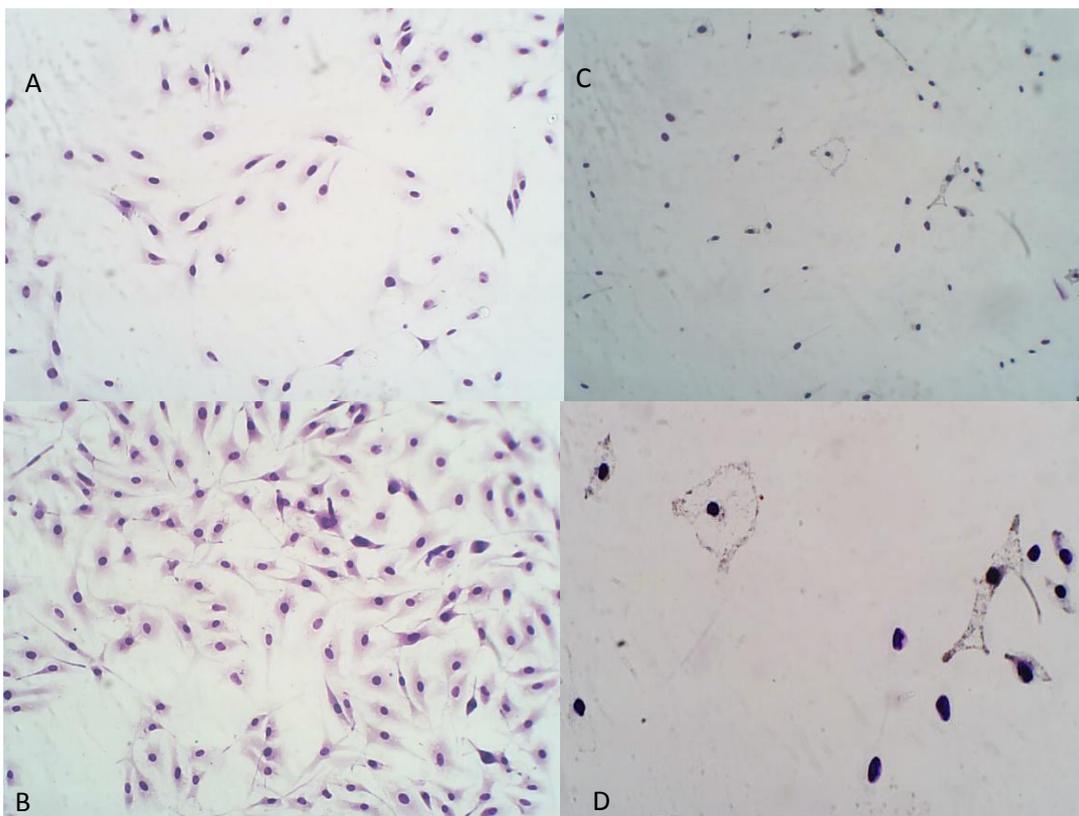


Figura 2. Fotomicrografias de células de melanoma murino (B16F10) após 24 horas de Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal. A: Grupo Controle (Cristal Violeta, Objetiva 20x). B: Grupo Laser (Cristal Violeta, Objetiva de 20 x). Grupo C: Grupo TFD (Cristal Violeta, Objetiva de 20 x). D: Grupo TFD (Cristal Violeta, Objetiva de 40x). Escala 20 μ m.

5. Discussão

Sistemas de distribuição de fármacos representam uma importante tecnologia para o tratamento do câncer. Além de potencializarem os efeitos do medicamento, reduzem efeitos adversos do fármaco e melhoram a qualidade de vida das pessoas em tratamento. Insere-se nesse contexto o uso de formulações lipossomais que facilitam a absorção celular de fotossensibilizadores hidrossolúveis, vencendo as forças de oposição das membranas celulares de natureza fosfolipoproteica.

A síntese de lipossomos e a encapsulação do fármaco embarcado é processo criterioso em que cada etapa pode influenciar a segurança e a efetividade do tratamento. Sabe-se que uma das principais limitações farmacológicas no tratamento de neoplasias é a possibilidade do fármaco apresentar índice terapêutico baixo (IT), ou seja, seu efeito antineoplásico é obtido com doses citotóxicas para os tecidos normais. Entre as razões para o fato registram-se problemas associados ao uso de surfactantes ou solventes orgânicos na formulação, que podem provocar efeitos indesejáveis, quando não completamente removidos antes da estocagem (SHARMA et col., 1997; EDWARDS e col., 2005).

Os resultados de citotoxicidade obtidos com AICIFc lipossomal na concentração padrão (5 μ M), sem fotoativação, indicam a interferência de variável relacionada à formulação da solução lipossomal, possivelmente em concentração tóxica para células de B16F10, quer mediada pelo diluente (etanol), quer pela concentração do fotossensibilizador, efeito ainda potencializado pelas dimensões do lipossomo (NUNES, 2004), visto que a diluição da solução original em 1:10 e 1:20 reverteu o efeito que contradizia um

entre os mais importantes requisitos exigidos para um agente fototerapêutico sensibilizador, que é o de não apresentar fototoxicidade em condições de não exposição à radiação luminosa.

A reversão do efeito indesejável com o uso das diluições citadas e a preservação dos efeitos terapêuticos do fármaco em Terapia Fotodinâmica são evidências de que do ponto de vista farmacotécnico a solução de AICIFc lipossomal é física e quimicamente estável, indicativo de que a citotoxicidade observada está possivelmente relacionada a maior sensibilidade do espécime celular utilizado no experimento ao solvente. Níveis residuais aceitáveis de solvente podem variar de acordo com o uso final a que se destina o fármaco (VERMURI et col., 1994).

Estudos sobre o uso de Ftalocianinas em Terapia Fotodinâmica de melanoma murino B16F10 são escassos na literatura (RIJKEN et cols., 2007; HOFFMANN et cols., 2007; HADDAD et cols., 1998; KOLAROVA et cols., 2007), e nenhuma referência foi selecionada nas bases de dados internacionais consultadas (Pubmed, Bireme e OVID Medline) sobre estudos de Terapia Fotodinâmica com Alumínio-Cloro-Ftalocianina lipossomal, dificultando comparações de metodologias e resultados. Os estudos de Terapia Fotodinâmica com células B16F10 de RIJKEN et cols.; HADDAD e cols.; HOFFMAN et cols. e de KOLAROVA et cols. utilizam AICIFc sulfatada e a Ftalocianina solketal – substituída, o que no conjunto dificultam comparar os resultados obtidos com a formulação lipossomal de Ftalocianina nos grupos pré-tratamento e TFD.

Os achados morfológicos observados com o uso de Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal em cultura de células de B16F10 são sugestivos de um mecanismo de morte celular por necrose, a semelhança de resultados

descritos por DARVISH et cols (2000) para igual linhagem celular, mas submetidas a TFD com Ácido 5-Aminolevulínico (ALA), e MIJAN et cols (2006) para o tratamento de linhagens distintas de carcinoma bucal por Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal.

A citotoxicidade da Terapia Fotodinâmica depende de vários fatores interdependentes, como por exemplo, a estrutura físico-química e a localização do fotossensibilizador, se intra ou extracelular, da intensidade e do campo de radiação, da disponibilidade de oxigênio e do tempo entre a administração do fármaco e a exposição à luz (DOLMANS et cols., 2003). Para curtos períodos de incubação, a membrana plasmática constitui um importante sítio de lesão, enquanto os tempos mais prolongados estão relacionados ao dano mitocondrial, conforme demonstrado com o uso de Photophrin® (PAZOS et cols., 2003).

Em termos gerais, a Terapia Fotodinâmica pode levar a morte celular tanto por necrose quanto por apoptose. A necrose é descrita como relacionada a radiação luminosa intensa e concentrações elevadas de fotossensibilizador, levando a alterações na permeabilidade da membrana plasmática. A peroxidação do substrato lipoproteico é considerada como causa primária para a ocorrência de necrose em razão de promover alterações subcelulares sequenciais que culminarão com a inativação mitocondrial e a desorganização de todo o sistema de transporte e energia celular (PLAETZER et cols, 2003).

Mas, apesar da necrose ser um processo de morte celular conhecido de longa data em Biologia, evidências recentes, observadas em algumas linhagens celulares, têm sugerido possível relação com algumas vias de transdução do sinal, com a ativação de receptores RIP1 (Receptor de Interação Protéica 1)

Kinase, TNF- e Fas, em situação de inibição das Caspases. A RIP1 está relacionada com a ativação da JNK - mediadora de necrose, em condições de stress oxidativo (BUYTAERT et cols., 2007).

O mecanismo pelo qual Fotossensibilizadores lipofílicos e hidrossolúveis inviabilizam as células é absolutamente distinto. Fotossensibilizadores com localização lisossomal estão relacionados principalmente a mecanismo de morte celular por necrose, possivelmente em razão da liberação de enzimas lisossomais e outras substâncias tóxicas no citoplasma, levando a lise celular. Por outro lado, existe a possibilidade de por brevíssimo tempo fotossensibilizadores lisossomais serem realocados para a mitocôndria nos primeiros segundos de iluminação, iniciando processo de apoptose via citocromo C (HASAN et cols., 2003). Nesse sentido, a Terapia Fotodinâmica possui potencial para superar a resistência das células neoplásicas à apoptose. Uma das possíveis razões para o fenômeno é a capacidade da TFD em disparar a apoptose em estádios tardios, induzindo em alguns casos a abertura dos poros e a alteração do potencial de membrana mitocondrial (PLAETZER et cols., 2003).

Estudo *in vivo* de avaliação de ftalocianinas lipossomais em tumores murinos (Zinco Ftalocianina [ZnFc] e Zinco- Octadecil-Ftalocianina [ZnODFc]) demonstrou que a ZnFc provocou um dano direto a múltiplos sítios celulares, evidenciado por edema, destruição mitocondrial, extensa vacuolização citoplasmática e descolamento parcial da membrana perinuclear, com poucas células neoplásicas apresentando sinais característicos de apoptose. O padrão descrito se assemelhava ao observado para os fotossensibilizadores hematoporfirina-derivados, quimicamente hidrofóbicos (JORI et col., 1998).

6. Conclusão e perspectivas.

O presente ensaio com melanoma murino (B16F10), a Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal demonstrou potencial antitumoral importante para a linhagem celular.

Os achados de inibição de viabilidade celular superior a 50%, em grupos experimentais expostos ao fármaco não fotoativado, na concentração de 5 μM , demonstraram que a concentração é citotóxica e letal para a linhagem celular.

Para readequar a solução de Ftalocianina lipossomal às características exigidas para os fotossensibilizadores, experimentaram-se concentrações 0,5 μM e 0,25 μM , obtendo-se viabilidade celular superior a 90% em condições de pré-tratamento e sem fotoativação ambiental. Esses resultados permitiram questionar que o efeito de inviabilidade celular sem fotoativação, na concentração 5 μM , poderia relacionar-se à concentração inadequada de solventes e de fotossensibilizador na solução lipossomal.

Os Testes de Azul Tripán e MTT demonstraram citotoxicidade alta após TFD com AICIFc lipossomal nas concentrações 5 μM , 0,5 μM e 0,25 μM , evidenciando o potencial anti-neoplásico do fármaco. Contudo, entre as duas últimas concentrações não foram observadas diferenças estatísticas significativas, sugerindo eficácia semelhante.

Em termos morfológicos, as alterações descritas para os grupos submetidos à Terapia Fotodinâmica sugerem que a necrose é o principal mecanismo de morte celular mediado pela AICIFc lipossomal em células de melanoma murino. Contudo, investigações sobre mecanismos e mediadores moleculares de morte celular, relacionadas ao uso Terapia Fotodinâmica com AICIFc lipossomal em linhagem B16F10, devem ser conduzidas para o desdobramento das conclusões aqui apresentadas e a melhor compreensão da biologia do câncer.

7. Referências Bibliográficas

1. Moan J, Peng Q. An outline of the history of PDT. In: Patrice T, editor. Comprehensives series in photochemistry & photobiology. Cambridge: Springer; 2003. p 3 -17.
2. Babilas P, Karrer S, Sidoroff A, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology – an update. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005; 21: 142-149.
3. Ackroyd r, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2001; 74 (5): 656-669.
4. Wöhrle D, Hirth A, Bogdahn-Rai T, Schnurpfeil G, Shopova M. Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. *Russ Chem Bull*. 1998; 47 (5): 807- 816.
5. Tomazini MV, Garcia SB, Souza CS, Tedesco AC. Terapia fotodinâmica com Ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas, e imuno-histoquímicas em pele do modelo animal. *An Bras Dermatol*. 2007; 82 (06): 535-541.
6. Konan YN, Berton M, Gurny R, Allémann E. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra (4-hydroxyphenyl) porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 18: 241-249.

7. Saczko J, Daczewska M, Chwilkowska A, Kulbacka J, Marcinkowska A, Banas T. Photodynamic therapy – a modern method of cancer therapy. Prog Med Res. 2004; 31: 2 -11
8. Kalka K, Merk H, MUKhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. J Am Acad Dermatol. 2000; 42 (3): 389 – 413.
9. Detty, MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. J Med Chem. 2004; 47 (16): 3897 – 3915.
10. Hoebeke M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. J Photochem Photobiol B. 1995; 28: 189 -196.
11. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbely M, Moan J, Peng Q. Photodynamic Therapy. J Natl Cancer Inst. 1998; 90 (12): 889 – 905.
12. ClinicalTrials.gov – <http://www.clinicaltrials.gov> , consultado em 28 de janeiro de 2007.
13. International Clinical Trials Registry Platform - <http://www.who.int/trialsearch/>, consultado em 28 de janeiro de 2007.
14. Moore JV, West CML, Whitehurst C. The biology of photodynamic therapy. Phys Med Biol. 1997; 42: 913-935.
15. Dolmans DE, GJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nat Rev Cancer. 2003; 3 (5): 380 – 387.

16. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6 (7). 535 – 545.
17. Canti G, De Simone A, Korbélik M. Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology. *Photochem Photobiol Sci*. 2002; 1: 79 – 80.
18. Weinberg, RA. *The biology of cancer*. 1st ed. N. York: Garland Science; 2007.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. *A situação do câncer no Brasil*. 1^a ed. Rio de Janeiro: INCA, 2006.
20. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill, 2005.
21. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. In: Coligan JE, editor. *Current protocols in immunology*. New York: Wiley & Sons; 2003.
22. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89: 271-277.
23. American Type Culture Collection – ATCC. MTT cell proliferation assay. Instructions. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/documents/pdf/30-1010k.pdf>

24. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm.* 1997; 154: 123 -140.
25. Edwards KA, Baeumner AJ. Analysis of liposomes. *Talanta.* 2006; 68: 1432 – 1441.
26. Nunes S M T, Sguila F S, Tedesco A C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz J Med Bio Res.* 2004; 37 (2): 273 – 284.
27. Vermuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* 1995; 70: 95 – 111.
28. Rijcken CJ, Hofman JW, van Zeeland F, Hennink WE, van Nostrum CF. Photosensitizer – loaded biodegradable polymeric micelles: preparation, characterization and in vitro PDT efficacy. *J Control Release.* 2007; 124 (3): 144 – 153.
29. Hoffman JW, van Zeeland F, Turker S, Talsma H, Lambrechts SA, Sakharov DV et al. Peripheral and axial substitution of phthalocyanines with solketal groups: synthesis and in vitro evaluation for photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2007; 50 (7): 1485 -1494.
30. Haddad R, Blumenfeld A, Siegal A, Kaplan O, Cohen M, Schornick Y et al. In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on murine malignant melanoma. *Ann Surg Oncol.* 1998; 5 (3): 241 – 247.

31. Kolarova H, Nevrelova P, Bajgar R, Jirova D, Kejlova K, Strnad M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanines. *Toxicol in vitro*. 2007; 21: 249 – 253.
32. Darvish D, Safrai M, Maik Z, Weiss A. Morphological characterization of photodynamic therapy. The 41st Annual Scientific Meeting of Israel Society of Microscopy – May 2006. Disponível em: <http://materials.techmon.ac.il/ism/docs/2006/Darvish-Poster.pdf>
33. Mijan MC, Longo JPF, Tapajós ECC, Simioni AR, Tedesco AC, Leal SC, Azevedo RB. Morfologia de células KB e OSCC após aplicação de terapia fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina. *Braz Oral Res*. 2006; 20 suppl Proceedings of 23rd. Annual SBPqO.
34. Pazos MC, Pacheco-Soares C, da Silva NS, DaMatta RA, Pacheco MT. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after lases irradiation. *Biocell*. 2003; 27 93); 301-309.
35. Plaetzer C, Kiesslich T, Vermanger T, Krammer B. The modes of cell death induced by PDT: An overview. *Med Laser Appl*. 2003; 18: 7 -19.
36. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1776: 86 – 107.
37. Hasan T, Ortel B, Moor ACE, Pogue BW. Photodynamic therapy of cancer. In: Brown C, Rini B, Connel P, Posner M,

editors. Holland-Frei Manual of Cancer Medicine. Hamilton (Ontario) B C Decker Inc.; 2003: 605 – 622.

38. Jori G, Fabris C. Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumour response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn (II)-phthalocyanines. J Photochem Photobiology B. 1998; 43: 181 – 185.