

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento

ALINE HELENA ARAUJO MACHADO

***AVALIAÇÃO DE UM NOVO FOTOSSENSIBILIZANTE
PARA TERAPIA FOTODINÂMICA***

São José dos Campos, SP.

2006

ALINE HELENA ARAUJO MACHADO

***AVALIAÇÃO DE UM NOVO FOTOSSENSIBILIZANTE PARA
TERAPIA FOTODINÂMICA***

Evaluation of a new photosensitizer to Photodynamic Therapy

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva
Orientadora: Prof^a.Dr^a. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos, SP.

2006

M129a

.....

Machado, Aline Helena Araujo

Avaliação de um novo fotossensibilizante para Terapia Fotodinâmica / Aline Helena Araujo Machado. São José dos Campos, 2006.

1 disco laser: color.

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Terapia Fotodinâmica 2. Fotossensibilizante 3. MTT 4. Microscopia de Fluorescência 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão 6. Morte celular.
I. Silva, Newton Soares da, Orient. II. Soares, Cristina Pacheco, 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: 08/12/2006

“AVALIAÇÃO DE UM NOVO FOTOSSENSIBILIZANTE PARA TERAPIA FOTODINÂMICA”

Aline Helena Araújo Machado

Banca Examinadora:

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

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

Prof. Dr. **WAGNER JOSÉ MARTINS PAIVA** (UEL)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me ajudaram na sua realização, a todos aqueles que com um simples gesto, palavra ou sorriso me ajudaram a tornar realidade cada pedacinho deste meu sonho, aqueles que mesmo nos momentos mais difíceis estiveram sempre batalhando ao meu lado. Obrigado por existirem e serem tão importantes na minha vida...

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, por todos os momentos maravilhosos que ele me proporcionou sempre iluminando meus passos e me guiando pela vida.

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Newton Soares da Silva e Prof^a. Dr^a. Cristina Pacheco Soares por todo carinho, respeito e atenção que me dedicaram em todos os momentos que necessitei, sem os quais a realização deste trabalho seria impossível, agradeço a eles a oportunidade de ter desenvolvido este projeto o qual acreditei intensamente que pudesse futuramente ajudar a humanidade a combater uma doença tão desesperadora como o câncer.

Agradeço aos meus avós José de Alencar Araujo e Waldet Vanny Martins Araujo e a minha mãe Luisa Helena Martins Araujo, pessoas estas que me ensinaram a ter fé, esperança e dignidade.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos.

Agradeço a todos os companheiros do Laboratório, especialmente: Maíra, Karina, Deise, Rodrigo, Tatyane, Vinícius, Frederico, Alexandre, Denise, Cibelle e Bianca.

Agradeço as minhas amigas Fernanda Maria e Fernanda Roberta por terem me acompanhado todos estes anos, transmitindo-me compreensão e companheirismo.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Josane Mittmann pela gentileza de ter compartilhado seus conhecimentos e por todas as dicas.

Agradeço ao amigo Leandro Procópio por toda sua ajuda.

Agradeço ao Prof. Dr. Milton Beltrame Júnior pela gentileza de ter cedido a ftalocianina com a qual pude realizar meus experimentos.

Agradeço ao Reitor Prof. Dr. Baptista Gargione Filho, ao Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro e ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, responsáveis pela minha bolsa de estudos.

A todas estas e outras pessoas não citadas, mas que estiveram sempre ao meu lado, não só nos momentos de alegria, mas também nos momentos mais difíceis, dando-me forças e não deixando que o desânimo me fizesse desistir.

“Se um dia tudo lhe parecer perdido lembre-se que você nasceu sem nada e que tudo o que conseguiu foi através de esforços, e os esforços nunca se perdem somente dignificam o homem !”

Autor desconhecido

Resumo

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade promissora de tratamento de células neoplásicas que emprega a combinação de um componente fotossensibilizante, oxigênio molecular e luz visível. A excitação de um agente fotossensibilizante na presença do oxigênio o converte para o estado tripleto fotoativo, o qual reage tanto com o substrato local (reação tipo I) para induzir radicais citotóxicos, quanto com o oxigênio molecular (reação tipo II) para produzir oxigênio singlete citotóxico. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial terapêutico do novo agente fotossensibilizante Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr_8) nas células L929 em relação a citotoxicidade, a localização subcelular e os fotodanos decorrentes da utilização deste agente fotossensibilizante em organelas celulares. As células L929 foram cultivadas em condições padrão, incubadas com a ZnPcBr_8 por 1 hora, irradiadas com laser ($\lambda=685\text{nm}$) e incubadas em meio MEM por 1, 12 ou 24 horas, sendo analisadas através de MTT e Microscopia de Fluorescência. Os resultados da técnica MTT demonstraram que $1\mu\text{M}$ foi a concentração mais efetiva para a TFD, com perda da atividade mitocondrial, ficando em torno de 63% após 1 hora, 99% após 12 horas e 100% 24 horas após TFD, em relação ao grupo controle. Os resultados da microscopia de fluorescência demonstraram que ZnPcBr_8 localiza-se na região perinuclear quando analisada 1 hora após incubação. A marcação do núcleo com DAPI tornou possível observar, uma discreta fragmentação nuclear 24 horas após TFD, retração citoplasmática 1, 12 e 24 horas após TFD e a presença de vacúolos ao longo do citoplasma 12 e 24 horas após TFD.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Lasers, Ftalocianina, Morte Celular.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a promising treatment modality of neoplastic cells that employs the combination of a photosensitizer compound, molecular oxygen and visible light. The excitation of the photosensitizer agent in the presence of oxygen converts it into its photoactive triple state, which reacts with either local substrate (type 1 reaction) to induce cytotoxic radicals, or with molecular oxygen (type 2 reaction) to produce cytotoxic singlet oxygen. The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of a new photosensitizer agent Octal-bromide Zinc Phthalocyanine (ZnPcBr_8) in the L929 cells in relation the cytotoxicity, the subcellular localization, and the photodamages due the use of photosensitizer agent in cell organelles. L929 cells were cultivated at standard conditions, incubated with ZnPcBr_8 for 1 hour, irradiated with laser ($\lambda=685\text{nm}$) and incubated in MEM medium for 1, 12 or 24 hours. Be analyzed through of MTT and Fluorescence Microscopy. The MTT technique results demonstrated that $1\mu\text{M}$ was the most effective concentration for PDT, with lost of mitochondrial activity, stayed in torn of 63% after 1 hour, 99% after 12 hours and 100% 24 hours after PDT, in relation to the control group. The fluorescence microscopy results showed that ZnPcBr_8 was localized in the perinuclear region when analyzed 1 hour after incubation. Nucleus staining with DAPI made was possible to observe a discreet nuclear fragmentation 24 hours after PDT, cytoplasm retraction 1, 12 and 24 hours after PDT and the presence of vacuoles along to the cytoplasm 12 and 24 hours after PDT.

Key-words: Photodynamic Therapy, Lasers, Phthalocyanine, Cell Death.

Lista de Esquemas, Figuras, Gráficos e Tabelas

Esquema 1: Síntese da Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr ₈).....	15
Figura 1: Diagrama de Jablonski simplificado para o processo de fotossensibilização.....	05
Figura 2: Localização subcelular da ZnPcBr ₈ em cultura de células L929 após 1 hora de incubação.....	27
Figura 3: Células L929 incubadas com o marcador fluorescente DAPI após 1 hora do tratamento fotodinâmico com a ZnPcBr ₈	29
Figura 4: Células L929 incubadas com o marcador fluorescente DAPI após 12 horas do tratamento fotodinâmico com a ZnPcBr ₈	30
Figura 5: Células L929 incubadas com o marcador fluorescente DAPI após 24 horas do tratamento fotodinâmico com a ZnPcBr ₈	31
Fluxograma 1: Seqüência de experimentos para o Teste da atividade mitocondrial de células L929 incubadas com ZnPcBr ₈ em diferentes concentrações.....	17

Fluxograma 2: Seqüência de experimentos para o Teste da atividade mitocondrial de células L929 após Terapia Fotodinâmica com a ZnPcBr ₈	19
Gráfico 1: Espectro de absorção da ZnPcBr ₈	22
Gráfico 2: Atividade mitocondrial de células L929 após 1 hora de incubação com a ZnPcBr ₈ em diferentes concentrações.....	24
Gráfico 3: Atividade mitocondrial de células L929 1, 12 e 24 horas após TFD com a ZnPcBr ₈	26
Tabela 1: Parâmetros de irradiação utilizados no teste de atividade mitocondrial.....	18
Tabela 2: Parâmetros de irradiação utilizados na Microscopia de Fluorescência.....	21

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AlPc: Alumínio Ftalocianina

AlPcS₄: Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada

ANOVA: Análise de Variância

Apaf-1: Fator associado às proteínas apoptóticas

As-Ga-Al: Arseneto de Gálio e Alumínio

ATP: Adenosina tri-fosfato

Br₂: Bromo molecular

Caspases: Cisteína proteases

CCl₄: Tetracolorometano

CHO-K1: Células do ovário de Hamster chinês

Clone L929: Células do tecido conjuntivo de camundongo

CO₂: Dióxido de carbono

D.E: Densidade de energia

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

dATP: Deoxiadenosina 5 trifosfato

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiamínicotetraacético sal dissódico

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

Fas: Proteína de membrana tipo II

Fe: Ferro

Formazan: 1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan

GaAl: Gálio-alumínio

GaAs: Arseneto de Gálio

HCT116: Células cancerígenas de cólon humano

HeNe: Hélio-neônio

HeNeAs: Arseneto de Hélio-neônio

Hep-2: Carcinoma de laringe humana

InGaAlP: Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio

ISO: Organização de Normas Internacionais

I₂: Iodo Molecular

KB: Carcinoma de nasofaringe maligno humana

L5178Y-R: Célula linfoblastóide leucêmica radiosensitiva de camundongo

LASER: Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação.

LED: Diodos emissores de luz

LLLT: Terapia Laser de Baixa Intensidade

MEM: Meio mínimo essencial

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MTT: *(3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide])*

NaCl: Cloreto de sódio

NBS: N-bromosucinamida

PA: Paraformaldeído

PBS: Salina tampão fosfato

PHEM: Salina tampão

RPM: Rotações por minuto

SFB: Soro Fetal Bovino

SIDA: Síndrome de imunodeficiência adquirida

SiPcS₄ : Tetrasulfonada Silicone Ftalocianina

TFD: Terapia fotodinâmica

UV: ultravioleta

ZnPc: Zinco Ftalocianina

ZnPc (II): Zinco (II) Ftalocianina Lipossomal

ZnPcBr₈: Zinco Ftalocianina Octa-bromada

ZnPcS₂: Disulfonada Zinco (II) Ftalocianina

ZnPcS₃: Trisulfonada Zinco (II) Ftalocianina

λ : Comprimento de onda

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

¹O₂,: Oxigênio singleto

O₂(¹Δ_g): Oxigênio singleto molecular

Sumário

1. Introdução.....	01
1.1 Objetivos gerais.....	02
1.2 Objetivos específicos.....	02
2. Revisão da Literatura.....	03
2.1 Terapia Fotodinâmica (TFD).....	03
2.2 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica.....	04
2.3 Agentes Fotossensibilizantes.....	06
2.4 Ftalocianinas.....	07
2.5 Localização Subcelular do Corante.....	08
2.6 Laser.....	08
2.7 Morte celular.....	11
3. Material e Métodos.....	14
3.1 Linhagem Celular.....	14
3.2 Fotossensibilizante.....	14
3.3 Espectro de Absorção.....	15
3.4 Crescimento e Manutenção da Cultura Celular L929.....	16
3.5 Teste da atividade mitocondrial de células L929 incubadas com ZnPcBr ₈ em diferentes concentrações.....	16
3.6 Teste da atividade mitocondrial de células L929 após Terapia Fotodinâmica com a ZnPcBr ₈	18

3.7 Avaliação da localização subcelular através da Microscopia de Fluorescência.....	19
3.8 Microscopia de Fluorescência utilizando marcador fluorescente específico para núcleo.....	20
4. Resultados.....	22
4.1 Espectro de Absorção da $ZnPcBr_8$	22
4.2 Atividade mitocondrial de células L929 incubadas com $ZnPcBr_8$ em diferentes concentrações.....	23
4.3 Atividade mitocondrial de células L929 após Terapia Fotodinâmica com a $ZnPcBr_8$	25
4.4 Localização subcelular do corante através da Microscopia de Fluorescência.....	27
4.5 Microscopia de Fluorescência utilizando marcador fluorescente específico para núcleo.....	28
5. Discussão.....	32
6. Conclusão.....	38
Referências	39
Anexos.....	48

1. INTRODUÇÃO

Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento alternativo para o câncer e diversas outras condições médicas (CAUCHON et al., 2005). Esta técnica envolve a combinação de um agente fotossensibilizante, uma fonte de luz e oxigênio molecular (ALISSON et al., 2004; BAKALOVA et al., 2004; CÓRDOBA et al., 2005; FERREIRA et al., 2004; HAYWOOD-SMALL et al., 2006; KOLÁROVÁ et al., 2003; ZHU; FINLAY; HAHN, 2005).

As ftalocianinas apresentam efeitos citotóxicos quando ativadas por luz. Sob irradiação, estes fotossensibilizantes são promovidos ao seu estado excitado e geram oxigênio singlete. As biomoléculas circunvizinhas são danificadas e isto inicia uma cascata de respostas biológicas conduzindo a morte tumoral (BAYIR, 2005).

Com o intuito de aprimorar a técnica de Terapia Fotodinâmica, vêm sendo estudados novos fotossensibilizantes de segunda geração, como é o caso da Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr_8), uma ftalocianina hidrofílica, recentemente desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial do novo agente fotossensibilizante Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr_8) nas células L929 (Tecido conjuntivo de camundongo) em relação a citotoxicidade, a localização subcelular e os fotodanos decorrentes da utilização deste agente fotossensibilizante em determinadas organelas celulares.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito citotóxico do agente fotossensibilizante Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr_8) na interação com cultura de células L929, antes e após TFD (1, 12 e 24 horas) através da técnica MTT;
- Analisar a localização subcelular da ZnPcBr_8 após 1 hora de incubação em cultura de células L929;
- Analisar os efeitos da ZnPcBr_8 1, 12 e 24 horas após TFD em cultura de células L929 através da microscopia de fluorescência utilizando um marcador específico para o núcleo (DAPI).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Terapia Fotodinâmica (TFD) é um procedimento muito conhecido no campo da medicina clínica para o tratamento de várias doenças (SCHASTAK et al., 2005), bem como o câncer (DEMIDOVA et al., 2005; ICHIKAWA et al., 2005; COMUZZI et al., 2006) e determinadas condições não-cancerígenas (SIBATA et al., 2000). Podem ser citadas como exemplo, degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenosis, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose, SIDA, dentre outras (ALEXANDRATOU; YOVA; LOUKAS, 2005; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Essas doenças geralmente são caracterizadas pelo grande crescimento de células não desejadas ou células anormais (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002).

O desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica começou em 1900, quando um estudante de medicina alemão, Oscar Raab, trabalhando com o Professor Herman von Tappeiner em Munich, descobriu o efeito fotodinâmico da laranja de acridina em paramécios na presença de luz solar (RAAB, 1900 apud MACHADO, 2000; ACKROYD et al., 2001; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; DETTY; GIBSON; WAGNER, 2004; BERG et al., 2005; BABILAS et al., 2005; KUBLER, 2005).

A era atual da TFD iniciou-se em 1960, através dos estudos de Lipson e Schwartz, os quais observaram que a injeção de hematoporfirina levava a fluorescência de lesões neoplásicas visualizadas durante cirurgia (LIPSON;

BALDES; OLSEN, 1961; HENDERSON; DOUGHERTY, 1992 apud DOUGHERTY et al., 1998; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

O procedimento da TFD requer a exposição de células ou tecidos para uma droga fotossensibilizante seguida pela irradiação com luz visível de um apropriado comprimento de onda, usualmente na região do vermelho ou infravermelho próximo, sendo esta compatível com o espectro de absorção da droga (BRANCALEON; MOSELEY, 2002; OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002; PAZOS et al., 2003; USUDA et al., 2003; USUDA et al., 2006).

Estas interações fotoquímicas na presença de oxigênio molecular (KOLAROVA et al., 2005) levam a geração de espécies citotóxicas (oxigênio singleto), o qual pode induzir dano oxidativo para as estruturas celulares (HARADA et al., 2005), podendo então resultar em morte celular e destruição tecidual (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; ALISSON et al., 2005).

2.2 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

Após absorção da luz pelo corante na presença de oxigênio, vários processos fotofísicos envolvendo espécies reativas excitadas induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares (TOMÉ, 2002).

O agente fotossensibilizante ao sofrer irradiação com luz de um apropriado comprimento de onda, passa de seu estado fundamental (S_0) ao estado excitado, denominado estado singleto (S_1), as moléculas deste estado prontamente decaem retornando ao estado fundamental com a emissão de luz (fluorescência) ou calor, ou podem realizar um cruzamento intersistema (ϕ_{isc}), passando a um estado intermediário, denominado estado tripleto (T_1), neste estado ocorre emissão de

elétrons que reagem com o oxigênio formando EROs (figura 1). Os EROs podem ser gerados por dois processos principais:

O processo tipo I gera radicais livres reativos, peróxidos e superóxidos por reações de transferência de elétrons ou hidrogênio com água ou uma biomolécula.

No processo tipo II, o fotossensibilizante no estado tripleto reage com o oxigênio via um processo de transferência de energia gerando oxigênio singlete.

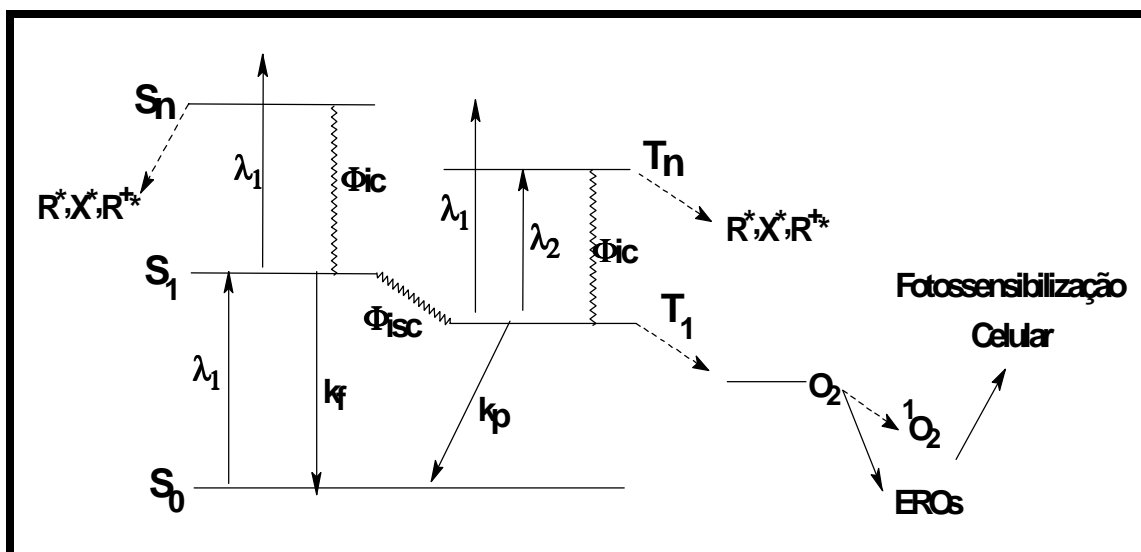


Figura 1: Diagrama de Jablonski simplificado para o processo de fotossensibilização.

Estas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas via mecanismos tipo I e/ou II são responsáveis por danos irreversíveis aos componentes celulares, causando então uma cascata de eventos citotóxicos que pode levar a morte celular através de necrose ou apoptose (SIBATA et al., 2000; TOMÉ, 2002; MARTINES, 2003; ALEXANDRATOU; YOVA; LOUKAS, 2005).

2.3 Agentes Fotossensibilizantes

Um agente fotossensibilizante é geralmente definido como uma substância que induz sensibilidade luminosa a processos químicos e físicos, normalmente insensíveis à luz (PAZOS, 2001; BUSANELLO, 2003). Estes componentes acumulam-se no alvo celular (BABILAS et al., 2005) e absorvem energia diretamente de uma fonte de luz (BROWN; BROWN; WALKER, 2004), de um específico comprimento de onda (630-800nm) (CAUCHON et al., 2005), sendo capazes de utilizar esta energia para induzir reações em outras moléculas não absorvidas (SIBATA et al., 2000), gerando assim uma reação fotodinâmica mediada pelo oxigênio (ALLISON et al., 2005).

O fotossensibilizante ideal para a Terapia Fotodinâmica deve possuir os seguintes requisitos: ser quimicamente puro e de composição conhecida, ser biologicamente estável, ter toxicidade mínima no escuro sendo somente citotóxico na presença de luz, ser preferencialmente retido pelo tecido alvo, ser rapidamente excretado pelo corpo para prover baixa toxicidade sistêmica, ter uma alta eficiência quântica para o evento fotoquímico, ter forte absorção com um alto coeficiente de excitação na faixa de 600-800nm, onde a penetração da luz no tecido está no máximo e onde o comprimento de onda da luz permanece energético o suficiente para produzir oxigênio singleto (FICKWEILER et al., 1999; ACKROYD et al., 2001; DETTY; GIBSON; WAGNER, 2004; KARMAKOVA et al., 2006).

O Photofrin[®] foi o primeiro agente fotossensibilizante aprovado pelos órgãos governamentais para utilização em seres humanos, este vem sendo empregado no tratamento de muitos tipos de tumores, incluindo pulmão, esôfago, cervical, bexiga e tumores gástricos (MACHADO, 2000; ALMEIDA et al., 2004). É o único

fotossensibilizante aprovado para terapia de câncer nos Estados Unidos, Europa, Japão e Canadá (BELLNIER et al., 2006).

Resultados clínicos promissores vêm sendo obtidos com o Photofrin, porém, ele possui algumas desvantagens, como por exemplo, heterogenicidade química, alta fototoxicidade e tolerância à luz solar. Devido a este fato, diversos fotossensibilizantes de segunda geração estão sendo testados atualmente (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; MEISEL; KOCHER, 2005; SCHASTAK et al., 2005).

2.4 Ftalocianinas

O desenvolvimento de novas gerações de fotossensibilizantes para o aperfeiçoamento da Terapia Fotodinâmica e do Diagnóstico Fotodinâmico compreende uma extensa área de pesquisa (ALI; OLIVO, 2002).

Entre os mais promissores fotossensibilizantes de segunda geração estão às ftalocianinas (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004), as quais vêm atraindo muita atenção há décadas devido ao fato de possuírem excelentes propriedades fotoquímicas (ALLEN et al., 2002; LIU et al., 2004).

Estes tipos de fotossensibilizantes constituem uma vasta classe de componentes com alto coeficiente de excitação na região vermelha do espectro (630-750nm), possuem excelentes propriedades de localização tumoral, alta eficiência fotossensibilizante (FERREIRA et al., 2004) e um longo tempo de vida do estado excitado tripleto para produzir eficientemente o oxigênio singleto molecular ($O_2(^1\Delta_g)$) (YSLAS; RIVAROLA; DURANTINI, 2005).

As ftalocianinas são componentes químicos (SILVA et al., 2004), que sob irradiação são promovidas para seu estado excitado, gerando oxigênio singleto.

Neste estado, biomoléculas ao redor são danificadas e isto inicia uma cascata de respostas biológicas levando a morte tumoral (BAYIR, 2005).

2.5 Localização Subcelular do Corante

O mecanismo de citotoxicidade da TFD depende fortemente do tipo celular, do fotossensibilizante empregado e de sua localização subcelular (GREBENOVA et al., 2003; MORIYAMA et al., 2005).

Diversas organelas celulares podem ser postuladas como alvos para TFD com diferentes fotossensibilizantes, como membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de golgi, lisossomos e estruturas do citoesqueleto (ACKROYD et al., 2001; BOURRÉ et al., 2002; KOLAROVA et al., 2003; FERREIRA et al., 2004; KOLAROVA et al., 2005).

A localização intracelular é dependente também das propriedades químicas do fotossensibilizante. Esses podem entrar nas células diretamente através da membrana plasmática ou por endocitose. A captação pela membrana plasmática deve ocorrer por difusão simples ou facilitada ou por um mecanismo de transporte ativo (ALI; OLIVO, 2002).

2.6 Laser

O termo "*LASER*" significa "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation", ou seja, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação.

Pesquisas realizadas por Albert Einstein e mais tarde por Schawlow e Townes do Laboratório Bell levaram a descrição do laser em 1957. O primeiro laser a ser construído foi o de Rubi, em 1960 na Califórnia pelo físico Theodore Maiman (SCHAWLOW; TOWNES, 1958; MAIMAN, 1960 apud ARONOFF, 1997).

Os lasers possuem três elementos chave. Um, é o meio propriamente dito, que gera a luz laser. O segundo é a fonte de energia, que entrega energia ao meio do laser de forma a excitá-lo para emitir luz. Um terceiro é a cavidade óptica ou ressonante, a qual concentra a luz para estimular a emissão da radiação laser (HECHT, 1992).

A luz laser possui algumas características que a diferencia de outras fontes luminosas, entre estas características destacam-se a monocromaticidade (compostos de fótons de mesmo comprimento de onda ou cor), colimação (os feixes de luz são paralelos, permitindo que uma grande quantidade de energia seja transmitida a um alvo preciso) e coerência (sincronização das ondas de luz no espaço e no tempo) (SCHAWLOW, 1995; GENOVESE, 2000). Estes também possuem uma alta potência de saída e compatibilidade com fibras ópticas (VOGL et al., 2004).

Os lasers são comumente utilizados na medicina devido a absorção seletiva de específicos comprimentos de onda nas diferentes estruturas teciduais (KOLÁROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999). Estes podem ser classificados em relação a utilização terapêutica como lasers cirúrgicos (alta potência) e não-cirúrgicos (baixa potência). Os primeiros são utilizados para corte, vaporização e coagulação, enquanto que os de baixa potência são utilizados na regularização de processos fisiológicos, como inflamação, cicatrização, e produção de energia (ATP) pelas células (PEREIRA et al., 2002).

Desde 1960, diferentes comprimentos de onda em baixas doses de luz (terapia a laser de baixa potência ou fotobiomodulação) vêm sendo utilizados no tratamento de doenças específicas (ALBERTINI et al., 2004; AIMBIRE et al., 2005), possuindo atualmente uma extensa aplicação clínica (KREISLER et al., 2002), como

por exemplo, na fisioterapia, odontologia, dermatologia, reumatologia, oncologia, entre outros (GULSOY et al., 2006).

Os efeitos dos lasers nas células são dependentes da dose e do comprimento de onda (KREISLER et al., 2002). Estudos *in vitro* vêm demonstrando bem os efeitos da Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT) em nível celular em determinadas culturas celulares, como por exemplo, em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, entre outras (HERASCU et al., 2005), demonstrando que esta terapia tem uma significativa influência nestas funções celulares (BRONDON; STADLER; LANZAFAME, 2005).

O mecanismo de interação da radiação laser em taxas moleculares foi descrito por Karu et al. (1995 e 1999) a qual sugeriu diferentes mecanismos de ação para comprimentos de ondas emitidos na faixa do visível e infravermelho (KARU et al., 1995; KARU et al., 1999).

A irradiação em baixas taxas de energia pode gerar significantes bioefeitos, os quais são manifestados na bioquímica, fisiologia e fenômeno proliferativo. Estes bioefeitos podem ocorrer em várias enzimas, células, tecidos, órgãos ou organismos. Os fenômenos de estimulação e inibição causados pela luz laser são denominados laser bioestimulação e bioinibição (YU; NAIM; LANZAFAME, 1997).

Os lasers mais comumente utilizados são:

- Laser de Hélio-neônio (HeNe) - 632.8nm;
- Laser de Gálio-alumínio (GaAl) - 630 e 685nm;
- Laser de Arsenieto de Hélio-neônio (HeNeAs) - 780 e 870nm;
- Laser de Arsenieto de Gálio (GaAs) - 904nm;
- Laser de Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) - 685nm;
- Diodos emissores de luz (LED) - 670 a 950nm.

A principal razão para utilização destas fontes de radiação na região do vermelho e infravermelho-próximo (600 a 1200nm) é o fato de que a hemoglobina e a água não absorvem nesta região e a luz pode penetrar através de tecidos vivos, sendo assim esses comprimentos de ondas são denominados “Janela Óptica Terapêutica” (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

2.7 Morte Celular na Terapia Fotodinâmica

O processo de morte celular é o principal mecanismo de controle do número de células (diferenciação, embriogênese, envelhecimento e metamorfose), agindo também no mecanismo de defesa removendo células indesejadas e até mesmo potencialmente perigosas para o organismo e na prevenção de diversas doenças, como exemplo o câncer (KLIONSKY; EMR, 2000; GUIMARÃES; LINDEN, 2004; CANDAL et al., 2005; TAMIETTI, 2006).

A TFD pode induzir morte celular através de necrose ou apoptose (morte celular programada), os quais são acompanhados por dano vascular e resposta inflamatória. Tanto a apoptose quanto à necrose podem ocorrer in vitro e in vivo (LUO; KESSEL, 1997; FABRIS et al., 2001; BARGE et al., 2004; WISING et al., 2005).

O termo apoptose foi adotado pela primeira vez em 1972 por Kerr et al. (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972 apud HAUNSTETTER; IZUMO, 1998; PAROLIN; REASON, 2001). Apoptose, também conhecida por “morte celular programada” é um processo fisiológico de eliminação celular que ocorre durante embriogênese, metamorfose, atrofia tecidual e regressão tumoral. Esta possui duas funções principais, a primeira, como um antagonista para mitose para a eliminação controlada de células em excesso que não serão necessárias ao organismo, a

segunda, como uma das linhas de defesa do organismo contra doenças, como exemplo, para eliminação de células neoplásicas ou células danificadas após injúria citotóxica (BURSCH et al., 2000).

As características morfológicas da apoptose são: condensação da cromatina, fragmentação nuclear, protusões da membrana, formação de corpos apoptóticos, encolhimento e arredondamento celular com perda de adesão (YU; CHOI, 2000; PAZOS et al., 2003; EDINGER; THOMPSON, 2004; BLAISE et al., 2005; CHEN; WU; LIN, 2006).

A apoptose ocorre através de dois caminhos principais: o primeiro, refere-se a um caminho extrínseco ou citoplasmático, é ativado através do receptor de morte Fas, um membro da superfamília receptora do fator de necrose tumoral (TNF). O segundo caminho é intrínseco ou caminho mitocondrial que quando estimulado conduzem a liberação do citocromo C da mitocôndria e a ativação do sinal de morte. Ambos caminhos convergem para uma via final comum envolvendo a ativação de uma cascata de proteases chamada caspases, resultando em morte celular (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005).

As células também podem terminar em uma morte tipo-apoptótica sem ativação das caspases, refletindo um caminho alternativo por meio de proteases lisossomais, os quais representam um papel crucial. Nestes casos a condensação da cromatina é baixa e a fragmentação nuclear normalmente não ocorre (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A morte celular também pode ser iniciada por um programa padrão de apoptose, o qual é então inibido nos estágios tardios da ativação da caspase e é finalizado pela necrose. Este fenótipo aponecrótico é caracterizado pela coexistência

de núcleo fragmentado e degeneração das organelas (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A necrose é uma forma rápida e violenta de degeneração afetando extensas populações celulares (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003) caracterizada por inchaço do citoplasma, destruição de organelas e rompimento da membrana plasmática, conduzindo a uma liberação de conteúdos intracelulares e inflamação. Ela vem sendo referida como uma morte celular accidental causada por danos físicos e químicos, sendo considerada um processo não programado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Dependendo da morfologia e o envolvimento dos lisossomos, pode-se ocorrer dois tipos diferentes de morte celular necrótica: a autofagia e a desintegração não-lisossomal (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A morte celular autofágica é caracterizada por numerosos vacúolos no citoplasma ocupados com restos celulares. A morte celular não-lisossomal demonstra que uma pronunciada dilatação das organelas e espaços vazios são formados sendo que a degeneração ocorre sem nenhum envolvimento detectável de lisossomos (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem Celular

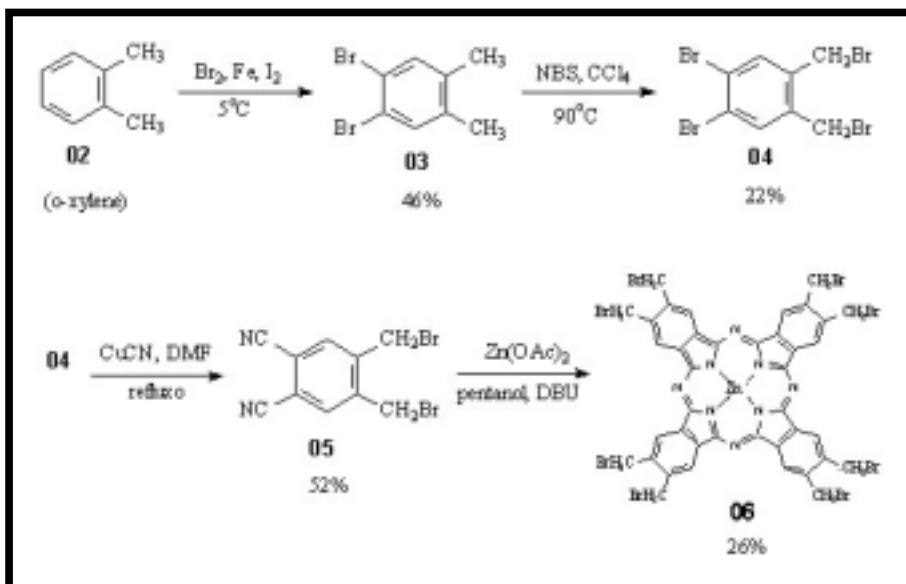
A linhagem celular utilizada neste trabalho, Clone L929 (ATCC CCL-1 NCTC), derivada de Tecido conjuntivo de camundongo, foi adquirida do Laboratório de Cultura de Células – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, SP, Brasil.

3.2 Fotossensibilizante

O corante fotossensibilizante utilizado foi a Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr_8), desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade do Vale do Paraíba, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Milton Beltrame Júnior - UNIVAP - São José dos Campos.

A preparação da Zinco Ftalocianina Octa-bromada (esquema 1.06) foi realizada a partir do xileno. Iniciando com uma reação de bromação do xileno à temperatura controlada (5°C) na presença de ferro e alguns cristais de iodo (46% de rendimento). Na reação seguinte a halogenação de **03** com N-bromo-succinimida (NBS) ocorreu principalmente na cadeia lateral fornecendo o composto **04** com apenas 22% de rendimento. O baixo rendimento do composto **04** é comum em reações desse tipo. Um acompanhamento da reação por cromatografia a gás mostra o ponto ideal para a interrupção da reação. A ftalonitrila **05** foi obtida tratando o composto **04** com cianeto de cobre I em refluxo de dimetil-formamida (DMF) previamente tratada e seca. A reação de ciclização para formar a ftalocianina **06** foi

efetuada refluxando uma mistura contendo a ftalonitrila **05**, acetato de zinco, DBU e pentanol seco (esquema 1).



Esquema 1: Síntese da Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr₈).

Para a diluição da ZnPcBr₈ misturou-se 1,3mg da ftalocianina em 1mL de DMSO (Dimetil Sulfóxido - Synth) estéril. Após a completa dissolução, a solução de ftalocianina foi esterilizada (filtro estéril Millex GV 0,22µm - Millipore), e colocada em um tubo tipo eppendorf estéril, sendo mantida no escuro à 4°C até o momento da utilização.

3.3 Espectro de absorção

A fim de se verificar o pico máximo de absorção da ZnPcBr₈ foi preparado uma solução a 10µM em DMSO a partir da solução estoque de 1mM, e obtido o espectro de absorção em Espectrofotômetro (UV-VIS Varian Cary 50), utilizando cubetas de quartzo tipo 111-QS 10mm (Hellma®, Sulamericana LTDA). A partir destes dados é possível selecionar o tipo de laser a ser utilizado com máxima eficiência do fotossensibilizante.

3.4 Crescimento e Manutenção da Cultura Celular L929

Partindo-se inicialmente de uma ampola de congelamento (NALGENE®) contendo células L929 estocadas em nitrogênio líquido, foi preparada uma garrafa de cultura de 25cm² (TPP, Switzerland), contendo 1mL de cultura de células (~10⁶ células/mL), mais 2mL de meio de cultura MEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL). A garrafa foi então incubada em estufa com controle automático de temperatura (37°C) e pressão de CO₂ (5%) (Forma Scientific).

O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40 e as células subcultivadas pelo processo de tripsinização. O repique das células foi realizado quando havia a formação de uma monocamada confluyente.

3.5 Teste da atividade mitocondrial de células L929 incubadas com ZnPcBr₈ em diferentes concentrações

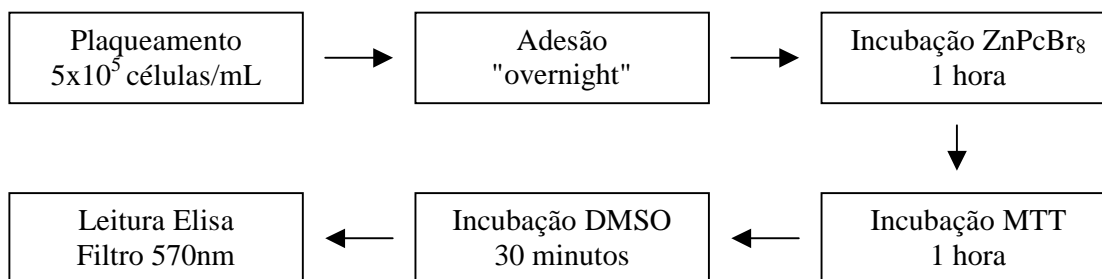
Para a avaliação da atividade mitocondrial através da técnica de MTT as células L929 foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 5x10⁵ células/mL por poço em placa de 24 poços (TPP, Switzerland) contendo o meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB e incubadas por uma noite para adesão a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. No dia seguinte, foi adicionada às células a ZnPcBr₈ diluída em DMSO estéril nas concentrações 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 e 10μM. As células foram incubadas na presença de ZnPcBr₈ durante 1 hora a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Após incubação, a atividade mitocondrial foi avaliada pela análise baseada na redução do sal 3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) solúvel em água para um formazan insolúvel de cor roxa, produto das

desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas. Para tal, os poços foram lavados com PBS, em seguida foi adicionado o MTT diluído em PBS na concentração de 0,5mg/mL. As placas foram então incubadas por 1 hora a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos através da adição do solvente orgânico Dimetil Sulfóxido 100% (DMSO) e mantidos por 30 minutos sob agitação. Após este período foi efetuada a leitura das placas no leitor de Elisa Spectracount (Packard, USA), utilizando filtro de 570nm. Os dados obtidos foram tratados de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{(\text{Absorbância de Células Tratadas} - \text{Absorbância do Branco})}{(\text{Absorbância de Células Controle} - \text{Absorbância do Branco})} \times 100$$

Os resultados foram plotados no programa GraphPad Prism com média e desvio padrão de 7 amostras em triplicata. Os testes estatísticos utilizados foram o ANOVA e o Friedman.



Fluxograma 1: Seqüência de experimentos para o Teste da atividade mitocondrial de células L929 incubadas com ZnPcBr₈ em diferentes concentrações.

3.6 Teste da atividade mitocondrial de células L929 após TFD com a ZnPcBr_8

Para a avaliação da atividade mitocondrial através da técnica de MTT, as células L929 foram divididas em três grupos: controle, laser e Terapia Fotodinâmica (concentrações 0.25, 0.5 e $1\mu\text{M}$). Para tal experimento, as células foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 5×10^5 células/mL por poço em placa de 24 poços (TPP, Switzerland) contendo o meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB e incubadas por uma noite para adesão a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . No dia seguinte, foi adicionada às células a ZnPcBr_8 diluída em DMSO estéril nas concentrações 0.25, 0.5 e $1\mu\text{M}$. As células foram incubadas na presença de ZnPcBr_8 durante 1 hora em condições de crescimento.

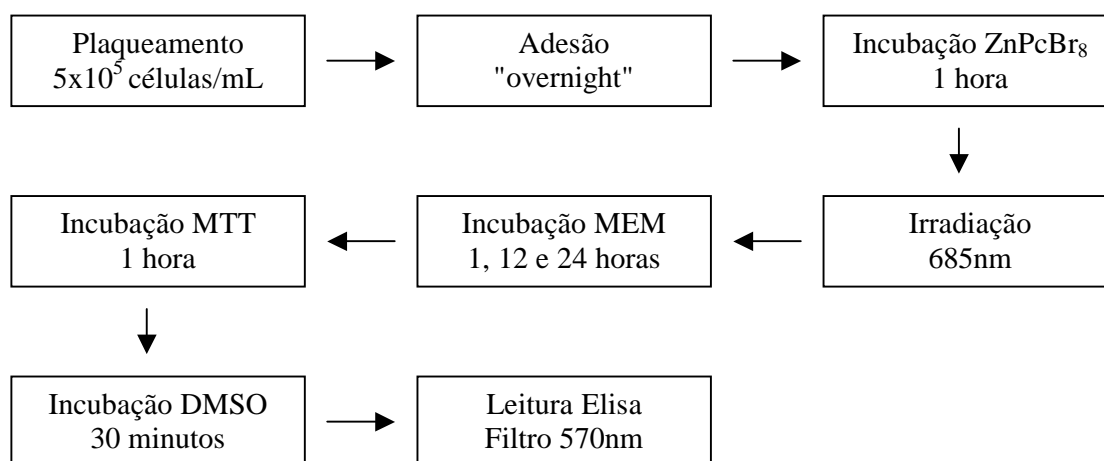
Para o grupo laser e Terapia Fotodinâmica (após o tempo de incubação), as células foram irradiadas no escuro com um aparelho clínico portátil de laser semiconductor com meio ativo de InGaAlP, operando com onda contínua. Os parâmetros utilizados foram pré-determinados em estudos anteriores (PAZOS, 2001; FERREIRA et al., 2004; TAMIETTI, 2006) e estão no quadro a seguir:

Tabela 1: Parâmetros de irradiação utilizados no teste de atividade mitocondrial.

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda (λ)	685nm
Densidade de energia (DE)	$4,5\text{J}/\text{cm}^2$
Potência	35mW
Área	$2,0\text{cm}^2$
Tempo	4 minutos e 18 segundos
Distância da fibra a placa	5cm
Diâmetro do feixe	1,5cm

Após irradiação, as células receberam novamente o meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB e foram incubadas por 1, 12 e 24 horas em condições de crescimento.

Após tais períodos, a atividade mitocondrial foi avaliada conforme descrito no item 3.5. Os resultados foram plotados no programa GraphPad Prism com média e desvio padrão de 5 amostras em triplicata. Os testes estatísticos utilizados foram o ANOVA e o Friedman.



Fluxograma 2: Seqüência de experimentos para o Teste da atividade mitocondrial de células L929 após Terapia Fotodinâmica com a ZnPcBr₈.

3.7 Avaliação da localização subcelular através da Microscopia de Fluorescência

Para a avaliação da localização subcelular da ZnPcBr₈ as células L929 foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 5x10⁵ células/mL em placas de 24 poços (TPP, Switzerland) contendo lamínulas estéreis, com meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB e incubadas por uma noite para adesão a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte, foi adicionada às células a ZnPcBr₈

diluída em DMSO na concentração 1 μ M e incubadas por 1 hora em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Após este período, as células L929 foram cuidadosamente lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e fixadas por 10 minutos com paraformaldeído a 4% (diluído em tampão PHEM). As lamínulas foram lavadas com tampão PHEM no escuro e montadas em lâminas com n-propil galato. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

3.8 Microscopia de Fluorescência utilizando marcador fluorescente específico para núcleo

O DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride - Molecular Probes) é um marcador amplamente utilizado para técnicas fluorescentes corando núcleos especificamente, com pouca ou nula marcação de citoplasma (Molecular Probes).

Para tal experimento foram utilizados 4 grupos, controle (somente células), fotossensibilizante (células incubadas com a ZnPcBr₈ na concentração 1 μ M), laser (células irradiadas) e Terapia Fotodinâmica (células incubadas com a ZnPcBr₈ na concentração 1 μ M e irradiadas).

Para os quatro grupos, as células foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 5x10⁵ células/mL em placas de 24 poços (TPP, Switzerland) contendo lamínulas estéreis, com meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB e incubadas por uma noite para adesão a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. No dia seguinte, foi adicionada às células a ZnPcBr₈ diluída em DMSO na concentração 1 μ M para o grupo fotossensibilizante e Terapia Fotodinâmica, sendo incubadas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 1 hora.

Para o grupo Laser e Terapia Fotodinâmica, após procedimento previamente descrito, as células foram irradiadas no escuro com um aparelho clínico portátil de laser semiconductor com meio ativo de InGaAlP, operando com onda contínua. Os parâmetros utilizados foram pré-determinados em estudos anteriores (PAZOS, 2001; FERREIRA et al., 2004; TAMIETTI, 2006) e estão no quadro abaixo:

Tabela 2: Parâmetros de irradiação utilizados na Microscopia de Fluorescência.

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda (λ)	685 nm
Densidade de energia (DE)	4,5 J/cm ²
Potência	35 mW
Área	2,0 cm ²
Tempo	4 minutos e 18 segundos
Distância da fibra a placa	5 cm
Diâmetro do feixe	1,5 cm

Após irradiação, as células receberam novamente o meio de cultura MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e foram incubadas por 1, 12 e 24 horas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Após a realização dos procedimentos previamente descritos, as células foram fixadas por 10 minutos com Paraformaldeído a 4% (diluído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2), lavadas com PBS e então marcadas por 10 minutos com DAPI a uma concentração de 300nM (diluído em PBS). Após a marcação, as lamínulas contendo as células foram lavadas com Tampão PHEM e montadas sobre lâminas contendo n-propil galato. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

4. RESULTADOS

4.1 Espectro de absorção da ZnPcBr_8

O espectro de absorção da ZnPcBr_8 demonstra que a absorção máxima desta ftalocianina está localizada na faixa de 676nm do espectro, como demonstra o gráfico a seguir:

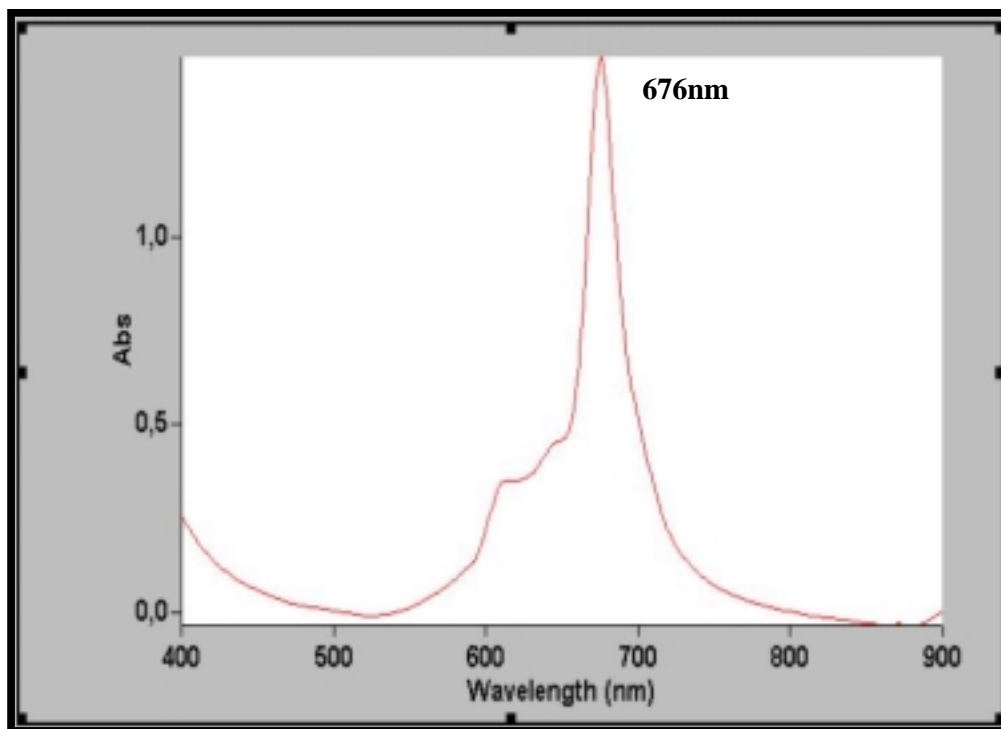


Gráfico 1: Espectro de absorção da ZnPcBr_8 na concentração de $10\mu\text{M}$ em DMSO. Observa-se que o pico máximo de absorção localiza-se na faixa de 676nm do espectro.

4.2 Atividade mitocondrial de células L929 incubadas com ZnPcBr₈ em diferentes concentrações

O teste de MTT foi utilizado para analisar a atividade mitocondrial de células L929 incubadas com o agente fotossensibilizante ZnPcBr₈ nas concentrações 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 e 10µM por um período de 1 hora em cultura de células L929.

Os resultados obtidos no gráfico 2 demonstram que nas concentrações 0.25 a 1µM, as células permaneceram com uma alta porcentagem da atividade mitocondrial, ficando em torno de 94% para 0.25µM, 87% para 0.5µM e 82% para 1µM, sendo essas concentrações consideradas não-tóxicas para as células. Porém, quando aumentou a concentração, ocorreu uma queda acentuada na porcentagem da atividade mitocondrial, ficando em torno de 8% para 2.5µM, 3% para 5µM e 1% para 10µM, sendo essas concentrações consideradas tóxicas para as células. O grupo controle foi considerado como 100%.

Pelos testes ANOVA e Friedman, as diferenças entre as concentrações foram estatisticamente significativas (n=3, p<0.05).

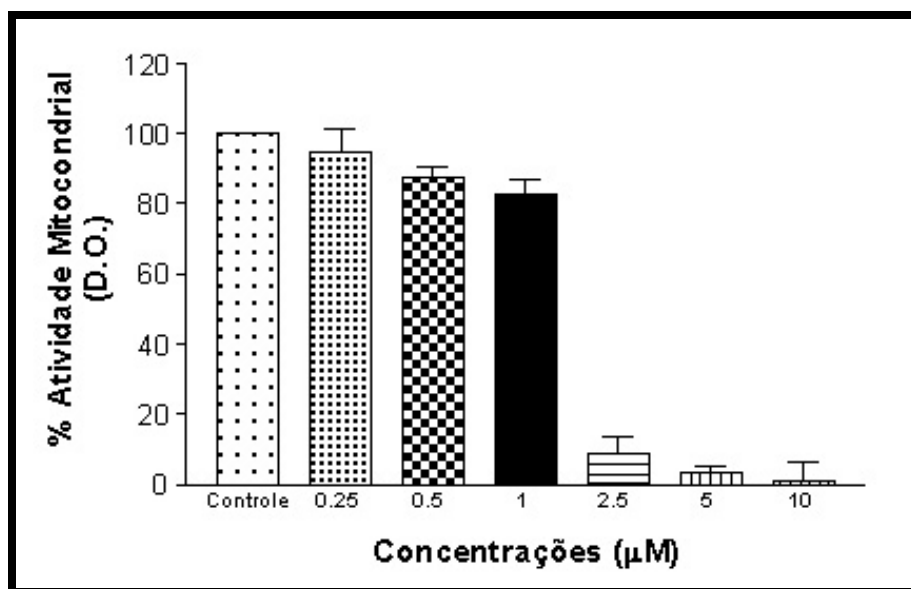


Gráfico 2: Atividade mitocondrial de células L929 após 1 hora de incubação com a ZnPcBr_8 em diferentes concentrações. Pelos testes ANOVA e Friedman, as diferenças entre as atividades mitocondriais de cada concentração foram estatisticamente significativas ($P < 0.05$). Média e erro padrão de 3 repetições.

4.3 Atividade mitocondrial de células L929 após TFD com a ZnPcBr_8

O teste de MTT foi utilizado para analisar a atividade mitocondrial de células L929 1, 12 e 24 horas após Terapia Fotodinâmica com a ZnPcBr_8 nas concentrações 0.25, 0.5 e $1\mu\text{M}$.

O grupo controle foi considerado como 100% em todos os tempos. No grupo laser ocorreu um aumento da atividade mitocondrial, ficando em torno de 114% após 1 hora da irradiação, 104% após 12 horas e 104% após 24 horas. No grupo de células que foram incubadas com a ZnPcBr_8 na concentração $0.25\mu\text{M}$ e irradiadas com laser ocorreu uma alta atividade mitocondrial após 1 hora da TFD, ficando em torno de 97%. Porém, após 12 e 24 horas da irradiação ocorreu um decaimento desta porcentagem, ficando em torno de 19% após 12 horas e 7% após 24 horas da TFD. No grupo de células que foram incubadas com a ZnPcBr_8 na concentração $0.5\mu\text{M}$ e irradiadas com laser ocorreu um decaimento da porcentagem de atividade mitocondrial desde 1 hora até 24 horas após irradiação, sendo que esta viabilidade ficou em torno de 69% após 1 hora, 5% após 12 horas e 5% 24 horas após TFD. No grupo de células que foram incubadas com a ZnPcBr_8 na concentração $1\mu\text{M}$ e irradiadas ocorreu um significativo decaimento da porcentagem de atividade mitocondrial em todos os tempos analisados (1, 12 e 24 horas), ficando em torno de 37% após 1 hora, 0.5% após 12 horas e 0% 24 horas após TFD, sendo esta, a concentração considerada a mais eficiente para o tratamento fotodinâmico.

Pelos testes ANOVA e Friedman, as diferenças entre os grupos foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

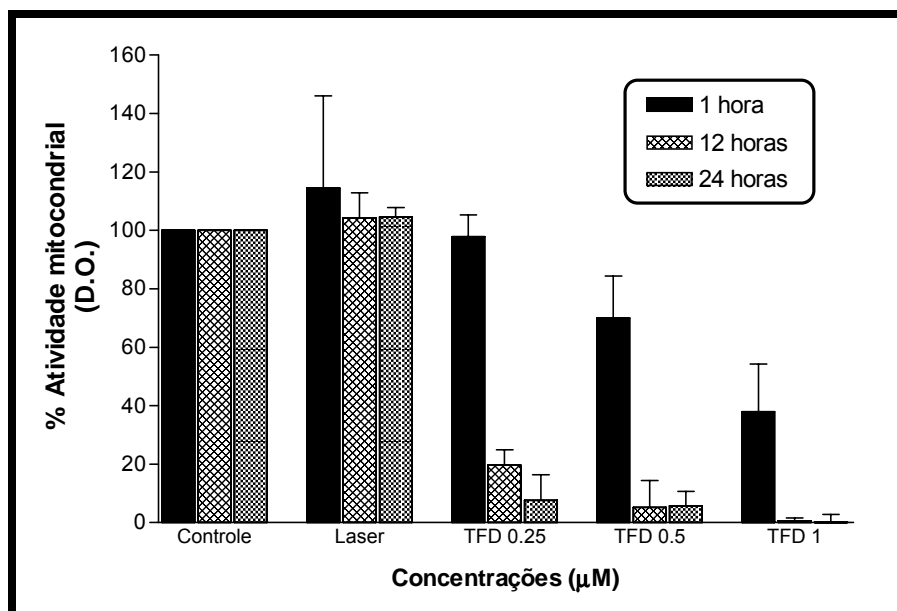


Gráfico 3: Atividade mitocondrial de células L929 1, 12 e 24 horas após Terapia Fotodinâmica com ZnPcBr₈. Pelos testes ANOVA e Friedman as diferenças entre as atividades mitocondriais de cada grupo foram estatisticamente significativas ($P < 0.05$). Média e erro padrão de 3 repetições.

4.4 Localização subcelular do corante através da Microscopia de Fluorescência

A Microscopia de Fluorescência foi realizada para avaliar a localização subcelular da ZnPcBr_8 em cultura de células L929 incubadas na concentração $1\mu\text{M}$ por 1 hora.

A fotomicrografia demonstra que a ZnPcBr_8 (seta) está localizada na região perinuclear quando as células foram incubadas na concentração $1\mu\text{M}$ (figura 2B).

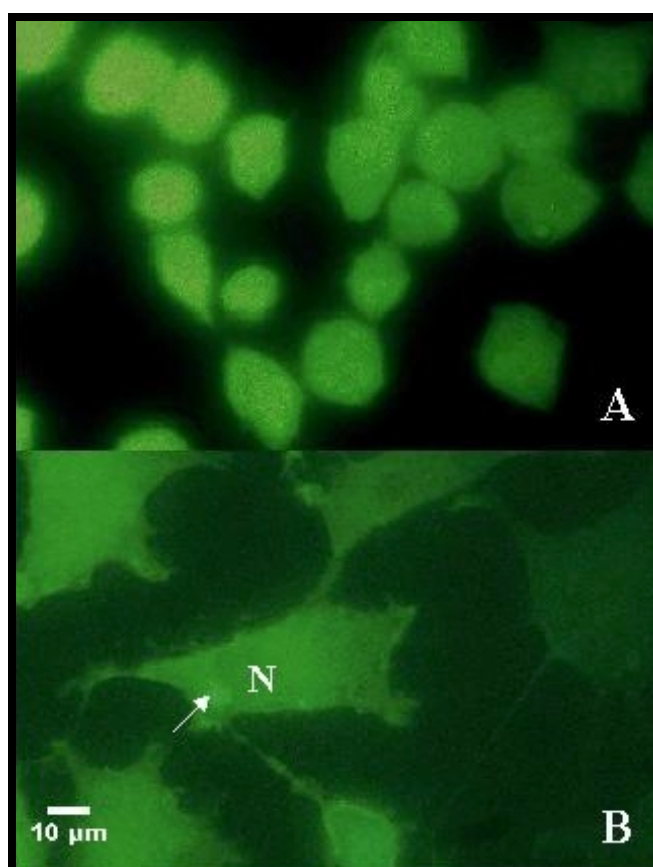


Figura 2: Localização subcelular da ZnPcBr_8 em cultura de células L929 após 1 hora de incubação. A) Controle; B) $1\mu\text{M}$. Pode-se notar a presença da ZnPcBr_8 (seta) através da fluorescência (figura B) localizada na região perinuclear. Núcleo (N).

4.5 Microscopia de Fluorescência utilizando marcador fluorescente específico para núcleo

A Microscopia de Fluorescência utilizando um marcador específico para núcleo (DAPI) foi realizada para avaliar as alterações nucleares 1, 12 e 24 horas após TFD com a ZnPcBr_8 na concentração $1\mu\text{M}$ em cultura de células L929.

Podemos observar através das micrografias que, no grupo controle (somente células), fotossensibilizante (células incubadas com a ZnPcBr_8) e laser (células irradiadas) de todos os tempos (1, 12 e 24 horas) as células não apresentaram alterações no formato nuclear (figuras 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C, 5A, 5B e 5C) observando-se núcleo preservado, cromatina e membrana nuclear intactas. Tais características também foram observadas no grupo de células marcadas com DAPI 1 e 12 horas após TFD (figuras 3D e 4D). No grupo de células marcadas com DAPI 24 horas após TFD (figura 5D) pode-se observar que o núcleo sofreu alterações, como uma discreta fragmentação nuclear.

Embora a marcação com DAPI seja especificamente para demarcar o núcleo, esta também nos possibilitou visualizar a disposição do citoplasma, onde foi observado que no grupo analisado após 1 hora da TFD (figura 3D) ocorreu retração do citoplasma, no grupo analisado após 12 e 24 horas da TFD (figura 4D e 5D) além da retração ocorreu a presença de vacúolos ao longo do citoplasma. Tais características não foram observadas nos demais grupos, onde a disposição e a integridade do citoplasma permaneceu normal.

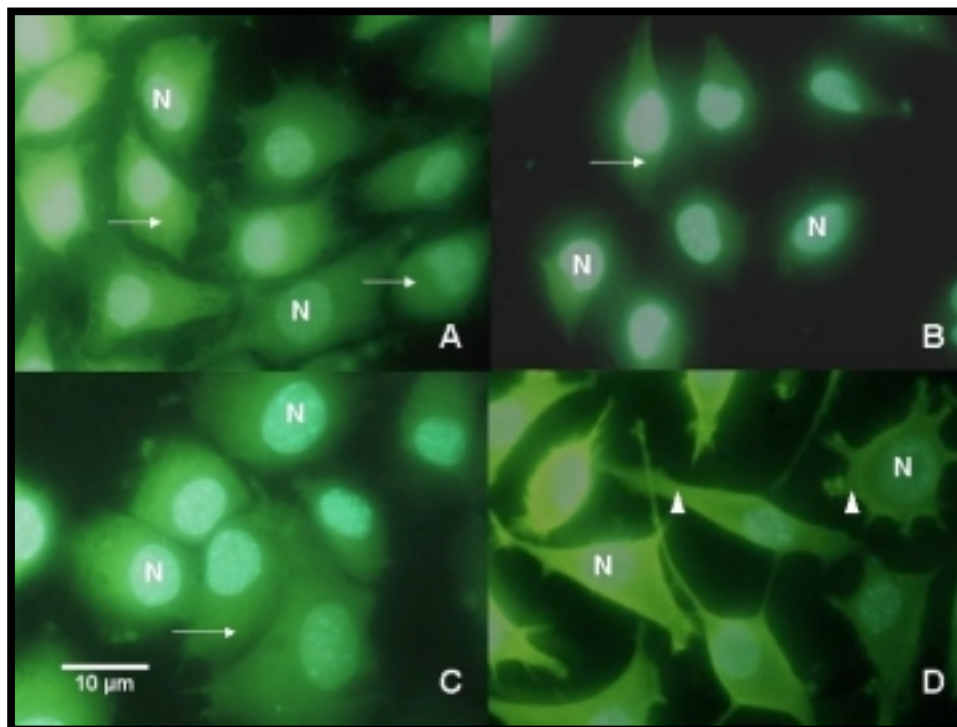


Figura 3: Células L929 incubadas com o marcador fluorescente DAPI após 1 hora do tratamento fotodinâmico com a ZnPcBr_8 . A) Grupo controle (células sem fotossensibilizante e sem irradiação); B) Grupo Fotossensibilizante (células incubadas por 1 hora com ZnPcBr_8); C) Grupo Laser (células irradiadas com laser); D) Grupo TFD (células incubadas por 1 hora com ZnPcBr_8 e irradiadas com laser). Através da marcação com DAPI pode-se notar que em todos os grupos (figuras A, B, C e D) a apresentaram morfologia nuclear normal e cromatina condensada (N). No grupo TFD (figura D) ocorreu claramente uma retração do citoplasma (cabeça de seta), o que não aconteceu nos demais grupos, onde a disposição do citoplasma permaneceu normal (seta).

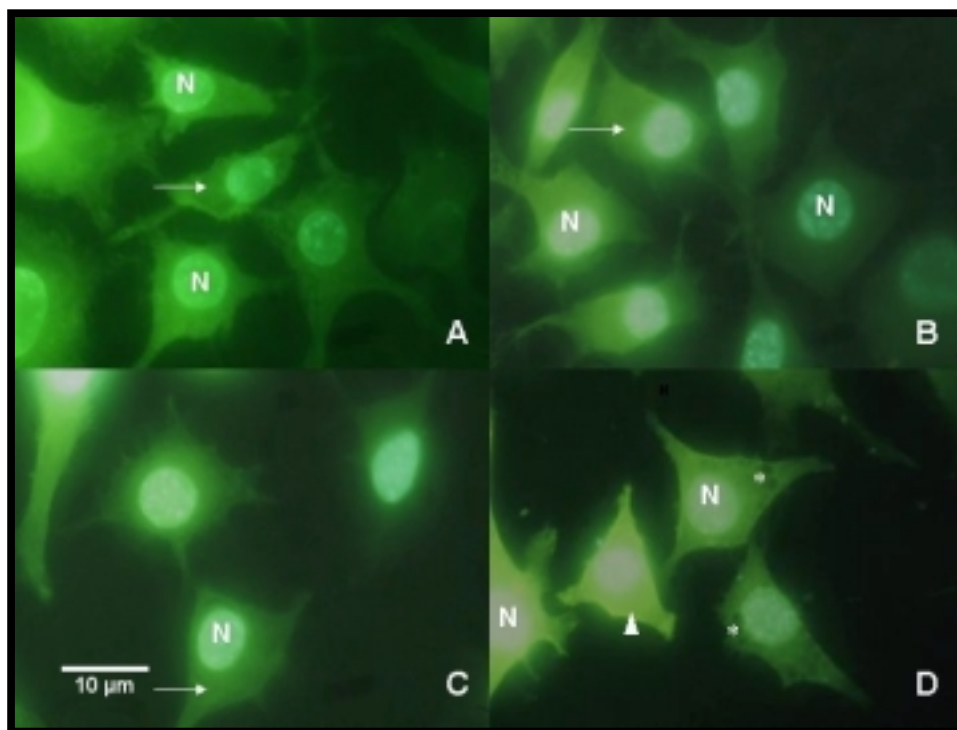


Figura 4: Células L929 incubadas com o marcador fluorescente DAPI após 12 horas do tratamento fotodinâmico com a ZnPcBr_8 . A) Grupo controle (células sem fotossensibilizante e sem irradiação); B) Grupo Fotossensibilizante (células incubadas por 1 hora com ZnPcBr_8); C) Grupo Laser (células irradiadas com laser); D) Grupo TFD (células incubadas por 1 hora com ZnPcBr_8 e irradiadas com laser). Através da marcação com DAPI pode-se notar que em todos os grupos (figuras A, B, C e D) a morfologia nuclear não foi alterada (N). No grupo TFD (figura D) ocorreu claramente à retração do citoplasma (cabeça de seta) e a presença de vacúolos (asterisco) ao longo do citoplasma, o que não aconteceu nos demais grupos, onde a disposição e a integridade do citoplasma permaneceu normal (seta).

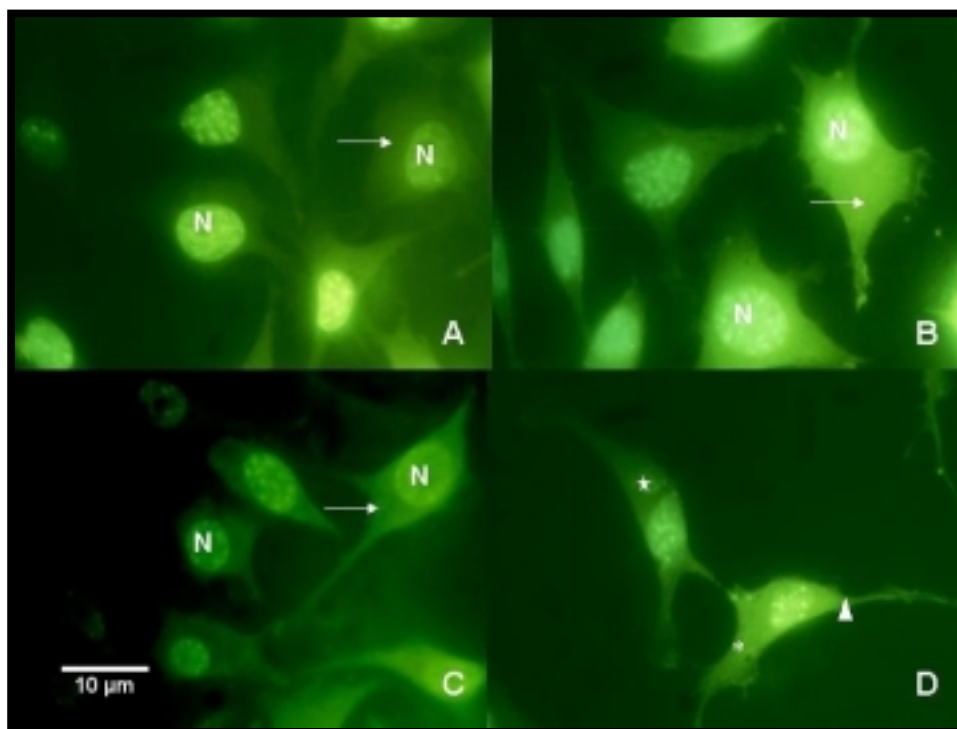


Figura 5: Células L929 incubadas com o marcador fluorescente DAPI após 24 horas do tratamento fotodinâmico com a ZnPcBr_8 . A) Grupo controle (células sem fotossensibilizante e sem irradiação); B) Grupo Fotossensibilizante (células incubadas por 1 hora com ZnPcBr_8); C) Grupo Laser (células irradiadas com laser); D) Grupo TFD (células incubadas por 1 hora com ZnPcBr_8 e irradiadas com laser). Através da marcação com DAPI pode-se notar que nos grupos controle, laser e ftalocianina (figuras A, B e C) a morfologia nuclear não foi alterada (N). No grupo TFD (figura D) pode-se observar uma discreta fragmentação nuclear (estrela), bem como uma notável retração citoplasmática (cabeça de seta) e vacuolização (asterisco) ao longo do citoplasma, o que não aconteceu nos demais grupos, onde a disposição e a integridade do citoplasma permaneceu normal (seta).

5. DISCUSSÃO

Uma das mais recentes e promissoras aplicações das ftalocianinas na medicina está na detecção e cura de tumores (YSLAS; RIVAROLA; DURANTINI, 2005). Para tais aplicações, diversos novos agentes fotossensibilizantes de segunda geração estão sendo criados, conforme descrito por diversos pesquisadores (MACDONALD et al., 2001; ALMEIDA et al., 2004).

Devido a este fato, foi estudado neste trabalho a Zinco Ftalocianina Octabromada (ZnPcBr_8), recentemente desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas células do tecido conjuntivo de camundongo (Clone L929) (ATCC CCL-1 NCTC) devido ao fato desta linhagem celular ser recomendada pela ISO 10993-5, a qual se refere aos Testes para citotoxicidade *in vitro*.

O espectro de absorção da ZnPcBr_8 demonstra que o pico máximo de absorção desta ftalocianina está localizado na faixa de 676nm do espectro. Este comprimento de onda está de acordo com as demais ftalocianinas, que possuem seu coeficiente de absorção na região vermelha do espectro, possuindo excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência fotossensibilizante, como descrito anteriormente por Ferreira et al., (2004). Tais características foram previamente descritas em outras ftalocianinas com comprimentos de onda aproximados a ftalocianina em estudo, como é o caso da Zinco (II) Ftalocianina Lipossomal (ZnPc) (FERREIRA et al., 2004; YSLAS; RIVAROLA; DURANTINI,

2005), da Disulfonada Zinco (II) Ftalocianina (ZnPcS_2), Trissulfonada Zinco (II) Ftalocianina (ZnPcS_3) (CAUCHON et al., 2005), Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS_4) (PAZOS et al., 2003), entre outras.

O teste de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) é um dos métodos mais utilizados para medidas de proliferação celular e citotoxicidade (LIU et al., 1997; ABE; MATSUKI, 2000). Este vem sendo modificado por diversos pesquisadores desde que foi desenvolvido pela primeira vez por Mosmann (1983) (apud HAMID et al., 2004).

Em células vivas, o sal tetrazolium MTT é reduzido a um formazan (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan), o qual pode ser analisado colorimetricamente. A redução do MTT é geralmente atribuída a atividade mitocondrial, mas isto tem sido também relatado para enzimas não-mitocondriais, bem como endossomos e lisossomos (VELLONEN; HONKAKOSKI; URTTI, 2004).

As células L929 foram incubadas com a ZnPcBr_8 por 1 hora em diferentes concentrações, este período de incubação está de acordo com outros trabalhos previamente desenvolvidos, como os estudos de Pazos et al., (2003) que utilizou o mesmo tempo de incubação (1 hora) para a AlPc e AlPcS_4 , e Ferreira et al., (2004) que utilizou somente a AlPcS_4 (PAZOS et al., 2003; FERREIRA et al., 2004).

De acordo com os resultados do teste de citotoxicidade através da técnica MTT, realizado em cultura de células L929 incubadas com a ZnPcBr_8 sem irradiação, pode-se observar que uma concentração tolerável para um possível tratamento fotodinâmico varia de 0,25 a $1\mu\text{M}$. Nestas concentrações a ZnPcBr_8 é considerada não-tóxica para as células L929, possuindo uma porcentagem de atividade mitocondrial de 94 a 82%, respectivamente.

A partir destes resultados, foi realizado um novo teste de MTT, utilizando-se as concentrações consideradas não-tóxicas para as células L929, porém desta vez, as células L929 incubadas com ZnPcBr_8 sofreram tratamento fotodinâmico.

No grupo de células somente irradiadas ocorreu um aumento da taxa de atividade mitocondrial em relação ao grupo controle de 14% após 1 hora e 4% após 12 e 24 horas da irradiação. Este efeito bioestimulatório positivo foi observado anteriormente por Werneck et al., (2005) em cultura de células Hep-2 (Carcinoma de laringe humana) e por Castro et al., (2005) em cultura de células KB (Carcinoma de nasofaringe maligno humana), ambas irradiadas com um laser de baixa potência (685nm) (CASTRO et al., 2004; WERNECK et al., 2005).

Após tratamento fotodinâmico das células incubadas com a ZnPcBr_8 nas concentrações 0.25, 0.5 e $1\mu\text{M}$ (consideradas não-tóxicas antes do tratamento) ocorreu uma queda significativa na taxa da atividade mitocondrial. A concentração cujo efeito fotodinâmico foi mais satisfatório para o processo de Terapia Fotodinâmica foi de $1\mu\text{M}$, reduzindo aproximadamente em 63% a atividade mitocondrial das células L929 após 1 hora da TFD, 99.5% após 12 horas e 100% após 24 horas em relação ao grupo controle. Esta mesma concentração ($1\mu\text{M}$) foi utilizada anteriormente por Fabris et al. (2001) com o intuito de analisar o tipo de morte celular causada pela fotossensitização com a ZnPc (FABRIS et al., 2001).

A diminuição da atividade mitocondrial causada pela TFD com ZnPcBr_8 na concentração $1\mu\text{M}$ é mediada pela reação tipo II, conforme ocorre com a maioria dos fotossensibilizantes utilizados na TFD, esta reação envolve a produção de oxigênio singleto. Esta espécie reativa é muito eficiente na produção de formas oxidadas de biomoléculas, iniciando assim a maioria dos tipos de danos da TFD (RIBEIRO et al., 2005).

A localização subcelular do fotossensibilizante contribui para a eficácia da Terapia Fotodinâmica (HAYWOOD-SMALL et al., 2006). As propriedades fluorescentes dos agentes fotossensibilizantes podem ser utilizadas para avaliar sua localização intracelular e os efeitos do tratamento (BERG et al., 2005). Partindo-se desses princípios, foi realizada então a técnica de Microscopia de Fluorescência para avaliar a localização e os fotodanos da ZnPcBr_8 em cultura de células L929.

De acordo com as fotomicrografias pode-se observar que a ZnPcBr_8 , uma ftalocianina hidrofílica, localiza-se na região perinuclear quando analisadas após 1 hora de incubação. Tal localização foi anteriormente observada por Machado et al., (2005) em cultura de células CHO-K1 (Ovário de Hamster chinês). Ambos os resultados estão de acordo com os estudos de Pazos et al., (2003) o qual relatou que a AlPcS_4 um fotossensibilizante solúvel em água, como a ZnPcBr_8 , é endocitada pela célula e, portanto localiza-se em endossomos e lisossomos (PAZOS et al., 2003; MACHADO et al., 2005).

Após a análise da concentração viável da ZnPcBr_8 para utilização em TFD e de sua localização subcelular, realizou-se novamente a Microscopia de Fluorescência. Desta vez, utilizando o marcador fluorescente específico para núcleo a fim de se observar os fotodanos ocasionados pelo agente fotossensibilizante ZnPcBr_8 na concentração $1\mu\text{M}$ após 1, 12 e 24 horas da TFD.

O DAPI (4', 6' - diamidino, 2' phenylindole) é um marcador amplamente utilizado para técnicas fluorescentes corando núcleos especificamente, com pouca ou nula marcação de citoplasma (Molecular Probes®). De acordo com as fotomicrografias pode-se observar que os grupos controle, fotossensibilizante e laser de todos os tempos não sofreram alterações nucleares significativas, já no grupo

TFD notou-se significante alterações, bem como retração e vacuolização citoplasmática e uma discreta fragmentação nuclear.

De acordo com a literatura, as características morfológicas encontradas após a realização da Microscopia de Fluorescência com DAPI (perda de adesão, protusões da membrana plasmática, encolhimento celular, condensação da cromatina, divisão do DNA internucleossomal, fragmentação celular, formação de corpos apoptóticos) são características de células que sofreram morte celular por apoptose (BOZANIC; TAFRA; SARAGA-BABIC, 2003; RIBEIRO; SILVA; JORGE, 2004; BLAISE et al., 2005).

Nas últimas décadas, os pesquisadores acreditavam que o núcleo era a única organela responsável pelo controle da apoptose (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). Kessel e Luo (1998) demonstraram que a liberação de componentes mitocondriais também poderia provocar uma resposta apoptótica (KESSEL; LUO, 1998).

Quando o caminho apoptótico é caracterizado pela mediação da mitocôndria, ou seja, provocada pela interrupção da função mitocondrial, ocorre à 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 o iniciador da caspase-9 (ALMEIDA et al., 2004). A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras subsequentes (-2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10) (ANAZETTI, 2003). As caspases efetoras, por sua vez, clivam as proteínas (após um resíduo de aspartato em um tetrapeptídeo específico) cuja ativação/desativação resultará na execução da apoptose (BARBIERI, 2004).

As características morfológicas da apoptose resultam da ativação das caspases (cisteína proteases) tanto por ligação do receptor de morte quanto por

liberação dos mediadores de apoptose da mitocôndria (EDINGER; THOMPSON, 2004).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a morte celular ocasionada pela TFD utilizando a Zinco Ftalocianina Octa-bromada em cultura de células L929 possui características indicativas de apoptose, devido a diminuição da atividade mitocondrial, a localização subcelular e os fotodanos encontrados.

A morte celular por apoptose foi observada anteriormente por Chiu et al., (2001) no tratamento fotodinâmico de células de rato L5178Y-R com a Silicone ftalocianina tetrasulfonada (SiPcS₄) (CHIU et al., 2001 apud DONGEN; VISSER; VROUENRAETS, 2004) e com células HCT116 (CHIU et al., 2005).

Novos estudos deverão ser realizados para confirmar o tipo de morte celular e os mecanismos envolvidos.

6. CONCLUSÃO

Após realizar a terapia fotodinâmica com o novo agente fotossensibilizante ZnPcBr₈ em cultura de células L929, a análise dos resultados nos leva às seguintes conclusões:

- Após tratamento fotodinâmico das células incubadas com a ZnPcBr₈ nas concentrações 0.25, 0.5 e 1μM (consideradas não-tóxicas antes do tratamento) ocorreu uma queda significativa na taxa da atividade mitocondrial.
- A concentração ideal do agente fotossensibilizante Zinco Ftalocianina Octa-bromada para a TFD em cultura de células L929 é de 1μM.
- A ZnPcBr₈ concentra-se na região perinuclear de células L929 quando analisadas após 1 hora de incubação.
- Após 24 horas da TFD com a ZnPcBr₈ na concentração 1μM o núcleo sofreu alterações significativas em sua morfologia, quando analisado através da Microscopia de Fluorescência.

REFERÊNCIAS

ABE, K.; MATSUKI, N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neuroscience Research**. v.38, p.325-329, 2000.

ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v.74, n.5, p.656-669, 2001.

AIMBIRE, F. et al. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers in Medical Science**. v.20, p.11-20, 2005.

ALBERTINI, R. et al. Effects of different protocol doses of low power gallium - aluminum - arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.74, p. 101-107, 2004.

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 Radical Biology & Medicine**. v.39, p.1119-1127, 2005.

ALI, S.M.; OLIVO, M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. **International Journal of Oncology**. v. 21, p. 531-540, 2002.

ALLEN, C.M. et al. Photodynamic Properties of Amphiphilic Derivatives of Aluminum Tetrasulfophthalocyanine. **Photochemistry and Photobiology**. v.76, n.2, p.208-216, 2002.

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

ALLISON, R.R. et al. PD/PDT for gynecological disease: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.2, p.51-63, 2005.

ALMEIDA, R.D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1704, p.59-86, 2004.

ANAZETTI, M.C. **Avaliação de citotoxicidade e indução de diferenciação e apoptose em células de leucemia (HL60) pela dimetilamida-crotonia** 2003. 119f. Dissertação (Mestrado Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, 2003.

ARONOFF, B.L. Lasers: Reflections on Their Evolution. **Journal of Surgical Oncology**. v.64, p.84-92, 1997.

BABILAS, P. et al. Photodynamic therapy in dermatology – an update. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**. v.21, p.142-149, 2005.

BAKALOVA, R. et al. Quantum dots as photosensitizers. **Nature Biotechnology**. v.22, n.11, p.1360-1361, 2004.

BARBIERI, G.N.F. **Ação citotóxica e transformante do antineoplásico tamoxifeno sobre células da linhagem Vero**. 2004. 101f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

BARGE, J. et al. Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. **Experimental Dermatology**. v.13, p.33-44, 2004.

BAYIR, Z.A. Synthesis and characterization of novel soluble octa-cationic Phthalocyanines. **Dyes and Pigments**. v.65, p.235-242, 2005.

BELLNIER, D.A. et al. Mild skin photosensitivity in cancer patients following injection of Photochlor (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a;HPPH) for photodynamic therapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v.57, p.40-45, 2006.

BERG, K. et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. **Journal of Microscopy**. v.218, p.133-147, 2005.

BLAISE, G.A. et al. Nitric oxide, cell signaling and cell death. **Toxicology**. v.208, p.177-192, 2005.

BOURRÉ, L. et al. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. **Apoptosis**. v.7, p.221-230, 2002.

BOZANIC, D.; TAFRA, R.; SARAGA-BABIC, M. Role of apoptosis and mitosis during human eye development. **European Journal of Cell Biology**. v.82, p.421-429, 2003.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. **Lasers in Medical Science**. v.17, p.173-186, 2002.

BRONDON, P.; STADLER, I.; LANZAFAME, R.J. A Study of the Effects of Phototherapy Dose Interval on Photobiomodulation of Cell Cultures. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.36, p.409-413, 2005.

BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**. v.5, p.497-508, 2004.

BURSCH, W. et al. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. **Journal of Cell Science**. v.113, p.1189-1198, 2000.

BUSANELLO, R.Z. **Avaliação dos efeitos do fracionamento de dose de energia em Terapia Fotodinâmica utilizando Poli-hematoporfirina de Sódio em língua normal de rato.** 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

CANDAL, E. et al. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of brown trout. **Developmental Brain Research.** v.154, p.101-119, 2005.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. REVIEW: Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.** 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. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.** v.2, p.1-23, 2005.

CASTRO, J.L.F. et al. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery.** v.23, n.6, p.586-589, 2005.

CAUCHON, N. et al. Structure - Photodynamic Activity Relationships of Substituted Zinc Trisulfophthalocyanines. **Bioconjugate Chemistry.** v.16, p.80-89, 2005.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; LIN, J.K. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. **Cancer Letters.** p.1-14, 2006.

CHIU, S.M. et al. Phthalocyanine 4 photodynamic therapy-induced apoptosis of mouse L5178Y-R cells results from a delayed but extensive release of cytochrome c from mitochondria. **Cancer Letters.** v.165, p.51-58, 2001.

CHIU, S.M. et al. Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: Apoptosis with or without Bax expression. **Apoptosis.** v.10, n.6, p.1357-1368, 2005.

COMUZZI, C. et al. Synthesis and Biological Evaluation of New Pentaphyrin Macrocycles for Photodynamic Therapy. **Journal of Medical Chemistry.** v.49, p.196-204, 2006.

CÓRDOBA, F. et al. 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy in a transgenic mouse model of skin melanoma. **Experimental Dermatology.** v.14, p.429-437, 2005.

DEMIDOVA, T.N. et al. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.** v.81, p.15-25, 2005.

DETTY, M.R.; GIBSON, S.L.; WAGNER, S.J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.47, n.16, p.3897-3915, 2004.

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

DOUGHERTY, T.J. Review: Photodynamic Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. v.90, p.889-905, 1998.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**. v.16, p.663-669, 2004.

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

FERREIRA, S.D.R.M. et al. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with ALPcS4. **Lasers in Medical Science**. v.18, p.207-212, 2004.

FICKWEILER, S. et al. Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.48, p.27-35, 1999.

GENOVESE, W.J. Características físicas da radiação a laser. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000. p.23-32.

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

GREBENOVA, D. et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.69, p.71-85, 2003.

GUIMARÃES, C. A., LINDEN, R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry**. v.271, p.1638-1650, 2004.

GULSOY, M. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.82, p.199-202, 2006.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assaysfor high through-put screening. **Toxicology in Vitro**. v.18, p.703-710, 2004.

HARADA, M. et al. The vascular response to photodynamic therapy with ATX-S10Na (II) in the normal rat colon. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.79, p.223-230, 2005.

HAUNSTETTER, A.; IZUMO, S. Apoptosis: Basic Mechanisms and Implications for Cardiovascular Disease. **Circ. Research**. v.82, p.1111-1129, 1998.

HAYWOOD-SMALL, S.L. et al. Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G₀/G₁ cell cycle arrest in cervical cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.339, p.569-576, 2006.

HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY T.J. **Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications**. New York: Marcel Decker, 1992. p.1-15.

HERASCU, N. et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) Efficacy in Post-operative Wounds. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.23, n.1, p.70-73, 2005.

HECHT, Y. J. **The Laser Guidebook**. 2 ed. New York: McGraw-Hill, 1992. cap.24, p.297-303.

ICHIKAWA, K. et al. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1669, p.69-74, 2005.

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

KARMAKOVA, T. et al. Tissue distribution and in vivo photosensitizing activity of 13,15-[N -(3-hydroxypropyl)]cycloimide chlorin p6 and 13,15-(N -methoxy)cycloimide chlorin p6 methyl ester. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.82, p.28-36, 2006.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.27, p.219-223, 1995.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.49, p.1-17, 1999.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Brazilian Journal of Cancer**. v.26, p.239-257, 1972.

KESSEL, D.; LUO, Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.42, p. 89-95, 1998.

KLIONSKY, D. J., EMR, S. D. Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. **Science**. v.290, p.1717-1721, 2000.

KOLÁROVÁ, H.; DITRICHOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.24, p.231-235, 1999.

KOLÁROVÁ, H. et al. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicology in Vitro**. v.17, p.775-778, 2003.

KOLAROVA, H. et al. Photodynamic therapy with zinc-tetra (*p*-sulfophenyl) porphyrin bound to cyclodextrin induces single strand breaks of cellular DNA in G361 melanoma cells. **Toxicology in Vitro**. v.19, p.971-974, 2005.

KREISLER, M. et al. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.30, p.365-369, 2002.

KUBLER, A.C. Photodynamic therapy. **Medical Laser Application**. v.20, p.37-45, 2005.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **Journal of the National Cancer Institute**. v.26, p.1-11, 1961.

LIU, Y. et al. Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**. v.69, p.581-593, 1997.

LIU, M.O. et al. Photodynamic applications of Phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.165, p.131-136, 2004.

LUO, Y.; KESSEL, D. Initiation of Apoptosis versus Necrosis by Photodynamic Therapy with Chloroaluminum Phthalocyanine. **Photochemistry and Photobiology**. v.66, n.4, p.479-483, 1997.

MACDONALD, I.J; DOUGHERTY, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. v.5, p.105-129, 2001.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**. v.23, n.2, p.237-243, 2000.

MACHADO, A.H.A. et al. Subcelular Localization of Octal-bromide Zinc Phthalocyanine in CHO-K1 Cells Culture. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**. Supplement, p.45, 2005.

MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**. v.187, p.493-494, 1960.

MARTINES, N.S. **Avaliação do processo de morte celular após terapia fotodinâmica**. 2003. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Review: Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.79, p.159-170, 2005.

Molecular probes. Disponível em: <http://probes.invitrogen.com>. Acesso em: 15 abr. 2006.

MORIYAMA, E.H. et al. Resposta in vitro de Células Gliossarcoma 9L após Terapia Fotodinâmica utilizando Imagem de Bioluminescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.51, n.1, p.15-22, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, p.55-63, 1983.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.37, p.273-284, 2004

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

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquive of Gastroenterology**. v.38, n.2, p.138-144, 2001.

PAZOS, M.C. **Análise ultraestrutural de células submetidas a tratamentos com fotossensibilizadores e radiação laser**. 2001. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2001.

PAZOS, M.C. et al. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell**. v.27, n.3, p.301-309, 2003.

PEREIRA, A.N. et al. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.31, p.263-267, 2002.

PROSKURYAKOV, S.Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**. v.238, p.1-16, 2003.

RAAB, O. Ueber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. **Zeitschrift fur Biologie**. v.39, p.524-546, 1900.

RIBEIRO, J.N.; SILVA, A.R.; JORGE, R.A. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**. v.40, n.6, p.383-390, 2004.

RIBEIRO, J.N. et al. Evaluation of photodynamic activity of octaethylporphyrin and vanadyl octaethylporphyrin. **Applied Cancer Research**. v.25, n.3, p.142-150, 2005.

SCHASTAK, S. et al. Improved pharmacokinetics, biodistribution and necrosis in vivo using a new near infra-red photosensitizer: tetrahydroporphyrin tetratosylat. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.78, p.203-213, 2005.

SCHAWLOW, A.L.; TOWNES, C.H. Infrared and optical lasers. **Physical Review**. p.112, 1958.

SCHAWLOW, A.L. Principle of Laser. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v.13, n.3, p.127-130, 1995.

SIBATA, C.H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.33, p.869-880, 2000.

SILVA, J.C.E. et al. Evaluation of the Use of Low Level Laser and Photosensitizer Drugs in Healing. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.34, p.451-457, 2004.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI ; F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**. v.25, n.5, p.801-807, 2002.

TAMINETTI, B.F.P. **Análise da Atividade Mitocondrial Associada à Morte Celular**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

TOMÉ, F.M. **Síntese e análise espectrofotométrica de naftalocianinas com aplicação na Terapia Fotodinâmica**. 2002. 88f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2002.

USUDA, J. et al. Domain-dependent Photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine Photosensitization. **The Journal of Biological Chemistry**. v.278, n.3, p.2021-2029, 2003.

USUDA, J. et al. State of the art: Concise Review – Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers. **Journal of Thoracic Oncology**. v.1, n.5, p.489-493, 2006.

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. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.23, p.181-188, 2004.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry**. v.69, n.1, p.81-90, 2004.

VOGL, T.J. et al. Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology. **European Radiology**. v.14, p.1063-1073, 2004.

YSLAS, E.I.; RIVAROLA, V.; DURANTINI, E.N. Synthesis and photodynamic activity of zinc (II) Phthalocyanine derivatives bearing methoxy and tri fluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.13, p.39-46, 2005.

YU, W.; NAIM, J.O.; LANZAFAME, R.J. Effects of Photostimulation on Wound Healing in Diabetic Mice. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.20, p.56-63, 1997.

YU, S.P.; CHOI, D.W. Ions, cell volume, and apoptosis. **PNAS**. v.97, n.17, p.9360-9362, 2000.

WERNECK, C.E. et al. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: A spectroscopic in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.23, n.3, p.300-303, 2005.

WISING, C. et al. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin. **Toxicon**. v.45, p.767-776, 2005.

ZHU, T.C.; FINLAY, J.C.; HAHN, S.M. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.79, p.231-241, 2005.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **News Physiology Science**. v.19, p.124-128, 2004.

ANEXOS

Meio de Cultura (Gibco-BRL)

Meio Mínimo Essencial - MEM. Na composição básica deste meio de cultura são encontrados todos os aminoácidos fundamentais, D-glicose, indicador vermelho de fenol, vitaminas e sais inorgânicos.

O meio MEM (Gibco BRL) foi dissolvido em 1L de água destilada. Sob agitação, foi adicionado 2.2g de bicarbonato de sódio (pH 7.2), sendo então filtrado e conservado a 4°C na geladeira.

Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco BRL)

O soro fetal bovino é utilizado na complementação de meios de cultura. Em sua composição básica encontra-se insulina, hormônios e fatores de crescimento. A solução estoque adquirida da Gibco BRL é pré-aquecida a 56°C e em seguida estocada em frascos num volume de 10mL cada. A conservação é feita em freezer a -20°C.

Tampão Fosfato 0,1M

Para o preparo da solução “A” foi adicionado 2,76g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific) em 100mL de água destilada e deixado sob agitação até que formasse uma mistura homogênea, o mesmo ocorreu com a solução “B”, onde foi adicionado 5,36g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific) em 100mL de água destilada.

A solução tampão é a mistura entre as duas soluções “A” e “B” (33mL de solução A + 67mL de solução B) (pH 7,1).

Salina Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

Para o preparo de 1L desta solução foi misturado 100mL de tampão fosfato 0,1M em 900mL de água destilada. Sob agitação adicionou-se 9g de NaCl (Merck).

Tampão PHEM

Para o preparo desta solução 20,72g de Pipes (Sigma), 6,50g de Hepes (Sigma), 3,8g de EDTA (Analyticals) e 0,54g de $MgCl_2$ (Analyticals) foram dissolvidos em 1000mL de água destilada (pH6,8).

Tripsina

Para o preparo desta solução foram dissolvidos 0,1g de Tripsina (Gibco BRL) e 0,05g de EDTA (Analyticals) em 100mL de PBS.

MTT (Sigma)

Para o preparo do MTT (*3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]*) 5mg da solução em pó foi diluída em 1mL de PBS para obter uma solução estoque $5mg/mL^{-1}$. O MTT foi mantido no escuro a $-20^{\circ}C$.

Paraformaldeído – PA 10%

Para o preparo da solução tamponada de Paraformaldeído (10%) foram aquecidos 80mL de Tampão Fosfato (0,2M – pH 7.1) até $65^{\circ}C$, no início do aquecimento foi adicionado 10g de Paraformaldeído (Sigma), agitando-se continuamente, adicionou-se gotas de Hidróxido de Sódio 2M e continuou agitando até a solução clarear. Após a solução esfriar, adicionou-se mais Tampão Fosfato 0,2M até completar 100mL.

DAPI (Molecular Probe)

O marcador fluorescente DAPI (4', 6' - diamidino, 2' phenylindole - Molecular Probes) foi diluído em DMSO estéril a uma concentração estoque de 3mM. A solução foi devidamente armazenada a -20°C ao abrigo de luz.

N-propil-galato

O n-propil-galato foi preparado a uma concentração de 0,02M. Foram dissolvidos 4,24g de n-propil-galto (Sigma) em 10mL de PBS aquecido a 37°C . Após a dissolução foram adicionados 90mL de glicerina (Sigma).

ACEITE DO ARTIGO

Data: Wed, 13 Dec 2006 17:32:59 -0200 ☐

De: [Newton Soares da Silva <nsoares@univap.br>](mailto:nsoares@univap.br) ☐ ☐

Para: Aline Helena Araujo Machado <alineh@univap.br>

Assunto: Artigo e e-mail

[Cabeçalho Completo](#)

[Todos os Anexos](#)

Dear Dr. Silva,

Thank you for your inquiry. Your manuscript number 2035 will be published in our April 2007 issue of Photomedicine and Laser Surgery.

Thank you for considering Photomedicine and Laser Surgery.

Sincerely,
Anne Hendren Coulter

-----Original Message-----

From: Newton Soares da Silva [mailto:nsoares@univap.br]

Sent: Tuesday, November 28, 2006 5:05 AM

To: Anne Hendren Coulter

Cc: Aldo Brugnera Junior

Subject: Article 2035

Dear Dr. Anne Hendren Coulter

We request of information on the evaluation of the sent article number 2035 ("Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent").

Sincerely,

Newton Soares da Silva, PhD

[Termo de uso](#) • [Anti-spam](#)

© 2006 Webmail Univap.

Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent

ALINE HELENA ARAUJO MACHADO,¹ FERNANDA MARIA PRADO BRAGA,²
CRISTINA PACHECO SOARES, Ph.D.,² MARCELO MIGUEL MARTINS
PELISSON, Ph.D.,³ MILTON BELTRAME JUNIOR, Ph.D.,³ and NEWTON
SOARES DA SILVA, Ph.D.¹

¹Cell and Tissue Biology Laboratory. Institute for Research and Development,
Univap, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

²Dynamic of Intracellular Compartments Laboratory. Institute for Research and
Development, Univap, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

³Organic Synthesis Laboratory. Institute for Research and Development, Univap, São
José dos Campos, São Paulo, Brazil.

Address reprint requests to:

Newton Soares da Silva

Institute for Research and Development - Univap

Av.Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova

São José dos Campos

São Paulo, 12244-000, Brazil

E-mail: nsoares@univap.br

Running Title: PDT with ZnPcBr₈

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the cytotoxicity of ZnPcBr₈ before and after irradiation with a low power laser (AsGaAl) and analyze the effects of PDT on the nucleus of L929 cells. *Background Data:* One of the most recent and promising applications of phthalocyanine in Medicine is in the detection and cure of tumors. We studied the ZnPcBr₈ in agreement with the development of new photosensitizing agents for curing tumors. *Methods:* L929 cells were cultivated at standard conditions, incubated with ZnPcBr₈ for 1 hour at different concentrations, irradiated with a semiconductor laser and incubated in MEM medium for 1, 12 or 24 hours. Cells were analyzed using the MTT technique and Fluorescence Microscopy. *Results:* The results demonstrated that ZnPcBr₈ at 1 μ M was the most effective concentration for PDT, with a decrease of 63% after 1 hour, 99% after 12 hours and 100% after 24 hours in relation to the control group. The fluorescence microscopy results showed that ZnPcBr₈ was localized in the perinuclear region when analyzed 1 hour after incubation. Nucleus staining with DAPI made it possible to observe that nuclear fragmentation occurred 24 hours after PDT, cytoplasm retraction 1, 12 and 24 hours after PDT and vacuoles along the cytoplasm 12 and 24 hours after PDT. *Conclusions:* According to the results obtained in this study, L929 cells death caused by PDT with ZnPcBr₈ possesses characteristics of apoptosis mediated by the mitochondria, due to the decrease in cells viability, the subcellular localization and the photodamages found.

KEYWORDS

Laser, photodynamic therapy, photosensitizer.

INTRODUCTION

The use of low level laser therapy has grown steadily in the past two decades.¹ It has been successfully used in several applications, such as Photodynamic therapy (PDT), which has proved to be a powerful therapeutic method for selective treatment of cancerous tumors and many other diseases.² The procedure requires exposure of cells or tissues to a photosensitizing drug followed by irradiation with visible light of appropriate wavelength, usually in the red or near-infrared region and compatible with the absorption spectrum of the drug.³⁻⁵ The photosensitizer accumulates in target cells,⁶ absorbing energy directly from a light source,⁷ in the appropriate wavelength (630-800nm).⁸ It is able to use that energy to induce reactions in other non-absorbing molecules,⁹ and generate an oxygen-mediated photodynamic reaction,¹⁰ which can induce oxidative damage to cellular structures,¹¹ that may result in cell death and tissue destruction.^{10,12}

This process happens in the following way: upon absorption of a photon, the photosensitizer undergoes one or more energy transitions and usually emerges in its excited triplet state. The triplet state can participate in a one-electron oxidation–reduction reaction (Type I photochemistry) with a neighboring molecule, producing free radical intermediates that can react with oxygen to produce peroxy radicals and various reactive oxygen species (ROS). Alternatively, the triplet-state photosensitizer can transfer energy to ground state oxygen (Type II photochemistry), generating singlet molecular oxygen, a highly reactive form of oxygen that reacts with many biological molecules, including lipids, proteins, and nucleic acids.⁵

The development of a new generation of photosensitizers to improve photodynamic therapy (PDT) is currently an area of extensive research.^{13,14}

The Phthalocyanines¹⁵ are among the most promising second-generation photosensitizers and thus have attracted much attention for many decades as they exhibit excellent photochemical properties¹⁶ as well as high excitation coefficient in the red region of the spectrum (630-750nm).^{15,17,18} Illumination of the affected region with a sufficient amount of light generates reactive oxygen intermediates and other radical species, resulting in tissue damage.¹⁹

PDT may cause cell death by necrosis or apoptosis,²⁰ both *in vitro* and *in vivo*.²¹

Apoptosis, also known as "programmed cell death", is a physiological process of cellular deletion that occurs during embryogenesis, metamorphosis, tissue atrophy and tumour regression. The morphological characteristics of apoptosis are: chromatin condensation, nuclear membrane blebbing and the formation of apoptotic bodies.²²

Necrosis, a violent and quick form of degeneration that affects extensive cell populations, is characterized by the swelling of the cytoplasm, destruction of organelles and disruption of the plasma membrane, thus leading to the release of intracellular contents and inflammation. It has been referred to as accidental cell death, caused by physical or chemical damage and has generally been considered an unprogrammed process.²³

The objective of the following study was to investigate the cytotoxicity of Octal-bromide Zinc Phthalocyanine before and after irradiation with a low power laser (AsGaAl) and analyze the effects of Photodynamic Therapy on the nucleus of L929 cells.

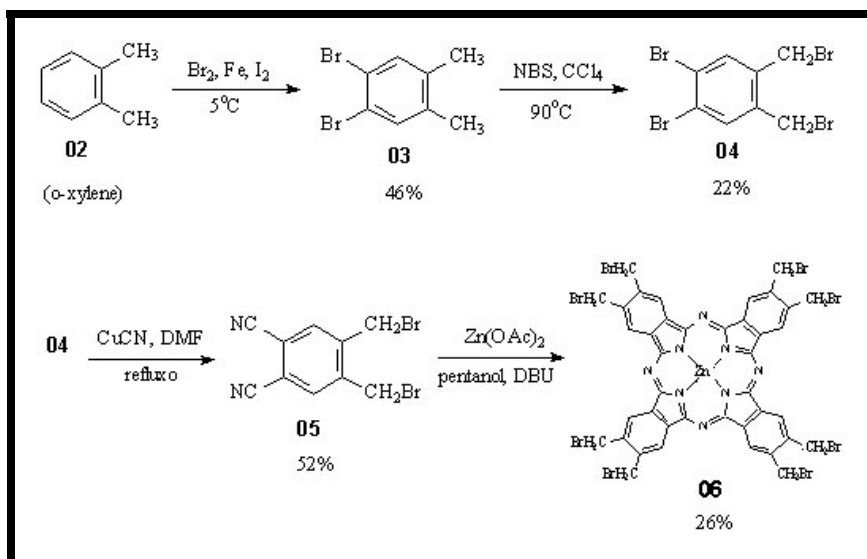
MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents and solvents were of synthesis grade (Aldrich – USA, or Acros – Belgium). Solvents for spectroscopic measurements were used as supplied. Tin layer chromatography was performed using Merck silica gel GF₂₅₄. Column chromatography was performed using silica gel, Merck, grade 60, with particle size of 70-230 mesh. Chromatograms were recorded on a gas chromatography Shimadzu – GC17A (Japan) with packaged columns and FID detector. Melting points were determined using a Kofler hot-stage melting point apparatus Büchi – B545 (Switzerland) and have not been corrected. UV-VIS spectra were recorded on a Varian – Cary 50 spectrophotometer (USA). H-RMN spectra were recorded on a Bruker DPX300 (Germany) using tetramethylsilane as internal standard.

Scheme 01 shows the synthetic pathways to prepare phthalocyanine 06. At first, the commercially available *o*-xylene (02) was bromide; when Br_2 was dropped onto the mixture of 02 with Fe and I_2 , at 5°C, it resulted in *4,5-dibromo-o-xylene* 03 (yield of 46%).²⁴ Next, compound 03 reacted with *N*-bromosuccinimide (NBS) in CCl_4 at 90 °C, resulting in *1,2-dibromo-4,5-bis(bromomethyl)benzene*, 04 (yield of 22%).²⁵ Low yield is normal in this kind of reaction because polibromide compounds can be obtained from the methyl groups. The final reaction was obtained with gas-chromatography analysis at the required time. The *1,2-dicyano-4,5-bis(bromomethyl)benzene*, 05, was prepared by refluxing 04 in the presence of dry *N,N*-dimethylformamide (DMF) and copper(I) cyanide (yield of 52%).²⁴ In a typical reaction, the last step was a cyclization.^{26,27} Dicyano compound 05 was refluxed with

zinc acetate, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) and pentanol, resulting in the desired phthalocyanine 06 (yield of 26%).



Scheme 01: Synthesis route of ZnPcBr₈

The stock solution of Octal-bromide Zinc Phthalocyanine (ZnPcBr₈) was diluted to a final concentration of 1mM in sterile DMSO (LabSynth Ltda, Diadema, Brazil), sterilized by filtration through a Millipore membrane filter (0.22µm - Millipore, Bedford, USA) and kept in the dark at 4°C until use.

Absorption Spectrum

The photosensitizing dye was diluted to 10µM from the stock solution, and the absorption spectrum was investigated using a Spectrophotometer UV-VIS (Cary 50 BIO, Varian, Australia) and quartz cuvettes type 111-QS 10mm (Hellma®, Sulamericana LTDA).

Cell culture

Clone L929 cells (Mouse conjunctive tissue - ATCC CCL-1 NCTC) (Laboratório de Cultura de Células - Instituto Adolfo Lutz - SP, Brazil) were routinely cultured in 25cm² flasks (TPP, Switzerland, Europe) with MEM medium (Gibco™ - Invitrogen Corporation, Grand Island, USA), supplemented with 10% FBS (Cultilab Ltda, Campinas, Brazil) and kept in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Fluorescence Microscopy - Localization

L929 cells (5x10⁵ cells/mL) were cultivated in 24-well plates (TPP, Switzerland, Europe), containing round sterile coverslips in MEM Medium supplemented with 10% SFB, and left overnight for adhesion at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% of CO₂. The following day, cells were incubated with ZnPcBr₈ diluted in DMSO at 1μM concentration and incubated at growth condition for 1 hour. After this, cells were carefully washed with phosphate buffered saline and fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany) in PHEM buffer. The coverslips were rinsed with PHEM in the dark and mounted on slides with n-propyl gallate (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany). Observations and photographs were made using a Leica photomicroscope (DMLB - Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), equipped with an HBO 100W mercury lamp and the corresponding filter sets for fluorescence microscopy: UV, blue and green.

Experiment Groups

For the MTT Technique, L929 cells were divided into 2 groups: photosensitizer (only cells incubated with ZnPcBr₈) and PDT (cells incubated with ZnPcBr₈ and irradiated).

For Fluorescence Microscopy, L929 cells were divided into 4 groups: control (cells without photosensitizer or light), photosensitizer (only cells incubated with ZnPcBr₈), laser (only irradiated cells) and PDT (cells incubated with ZnPcBr₈ and irradiated).

Incubation with photosensitizer

For the MTT Technique, L929 cells were plated at a number of 5×10^5 cells/mL in each well of a 24-well plate. After 24 hours of culture, cells were incubated with ZnPcBr₈ and diluted in sterile PBS at concentrations of 0.25, 0.5 or 1 μ M for 1 hour.

For Fluorescence Microscopy, L929 cells were plated at a number of 5×10^5 cells/mL in each well of a 24-well plate containing round sterile coverslips. After 24 hours of culture, cells were incubated with ZnPcBr₈ diluted in sterile PBS at 1 μ M concentration for 1 hour.

Photodynamic treatment

After incubation, cells were washed with PBS twice and 200 μ l of fresh PBS was added for irradiation. Dark barriers were placed between wells to prevent light from scattering during irradiation. Another dark barrier with an orifice the diameter of the well, was placed on top of the 24-well plate for the same purpose. Irradiation was done in the dark with an InGaAlP semiconductor laser as active medium (Thera Lase - DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, Brazil) operating at 685nm in a continuous wave mode, coupled to a 600 μ m diameter optical fiber. Irradiation time of 4 minutes and 18 seconds was used to deliver 4,5J/cm² (Power=35mW). After irradiation, PBS was removed and MEM medium with 10% FBS was added to the cells for 1, 12 and 24 hours of culture in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Test of cell viability using the MTT Technique (Cytotoxicity)

After each period of incubation, cells were incubated with 0,5mg/mL of MTT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) for 1 hour and agitated with DMSO for 30 minutes. Reading of the plate using a 570nm filter was performed in the Elisa Spectracount Reader (Packard Instrument Company Inc., Netherlands, USA). The graph with the average, shunting line standard and statistic analyzes was obtained using GraphPad Software Incorporated, version 2.0.

Fluorescence Microscopy - Nucleus staining

After each period of incubation, cells were carefully washed with PBS and fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde in PHEM buffer. After fixation, cells were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride - Molecular Probes, Eugene, USA) for 10 minutes. After all the procedures, the coverslips were rinsed in the dark with PHEM and mounted on slides with n-propyl gallate. Observations and photographs were made using a Leica photomicroscope (DMLB), equipped with an HBO 100W mercury lamp and the corresponding filter sets for fluorescence microscopy: UV, blue and green.

RESULTS

Absorbance Spectrum.

The absorbance spectrum of photosensitizer ZnPcBr_8 showed that the maximal spectrum absorption is localized in the 676nm level, as presented in Figure 01.

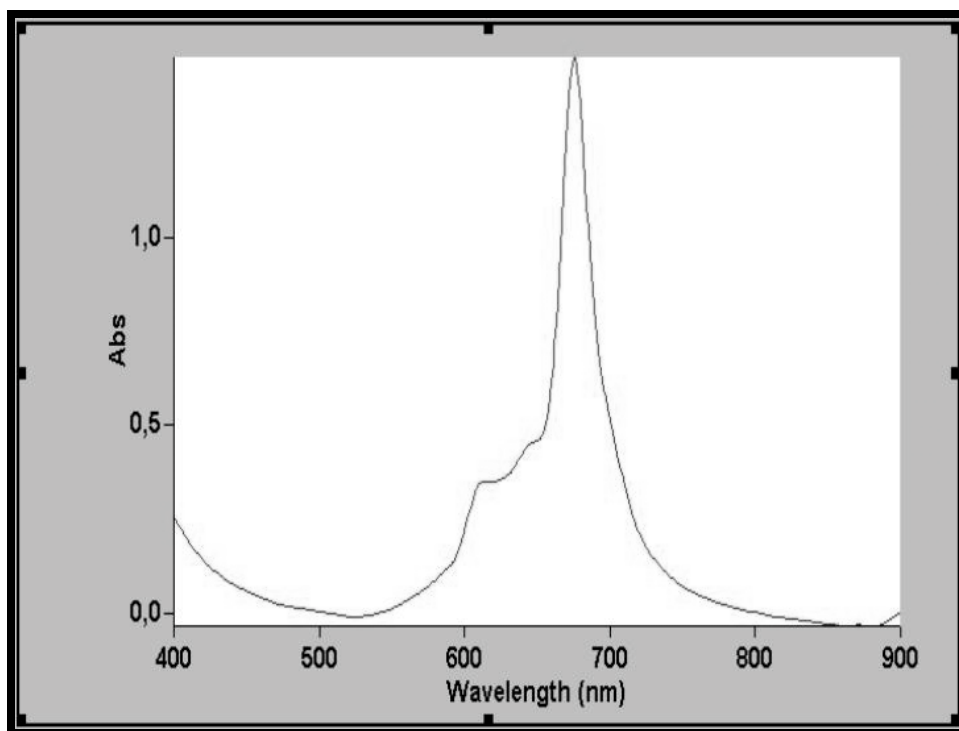
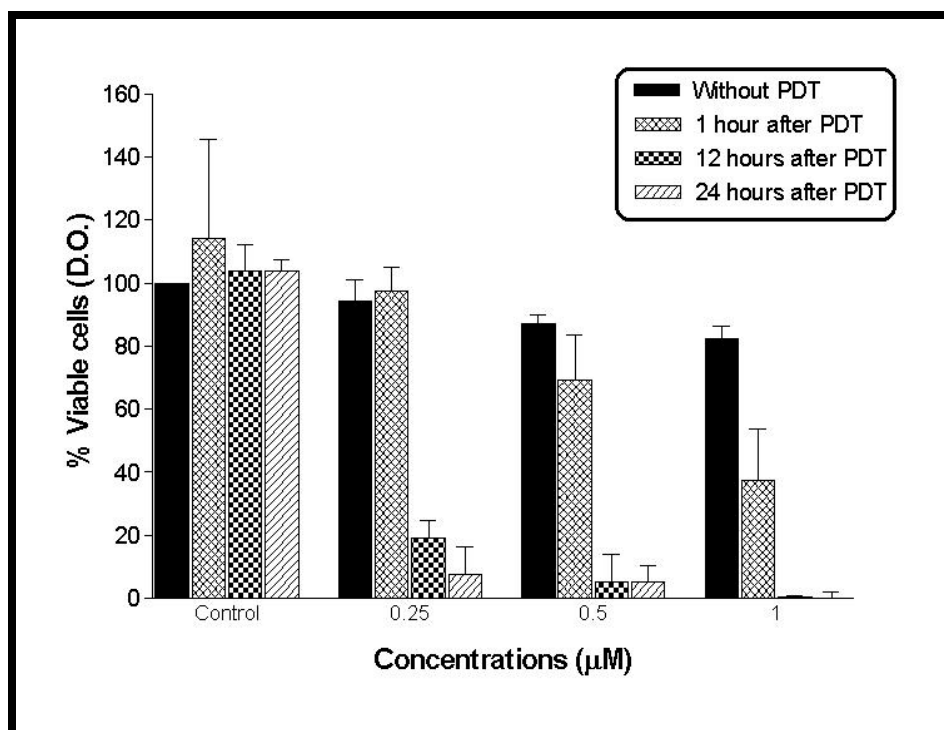


Figure 01: UV-visible absorption spectrum of ZnPcBr_8 .

Test of cell viability using MTT Technique (Cytotoxicity)

Results obtained in graph 01 showed that at 0.25, 0.5 and 1 μ M concentrations without irradiation, cells presented high viability: 94% for 0.25 μ M, 87% for 0.5 μ M and 82% for 1 μ M. The control group was considered as 100%. After irradiation of the control group, there was an increase in the number of viable cells: around 114% after 1 hour, 103% after 12 hours and 104% 24 hours after irradiation. One hour after PDT there was an increase in cell viability to around 97%, in the group of cells that were incubated with ZnPcBr₈ at 0.25 μ M concentration and irradiated. However, 12 and 24 hours after irradiation, there was a decrease in this percentage: to around 19% after 12 hours and 7% 24 hours after PDT. In the group of cells that were incubated with ZnPcBr₈ at 0.5 μ M concentration and irradiated, viability of L929 cells was reduced at all times, with 69% viability after 1 hour, 5% after 12 hours and 5% 24 hours after PDT. In the group of cells that were incubated with ZnPcBr₈ at 1 μ M concentration and also irradiated, there was a significant decrease in the number of viable cells from 1 hour to 24 hours after irradiation: 37% after 1 hour, 0.3% after 12 hours and 0% 24 hours after PDT. An ANOVA test showed that differences among the medium were significant ($P < 0.05$).



Graph 01: L929 cells viability 1, 12 and 24 hours after PDT with ZnPcBr₈. Error bars represent the standard error of the mean of three experiments. An ANOVA test showed that differences among the medium were significant ($P < 0.05$).

Fluorescence Microscopy - Subcellular localization.

When cells were incubated for 1 hour at $1\mu\text{M}$ concentration, photomicrography showed that ZnPcBr_8 fluorescence appeared in the perinuclear region.

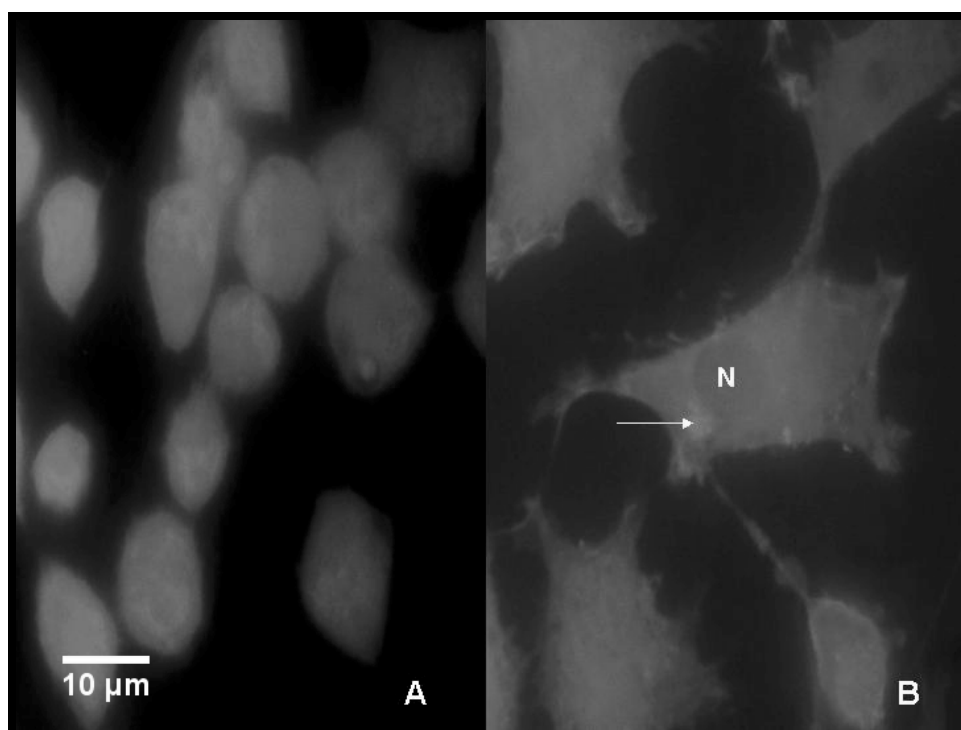


Figure 02: Subcellular localization of ZnPcBr_8 in L929 cells. A) Control cells (without photosensitizer); B) Cells incubated with ZnPcBr_8 ($1\mu\text{M}$) for 1 hour. (N: nucleus; arrow: fluorescence). 1000X

Fluorescence Microscopy - Nucleus staining with DAPI.

Alterations in the nucleus could be observed under fluorescence microscopy after staining of nuclei with DNA-specific fluorochromes.

Evaluation of photographs revealed that at all times (1, 12 and 24 hours) cells in the control group (only cells), photosensitizer (cells incubated with ZnPcBr₈) and laser (irradiated cells) did not show alterations in the nuclear format (figures 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C, 5A, 5B and 5C). Furthermore, preserved nucleus, intact chromatin and nuclear membrane were observed. Such characteristics were also observed in the group of cells stained with DAPI, 1 and 12 hours after Photodynamic Therapy (figures 3D e 4D). In the group stained 24 hours after PDT (figure 5D) there were nuclear alterations, such as nuclear fragmentation.

DAPI staining also facilitated visualization of cytoplasm disposition. Furthermore, it was observed that there was cytoplasm retraction in the group analyzed 1 hour after PDT (figure 3D). In the group that was analyzed 12 and 24 hours after PDT (figures 4D, 5D), besides retraction there were also vacuoles along the cytoplasm, which did not happen in the other groups, where the disposition and cytoplasm integrity remained normal.

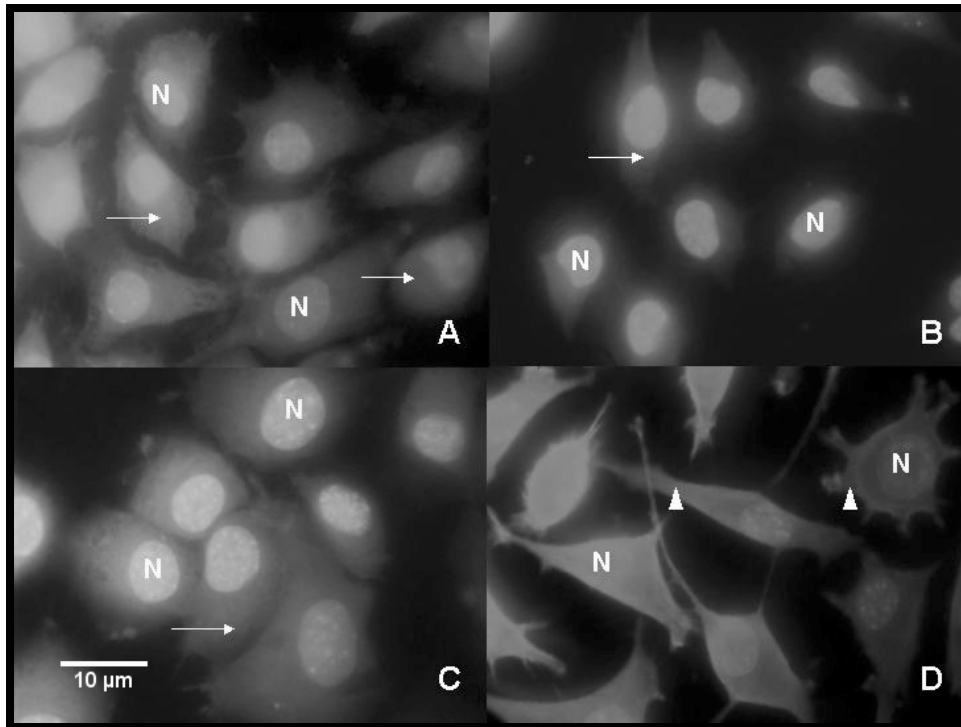


Figure 03: L929 cells staining with DAPI 1 hour after Photodynamic Therapy with ZnPcBr₈ at 1μM concentration. A) control (without photosensitizer or light); B) photosensitizer (only cells incubated with ZnPcBr₈); C) laser (only irradiated cells); D) PDT (cells incubated with ZnPcBr₈ and irradiated). (N: nucleus; arrow: intact cytoplasm; arrowhead: cytoplasm retraction). 1000X

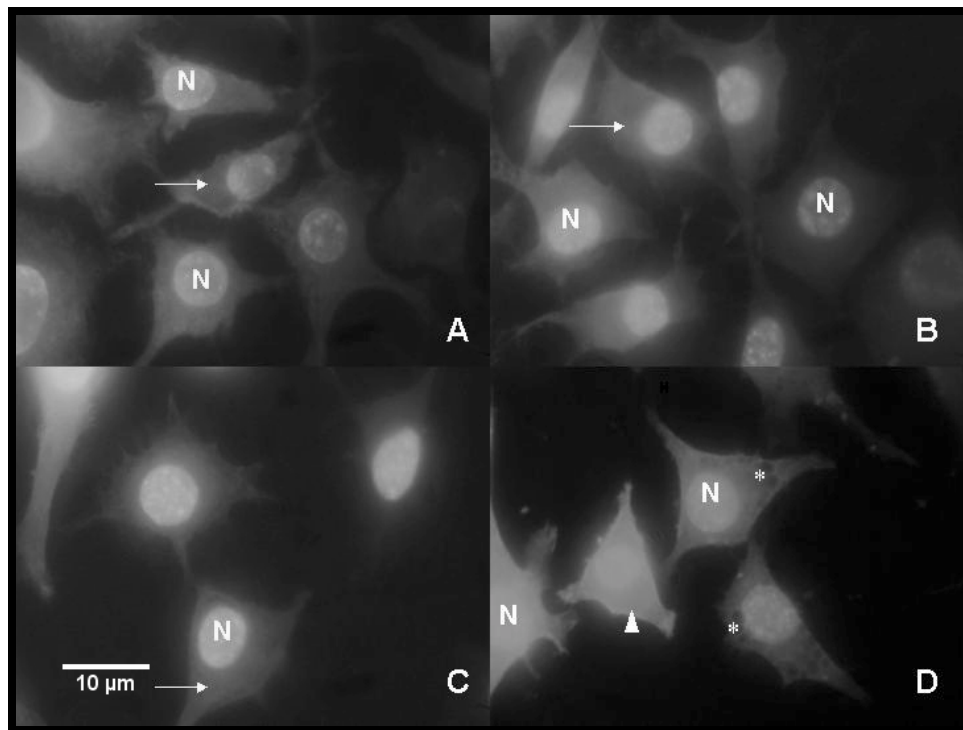


Figure 04: L929 cells staining with DAPI 12 hours after Photodynamic Therapy with ZnPcBr₈ at 1 μM concentration. A) control (without photosensitizer or light); B) photosensitizer (only cells incubated with ZnPcBr₈ at 1 μM concentration); C) laser (only irradiated cells; D) PDT (cells incubated with ZnPcBr₈ and irradiated). (N: nucleus; arrow: intact cytoplasm; arrowhead: cytoplasm retraction; asterisc: vacuoles). 1000X

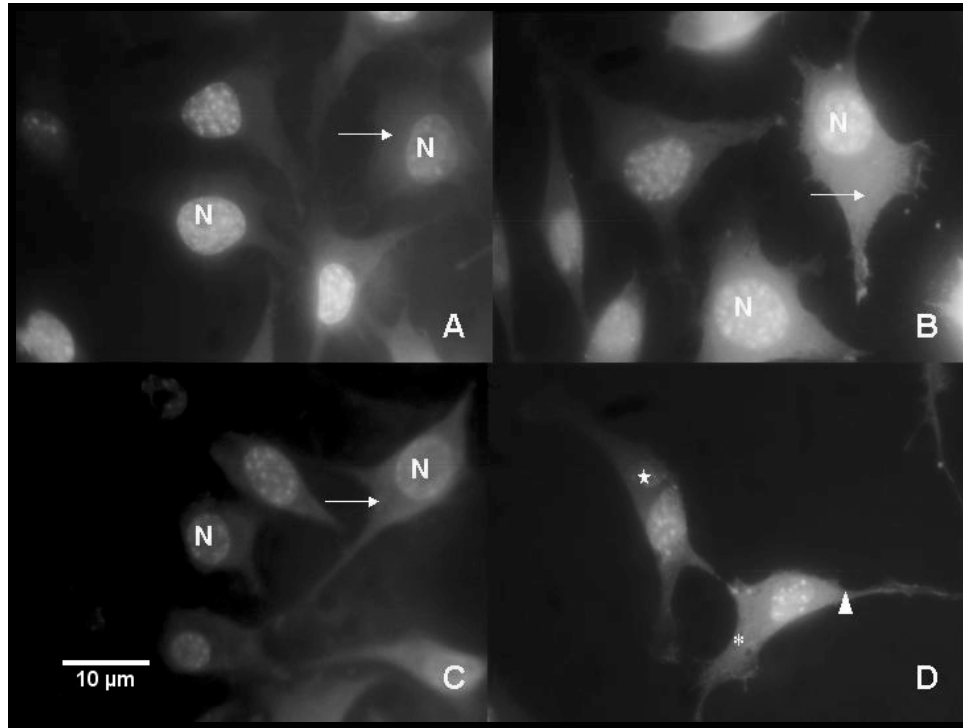


Figure 05: L929 cells stained with DAPI 24 hours after Photodynamic Therapy with ZnPcBr₈ at 1 μM concentration. A) control (without photosensitizer or light); B) photosensitizer (only cells incubated with ZnPcBr₈); C) laser (only irradiated cells); D) PDT (cells incubated with ZnPcBr₈ and irradiated). (N: nucleus; arrow: intact cytoplasm; arrowhead: cytoplasm retraction; asterisc: vacuoles; star: nucleus fragmentation). 1000X

DISCUSSION

One of the most recent and promising applications of phthalocyanine in Medicine is in the detection and cure of tumors.²⁸ For such applications, many second-generation photosensitizers have been created, as described by Macdonald et al. and Almeida et al.^{29,30} In agreement with the development of new photosensitizing agents for curing tumors, we studied the ZnPcBr_8 , recently developed by a group of researchers at the Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

Conjunctive tissue of mouse cells (Clone L929) (ATCC CCL-1 NCTC) were used in this experiment, since ISO 10993-5 recommends the use of this cell line for *in vitro* toxicity tests.³¹

L929 cells were incubated with ZnPcBr_8 for 1 hour at different concentrations. This period of incubation is in agreement with other previously developed studies, such as the ones carried out by Pazos et al. that used the same time of incubation for AlPc and AlPcS_4 ,²² and Ferreira et al., who only used AlPcS_4 .¹⁸

The absorption spectrum of ZnPcBr_8 showed that the maximal spectrum absorption is localized in the 676nm level, as presented in figure 1. This wavelength is in the same spectral band as other phthalocyanines that have their excitation coefficient in the red region of the spectrum (630nm-750nm), showing excellent properties for tumor localization and high photosensitizing efficiency, as described by Ferreira et al.¹⁸

Such characteristics were previously described in other phthalocyanines, such as Liposomal ZnPc ,²⁸ ZnPcS_2 , ZnPcS_3 ⁸ and AlPcS_4 .²²

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) test is one of the most frequently used methods for measuring cell proliferation and cytotoxicity.³²

In living cells, tetrazolium salt MTT is reduced to a formazan (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan), which can be colorimetrically analyzed. MTT reduction is generally attributed to mitochondrial activity, but it has also been related to non-mitochondrial enzymes as well as to endosomes and lysosomes.³³

According to MTT results, all the concentrations of ZnPcBr₈ presented tolerable effects in the dark, with cell viability of 94% at 0.25μM, 87% at 0.5μM and 82% at 1μM.

In these concentrations, we could observe that 1μM concentration was the most effective after PDT, with a decrease of 63% after 1 hour, 99% after 12 hours and 100% after 24 hours in relation to the control group.

The same concentration (1μM) was previously used by Fabris et al. in order to analyze the type of cell death caused by a photosensitizer with ZnPc.²¹

The demonstrated decreased cell viability caused by PDT with ZnPcBr₈ at 1μM concentration is mediated by type II reactions, like most photosensitizers used in PDT, which involve singlet oxygen production. This reactive species is very efficient in producing oxidized forms of biomolecules, thus initiating most types of PDT damage.³⁴

The fluorescent properties of the photosensitizing agent can be used to evaluate its intracellular localization and the treatment effects.³⁵

According to these principles, the Fluorescence Microscopy technique was performed to evaluate the intracellular localization and the photodamages caused by PDT with ZnPcBr₈ to L929 cells culture.

Fluorescence microscopy results showed that ZnPcBr_8 , a hydrophilic phthalocyanine, was localized in the perinuclear region when analyzed 1 hour after incubation. These results are in accordance with the study of Pazos et al., which described that AlPcS_4 , a photosensitizer soluble in water like the ZnPcBr_8 , is localized in endosomes and lysosomes.²²

DAPI (4', 6' - diamidino, 2' phenylindole) is a specific fluorescent stain for nucleus. The control, photosensitizer and laser groups, at all the times (1, 12 and 24 hours) did not suffer alterations in the nuclear format (figure 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C, 5A, 5B and 5C). Such characteristics were also observed in the group of cells stained with DAPI 1 and 12 hours after PDT (figure 3D and 4D). There was nuclear fragmentation in the stained group 24 hours after PDT (figure 5D).

DAPI staining also facilitated the visualization of cytoplasm disposition. A cytoplasm retraction (figure 3D) was observed in the group 1 hour after PDT. In the group analyzed 12 and 24 hours after PDT (figure 4D and 5D), besides retraction, there were vacuoles along the cytoplasm, which did not happen in other groups, where disposition and cytoplasm integrity remained normal.

According to literature, the morphological characteristics viewed through Fluorescence Microscopy with DAPI after Photodynamic Therapy, such as nuclear fragmentation, plasmatic membrane retraction and consequent loss of cellular adhesion, are characteristics of cell death by apoptosis.³⁶

There is release of cytochrome C to the cytosol whenever the apoptotic pathway is characterized by disruption of mitochondrial function. Released cytochrome C binds Apaf-1 and induces its oligomerization in the presence of dATP. This complex termed apoptosome, recruits and activates the initiator caspase-9. The

activation of initiator caspase-9 leads to the activation of effector caspases (caspase-3, -6 and -7).³⁰

The morphological features of apoptosis result from the activation of these caspases (cysteine proteases).³⁷ According to the results obtained in this study, L929 cells death caused by PDT with ZnPcBr_8 possesses characteristics of apoptosis mediated by the mitochondria, due the decrease in cells viability, the subcellular localization and the photodamages found. This apoptotic pathway mediated by the mitochondria is in agreement with the mechanism of cell death (apoptosis) described by Chiu et al. in the photodynamic treatment of L5178Y-R cells with SiPcS_4 ^{38,39} and with HCT116 cells.⁴⁰ New studies should be accomplished to confirm the cell death type and the involved mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by UNIVAP-IP&D, FAPESP, CAPES.

REFERENCES

1. Werneck, C.E., Pinheiro, A.L.B., Pacheco, M.T.T., Pacheco-Soares, C., and Castro, J.L.F. (2005). Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. *Photomed. Laser Surg.* 23 (3), 300–303.
2. Shan, X., Wang, T., Li, S., et al. (2006). Photophysical properties of diphenyl-2,3-dihydroxychlorin and diphenylchlorin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 82, 140–145.
3. Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J.Y., Habraken, Y., and Agostinis, P. (2003). Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane bound photosensitizers. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1651–1659.
4. Brancalion, L., and Moseley, H. (2002). Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med. Sci.* 17, 173–186.
5. Oleinick, N.L., Morris, R.L., and Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *J. Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 1–21.
6. Babilas, P., Karrer, S., Sidoroff, A., Landthaler, M., and Szeimies, R.M. (2005). Photodynamic therapy in dermatology – an update. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 21, 142–149.

7. Brown, S.B., Brown, E.A., and Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 5, 497–508.
8. Cauchon, N., Tian, H., Langlois, R., et al. (2005). Structure - Photodynamic Activity Relationships of Substituted Zinc Trisulfophthalocyanines. *Bioconjug. Chem.* 16, 80–89.
9. Sibata, C.H., Colussi, V.C., Oleinick, N.L., and Kinsella, T.J. (2000). Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 869–880.
10. Allison, R.R., Cuenca, R., Downie, G.H., Randall, M.E., Bagnato, V.S., and Sibata, C.H. (2005). PD/PDT for gynecological disease: A clinical review. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2, 51–63.
11. Harada, M., Woodhams, J., MacRobert, A.J., Feneley, M.R., Kato, H., and Bown, S.G. (2005). The vascular response to photodynamic therapy with ATX-S10Na (II) in the normal rat colon. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* 79, 223–230.
12. Castano, A.P., Demidova, T.N., and Hamblin, M.R. (2004). REVIEW: Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 1, 279–293.
13. Ali, S.M., and Olivo, M. (2002). Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int. J. Oncol.* 21, 531–540.

14. Schastak, S., Jean, B., Handzel, R., et al. (2005). Improved pharmacokinetics, biodistribution and necrosis in vivo using a new near infra-red photosensitizer: tetrahydroporphyrin tetratosylat. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 78, 203–213.
15. Nunes, S.M.T., Sguilla, F.S., and Tedesco, A.C. (2004). Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 273–284.
16. Liu, M.O., Tai, C.H., Sain, M.Z., The-Hu, A., and Chou, F. (2004). Photodynamic applications of Phthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 165, 131–136.
17. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu, X.H., Childs, C.J.H., and Sibata, C.H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 1, 27–42.
18. Ferreira, S.D.R.M., Tedesco, A.C., Sousa, G., et al. (2004). Analysis of mitochondria, endoplasmatic reticule and actin filaments after PDT with AlPcS4. *Lasers Med. Sci.* 18, 207–212.
19. Simkin, G.O., Tao, J.S., Levy, J.G., and Hunt, D.W.C. (2000). IL-10 Contributes to the Inhibition of Contact Hypersensitivity in Mice Treated with Photodynamic Therapy. *J. Immunol.* 164, 2457–2462.

20. Nyman, E.S., and Hynninen, P.H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 73, 1–28.
21. Fabris, C., Valduga, G., Miotto, G., et al. (2001). Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. *Cancer Res.* 61, 7495–7500.
22. Pazos MC, Pacheco-Soares C, Silva NS, DaMatta, R.A., and Pacheco, M.T.T. (2003). Ultrastructural effects of two Phthalocyanines in L929 and HeLa cells after laser irradiation. *Biocell.* 27, 301–309.
23. Castano, A.P., Demidova, T.N., and Hamblin, M.R. (2005). REVIEW: Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2, 1–23.
24. Sakamoto, K., and Ohno-Okumura, E. (1999). Synthesis of octasubstituted cobalt phthalocyanines and their redox properties. *J. Porphyr. Phthalocyan.* 3, 634–642.
25. Pelisson, M.M.M., Tomé, F.M., Beltrame-Jr, M., Simioni, A.R., and Tedesco, A.C. (2003). Synthesis and photochemical properties of a tribenzonaphtho-condensed porphyrazinato zinc complex. *J. Porphyr. Phthalocyan.* 7, 630–636.
26. Ali, H., and Van-Lier, J. (1999). Metal Complexes as Photo and Radiosensitizers. *Chem. Rev.* 99, 2379–2450.

27. Cook, M.J., Chambrier, I., Cracknell, S.J., Mayes, D.A., and Russell, D.A. (1995). Photochem. Photobiol. 62, 542–545.
28. Yslas, E., Rivarola, V., and Durantini, E.N. (2005). Synthesis and photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanine derivatives bearing methoxy and trifluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media. Bioorg. Medic. Chem. 13, 39–46.
29. Macdonald, I.J., and Dougherty, T.J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. J. Porphyr. Phthalocyan. 5, 105–129.
30. Almeida, R.D., Manadas, B.J., Carvalho, A.P., and Duarte, C.B. (2004). Review: Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. Biochim. Biophys. Acta. 1704, 59–86.
31. International Standard - ISO 10993-5, second edition 1999-05-15. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
32. Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., and Schubert, D. (1997). Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. J. Neurochem. 69, 581–593.

33. Vellonen, K.S., Honkakoski, P., and Urtti, A. (2004). 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.* 23, 181–188.
34. Ribeiro, J.N., Silva, A.R., Pelegrino, A.C., Tedesco, A.C., and Jorge, R.A. (2005). Evaluation of photodynamic activity of octaethylporphyrin and vanadyl octaethylporphyrin. *Ap. Cancer Res.* 25(3), 142–150.
35. Berg, K., Selbo, P.K., Weyergang, A., et al. (2005). Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J. Microsc.* 218, 133–147.
36. Ribeiro, J.N., Silva, A.R., and Jorge, R.A. (2004). Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 40(6), 383–390.
37. Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 663–669.
38. Chiu, S., Evans, H.H., Lam, M., Nieminen, A., Oleinick, N.L. (2001). 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.* 165, 51–58.

39. Dongen, G.A.M.S., Visser, G.W.M., and Vrouenraets, M.B. (2004). Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 31–52.
40. Chiu, S.M., Xue¹, L.Y., Azizuddin, K., and Oleinick, N.L. (2005). Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: Apoptosis with or without Bax expression. *Apoptosis*. 10(6), 1357–1368.

ABREVIATIONS

AlPc - Aluminum phthalocyanine

AlPcS₄ - Tetrasulphonate Aluminum Phthalocyanine

ANOVA - Analysis of Variance

Apaf-1 - Factor associated to apoptotic proteins

AsGaAl - Gallium-Aluminum-Arsenide

Br₂ - Molecular bromine

Caspases - Cysteine proteases

CCl₄ - Tetrachloromethane

CO₂ - Carbon dioxide

DAPI - (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)

dATP - Deoxyadenosine 5 triphosphate

DBU - 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

DMF - *N,N*-dimethylformamide

DMSO - Dimethyl sulfoxide

DNA - Deoxyribonucleic acid

FBS - Fetal Bovine Serum

Fe - Iron

Formazan - (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan)

HCT116 - Human Colon Cancer Cells

InGaAlP - Indium Gallium Aluminum Phosphide

ISO - International Standards Organization

I₂ - Molecular iodine

L5178Y-R - radiosensitive murine leukemic lymphoblastoid cell line

L929 - Clone L929 cells (Mouse conjunctive tissue)

MEM - Minimum Essential Medium

MTT - (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)

NBS - N-bromosuccinimide

PBS - Phosphate buffered saline

PDT - Photodynamic Therapy

SiPcS₄ - Tetrasulphonate Silicone Phthalocyanine

UV - ultraviolet

ZnPc - Zinc Phthalocyanine

ZnPc (II) - Zinc (II) Phthalocyanine Liposomal

ZnPcBr₈ - Octal-bromide Zinc Phthalocyanine

ZnPcS₂ - Disulphonate Zinc (II) Phthalocyanine

ZnPcS₃ - Trisulphonate Zinc (II) Phthalocyanine