

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**  
**MARA DENIZE IGNÁCIO LEITE**

***AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOQUÍMICAS, BIOENERGÉTICAS E  
FOTOQUÍMICAS DE MACRÓFAGOS FRENTE À TERAPIA  
FOTODINÂMICA MEDIADA POR ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO.***

**UBERABA - MG**

**2013**

**MARA DENIZE IGNÁCIO LEITE**

***AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOQUÍMICAS, BIOENERGÉTICAS E  
FOTOQUÍMICAS DE MACRÓFAGOS FRENTE À TERAPIA  
FOTODINÂMICA MEDIADA POR ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO.***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba - UNIUBE, como parte dos requisitos para obtenção do Título Mestre em Odontologia.

Orientador PROF. Dr. Tony de Paiva Paulino

**UBERABA - MG**

**2013**

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

**Leite, Mara Denize Ignácio.**

L536a            Avaliação das respostas imunoquímicas, bioenergéticas e fotoquímicas de macrófagos frente à terapia fotodinâmica mediada por ácido 5-aminolevulínico / Mara Denize Ignácio Leite. – Uberaba, 2013.

77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

**Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biomateriais, a que se submeteu a aluna Mara Denize Ignácio Leite – matrícula 6102329/2, orientada pela Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino**

Aos vinte e sete dias do mês de março do ano de dois mil e treze, às 14 horas, no Anfiteatro da Biblioteca Central da Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo o Colegiado do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: Tony de Paiva Paulino - **Presidente**, Geraldo Thedei Júnior e Carlo José Freire de Oliveira, para julgar o trabalho da candidata Mara Denize Ignácio Leite, apresentado sob o título: **“Avaliação das Respostas Imunoquímicas Bioenergéticas e Fotoquímicas de Macrófagos Frente à Terapia Fotodinâmica Mediada por Ácido 5-Aminolevulinico.”**. O Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi argüida pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas argüições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

**APROVADA**

**REPROVADA** (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOMATERIAIS, a versão final da dissertação, considerada aprovada devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Odontologia, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno Aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, O Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, vinte e sete de março de dois mil e treze.

Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino Tony P. Paulino

Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior Geraldo Thedei Júnior

Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira Carlo José Freire de Oliveira

Prof. Dr. José Bento Alves Bento  
Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Poliana Gomes da Silva Alves Poliana  
Secretária do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Ciência da Aluna: Mara Denize Ignácio Leite

***“A persistência é o menor caminho do êxito”.***

**Charles Chaplin**

## DEDICATÓRIA

Dedico essa obra:

Ao meu marido,

***Wécio Fausto Jezuino.***

Tem que ser muito companheiro (e você é) para manter carinho, ajuda e compreensão durante todo o Mestrado. Nunca vou esquecer isso. Obrigada!

A minha irmã,

***Mara Fernanda.***

Você é motivo de orgulho para mim, obrigada pelo incentivo.

A minha mãe e ao meu pai,

***Celma Marilsa Ignácio Leite e João Leite.***

Agradeço por me mostrarem o caminho. Tudo que faço é para elevar o nome de vocês.

Ao meu filho,

***Wécio Ignácio Leite Jezuino.***

Por ser, a partir de agora e sempre, o motivo de empenho para mais conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

Para a realização e êxito desta pesquisa muitas pessoas especiais trouxeram contribuições tanto para meu conhecimento científico quanto para meu crescimento pessoal e, dentre elas agradeço:

A Jesus e a Nossa Senhora pela graça alcançada.

Ao orientador Professor Doutor Tony de Paiva Paulino que me apresentou os primeiros passos na área da Biopatologia. Todos seus ensinamentos foram, sempre, acompanhados com muita dedicação, refletindo em mim confiança e amizade. Muito Obrigada, por tudo!

Aos professores

Doutor Renes de Resende Machado por contribuir com seu conhecimento científico o que muito fez para colaborar com a riqueza de nossa pesquisa.

Doutor André Belico de Vasconcelos pelo empréstimo, auxílio e acompanhamento na realização dos testes de Microcalorimetria.

Aos Alunos de Iniciação Científica (Danilo Antonio da Costa, Camila Beatriz Silva Vaz e Rafael Destro Rosa Tiveron); pela participação durante todos os experimentos e pela amizade construída.

A técnica de laboratório do Cefores, Polyanna Miranda Alves, por toda ajuda e acompanhamento da pesquisa.

Agradeço as Instituições de Ensino - CEFORES/UFTM e UNIVERSIDADE DE UBERABA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA, pelos equipamentos e suporte financeiro empregados neste projeto.

## RESUMO

LEITE, Mara Denize Ignácio. **Avaliação das respostas imunoquímicas, bioenergéticas e fotoquímicas de macrófagos frente à terapia fotodinâmica mediada por ácido 5-aminolevulínico.** Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino. Mestrado em Odontologia, Uberaba 2013.

A TFD é uma modalidade terapêutica cujo princípio se baseia no emprego de luz visível e um fotossensibilizador na presença de oxigênio. É usada no tratamento de lesões cancerígenas ou pré-cancerígenas e outras doenças que apresentam crescimento desordenado das células, além de tratamentos cosméticos, odontológicos e como modulação da resposta inflamatória. Por atuação tão extensa, estudos envolvendo TFD em células são necessários porque ainda é difícil diferenciar a intensidade de reação inflamatória do tecido normal com o tecido doente. O objetivo desse experimento foi determinar o metabolismo bioenergético, os níveis de TNF- $\alpha$ , a produção de NO e a peroxidação por macrófagos após o emprego da TFD mediada por ALA. O experimento envolveu coleta de macrófagos do peritônio de ratos Wistar. Essas células foram tratadas e avaliadas segundo grupos como, controle (não tratadas), LPS, LUZ, LUZ+LPS, TFD+LPS e somente TFD para verificar a produção de TNF- $\alpha$ , NO, peroxidação lipídica. Em adição, foi realizada microcalorimetria para avaliar a capacidade metabólica dos macrófagos. A dose da pró-droga (ALA – 150  $\mu\text{g/ml}$ ) e fluência da luz (5  $\text{J/cm}^2$ ) foram escolhidas dentro de um padrão de menor agressão possível a função celular, para isso, foi realizada a viabilidade celular logo após coleta das células, após TFD e antes dos testes de microcalorimetria. Como resultados, nesse experimento não houve produção de NO e peroxidação lipídica. A produção de TNF reduziu significativamente, em relação ao controle, nos grupos tratados com TFD. Assim, baseado no experimento proposto, pudemos concluir que foi possível investigar a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais. Quanto à microcalorimetria foi possível determinar a produção energética dos macrófagos após TFD, tratados ou não com inibidores específicos da via glicolítica e cadeia respiratória. Percebe-se, portanto que a TFD interfere no metabolismo energético dos macrófagos nestas vias metabólicas e, portanto há a hipótese de que se houver morte celular via TFD mediada por ALA, esta morte se deve a danos em enzimas e/ou organelas responsáveis por estas vias.

Palavra chave: Terapia Fotodinâmica, macrófagos, ALA, TNF- $\alpha$ , microcalorimetria.

## ABSTRACT

LEITE, Mara Denize Ignácio. **Evaluation of responses immunochemical, bioenergetics and photochemical macrophages front photodynamic therapy mediated by 5-aminolevulinic acid.** Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino. Mestrado em Odontologia, Uberaba 2013.

PDT is a treatment modality whose principle is based on the use of visible light and a photosensitizer in the presence of oxygen. It is used to treat cancerous lesions and precancerous other diseases that exhibit uncontrolled cell growth, and cosmetic treatments, such as dental and modulation of the inflammatory response. By acting as extensive studies involving PDT cells are needed because it is still difficult to differentiate the intensity of inflammatory reaction of normal tissue with diseased tissue. The objective of this experiment was to determine the bioenergetic metabolism, levels of TNF- $\alpha$ , NO production by macrophages peroxidation after employment of ALA-mediated PDT. The experiment involved collecting peritoneal macrophages of rats. These cells were treated and evaluated according to groups as control (untreated), LPS, LIGHT, LIGHT + LPS, LPS + PDT and PDT only to check the production of TNF- $\alpha$ , NO, lipid peroxidation. In addition, microcalorimetry was conducted to evaluate the metabolic capacity of macrophages. The dose of the prodrug (ALA - 150  $\mu\text{g/ml}$ ), and the light fluence ( $5 \text{ J/cm}^2$ ) were chosen in a pattern of less invasively cellular function for this, cell viability was performed after collecting cells after PDT and microcalorimetry before testing. As a result, in this experiment there was no production of NO and lipid peroxidation. The production of TNF significantly reduced compared to control groups treated with PDT. Thus, based on the proposed experiment, we concluded that it was possible to investigate the production of TNF- $\alpha$  in peritoneal macrophages. Regarding microcalorimetry was possible to determine the energy production of macrophages after PDT, treated or not with specific inhibitors of the glycolytic pathway and the respiratory chain. It is understood, therefore, that the PDT interfere in energy metabolism of macrophages in these pathways, and thus there is a possibility that if there cell death pathway mediated by PDT-ALA, this death is due to enzyme damage and / or organelles responsible for these routes.

Keyword: Photodynamic Therapy, macrophages, ALA, TNF- $\alpha$ , microcalorimetry.

## LISTA DE SIGLAS

Siglas em ordem alfabética:

**ALA** - ácido 5-aminolevulínico

**BSA** - albumina de soro bovino

**CBC** - carcinoma superficial  
basocelular

**CXCL8** - CXC-quimiocina-ligando 8

**DB** - doença de Bowen

**ERN's** - espécies reativas de  
nitrogênio

**ERO's** - espécies reativas de oxigênio

**FS** - fotossensibilizador

**GPx** - glutathione peroxidase

**HSPs** - proteínas de choque térmico

**IL-10** – interleucina 10

**IL-1 $\beta$**  - interleucina-1 $\beta$

**IL-2** - interleucina 2

**IL-6** – interleucina 6

**IL-8** – interleucina 8

**LED** - diodos emissores de luz

**LPS** – lipopolissacarídeo

**MAL** - aminolevulinato de metila

**MDA** - malonaldeído

**NMSC** - câncer de pele não melanoma

**NO** - óxido nítrico

**NOS** - enzima óxido nítrico sintase

**NOS1** - enzima óxido nítrico sintase  
neuronal

**NOS2** - enzima óxido nítrico sintase  
induzível

**NOS3** - enzima óxido nítrico sintase  
endotelial

**PBS** – Solução salina de tampão  
fosfato

**PII** - Protofrin II

**PpIX** - Protoporfirina

**QA** - ceratoses actínicas

**ROI** - oxigênio reativo intermediário

**TFD** – Terapia Fotodinâmica

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação esquemática do conceito de pró-droga.....	10
Figura 2: Captação do ALA exógeno e biossíntese no Heme.....	11
Figura 3: Esquema resumido da conversão de ALA em PpIX.....	12
Figura 4: Conversão bioquímica do ALA para a PpIX e posterior uso da TFD.....	12
Figura 5: Estrutura química do MAL / Metvix® .....	13
Figura 6: Estrutura química do ácido 5-aminolevulínico (ALA).....	14
Figura 7: Representação de um macrófago, observado ao microscópio.....	23
Figura 8: Esquema ilustrativo das câmaras calorimétricas.....	32
Figura 9: Via de formação do MDA após peroxidação lipídica.....	34
Figura 10: Reação entre o MDA e o TBA formando o complexo de cor MDA-TBA..	34
Figura 11: Eritema e edema no pós-operatório imediato de MAL-TFD.....	36
Figura 12: Foto da placa de 24 poços onde foi colocado lavado peritoneal.....	44
Figura 13: Aplicação da Luz nos poços para Luz e TFD.....	46
Figura 14: Eppendorf sendo disposto na centrífuga.....	46
Figura 15: Sobrenadante sendo transferido para placa de ELISA.....	47
Figura 16: Apresentação esquemática das câmaras.....	49

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Disposição das amostras sobre a placa de 24 poços.....	44
Esquema 2: Realização do ensaio microcalorimétrico.....	50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros para countess.....	43
Quadro 2: Descrição dos grupos e parâmetros analisados nos testes de microcalorimetria de condução.....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Análise comparativa entre concentração de TNF- $\alpha$ produzida pelos grupos experimentais frente ao grupo controle.....	54
Gráfico 2: Dados da calibração do microcalorímetro de condução.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Viabilidade celular dos grupos experimentais após respectivos tratamentos.....	52
Tabela 2: Resultados dos ensaios calorimétricos referentes à calibração.....	55
Tabela 3: Ensaio termodinâmico com macrófagos.....	56
Tabela 4: Ensaio termodinâmico com macrófagos para o segundo protocolo.....	57

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>4</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Terapia Fotodinâmica.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.1 Definição.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.2 Rumos para as pesquisas com TFD.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1.3 Precursor de corante.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.4 Mecanismos celulares e moleculares – efeitos dos radicais livres sobre as células.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Formação de NO.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Efeito apoptótico e morte celular.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 A Terapia Fotodinâmica e a resposta inflamatória.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Macrófagos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6 LPS - Lipopolissacarídeo.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Citocinas.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7.1 TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8 Microcalorimetria.....</b>	<b>29</b>
<b>3.9 Peroxidação lipídica.....</b>	<b>33</b>
<b>3.10 Efeitos adversos da TFD.....</b>	<b>34</b>
<b>3.11 Vantagens da TFD.....</b>	<b>36</b>
<b>4 HIPOTESE.....</b>	<b>38</b>

<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Materiais e equipamentos utilizados.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Drogas e Reagentes.....</b>	<b>39</b>
<b>5.3 Preparo dos reagentes.....</b>	<b>40</b>
5.3.1 Tampão fostato salino – PBS.....	40
5.3.2 Meio de cultura – RPMI 1640.....	40
5.3.3 Reagentes para Peroxidação lipídica.....	41
5.3.4 Reagentes para Óxido Nítrico.....	41
5.3.5 Tampão de lavagem (ELISA).....	42
5.3.6 Tampão de bloqueio (ELISA).....	42
<b>5.4 Esterilização.....</b>	<b>42</b>
<b>5.5 Animais.....</b>	<b>42</b>
5.6 Fontes de Luz para aplicação da TFD.....	42
5.7 Determinação da viabilidade celular.....	42
5.8 Obtenção, cultura de macrófagos peritoneais e delineamento do grupos experimentais.....	43
5.9 Tratamento com ALA.....	45
5.10 LPS.(lipopolissacarídeos).....	45
5.11 Terapia Fotodinâmica.....	45
5.12 Separação do sobrenadante e pellet.....	46
5.13 Avaliação da produção de citocinas (em sobrenadante celular)....	47
5.14 Grupo controle.....	47
5.15 Ensaios de peroxidação lipídica (pellet celular).....	48
5.16 Determinação dos níveis de NO (sobrenadante celular).....	48
5.17 Microcalorimetria.....	49
5.18 Análise estatística.....	51

5.19 Descartes das células.....	51
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
i) Determinação da fluência de luz e da dose da pró-droga.....	52
ii) Determinação da viabilidade celular dos grupos experimentais.....	52
iii) Determinação da liberação de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais estimulados pelo LPS, pela TFD e pelo LPS associado á TFD.....	53
iv) Investigação da produção de óxido nítrico por macrófagos tratados por TFD.....	54
v) Determinação quantitativa dos níveis de peroxidação lipídica causada pela TFD em macrófagos peritoneais.....	54
vi) Investigação do metabolismo energético através da microcalorimetria de condução.....	55
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>77</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento de lesões pré-cancerígenas e cancerígenas que é realizada com a administração (sistêmica ou tópica) de um fotossensibilizador (FS) seguida de irradiação com uma luz visível. A interação fotoquímica do FS com a luz na presença de oxigênio produz moléculas de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e outras formas de oxigênio ativo, como por exemplo, peróxido de radical hidroxila, e/ou íon superóxido. O fotodano nas células malignas leva a destruição do tumor. Os principais locais de dano são as organelas membranosas, como: mitocôndrias, membrana plasmática e os lisossomos (AGARWAL et al., 1991).

O ALA (ácido 5-aminolevulínico) não é um fotossensibilizador por si só, é uma pró-droga, metabolizada em Protoporfirina (PpIX), sendo ela o agente fotossensibilizante. A PpIX pode ser ativado por fontes de luz vermelha (635 nm) ou azul (405 – 420 nm) para promover destruição tecidual, sendo usado em lesões superficiais. O ALA é eliminado do tecido e corpo em 48 horas e produz fotossensibilidade na pele por menos que 24 horas (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). Embora sua capacidade de invasão seja baixa o ALA tem boa tolerância pelos pacientes, excelente efeito cosmético (estabilidade e boa absorção) com capacidade de tratar múltiplas lesões e seu uso repetitivo não causa risco de toxicidade (DOUGHERTY et al., 1998; KONOPKA e GOSLINSKI, 2007) sendo sua aplicação rápida e simples (DOUGHERTY et al., 1998).

Entre as fontes de luz para a aplicação da TFD o LED (Diodos emissores de luz) se destaca entre o laser e as lâmpadas por ter melhor design, ser mais barato e popular. Geram um espectro estreito de luz (comprimento médio de onda de 630 nm), ideal para ativação do FS, sem gerar os efeitos adversos das ondas de comprimentos mais extremos. Oferecem uma dose contínua de intensidade ótima e por isso o interesse para seu uso na TFD tem aumentado, sendo considerados mais seguros e de manuseio mais fácil (MORTON et al., 2008). Além disso, emitem baixa quantidade de calor, evitando assim danos termiais aos tecidos (SATROM, 1987).

A TFD empregada em células ou tecidos pode estimular macrófagos, neutrófilos e linfócitos T a secretar citocinas (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011; GOLLNICK, 2003). Pesquisas mostram que os macrófagos, quando estimulados pelo LPS (lipopolissacarídeos) são capazes de produzir citocinas, quimiocinas e fatores de estimulação de crescimento *in vitro* e *in vivo* (ADAMS e HAMILTON, 1984; EVANS et al., 1990; ZAMPRONIO et al., 1994). Neste sentido, macrófagos ativados podem apresentar alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais importantes na regulação do processo inflamatório e imunológico pós-estresse biológico causado por diversos agentes. Dentre as técnicas existentes para a avaliação metabólica a microcalorimetria se destaca como uma técnica analítica universal que possibilita medir variações de calor para monitorar reações físicas, químicas e biológicas e com essa análise é possível detectar uma mínima variação de energia de sistemas biológicos. Existem poucos trabalhos correlacionando a aplicação *in vitro* da TFD com os níveis de citocinas e a respectiva alteração bioenergética de macrófagos. Entre estes trabalhos, Evans e colaboradores (1990) demonstraram que o tratamento de macrófagos de camundongo com TFD, estimulados com endotoxina (LPS), inibiu a produção de TNF- $\alpha$  utilizando níveis mais elevados de energia de tratamento via TFD. Mais recentemente Kawczyk-Krupka e colaboradores (2011) questionaram a atuação dos macrófagos na TFD quanto ao seu papel com influência do ALA na resposta imunológica com base na viabilidade celular e na produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); e fator nuclear kB (NF-kB) e (proteína) p50/p65. No entanto não existe nenhum estudo do efeito da TFD sobre a capacidade metabólica dos macrófagos.

Assim, a avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica sobre os macrófagos peritoneais estimulados ou não pelo LPS permitirá elucidar se a terapia altera a produção da citocina TNF- $\alpha$ , assim como, do mediador inflamatório NO pelos macrófagos e ainda ampliaria nosso entendimento sobre o uso da TFD-ALA em macrófagos ativados, elucidando também o entendimento sobre seu metabolismo bioenergético e a peroxidação lipídica pós TFD.

Este estudo ampliará o entendimento sobre o uso da TFD em macrófagos ativados pela TFD, associada ao uso de LPS, auxiliando na elucidação do

mecanismo de citotoxicidade da TFD. Os resultados obtidos em tal projeto servirão de subsídio para a aplicação futura da TFD *in vivo* com paralela avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, analisadas experimentalmente *in vitro*, assim como na avaliação da viabilidade e do metabolismo celular.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Geral

O objetivo desse projeto foi determinar o metabolismo bioenergético, os níveis de TNF- $\alpha$ , a produção de óxido nítrico e a peroxidação lipídica por macrófagos após o emprego da Terapia fotodinâmica mediada por ALA.

### 2.2 Objetivos Específicos

- i) Determinar a fluência de luz e da dose da pró-droga máximas que não influenciem a viabilidade celular;
- ii) Investigar a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais estimulados pelo LPS, pela TFD e pelo LPS associado à TFD;
- iii) Investigar a produção de óxido nítrico por macrófagos tratados com terapia fotodinâmica.
- iv) Determinar quantitativamente a peroxidação lipídica causada pela TFD em macrófagos peritoneais.
- v) Avaliar através da microcalorimetria de condução as alterações bioenergéticas em macrófagos tratados com terapia fotodinâmica.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Terapia Fotodinâmica

#### 3.1.1 Definição

Atualmente a terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento para várias enfermidades, como câncer, doenças pele, estética facial, infecções gerais e até mesmo bucais. Sua definição engloba não apenas seu uso, mas também seu mecanismo de ação. A definição de Agarwal e colaboradores (1991) (usada na Introdução deste trabalho), entre tantas, talvez englobe mais eventos desse mecanismo complexo, mas por outro lado limita seu uso a lesões de câncer. Isto poder ser explicado porque a TFD foi inicialmente idealizada para tratamento de câncer. No entanto, um ano antes do artigo de Agarwal, Kennedy et al. (1990) iniciaram estudos com ALA (ácido 5-aminolevulínico) e com MAL (aminolevulinato de metila) introduzindo o uso da TFD na dermatologia. A partir desse estudo a TFD ganhou novas dimensões de tratamento.

A TFD é uma modalidade terapêutica oxigênio dependente (DOUGHERTY et al., 1998; ORTEL et al., 2009) que envolve a aplicação de uma droga (FS ou corante) utilizada de maneira tópica ou no tecido a ser tratado e em seguida aplicação de uma luz visível (laser, lâmpadas ou LED) (PAULINO et al., 2005) com o comprimento de onda pré-determinado (PAULINO et al., 2005; WEI et al., 2007; KONOPKA e GOSLINSKI, 2007; ORTEL et al., 2009), a qual se espera uma reação com liberação de substâncias que podem atuar em locais diferentes das células (parede da membrana celular / plasma) levando ao vazamento do citoplasma e ruptura das hélices do ácido nucléico, entre outros danos (ORTEL et al., 2009; WAINWRIGHT, 1998). Em concentrações e doses terapêuticas a droga e a luz, separadamente, não são citotóxicas (PAULINO et al., 2005), assim a TFD não é genotóxica e não produz toxicidade cumulativa (ORTEL et al., 2009). O tratamento é seletivo e não invasivo por causa do seu processo fotoquímico e também porque

exerce influência nas células do sistema imunológico (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2011).

### 3.1.2 Rumos para as pesquisas com TFD

O uso da TFD também tem se estendido para tratamento de doenças infecciosas e terapias odontológicas (ACKROYD et al., 2001; PAULINO et al., 2005), como tratamento de periodontite (ROVALDI et al., 2000), infecções locais (DAI et al., 2009) e além de células humanas, em bactérias, levedura e vírus (PAULINO et al., 2005). Assim estudos com TFD estão levando seu uso, não só tratamento oncológico, mas também em outras áreas, como Dermatologia no tratamento de acne, verrugas e na Odontologia para leucoplasia oral, líquen plano, tratamentos de infecções bacterianas, fúngicas e virais (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007) e doenças periodontais (MALIK et al., 2010).

O estudo da TFD mostra sua expressão sobre proteínas de estresse como a HSP70 em macrófagos e em bactérias (BOLEAN et al., 2010). As bactérias são resistentes ao estresse oxidativo (particularmente as proeminentes de espécies reativas de oxigênio - ERO's) e danos oriundos do estado aeróbio, por isso elas têm que lidar com o dano oxidativo. Esse estresse oxidativo primeiro leva a produção de ERO's (ex: peróxido hidrogênio, radical superóxido, radical peridroxil e outros metabólicos tóxicos) que são capazes de transferir elétrons para regiões de dano oxidativo. (MARQUIS, 2004; PAULINO, 2006).

Estudos indicam que certas bactérias são inativadas quando associada o azul de toluidina ou azul de metileno após TFD. E também com moléculas mais complexas como, alumínio ftalocinina dissulfonada ou a zinco Ftalocianina (PAULINO, 2006).

Experimento com *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis* foi empregando FS derivado de hematoporfirina e irradiado com luz visível vermelha com espectro 630 nm. Os autores relatam a importância da concentração da droga e sua absorção em estudos cinéticos dizendo que a quantidade de droga ligada as células aumenta à medida que sua concentração eleva na mistura de incubação e isto provavelmente se deve a saturação dos sítios de ligação da droga (SHAWAR e COOPER, 1990).

Park e colaboradores (2010) mostram a TFD como sendo uma alternativa eficaz para o tratamento antimicrobiano e está ligada com um elevado nível de oxigênio reativo intermediário (ROI) (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2011).

Bolean e colaboradores (2010) fizeram experimento com *Streptococcus mutans* para testar expressão de GroEL (proteína choque térmico HSP-60 por ter peso molecular de ~ 60KDa) em TFD com fotossensibilizador Rose Bengal. A expressão de HSPs (proteínas de choque térmico) após TFD foi semelhante à induzida por estresse osmótico. Nenhuma degradação de DNA foi observada após TFD de *S. mutans*. Em concentrações adequadas o Rose Bengal associado à Luz promove morte do *Streptococcus mutans* sem causar danos nos fibroblastos. Eles observaram que a TFD causa em *S. mutans* morte celular com o uso do Rose Bengal, mas que são necessários mais estudos porque a TFD envolve muitos sítios de ações.

Paulino e colaboradores (2005) investigaram o efeito da TFD em *Streptococcus mutans* com Rose Bengal usando um fotopolimerizador odontológico (fonte de luz não laser de 400-600 nm) irradiada por 20 segundos e em seguida avaliada a viabilidade celular. Observou-se que a luz (*per se*), não é tóxica, e no escuro, Rose Bengal é tóxico somente às células testadas em concentrações superiores a 5,0 µmol/litro. Sob exposição à luz, as concentrações de Rose Bengal acima de 0,5 µmol/litro matou todos *S. mutans*. Portanto, de acordo com o propósito deste trabalho, a fotoativação de Rose Bengal usando o fotopolimerizador portátil foi eficiente na inativação de bactérias.

Rovaldi e colaboradores (2000) usaram vários organismos entre anaeróbicos e aeróbicos com um fotossensibilizador derivado de porfirina conjugado a clorina e6-(Lys) 5-OH (CE6-5K) e o produto final CE6-SK (clorina e6) mostrou atividade *in vitro* contra um espectro limitado de bactérias, clorina e6 conjugado para pentalyisin e mostrou atividade *in vitro* contra todos os microrganismos orais. A fonte de luz usada foi um diodo de laser com comprimento de onda de 662 nm. Foi observada redução das bactérias na bolsa periodontal o que pode significar tratamento com TFD em doença periodontal.

Dias e colaboradores (2010) avaliaram a citotoxicidade da TFD em células L929 e MDPC-23 com Photogen® associado com LED (diodo emissor de luz azul). Eles puderam demonstrar um predomínio de morte celular por necrose relacionado com altos níveis de ERO's (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2011).

Kawczyk-Krupka e colaboradores (2011) fizeram experimento *in vitro* para avaliar a ativação de macrófagos durante a TFD e também a influência do ALA na resposta imune. Macrófagos murino J-774A.1 foram incubados com diferentes concentrações de ALA (125, 250, 500, e 1000  $\mu\text{M}$ ) e irradiados com uma fonte de luz VIS (fonte de ions versátil) (400-750 nm) com 5, 10 e 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Os efeitos da ALA-TFD foram avaliados com base na viabilidade celular e a atividade secretora dos macrófagos com óxido nítrico (NO); intermediários de oxigênio reativo (ROI); fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); e fator nuclear kB (NF-kB); proteínas (p50 e p65). Os resultados de viabilidade celular, medida através do teste de MTT aos 5, 10 e 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , foram confirmados pelo vazamento LDH (lactato desidrogenase) liberado a partir de células mortas. Em doses mais baixas de níveis de energia de LDH não foram significativas, inicialmente, mas eram mais elevadas em 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Com 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  a concentração de TNF- $\alpha$  foi diminuída, o que era provavelmente devido à influência citotóxica de maior irradiação, assim a sobrevivência celular após TFD decresceu gradualmente com doses crescentes de luz. A 5 e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , a viabilidade celular era comparável com o grupo controle. A partir desse dado, as investigações seguintes foram realizadas com estas doses de energia, utilizando diferentes concentrações de ALA. Com isso, a sequencia do experimento foi revelado que o ALA-TFD leva a atenuação do nível de NF-kB p50 / p65 e redução do nível de IL-1 $\beta$ . Subsequentemente pesquisa revelou que o maior aumento de quimioluminescência foi em 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , com a seguinte diminuição em 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . A estas doses de energia, utilizando diferentes concentrações de ALA, observou-se que quanto mais elevadas doses de energia, maior é a diminuição observada na liberação de NO. A atividade secretória das células foi também encontrada por ser dependente da concentração de ALA. Quanto à concentração de ALA maior atividade secretora foi encontrada em 500  $\mu\text{M}$ . Com elevada dose de energia após TFD houve aumento de ROI e TNF- $\alpha$  (que sugere um fator adicional para a completa irradiação do tumor) e diminuição de NF- $\kappa\beta$ , p50/p65 e IL-1 $\beta$  (pode inibir progressão do tumor).

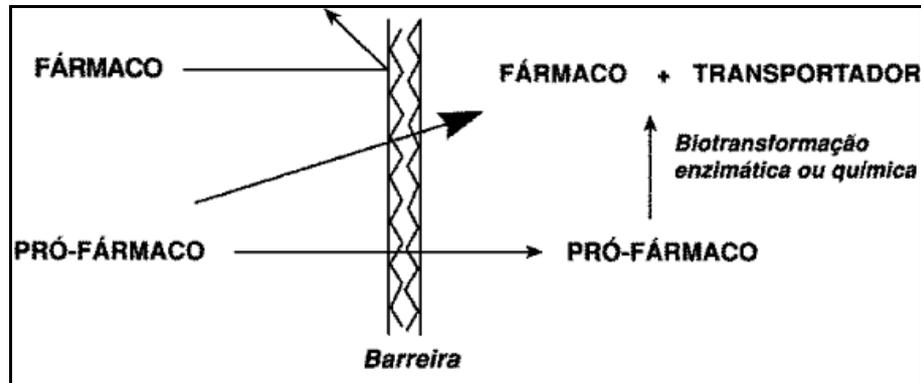
Wei e colaboradores (2007) demonstraram que a ação da citocina IL-6 é atenuada, em células epiteliais tumorais, e que a regulação por trans-sinalização de IL-6 é estabilizada. Células que perderam seu receptor de membrana IL- $\alpha$  devido à TFD responderam ao tratamento com complexo IL-6-IL-6R (Hyper-IL-6) com ativação de transdutores de sinais e ativador de transcrição (STAT3) e ERK. As células tratadas com TFD, as quais foram mantidas durante recuperação pós-TFD em presença de IL-6 ou Hyper-IL-6, mostraram uma supressão de proliferação é elevada. A atenuação da proliferação celular mediada pela trans-sinalização por IL-6 também é efetiva *in vivo* e pode ser detectável pelo aumento na cura tumoral do Colon26 pelo tratamento TFD combinado com Hyper-IL6. Os dados sugerem que o meio tumoral pós-TFD contem os componentes necessários para estabilizar efetivamente a trans-sinalização por IL-6, então provendo maneiras para maior controle tumoral.

Evans et al. (1990) fizeram experimentos com macrófagos murino. Relataram que *in vitro* o efeito direto da TFD é na membrana celular e *in vivo* há um efeito indireto no dano da rede capilar no tumor que resulta em hemorragia, trombose e colapso vascular.

### **3.1.3 Precursor de corante**

Uma grande parte dos fármacos utilizados atualmente na clínica não são necessariamente fármacos, mas sim pró-droga (FIGURA 1). O termo pró-droga denota aqueles compostos que necessitam de uma biotransformação prévia para que possa promover seu efeito farmacológico (CHIN e FERREIRA, 1999).

FIGURA 1: Formação esquemática do conceito de pró-droga.



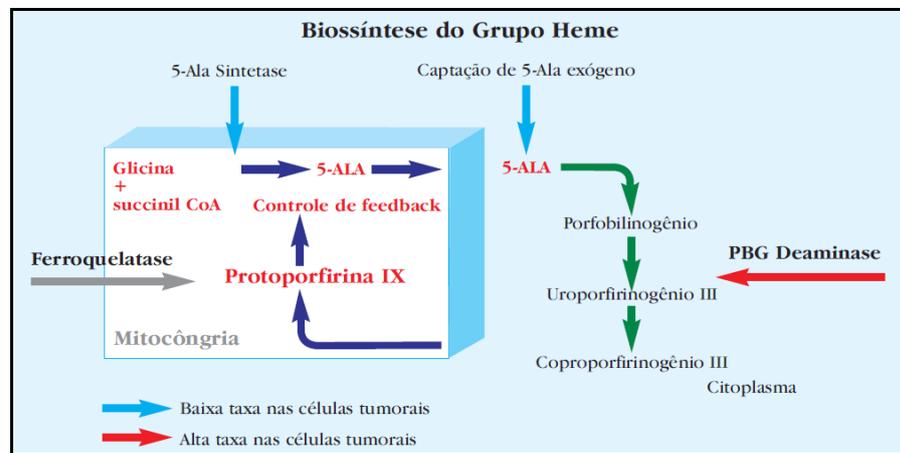
Fonte: CHIN e FERREIRA, 1999.

O ALA é formado a partir de duas rotas alternativas, uma no estroma das plantas e em algas, a partir do glutamato ou alfa-cetoglutamato, com participação de três enzimas (rota do carbono 5' da biossíntese do ALA). Nos microrganismos, é comum sua produção envolver o ácido levulínico, a substituição de nitrogênio em aminoácidos, materiais de início de ciclo, como furfurilamina, 5-hidroxi-2-piridone e N-metoxicarbonil-piperidinonas (FUKUDA, 2005) e a outra através da enzima mitocondrial ALA sintetase a partir de uma molécula de Succinil-Coa e outra de Glicina (DOUGHERTY et al., 1998; FUKUDA, 2005). No interior da mitocôndria o ALA utiliza o grupo Heme da hemoglobina via enzimas para produção de porfirina endógena (FIGURA 2) (DOUGHERTY et al., 1998; FUKUDA, 2005; MORTON et al., 2008), assim, inibe o primeiro passo da síntese de porfirina causando o acúmulo no tecido de protoporfirina IX (PpIX) (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). Assim, o ALA endógeno é convertido enzimaticamente em PpIX que é um fotossensibilizador endógeno produzido pela célula, no entanto existe diferença no metabolismo da via biosintética do grupo Heme porfirina entre as células normais e as do câncer o que faz com que o mecanismo de acumulação da protoporfirina específica não seja claramente demonstrado. O acúmulo da PpIX é devido a capacidade limitada para uma reação ferroquelase e a enzima catalisa a inserção de íons de ferro em PpIX em forma de fotoheme, assim maior quantidade de ALA absorvido na célula leva maior acúmulo de PpIX o que aumenta potência do fotodano, e a produção de heme no tumor é maior o que demonstra a maior necessidade de ferro na reação (YAMAMOTO et al., 2006). Por causa desse processo enzimático aumenta o nível

da complexidade para TFD, mas também garante a melhora na seletividade e eficácia em geral (ORTEL et al., 2009).

Já no citoplasma da célula, 2 moléculas de ALA formam o porfobilinogênio (PBG) e 4 moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio III. Este último é convertido em coproporfirinogênio III e, novamente no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX, que é convertido em PpIX (Protoporfirina IX), pela ação da protoporfirinogênio oxidase (TOREZAN et al., 2009).

FIGURA 2: Captação do ALA exógeno e biossíntese no Heme.



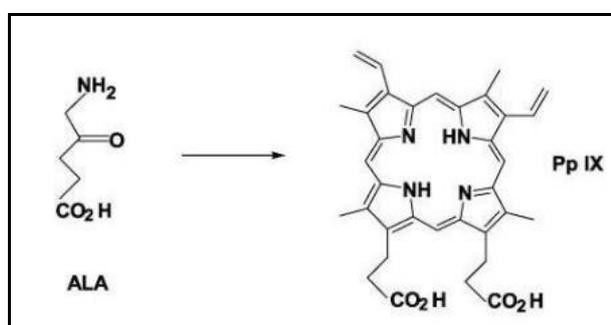
Fonte: TOREZAN et al., 2009.

A administração de ALA exógeno induz aumento dos níveis intracelulares de PpIX (FIGURA 3), levando seu acúmulo no tecido (FUKUDA et al., 2005), e assim quando ativado pela luz na presença de oxigênio, resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007); e na presença de NO, resulta em espécies reativas de nitrogênio (ERN's) (DALBASTI et al., 2002) que podem causar danos em proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outros componentes celulares. O PpIX heme endógeno tem velocidade limitada de conversão e é um fotossensibilizador eficaz (FUKUDA et al., 2005). O excesso de ALA exógeno produz porfirina que quando fotoativada gera o efeito no FS para TFD de fluorescência para fotodiagnóstico em câncer superficial em estágio inicial (FIGURA 4) (FUKUDA et al., 2005; DOUGHERTY et al., 1998).

A síntese normal de ALA, no interior da célula, é controlada pela enzima ALA sintetase que, por sua vez, é inibida pelo acúmulo de Heme (feedback negativo). Se

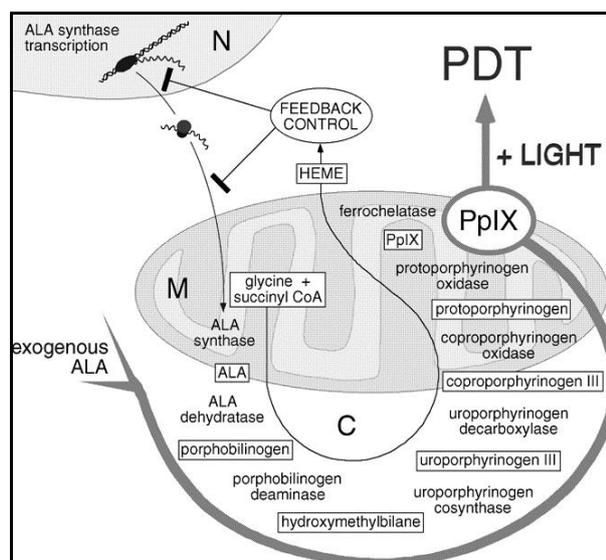
um excesso de ALA exógeno for aplicado topicamente, ocorrerá rápida passagem através da epiderme anormal e posterior conversão à PpIX no interior da mitocôndria. Uma vez que a conversão da PpIX para Heme é uma reação lenta, as células tendem a acumular grande concentração de PpIX. O acúmulo excessivo de PpIX no interior da mitocôndria induz à sua difusão para o retículo endoplasmático e membrana celular, ambos alvos finais do dano celular induzido pela TFD (TOREZAN et al., 2009).

FIGURA 3: Esquema resumido da conversão de ALA em PpIX.



Fonte: SIMPLICIO et. al. 2001

FIGURA 4: Conversão bioquímica do ALA para a PpIX e posterior uso da TFD.



Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed6&part=A9639>

O uso de PpIX derivada de 5-ácido aminolevulínico (ALA) tem sido amplamente investigado para TFD (SHARMA et al.; JAJOO; DUBE, 2007), no entanto seu uso foi recentemente demonstrado, sendo o primeiro relato de sucesso

no tratamento com ALA-TFD em 1990 com Kenedy e colaboradores em terapia para lesões na pele (DOUGHERTY et al, 1998; FUKUDA et al, 2005).

A PpIX pode ser ativada por fontes de luz vermelha (635 nm) ou azul (405-420 nm) para promover destruição tecidual. O ALA não é um fotossintetizador por si só, ele é metabolizado em PpIX.

Os agentes sensibilizantes mais testados são o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e o aminolevulinato de metila (MAL) (FIGURA 5).

FIGURA 5: Estrutura química do MAL / Metvix® (Photocure ASA, Oslo, Noruega).



Fonte: SIMPLICIO et al., 2001.

ALA e seus ésteres metilados (aminolevulinato de metila - MAL) são pró-drogas que administrados de forma inativa que sofrem biotransformação passando a produzir metabólicos ativos para melhorar a absorção ou ação da droga. Essas drogas são relativamente seletivas ao tecido alvo por causar alterações na permeabilidade superfície e no metabolismo do tumor por porfirina. ALA permanece 48 horas na pele com meia vida de cerca 24 horas e o éster metilado MAL o PpIX sai da pele de 24 - 48 horas (MORTON et al., 2008).

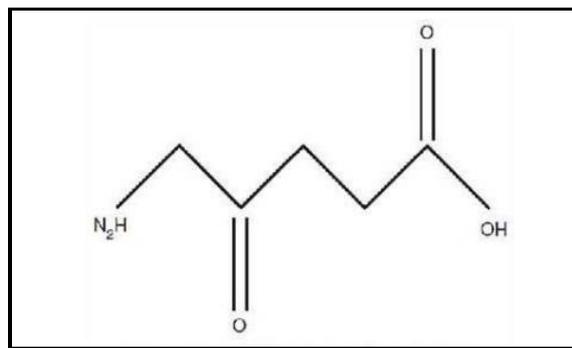
O tecido neoplásico tem uma absorção maior do ALA e do MAL, produzindo porfirinas fotoativas, diferente do tecido não neoplásico. Existem evidências de alta seletividade do MAL nos tecidos neoplásicos. Após a aplicação tópica do MAL e do ALA nos tecidos neoplásicos, deve-se deixar um tempo suficiente para permitir a produção e acúmulo de porfirinas antes da ativação pela luz. Logo após o MAL penetrar a célula ele é rapidamente desmetilado a ALA e, portanto seus passos metabólicos subsequentes são os mesmos do ALA. Ambos levam ao estágio final de síntese da PpIX.

O MAL é lipofílico, sua difusão é passiva, não necessitando assim de gasto de energia, fazendo com que sua penetração nas células malignas seja mais

significativa. Sendo mais lipofílico que o ALA essa característica permite ao MAL uma melhor distribuição através das membranas celulares. Tem sido utilizado com efetividade como um agente fotossensibilizador tópico na TFD de lesões epidérmicas como queratose actínica e CBC. O regime terapêutico ótimo consiste na aplicação do MAL de 160 mg/g por 3 horas antes da iluminação com luz vermelha (570-670 nm), em uma dose de luz total de 75 J/cm<sup>2</sup>. Aplicado topicamente penetra na pele e induz a alta produção de metabólitos porfirínicos nas células, levando a um acúmulo intracelular de porfirinas fotoativas.

O ALA é um aminoácido (FIGURA 6) que se acumula com mais intensidade nas células displásicas e de proliferação rápida e estimula a produção da protoporfirina IX (PpIX) por vias enzimáticas na rota de biossíntese do heme. Quando a pele tratada com ALA é exposta a uma fonte de luz que inclui o espectro de absorção da PpIX (400-730 nm), esta é fotoativada, gerando espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular.

FIGURA 6: Estrutura química do ácido 5-aminolevulínico (ALA). Substituindo o átomo H de O-H ligação no terminal de carbonilo da molécula, os diferentes ésteres de ALA são formados.



Fonte: FUKUDA et al., 2005.

ALA é hidrofílico e sua difusão é feita por mecanismos de transporte ativo, como a bomba de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, e depende de beta aminoácidos e do GABA como transportadores.

ALA tem sua administração tópica e é aplicado em vários campos da medicina como, urologia, gastroenterologia e dermatologia (YAMAMOTO et al., 2006). Seu nome comercial é o Levulan®. É usado para tratamento com TFD

principalmente em carcinoma de células basais (FUKUDA et al., 2005; MORTON et al., 2008), mas outros tipos de câncer recentemente tratados com ALA-TFD inclui bexiga, pulmão, cavidade oral, esôfago, endométrios e cérebro, além de também em Doença de Paget, escamoso carcinomas de células patch, e cutânea fase de placa Linfomas de células T (FUKUDA et al., 2005) e lesões cutâneas pré-cancerosas tais como queratoses e doença de Bowen (FUKUDA et al., 2005; MORTON et al., 2008) ou em tratamento de acne e antienvelhecimento (MORTON et al., 2008).

O MAL é lipofílico o que garante melhor penetração na lesão, seu nome comercial é Metivix® e além de ser usado em QA também em Doença de Bowen (DB), carcinoma basocelular superficial (CBC). O ALA apresenta níveis mais altos de PPIX que MAL (MORTON et al., 2008).

#### **3.1.4 Mecanismos celulares e moleculares - efeitos dos radicais livres sobre as células**

O primeiro passo no processo de fotossensibilização de uma célula é a ligação do agente fotossensível às membranas plasmáticas e sua permeação através das mesmas para o citosol. Em princípio, a permeação pode ocorrer por difusão, por um sistema de transporte ativo ou por endocitose. Os processos passivos, como difusão e a osmose, resultam das diferenças de concentração das substâncias dentro e fora da célula, isto é, o movimento de uma substância para um gradiente de menor concentração. Os processos de transporte ativo envolvem o movimento de substâncias através de uma membrana celular contra o gradiente de potencial. Este processo usualmente envolve o uso de sistemas carreadores de drogas (PAULINO, 2006).

Em geral, os agentes sensibilizantes lipofílicos (ftalocianinas) são captados pela célula por penetrarem diretamente pela membrana plasmática, e essa captação aumenta em proporção direta com a lipofílica. As moléculas hidrossolúveis (derivados dos xantenos), entretanto, são captadas por pinocitose (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010).

A TFD deve ocorrer na presença de oxigênio (DOUGHERTY et al., 1998). Assim, a energia resultante do corante fotossensibilizado dá origem a espécies reativas de oxigênio – ERO's (como oxigênio singleto -  $^1O_2$  e radicais livres)

(KONOPKA e GOSLINSKI, 2007) ou espécies reativas de nitrogênio – ERN's (GUPTA et al., 1998). Com isso, a luz na TFD ativa as moléculas que produzem ERO's desencadeando destruição dos tecidos indesejáveis (REEVES et al., 2010), como inativação da célula tumoral ou pela morte de alguns microrganismos (FOOTE, 1991). Ocorre assim uma sequência de processos que leva ao dano oxidativo das células do estroma e parenquimas tumorais (WEI et al., 2007). De uma maneira mais específica, quando a droga absorve a energia da luz decai do seu estado energético (excitado) e essa energia é transferida à molécula de oxigênio (no estado fundamental tripleto  $^3O_2$ ) que, por sua vez, passa a um estado mais energético (estado excitado singlete) (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007).

A oxidação dos constituintes celulares danifica as membranas plasmáticas e as organelas celulares, com subsequente alteração de permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelular. A inibição de enzimas mitocondriais parece ser o evento chave na morte por TFD. Uma resposta apoptótica a TFD foi relatada por Agarwal e colaboradores em 1991. Essa resposta pode ser diretamente induzida pela TFD, sem precisar de vias de transdução de sinais intermediário, que podem faltar em certas células neoplásicas resistentes a drogas. A morte celular por TFD não parece depender da fase do ciclo da célula ou de fatores genéticos (ISSA e MANUELA-AZULAY, 2010).

O oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) é citotóxico e atua como agente fotoquímico da maioria dos fotossensibilizantes (ORTEL et al., 2009), em geral sua formação pode iniciar uma série de eventos citotóxicos que induzem danos aos componentes celulares e conseqüentemente a morte da célula por necrose e ou apoptose (BRANCALEON e MOSELEY, 2002). A vida útil do oxigênio singleto em meio aquoso é de 4  $\mu$ segundos com intervalo de difusão de 125 nm. No entanto esses valores baixam muito no meio celular, sendo vida útil de 10 a 40 ns e difusão de 10 a 20 nm. Isso significa que a distância que o singleto reage com moléculas nesse percurso em locais subcelulares são grandes, aumentando a extensão do dano celular (ORTEL et al., 2009). O raio de ação do  $^1O_2$  é curto (< 0,02 mm), assim sua migração é limitada o que influencia no rendimento da fluorescência. A limitação de migração do  $^1O_2$  interfere no local inicial da célula e nos danos aos tecidos pela TFD porque influencia diretamente na localização do FS, por isso o

dano (principalmente por oxidação e sem atingir tecido vizinho) nos alvos subcelulares depende a tensão de  $O_2$  e da concentração do FS (DOUGHERTY, 1998). Por isso, devido à limitada migração do oxigênio singlete de seu local de origem ao sítio de ação, as regiões de localização dos agentes fotossensíveis estão intimamente relacionadas com a região de ação da TFD (PAULINO et al., 2005).

### **3.2 Formação de NO**

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. É produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). O NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. É um mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas capaz de destruir patógenos e células tumorais (DUSSE et al., 2003).

Como para algumas citocinas, há também o estímulo para a geração de óxido nítrico (NO), que pode ser induzido por várias condições de estresse, inclusive a terapia fotodinâmica (YAMAMOTO et al., 2006).

Os macrófagos e neutrófilos geram NO como resposta imunitária e para homeostase de vasos. Essa homeostasia se dá pela inibição contração muscular e agregação plaquetária de leucócitos ao endotélio (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2011). Na TFD com o uso de drogas específicas ou doadores de óxido nítrico também se pode produzir espécies reativas de nitrogênio (ERN's). O uso de NO na TFD pode aumentar o estresse oxidativo, com maior produção de ERN's, melhorando os resultados de morte celular (MARANHO et al., 2009).

NOS (NO sintase) apresenta formar diferentes. O NOS1 (neuronal) e NOS3 (endotelial) que são ativados por íons de cálcio e produzem concentração de NO em nanomolares. E NOS2 (induzível) induzido em condição de stress e produz várias concentrações micromolares de NO. Essas diferentes isoformas são expressas em vários tipos de tumores (NATHAN e XIE, 1994).

NO gerado por NOS (NO sintase) envolve progressão e supressão dos tumores. Função precisa do aumento NO é desconhecida, mas é sabido que ele inibe funções respiratórias e altera as vias de transdução de sinal (BROWN e BORUTAITE, 2004). Outra visão seria o tratamento de células doadoras de NO comprometer o metabolismo de Fe e a biossíntese no acúmulo de PpIX (COOPER, 1999).

Yamamoto et al. (2006) investigaram em células cancerígenas de DNA a indução de fotodano de ALA e acúmulo de porfirina e o papel do óxido nítrico (NO) nesse acúmulo específico de protoporfirina e ALA-TFD transfectedo em NOS2. O aumento da produção de NO2 conduziu à acumulação da protoporfirina com uma concomitante diminuição de ferroquelatase, o passo final da enzima de biossíntese do Heme. Quando as células de rato *macrophage-like* RAW264.7 foram cultivadas com interferon -  $\delta$  e lipopolissacarídeo-c ocorreu a indução da expressão de NOS2. A adição de ALA a estas células conduziu à acumulação de protoporfirina e morte celular após a exposição à luz. Estes resultados indicam que a geração de NO aumenta a acumulação induzida por ALA de protoporfirina IX e subsequente fotodano em células cancerosas, diminuindo os níveis de ferro mitocondrial contendo enzimas. Assim, com base no fato de que a produção de NO em células cancerosas é elevada, NO nas células é responsável pela melhora da atuação de ALA - TFD.

### 3.3 Efeito apoptótico e morte celular

A morte celular pode ser por necrose ou apoptose e na TFD o processo é definido com a célula alvo atingida pelo FS. A necrose é a morte celular seguida por autólise, onde ocorre degradação dos componentes celulares realizados pelas enzimas da própria célula, liberadas pelos lisossomos. Já a apoptose é um modo de “autodestruição celular” que requer energia e síntese protéica, sendo controlada na mitocôndria (BRASILEIRO FILHO, 2011).

A apoptose é o meio de o organismo iniciar a morte celular pelo material genético, com fragmentação do DNA nuclear e com liberação mínima de produtos inflamatórios, como enzimas lisossomais (DOUGHERTY et al., 1998). O efeito apoptótico garante eficácia da TFD em diferentes tumores (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007), isso porque ocorre uma aceleração no tempo de início da

apoptose das células normais de 1 a 3 dias para a TFD, após aplicação da luz, com tempo de 30 minutos. E o melhor, nem DNA, RNA ou síntese de proteínas são necessárias nesse período. Com isso na TFD a apoptose ocorre direto, sem envolvimento sinal de transdução, e isso é bom porque esse processo está ausentes em algumas drogas resistentes a células neoplásicas (DOUGHERTY et al., 1998), o que reafirma a procedimento de usar TFD em combinação com outros tratamentos anticâncer. Por isso a morte celular por apoptose na TFD não deve depender do ciclo celular ou da quantidade de fatores genéticos porque pode afetar o efeitos de outras drogas (DOUGHERTY et al., 1998). Por outro lado, quando o FS é absorvido na membrana plasmática ele desencadeia uma série de eventos, com consequências a longo alcance colocando a TFD em vias imunológicas com indução do processo de inflamação. Esses eventos são o processo de sinal transdução, aumento expressão proteínas stress e rápida resposta de genes para ativação morte por apoptose e aumento regulação de citocinas (TNF e interleucinas), que são mediadores inflamatórios (DOUGHERTY et al., 1998).

A necrose as células cancerígenas leva a hipóxia com ativação macrófagos associados a tumores (TAM's) (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2011). A necrose isquêmica parece ser o principal mecanismo de destruição da lesão submetida a TFD com agentes sistêmicos, enquanto, com agentes tópicos, a morte celular decorre do efeito direto do oxigênio singlete.

As vias de necrose e de apoptose, ativadas com o uso da TFD consiste na morte celular programada como um mecanismo genético normal do ciclo celular (DOUGHERTY et al., 1998), também podem ser ativadas. Agarwal e colaboradores (1991) relatam que TFD pode induzir apoptose, tanto *in vitro* como *in vivo*, evidenciado em células de linfoma L5178Y de ratos. Essa resposta pode ser diretamente induzida pela TFD, sem precisar de vias de transdução de sinais intermediários, que podem faltar em certas células neoplásicas resistentes a drogas. A morte celular por TFD não parece depender da fase do ciclo da célula ou de fatores genéticos (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010).

### 3.4 A terapia fotodinâmica e a resposta inflamatória

A inflamação é um importante promotor do tumor por liberar citocinas (IL-1, IL-6, TNF) que geram crescimento e progressão do tumor. No entanto, ainda é difícil diferenciar a intensidade de reação inflamatória no tecido normal com o tecido do tumor (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011).

A resposta inflamatória é, portanto, iniciada e conduzida por mediadores de origem celular e também por aqueles de origem plasmática que vão promover os sinais característicos desta resposta: dor, calor, rubor e tumor, que podem vir acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado. Assim, a reação inflamatória manifesta-se clinicamente como um fenômeno estereotipado e independente da natureza do agente agressor, mediado por vários fatores, podendo ocorrer somente pequenas variações em determinadas situações, dependentes do tecido ou órgão afetado e da coexistência de estados patológicos, que alterariam a capacidade do organismo de mobilizar as fontes de defesa (PAULINO, 2006).

Como resposta a TFD ocorrem múltiplos sinais sistêmicos de inflamação que são ativados pela liberação de citocinas (ORTEL et al., 2009). Assim, além da morte celular, por necrose e/ou apoptose, a TFD pode conduzir fechamento de vasos sanguíneos e linfáticos do tumor e também ser associada com a modulação da resposta imunitária e inflamatória do local (DOUGHERTY et al., 1998; CASTANO, MROZ e HAMBLIN, 2006; KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011). A ativação da resposta imunitária na TFD é caracterizada pela infiltração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos no tecido tratado. A TFD provoca inflamação aguda, expressão proteínas choque térmico, invasão e infiltração do tumor por leucócitos e pode aumentar no tumor os derivados antígenos das células T. Assim, fica claro a influência na TFD nas células do sistema imunitário e regulador e conseqüentemente na sua incidência no crescimento e metástase do tumor, porque o câncer estimula a infiltração dos macrófagos mais a TFD age como imunossupressor (para a modulação dessa atividade secretora de macrófagos) o que eleva a inativação das células do tumor e diminuindo sua expansão (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011).

A principal característica do processo inflamatório e a liberação de substâncias vasoativas, componentes do complemento, proteinases, peroxidases,

citocinas, fatores de crescimento e outros imunorreguladores. Os alvos da TFD incluem as células tumorais, a microvasculatura do tecido e os sistemas inflamatório e imune do hospedeiro. Assim, parece claro que a combinação de todos esses componentes é necessária para um controle do tumor a longo prazo. Existem evidências do aumento da regulação de interleucina 1- $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF) (ISSA e MANUELA-AZULAY, 2010).

Estudos de TFD tratam da liberação de diferentes citocinas, como TNF- $\alpha$  (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011), IL-6 (WEI et al., 2007; KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011), IL-1 $\beta$  (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011). Isto se dá pelo tratamento de tumores diversos, o que diferencia o controle na regulação dos genes e também pelo tempo de vida curta das proteínas devido a altos níveis de proteinase e RNAase em tecido tumor após TFD (DOUGHERTY et al., 1998). Alguns FS, para estimular a hematopoese em ratos, podem induzir citocinas ou TNF- $\alpha$  independente do tratamento com luz. O fato é que as reações inflamatórias em tecidos normais são diferentes da região do tumor por causa da seletividade do dano no tecido pela TFD (DOUGHERTY et al., 1998).

No início da TFD ocorre a modificação oxidativa que imediatamente ocorre a fotoativação de lipídeos da membrana plasmática levando a aceleração da degradação fosfolipídica e geração de mediadores inflamatório, que são citocinas potentes liberadas pelos neutrófilos e macrófagos (WEI et al., 2007; KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). Ortel e colaboradores (2009) relatam que os efeitos da TFD frente a resposta imunológica é a liberação de histamina, prostaglandina D2, Fator de Necrose Tumoral por macrófagos. Estudos mostram a infiltração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos em tecidos tratados com TFD o que indica a ativação da resposta imunitária (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011; KONOPKA e GOSLINSKI, 2007) e ativação de linfócitos T específicos durante e após a TFD (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). A inflamação é um mecanismo importante para controle tumoral pela TFD porque estimula a resposta autoimune (WEI et al., 2007; GOLLNICK et al., 2003). Por isso, o estudo da liberação dessas citocinas é muito importante para compreensão da TFD.

Evans e colaboradores (1990) relatam pela primeira vez que TFD induz

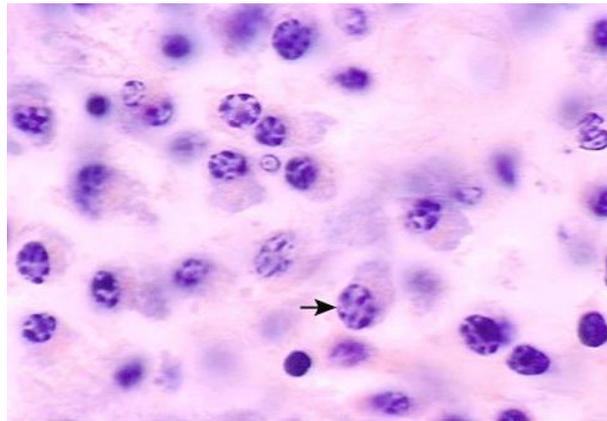
citotoxicidade em macrófagos murinho. Nesse experimento foram utilizados camundongos (B6) C57BL/6 onde coletaram macrófagos peritoniais. Antes injetaram tioglicolato no peritônio, segundo o autor, não só para estimular o aumento do número celular, mas também em resposta ao estímulo da produção de TNF. O FS usado foi Protofrin II (PII) 25 µg/ml. Mais especificamente, os macrófagos foram transferidos para 96 poços (100 µl/poço). O meio de cultura RPMI 1640 sem fenol pode proporcionar um meio claro para realização da TFD. O grupo controle foram células não expostas com PII. Grupo I sem LPS e II com LPS (20µg /ml) em paralelo aos poços com e sem PII, aplicando ou não a luz. A fonte de luz usada foi raio X com luz filtrada com fina folha acetato rubi vermelho (595-700 nm) com pico de 630 nm. As placas foram elevadas acima da fonte de luz numa plataforma transparente para dissipar calor com ventilador de conversão de correntes de ar. O tempo de exposição foi de 1, 2, 3, 4, 5, 15 e 30 mim, sendo que, por isso a intensidade de luz variou entre 180-5400 J/m<sup>2</sup>. Foi avaliada a viabilidade celular e a produção de TNF e a relação entre os dois após 18 horas com e sem LPS. Com a viabilidade entre 35-43% sem LPS a produção de TNF aumenta, acontecendo o mesmo entre 36-49% com LPS. No entanto quando a morte celular ultrapassa 50% os níveis de TNF abaixam. Em todos os grupo foi realizado ensaio de MTT de viabilidade após 18 horas depois TFD porque os macrófagos poderiam não proliferar. Em nenhum dos grupos o tempo de 30 min detectou produção de TNF. Assim, nesse experimento macrófagos associado a tumor quando sensibilizado com PII á luz estimula a produção de TNF, não somente associado com regressão do tumor in vivo, mas pode em parte, mediar este tumor a regredir através de efeitos na microvascularização.

### **3.5 Macrófagos**

O macrófago é uma célula do sistema imune responsável pela fagocitose de agentes externos e internos (FIGURA 7) (GARCES et al., 2008). São amplamente distribuídos em diferentes tecidos e desempenham uma função essencial no desenvolvimento da resposta imune específica e não específica (SILVA et al., 2008). O sistema da imunidade inata é mediado em maioria por macrófagos que são a maioria dos componentes do sistema mononuclear fagocitário que consiste de células de origem na medula óssea, incluindo monócitos sanguíneos, e macrófagos

teciduais (CARLOS et al., 2009). Estas células podem ser ativadas por componentes bacterianos, citocinas e produtos químicos. Quando ativados, os macrófagos produzem e liberam numerosos produtos como citocinas, radicais reativos inorgânicos, oxigênio reativo intermediário (ROI) e nitrogênio reativo intermediário (RNI), todos com atividade biológica (FORMAN et al., 2001 apud SILVA et al., 2008).

FIGURA 7: Representação de um macrófago, observado ao microscópio.



Fonte: [http://cytochemistry.net/cellbiology/medical/practice\\_exam\\_connective\\_tissue.htm](http://cytochemistry.net/cellbiology/medical/practice_exam_connective_tissue.htm)

São células encontradas por todo o corpo e diferenciadas na medula óssea, desde células formadoras de colônias até os monócitos que são as formas presentes na circulação sanguínea que, ao se migrarem para os tecidos, tornam-se macrófagos. Constituem um grupo heterogêneo de células que possuem diferentes funções. Macrófagos são uma das primeiras fontes de citocinas e liberam fator quimiotático (MNCF) que induz migração de neutrófilos (ZAMPRONIO et al., 1994).

Vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células endoteliais, linfócitos e astrócitos, produzem citocinas com atividade pirogênica (ROTH et al., 2006). Pirógenos endógenos, como as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 induzem febre. IL-1 $\beta$  é mediador primário da febre em diferentes espécies (ZAMPRONIO et al., 1994).

Durante a progressão neoplásica, macrófagos assim como outros leucócitos são recrutados para o interior da massa tumoral e iniciam a resposta imunológica. No entanto, as células cancerígenas são capazes de escapar do sistema imune que não é capaz de destruí-las completamente. Dessa forma, os macrófagos podem tanto ajudar a impedir o estabelecimento e a disseminação de células tumorais como apoiar seu crescimento (RIBEIRO et al., 2009).

Os macrófagos são importantes produtores de citocinas e óxido nítrico (NO) e bem adequado para aumentar a invasão tumoral e angiogênese, isto porque região com câncer atrai infiltração de macrófagos e estimula a angiogênese que é necessária para a expansão do tumor por favorece fatores do crescimento para células hematopoiéticas e fibroblastos (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011).

Em células cancerígenas os monócitos (diferenciam-se em macrófagos) migram para locais onde ocorre liberação de fatores angiogênicos, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), IL-6, CXC-quimiocina-ligando 8 (CXCL8), fator de crescimento vascular endotelial e fator 1 estimulante de colônia, que a promoção apoio crescimento e progressão do tumor (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011; NORMANN, 1985). Também a produção de espécies reativas nitrogênio (RNS) pela indução fator de transcrição nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) acumula mutações no DNA aumentando assim progressão das células do tumor (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011).

A necrose leva a hipóxia para a ativação dos macrófagos associados a tumores (TAMs) (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011). Koide e colaboradores (2004) fazem correlação entre o número de TAMs e diferença de prognóstico de alguns cânceres (mama, ovário, próstata).

A TFD as células estimula macrófagos, neutrófilos e linfócitos T a secretar citocinas (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011; GOLLNICK, 2003). Ativação de macrófagos por TFD contribui para um resultado eficaz de tratamento TFD (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011).

O envolvimento de macrófagos na terapia fotodinâmica tem sido relatado e estudado por Korbelick e colaboradores desde 1995. Estudos mostram que macrófagos associados a tumores acumulam até nove vezes os níveis de porfirinas presentes nas células tumorais. Esse aumento na acumulação é atribuído à associação de porfirinas a moléculas de LDL. Outro trabalho de Korbelick e colaboradores (1997) sugeriu que a ativação de macrófagos em ratos tratados com a TFD e uma imunoterapia adjuvante tem um efeito sinérgico na cura do tumor. A TFD não reduz somente a carga tumoral, mas também provoca inflamação. Acredita-se que o recrutamento de macrófagos ativados para o local inflamado é o principal fator

para uma completa erradicação do tumor (FERRARI, 2008).

Kawczyk-Krupka e colaboradores (2011) questionam em seu estudo *in vitro* qual seria a importância dos macrófagos na incidência do crescimento e progressão do tumor.

Zamprônio et al. (1994) realizou um estudo *in vitro* com macrófagos peritoneais de ratos a fim de avaliar sua atividade pirogênica após estimulação com LPS e também provável efeito dessa atividade com o número de circulação no soro de leucócitos, Fe, Cu e Zn. Os macrófagos foram estimulados por 60 minutos com dexametasona, 30 minutos com cicloheximida e 15 minutos com indometacina antes da adição de LPS. Os autores demonstraram que o tratamento dos macrófagos com dexametasona inibiu a síntese de pequenas quantidades de (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF). Os macrófagos contêm substâncias pirogênicas, mas que não estão relacionadas a IL-1 $\beta$ , IL-6, ou TNF- $\alpha$  e que atuam indiretamente ou diretamente na síntese de prostaglandina. Os autores dizem que a atividade pirogênica pode estar relacionada à diminuição do Fe no soro e nos níveis de Zn e não a neutrofilia (aumento número de neutrófilos no sangue).

Evans et al. (1990) apresenta resultado que com o aumento da exposição a luz acima de certo limite (30 minutos a uma intensidade de luz de 0,3 mW/cm<sup>2</sup>) a maioria dos macrófagos sofrem dano irreversível e ficam incapazes de produzir TNF, isso com ou sem presença de LPS.

### **3.6 LPS - Lipopolissacarídeo**

Lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula grande de um lipídio e um polissacarídeo ligados por uma ligação covalente, sendo um dos principais componentes da membrana exterior de bactérias gram-negativas.

Evans et al. (1990) usou LPS como um potente estimulador de macrófagos na produção de TNF, mas não só para fornecer um controle positivo e também para documentar qualquer outra amplificação de TNF com células tratadas com TFD.

### 3.7 Citocinas

As citocinas compreendem uma grande família de polipeptídios que incluem as interleucinas, quimiocinas, fator de estimulação de crescimento, fator de necrose tumoral e interferons (ROTHWELL, 1991). Segundo The Cytokine Handbook (1991) as citocinas podem ser definidas como “proteínas regulatórias secretadas pelas células brancas do sangue e por uma variedade de outras células no corpo; as ações pleiotrópicas das citocinas incluem numerosos efeitos nas células do sistema imune e modulação das respostas inflamatórias” (TURNBULL; RIVIER, 1999; revisado por DANTZER & KELLEY, 2007).

Particularmente, a terapia fotodinâmica ao produzir oxidação de lipídeos presentes na membrana plasmática, acelera a produção de mediadores inflamatórios. Este aumento leva conseqüentemente a um aumento na expressão de quimiocinas e citocinas que, por consequência, são importantes colaboradores nos processos tumorais (WEI et al., 2007).

Em especial, a IL-6 é geralmente uma das mais evidentes citocinas presentes nos processos tumorais em tecidos após a terapia fotodinâmica *in vivo* (WEI et al., 2007). A interleucina-1, por exemplo, tem como função mediar o processo inflamatório, e quando associada ao fator de necrose tumoral (TNF) partilha muitas propriedades biológicas. É produzida por monócitos e macrófagos, sendo que sua ação mais importante na inflamação se deve aos efeitos no endotélio, leucócitos e fibroblastos, bem como a indução das reações da fase aguda (NAOUM, 2009).

Estudos tem demonstrado a possibilidade de que uma possível produção local de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estaria induzindo a síntese de IL-6 (OKA et al., 2007), visto que, IL-1 e TNF são potentes indutores de IL-6. Harden et al. (2008) demonstraram que a IL-1 $\beta$  age de modo sinérgico com IL-6 para induzir febre, anorexia e diminuição de atividade de locomoção voluntária, reforçando a importância da IL-6 durante o processo inflamatório.

A terapia fotodinâmica induz a síntese de citocinas, como TNF- $\alpha$  que é responsável por distúrbios inflamatórios e pela sinalização da morte celular. O aumento do TNF- $\alpha$  ocorre em conjunto com IL-10 e com IL6. A IL6 induz efeito sobre tumor através da trans-sinalização que afeta o ciclo celular, apresentando papel

importante no efeito da inflamação localizada produzida por TFD. A IL-10 age de maneira sistêmica na imunossupressão (ORTEL et al., 2009). A trans-sinalização por IL-6 ocorre quando na atividade celular a citocina se liga ao receptor  $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ) e gp80 (cognata ligado a membrana) e desencadeia a tradução do sinal gp130 causando várias alterações das funções celulares, na proliferação e sobrevivência celular, na diferenciação, mobilidade e angiogênese (WEI et al., 2007).

Gollnick et al. (1997) demonstra que a produção de IL-6 *in vivo* é mais elevada que *in vitro*. Este grupo de pesquisadores realizou um experimento *in vitro* e *in vivo* com ratos de BALB/cj em tecido normal e em tumor com fotossensibilizador Profirin. O objetivo de verificar se a TFD poderia alterar a expressão de IL-6 e IL-10 foi confirmado. As alterações foram marcantes para IL-6 e IL-10, mas não para TNF- $\alpha$ . Demonstraram que os níveis de IL-6 mRNA são fortemente aumentados em tecidos tumorais e normais após PDT *in vivo*, isto foi relatado nos tumores tratados no experimento com um aumento prolongado de IL-6 da proteína. Os autores relataram que o TNF- $\alpha$  não parece desempenhar um papel na IL-6 por indução TFD porque as alterações nas citocinas que são nem precedida nem acompanhada por alterações semelhantes em TNF- $\alpha$ . Assim eles relatam que estes dados sugerem que a resposta inflamatória geral para TFD pode ser mediada, pelo menos em parte, por IL-6. Além disso, a IL-6 pode modular a resposta imune local antitumoral. Já IL-10 mRNA, no tumor diminui após TFD. Mais importante ainda, IL-10 é marcadamente induzido na pele de ratos expostos a um regime de TFD que fortemente inibe a resposta da hipersensibilidade de contato da pele (CHS), e a cinética da indução de IL-10 coincidir com a cinética de inibição conhecidos CHS. Por isso eles propuseram que a maior expressão de IL-10 desempenha um papel na supressão observada nas células mediada por respostas observada após a TFD. Os autores alegam que a ausência de TNF- $\alpha$  pode estar relacionada com a estirpe do animal utilizada, porque o TNF- $\alpha$  tem um alelo expresso em ratos BALB/cj que é resistente sobre-regulação por radiação UV e também pode ser resistente a alteração induzida por TFD.

Em outro estudo Gollinick et al. (2003) relatam que ocorre nos tecidos à estimulação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T em secretar IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ . No seguinte estudo foi analisado em camundongos a capacidade da TFD utilizando o fotossensibilizador de segunda geração 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl

pyropheophorbide-a (HPPH) para induzir citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (por estar envolvidas na migração dos neutrófilos). Este estudo mostrou que o HPPH induz migração dos neutrófilos para o tumor tratado e isto foi associado com um aumento local na expressão de (quimiocinas) proteínas inflamatórias dos macrófagos (MIP)-2 e KC. Outro aumento similar foi detectado na expressão funcional de moléculas de adesão (seletina E e molécula de adesão intracelular (ICAM)-1) e no nível local e da IL-6. Com isso demonstraram que uma resposta inflamatória, induzida pela TFD, semelhante, mas menos grave que a obtida com Photofrins-TFD.

Com base no exposto pode-se perceber a importância de ainda se quantificar citocinas em experimentos com TFD, e ainda podemos acrescentar que em vários tipos de tumores tratados com TFD são observados diferentes mediadores o que dificulta detectar outras substâncias semelhantes e isso se dá porque é diferente o controle de regulação de genes em tumores distintos e também por causa do tempo de vida curta das proteínas devido ao alto nível de proteinase e RNAase no tecido do tumor após TFD (DOUGHERTY, 1998).

### **3.7.1 TNF- $\alpha$**

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina potente sendo responsável por uma gama de eventos de sinalização dentro das células (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011). É produzida por várias células, como neutrófilos, macrófagos ativados, linfócitos T, células NK e fibroblastos, que o produzem em resposta a alguma lesão ou inflamação de tecido, e também em resposta a alguma alteração ambiental.

O TNF tem sido associado com a produção de efeitos vasculares em tumores tratados com citocina. Esses efeitos vasculares têm sido comparados àqueles vistos em tratamentos de endotoxina no tumor, com necrose central, colapso vascular, trombose, polimorfonuclear e recrutamento de leucócitos para periferia do tumor. Dessa forma, direta ou indiretamente o efeito vascular tem sido associado ao aumento da produção de TNF- $\alpha$  que pode causar produção associada de coagulação intermediária de células *in vitro*. Por isso o TNF tem sido evidenciado como indutor de atividade procoagulante de células endoteliais, o que leva a teoria de indução de fatores endotelial local por citocina que poderia promover um circuito

que poderia localizar monócitos, liberar mediadores de inflamação e causar retração endotelial (EVANS et al., 1990).

Nas atividades biológicas, o TNF- $\alpha$  atua sobre o controle da proliferação celular, na diferenciação celular e na apoptose, além de ser um importante mediador da inflamação. A administração ou indução do TNF- $\alpha$  melhora o efeito fotossensibilização o que confirma o seu papel na execução TFD (ORTEL et al., 2009).

Estudos com ratos portadores de tumores cerebrais (gliomas) mostram que a infiltração do sistema imunológico e a liberação de citocinas, como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  aumentam em animais que tem seus tumores tratados com a TFD. Essa imunidade ante o tumor, que é promovida pela TFD, é mediada pelo complemento C3 (LI et al, 2010).

Evans e colaboradores (1990) em experimento com camundongos relataram que a produção de TNF por macrófagos é evidente, a não ser quando o dano causado pela TFD leva a um dano irreversível a célula. Essa produção foi ainda maior quando avaliado o grupo que usou LPS.

### **3.8 Microcalorimetria**

Os calorímetros são instrumentos utilizados para a medição de mudanças de calor que acompanham processo físico e químico (STURTEVANT, 1972). Microcalorímetros são calorímetros de alta sensibilidade e, que requerem muito pouca quantidade de material a ser analisado (VASCONCELOS et al., 2009). Microcalorimetria é uma técnica analítica universal que mede variações de calor para monitorar reações físicas, químicas e biológicas. Diversas amostras em contato com as termopilhas promovem a liberação de energia, produzindo um perfil de atividade calorimétrica. Durante a reação, variação de calor entre a amostra e a queda de calor é monitorada e gravada continuamente em tempo real. Resultados são expressos nos perfis de atividade térmica onde a energia (usualmente em microwatts) é traçada contra o tempo (AL-HALLAK et al., 2010)

A energia liberada ou absorvida, na forma de calor em um processo termodinâmico pode ser medida por meio de equipamentos e técnicas calorimétricas

que permitam a sua detecção. Mais funções biológicas estão associadas com mudanças no metabolismo celular e, conseqüentemente, variação de calor envolvendo o ambiente (AL-HALLAK et al., 2010).

Com o desenvolvimento de calorímetros cada vez mais sensíveis a microcalorimetria tem sido amplamente utilizada na determinação de vários processos moleculares (AL-HALLAK et al., 2010). Microcalorímetros de fluxo de calor ou condução de calor são atualmente o tipo de microcalorímetro mais largamente utilizado para estudos termodinâmicos e analíticos (WADSO et al. 1968 apud BAZZANI, 1992).

Além da terminação do fluxo de calor em células animais *in vitro*, onde os princípios termodinâmicos são empregados no diagnóstico médico, farmacológico e toxicológico (KEMP, 1991), outro valor preponderante, para o uso das técnicas calorimétricas é o estudo de células e organismos em condições normais, correlacionado-as com condições de estresse.

Microcalorímetros de condução isotérmica são utilizados comumente para a avaliação de constantes de equilíbrio, variações de entalpia, ensaio de diferentes temperaturas, a capacidade calorífica de sistema (STURTEVANT, 1972). Esses microcalorímetros permitem a determinação de parâmetros termodinâmicos, pois lidam com fenômenos que são literalmente vitais para a estrutura, função e funcionamento das células. Fenômenos estes que incluem temperatura, energia, entropia, concentrações, movimentos moleculares, eletroquímica, pressão osmótica, taxas de reação, as mudanças de fase de agregação molecular (KEMP, 2000).

Metabolicamente, as células produzem calor que pode ser usado como o principal indicador da cinética do metabolismo celular, pois o fluxo de calor esta diretamente relacionada à função do fluxo metabólico (KEMP e GUAN, 2000). A validade de relação entre o calor e o metabolismo é demonstrada teoricamente, através do conceito da avaliação térmica e em experiências com o uso contínuo de cultura celular (KEMP, 1991; FENG et al., 2004).

A energia é adquirida a partir de fontes de baixa entropia, e é usado em uma variedade de diferentes mecanismos bioquímicos, fisiológicos (BRESLAUER et al., 1992; MARES-GUIA et al., 1990), funções coligadas e estados de transição. Além

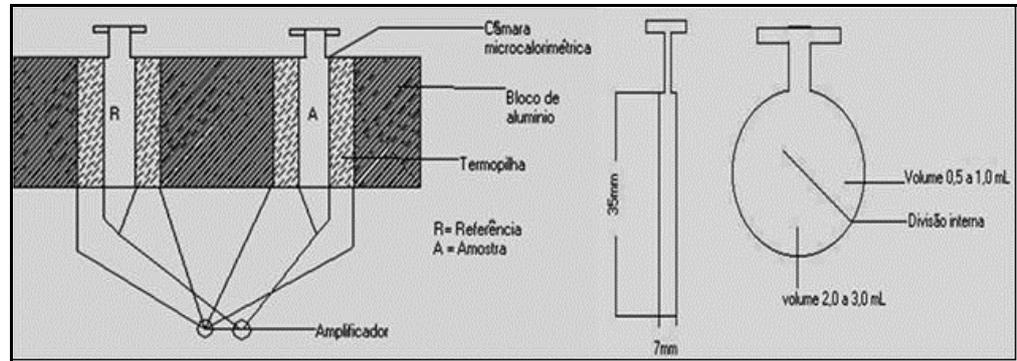
disto, diversas adaptações em microcalorímetros e sistemas de aquisição de dados têm sido realizados nas últimas décadas, visando o aprimoramento de procedimentos já existentes e a ampliação de metodologia calorimétrica em sistemas específicos.

A microcalorimetria permite detectar fluxos de energia da ordem de  $10^{-9}$ J que ocorram em um determinado processo. A energia liberada ou absorvida é muito pequenas sendo necessárias técnicas muito sensíveis como a microcalorimetria para detectá-la (MAGESTE, 2009).

A maior parte dos microcalorímetros utilizados com a finalidade de estudos microbiológicos apresenta o mesmo princípio de construção (PERRY et al. 1990 apud BAZZANI, 1992).

Esses microcalorímetros são construídos baseados no princípio “twin”, isto é, cada célula calorimétrica é encaixada entre duas termopilhas circundadas por pequenos blocos de alumínio ou trocador de calor. As termopilhas em cada cela calorimétrica são conectadas em série e os dois pares de termopilhas (cela amostra e cela referência) então formadas são conectadas em oposição e mantidas no interior do bloco calorimétrico com temperatura controlada (FIGURA 8). O bloco calorimétrico é então fechado num recipiente de aço, e mantido num banho de ar ou de água. Quando as junções da termopilha são mantidas em temperaturas diferentes uma força eletro motriz é produzida, e de maneira inversa quando uma corrente é aplicada a uma termopilha, um conjunto de junções torna-se mais quente e o outro se torna mais frio (Efeito Peltier). O processo a ser estudado deve ser realizado em uma das células, enquanto a outra é utilizada como um sistema não reagente, isto é sistema de referência. Desta forma sinais não desejáveis tais como flutuações de temperatura no trocador de calor irão afetar ambas as células na mesma intensidade, portanto se o sinal diferencial das duas células for registrado, os distúrbios serão então cancelados. Esta é a principal vantagem dos calorímetros que utilizam o princípio “twin”, que é de muita importância nos estudos que duram por longos períodos como por exemplos processos microbiológicos.

FIGURA 8: Esquema ilustrativo das câmaras calorimétricas; Corte transversal e Vista lateral e frontal.



Fonte: VASCONCELOS et.al., 2009.

Estas termopilhas são sensíveis a uma diferença de um milionésimos de grau Celsius entre a célula da amostra e o trocador de calor. Esta diferença de voltagem produzida gera um sinal que é amplificado e registrado. As constantes de calibração são normalmente determinadas eletricamente, e a sensibilidade de alguns aparelhos é  $10^{-7}$  watts e a estabilidade da linha de base é  $1\mu W/\text{dia}$ . Para processos no estado estacionário a voltagem nos terminais da termopilha (mV) é diretamente proporcional a taxa de liberação de calor no calorímetro, ou seja, a potência,  $W=dq/dt$ . O calorímetro atua como um voltímetro registrando a curva de voltagem versus o tempo, que é diretamente relacionada à cinética do processo estudado ( $V=k \cdot dq/dt$ ), cuja integração leva à  $Q= k \cdot V \cdot t$ , sendo então a quantidade de calor envolvida no processo proporcional à área sob a curva (BAZZANI, 1992).

A investigação de biopolímeros, a microcalorimetria também tem sido utilizada como um método conveniente para a caracterização do metabolismo celular, pela determinação da soma total de eventos metabólicos em uma população de células (NÄSSBERGER et al., 1986; WADSÖ, 1988).

Trata-se de uma descoberta particularmente útil no contexto da indústria farmacêutica porque vai ajudar a garantir a fidelidade da determinação das citocinas, a ação dos antibióticos e vacinas que produzidas em culturas em grande escala, podem ter sua utilização e avaliação direta através da calorimetria (GUAN et al., 2001).

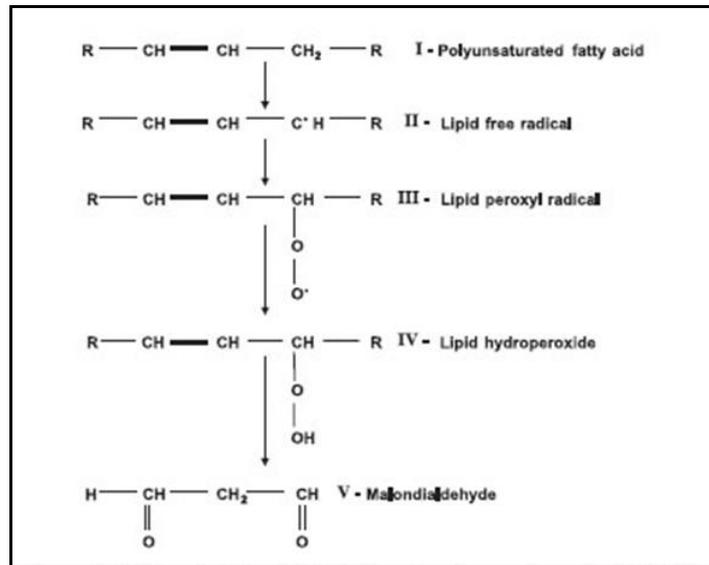
A utilização do microcalorímetro na avaliação do metabolismo celular é de grande relevância, uma vez que quantifica a energia produzida pelas células em vários estádios de preservação, além de poder padronizar estádios relevantes pelo processo metabólico para sua utilização *in vitro*. Além disso, o estudo de processos metabólicos de fenômenos bioquímicos poderá ser o início para se avaliar como são as interações energéticas em uma célula e organismos acometem em ambientes que sofrem algum tipo de mudança. Assim, a microcalorimetria é a técnica interessante para avaliar a capacidade metabólica de macrófagos, pois ela é capaz de detectar uma mínima variação de energia de sistemas biológicos.

### 3.9 Peroxidação lipídica

O estresse oxidativo pode ser induzido como resultado de um decréscimo do sistema antioxidante da célula ou pelo aumento da produção de ERO's como na TFD. Os sistemas antioxidantes são compostos por vários agentes endógenos e outros provenientes da dieta, que interagindo, inativam as ERO's provenientes do metabolismo celular. Um dos principais ERO's é o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), produzido por organismos aeróbicos e extremamente tóxicos para as células. Muito reativo, o  $O_2^-$  é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Tanto as enzimas catalase, quanto a glutathione peroxidase (GPx), podem converter o  $H_2O_2$  em oxigênio molecular e água. Desta forma, o estresse oxidativo pode ser induzido até mesmo pela relativa deficiência na atuação da SOD, catalase, e/ou GPX, que constituem as principais enzimas do sistema antioxidante da célula (FARMAND et al., 2005). Por isso, existe a necessidade de avaliar a peroxidação lipídica após tratamento via TFD não letal em macrófagos.

A peroxidação lipídica mediada por radicais livres resulta na deterioração de lipídeos poliinsaturados. Portanto um dos alvos mais comuns são as membrana biológicas. Estes alvos biológicos, quando atingidos, levam a produção produtos tóxicos como endoperóxidos e aldeídos (GROTO et al., 2009). Dentre estes aldeídos, o malonaldeído (MDA), produzido por diferentes mecanismos (FIGURA 9) é um analito presente em meio celular que permite a avaliação indireta da peroxidação (GROTO et al., 2009).

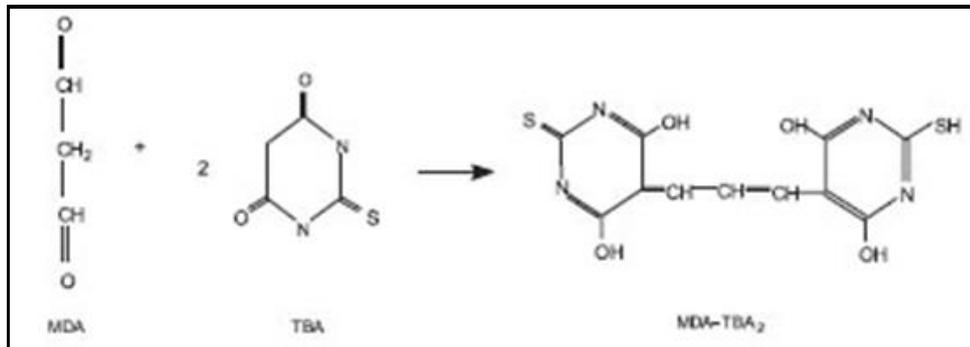
FIGURA 9: Via de formação do MDA após peroxidação lipídica.



Fonte: Adaptado de GROTO et al., 2009.

Estudos mostram o MDA pode ser determinado, portanto por uma técnica colorimétrica utilizando-se o ácido tiobarbitúrico, formando o complexo de cor MDA-TBA (FIGURA 10).

FIGURA 10: reação entre o MDA e o TBA formando o complexo de cor MDA-TBA.



Fonte: Adaptado de GROTO et. al, 2009.

### 3.10 Efeitos adversos da TFD

A TFD não induz modificação no DNA porque induz baixos níveis de p53 e mesmo que a geração de ROS possa provocar efeitos genotóxicos eles são limitados na região tratada. Além disso, há relatos da literatura que a molécula de porfirina ou moléculas semelhantes, possui propriedades antioxidantes e antimutagênicos (MORTON et al., 2008). Pode desencadear fotofobia e desconforto ocular. As discromias são, geralmente, reversíveis em alguns meses. Bolhas,

ulceras ou necrose são raras, sugerindo dose alta de energia com fototoxicidade (ISSA e MANUELA-AZULAY, 2010). A TFD tópica pode apresentar efeitos agudos e crônicos (MORTON et al., 2008).

Durante exposição à luz, os pacientes apresentam dor tipo queimação, sensação de ardência ou prurido restrito a área tratada. O desconforto e a dor têm início em minutos após o início da irradiação, refletindo o estímulo nervoso e/ou o dano tecidual pelo oxigênio reativo. A dor, principal efeito colateral, mantém por algumas horas e diminui com o tempo (ISSA e MANUELA-AZULAY, 2010).

Com relação aos fotossensibilizantes sistêmicos, a fotossensibilidade cutânea generalizada é o principal efeito colateral. O ALA pode levar a náusea e vômito em 7% a 19%, e também a alterações transitórias de enzimas hepáticas. Em adição, a reação alérgica aos fotossensibilizantes ou aos veículos deve ser considerada (ISSA e MANUELA-AZULAY, 2010).

No efeito agudo ocorre queimação com dor e ardor com a exposição à luz e estimulação das fibras nervosas. Dor é comum durante a exposição à luz na TFD, no entanto no uso tópico ela é bem tolerada. A produção de ERO's (espécie reativa de  $O_2$ ) causando dano no tecido agravando a hipertermia. Também pode ter resposta inflamatória aguda seguida por erosão e formação de crosta (MORTON et al., 2008), descamação e prurido de intensidade variável em torno de duas a oito semanas. O eritema e o edema podem ser tratados com corticóide tópico ou, eventualmente sistêmico (ISSA e MANUELA-AZULAY, 2010). Formação de eritema e edema pós-irradiação pode ser atribuída a uma resposta mediada pela histamina (FIGURA 11) (MORTON et al., 2008).

Os efeitos crônicos com cicatrização baixos, no entanto pode ocorrer hipopigmentação ou hiperpigmentação pós TFD, isso vai depender da dose de ALA e pode ocorrer 48 – 72 horas e aumentar durante 2 semanas seguintes (MORTON et al., 2008).

A maior desvantagem da TFD é a falta de controle histopatológico. Outra é o custo elevado quando usado com lasers. Outras desvantagens são dor local, risco de reações locais de fotossensibilidade, tempo de espera para o produto penetrar na lesão e tumores exofíticos podem necessitar de tratamentos repetidos.

FIGURA 11: Eritema e edema no pós-operatório imediato de MAL-TFD.



Fonte: ISSA E MANUELA-AZULAY, 2009.

### 3.11 Vantagens da TFD

- Especificidade no tecido alvo (YAMAMOTO et al. 2006);
- Tratar múltiplas lesões na mesma sessão (SIMPLICIO et al., 2002);
- É bem tolerada pelos pacientes (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011).;
- Aplicações repetidas não resultam em toxicidade cumulativa e não é genotóxico (ORTEL et al., 2009);
- Modalidade usada em vários tumores (ISSA e MANUELA-AZULAY, 2010), também para outras doenças que apresentam características comum de um crescimento anormal de tecido (SIMPLICIO et al., 2002) e doenças infecciosas e terapias odontológicas (ACKROYD et al.,2001; PAULINO et al., 2005; KONOPKA E GOSLINSKI, 2007)
- Produz bons resultados cosméticos (KENNEDY et al., 1990; MORTON et al., 2008);
- Tratamento ambulatorial, não invasivo e seletivo (KAWCZYR-KRUPKA et al., 2011);

- Pode ser utilizada em pacientes com risco cirúrgico elevado (SIMPLICIO et al., 2002) e combinado com outros tipos de tratamento (ORTELL et al., 2009)
- Tratamento localizado (DOUGHERTY et al., 1998);
- Satisfação do paciente pela rápida cicatrização por ser um procedimento não invasivo.

## **4 HIPÓTESE**

A Terapia Fotodinâmica aplicada sobre macrófagos de origem peritoneal induz a alterações imunoquímicas, bioquímicas e bioenergéticas.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Materiais e equipamentos utilizados

- Autoclave vertical – CS, Primatec , Brasil;
- Medidor de pH – MPA-210, Tecnopon, Brasil;
- Capela de fluxo – Fluxo Laminar Horizontal, Filterflux, Brasil;
- Contador de células automatizado, Automated Cell counter, Invitrogen, Estados Unidos;
- Incubadora de CO<sub>2</sub> – L212, Laboven, Brasil;
- Medidor de potência (Laser Power Meter) – Field Mate, Coherent, Estados Unidos.
- Fotoativador de resina composto – LED, Emitter, 14XOON, Schuster;
- Leitora de Elisa, TP – Reader, Thermo Plate, Brasil;
- Lavadora de elisa – TP-Washer, Thermo Plate, Brasil;
- Sonicador de ponta – DES500, UNIQUE, Brasil;

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura, obtida através do sistema de osmose reversa, com uma filtragem final em membrana de 0,22 µm de diâmetro. Os reagentes empregados são de grau de pureza analítico (PA).

### 5.2 Drogas e reagentes

- Tampão fosfato salino (Phosphate saline buffer) PBS
- RPMI-1640 (INLAB, Brasil).
- Ácido aminolevulínico- ALA (Sigma Chem Co., EUA).

- LPS (endotoxina de *Escherichia coli* 0111:B4, (Sigma Chem Co., EUA).
- Kit para dosagem de citocina TNF- $\alpha$  de rato, (R&D Systems, Billings, MT, EUA)
- Ácido fosfórico (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda)
- Água oxigenada (Synth)
- Sulfanilamida frasco com 100 gramas (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda)
- Alfa-naftiletilenodiamina (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda)
- Nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda)
- Hidróxido de Sódio (Synth)
- Sulfato ferroso (Synth)
- Soro Albumina Bovina – BSA (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda)
- Tween 20 (Synth)

### 5.3 Preparo dos reagentes

#### 5.3.1 Tampão fosfato-salino–PBS

Para um volume final de 2 litros de PBS foram utilizados: 16,015 g de NaCl, 0,4026 g de KCl, 0,4082 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,2997 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, água MiliQ q.s.p. 2000 ml. O pH acertado para 7,2 – 7,4. Armazenado a 4°C.

#### 5.3.2 Meio de cultura – RPMI 1640

Para a confecção do meio de cultura foram utilizados 10,4 g do conteúdo de um envelope do meio (previamente pronto e estéril, fornecido pelo fabricante - INLAB, Brasil). Este conteúdo foi dissolvido em aproximadamente 800 ml de água. Em seguida foram adicionados 2,383 gramas de tampão HEPES e 1,2 gramas de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). Após a completa dissolução destes reagentes o pH

foi acertado para 7,6 utilizando-se HCl 6 M. Ao final, o volume foi acertado para 1000 ml e o meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu$ M (por sistema à vácuo ou em membranas acopladas à seringas).

### 5.3.3 Reagentes para Peroxidação lipídica

Os quatro reagentes foram armazenados em tubos de plástico nomeados e datados. Todo procedimento foi realizado com máscaras, luva e óculos de proteção.

O primeiro, sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 100 ml a 1mM. Solução preparada com 0,03 g de  $\text{FeSO}_4$  e adição de 100 ml de água.

O segundo, 10 ml de água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 0,5 mM, com 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 10 ml de água.

O terceiro, sulfato ferroso ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a 7% 10 ml, sendo 9,2 ml de água com adição de 0,8 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

E solução com ácido Tiobarbitúrico. Primeiramente realizado a mistura de 0,02 g Hidróxido de cálcio (NaOH) com 10 ml água para conseguir solução de NaOH 10 ml 50 mM, depois adicionado 0,1 g de Ácido Tiobarbitúrico. Deve-se solubilizar todo o ácido Tiobarbitúrico no sonicador (potência média, 10 minutos) para não deixar partes da droga não dissolvida. Esta metodologia permite determinar a peroxidação lipídica por método indireto, quantificando o malonaldeído proveniente da lipoperoxidação.

### 5.3.4 Reagentes para Óxido Nítrico

Os reagentes (que doravante serão denominadas de **A** e **B**) para detecção de NO são feitos a partir de 20 ml de Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a 5%. Primeiramente, diluir 1,2 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 85% com 18,8 ml de água. Com essa solução pronta dividir em duas partes de 10 ml para preparar os ingredientes da solução **A** e **B**.

A solução chamada de **A** é feita a partir do Naftil, com mistura de 10 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 5% e 0,01 g de Naftil. Já a solução **B** e a base de Sulfanilamida, sendo 10 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 5% e 0,10 g de Sulfanilamida. Um detalhe no preparo para a solução **A** e **B** é sempre transferir o líquido para a massa para evitar errar na proporção já que a quantidade dos reagentes sólidos é muito pequena.

### **5.3.5 Tampão de lavagem (ELISA)**

O tampão de lavagem foi constituído agregando-se à solução de PBS previamente pronta o detergente Tween 20 (0,1%, v/v).

### **5.3.6 Tampão de bloqueio (ELISA)**

O tampão de bloqueio foi constituído a partir da mistura do PBS (previamente descrito) Albumina de soro bovino (BSA) numa concentração final de 1% (p/v).

## **5.4 Esterilização**

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127°C por 30 minutos (material plástico e soluções), esterilizados por calor seco a 180°C por duas horas (material de vidro).

## **5.5 Animais**

Todo o trabalho experimental ocorreu após consentimento e aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEAA/UNIUBE), protocolo número 004/2011 (ANEXO 1). As experiências foram conduzidas utilizando ratos machos Wistar, pesando 180-200 gramas, que foram mantidos sob condições controladas de temperatura (24° C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) com livre acesso à ração e água.

## **5.6 Fonte de Luz para aplicação da TFD**

O fotopolimerizador de resina odontológica, utilizado neste trabalho como fonte de luz, emite uma luz LED (Emitter, 14XOON, Schuster) (figura 8 no tópico 3.1.6.3 - LED) de aproximadamente 450 mW/cm<sup>2</sup>. A dose de luz aplicada às células foi de 5 joules (420–480 nm), sendo este comprimento de onda de luz azul emitido coincidente com o espectro de absorção do corante PpIX.

## **5.7 Determinação da viabilidade celular**

Para a contagem e viabilidade celular retirou-se 10 µL da amostra para misturar com 10 µL de azul de Trypan (concentração preconizada pelo fabricante). A mistura foi aplicada em uma lamina avaliada no contador de células (Countess Invitrogen®). Conforme princípio de funcionamento do equipamento considerou-se células viáveis

as quais não se evidenciou a presença do corante no citoplasma. Padronizou-se o aparelho de conforme com disposição do Quadro 1.

QUADRO 1 - Parametros para countess.

Sensibilidade	5
Tamanho Mínimo	10 $\mu\text{m}$
Tamanho Máximo	40 $\mu\text{m}$
Circularidade	80

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

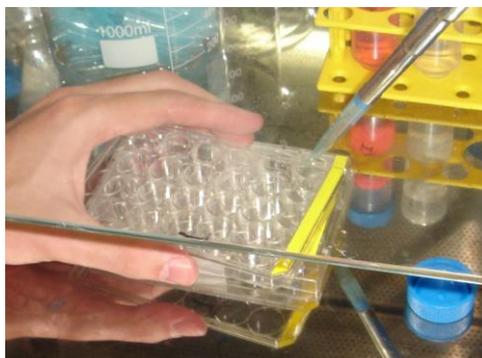
### 5.8 Obtenção, cultura de macrófagos peritoneais e delineamento dos grupos experimentais

Preparou-se o sobrenadante usando um processo semelhante ao descrito anteriormente por Zampronio et al.(1994) com algumas modificações.

A eutanásia dos animais realizou-se pelo método de deslocamento cervical. Não se utilizou anestesia para evitar possível modificação no lavado peritoneal. Cortou-se a pele do peritônio até alcançar o músculo (sem que houvesse perfuração) e com as mãos realizou-se movimento para aumentar a área abdominal atingida. A assepsia foi alcançada e mantida com álcool 70% (v/v) utilizando gaze como aplicador. Em seguida, injetou-se (seringas 10 ml) a solução de RPMI com Heparina 5000 UI/ml (100  $\mu\text{l}$ / 100 ml) e depois massagem no abdômen para poder facilitar o desprendimento dos macrófagos, em quantidade de 15 movimentos repetitivos. Por fim, realizou-se a coleta removendo aproximadamente 6 ml diretamente do peritônio. Nessa etapa foi realizada a contagem e viabilidade celular descrito no item 4.7.

As células foram tratadas dentro de uma placa com 24 poços em que se utilizou 6 poços (FIGURA 12). Uma placa é resultado da extração de 6 mL de RPMI-Heparina de cada animal, portanto cada 1 ml destes 6 ml foram aplicados em 6 diferentes poços da placa (ESQUEMA 1).

FIGURA 12: Foto da placa de 24 poços onde foi colocado lavado peritoneal.



Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

A distribuição das células na placa obedeceu às condições experimentais previamente estabelecidas de forma que a luz utilizada na irradiação não interferisse nos poços adjacentes, como demonstrado no Esquema 1.

ESQUEMA 1: Disposição das amostras sobre a placa de 24 poços.

Grupo	Poço	Condição experimental
1	A1	Células não tratadas
2	A6	Células tratadas somente com LPS
3	B4	Células tratadas apenas com LUZ
4	C4	Células tratadas com LUZ e LPS
5	D1	Células tratadas com TFD e LPS
6	D6	Células tratadas somente com TFD

	1	2	3	4	5	6
A	Ctrl-					CTR LPS
B				LUZ		
C				LUZ LPS		
D	PDT LPS					PDT

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora e meia. Após esse intervalo de incubação foi realizada lavagem com PBS (3 x 1 ml) em cada poço a fim de retirar células não aderidas. Em seguida, adicionou-se um

novo meio RPM para depois seguir o tratamento com ALA, no item 4.9.

### **5.9 Tratamento com ALA**

Somente nos poços D1 e D6 foram adicionados 300 µl de ALA (Sigma Chem Co.,EUA) em 10ml do meio. Em seguida incubação por 4 horas, como utilizado por Evans e colaboradores (1990), foi necessário para que os macrófagos absorvessem o ALA e o convertam em PpIX (Protoporfirina IX). Os macrófagos não expostos à ALA serviram como controles.

Antes do término dessa incubação foi adicionado LPS (com exceção de quando foi realizado experimento para microcalorimetria).

### **5.10 LPS (lipopolissacarídeos)**

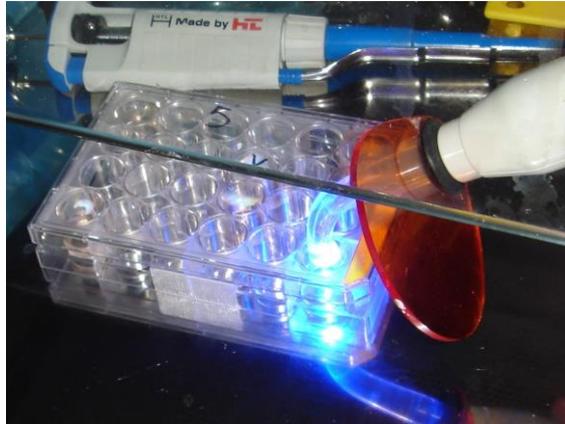
Após as primeiras 2 horas de incubação das células com o ALA, aos poços A6, C4 e D1 foram adicionadas 10 µg/ml de LPS (lipopolissacárido coli E.0111:B) e em seguida estas células foram retornadas à estufa de CO<sub>2</sub> a fim de se completar as 2 horas remanescentes (totalizando 4 horas de incubação da presença de ALA e apenas 2 horas na presença de LPS).

### **5.11 Terapia Fotodinâmica**

Com o término das 4 horas as células foram irradiadas com Luz utilizando um fotoativador LED de resina composta (descrito no item 4.6 - Fonte de Luz para aplicação da TFD), por 100 segundos para cada poço, obedecendo à distância do LED padronizada para o experimento de 10 cm (FIGURA 13). A potência da luz emitida pelo equipamento foi de aproximadamente 50 mW/cm<sup>2</sup> e previamente estabelecida a um comprimento de onda respectivo ao espectro máximo de absorção do corante PpIX ( $\pm$  400 nm) e medida com um Power Meter (Coherent).

A partir dessa etapa, a análise para Peroxidação lipídica, produção de NO e Microcalorimetria foi realizada em seguida, sem que houvesse lavagem dos poços. Já a análise para produção de TNF- $\alpha$  foi necessário tempo de incubação de 21 horas, assim os poços foram lavados com PBS novamente (3 x 1 ml) e em seguida foi adicionado meio de cultura (RPMI).

FIGURA 13: Aplicação da Luz nos poços.



Fonte: Dados da pesquisa, 2012

### 5.12 Separação do sobrenadante e pellet

Os poços foram raspados para desprendimento das células e o conteúdo coletado em Eppendorf previamente identificado para ser:

- Parte levado para a determinação da viabilidade celular;
- Parte centrifugado (centrifugado à 3000 RPM por 15 minutos a 4°C com uma desaceleração igual 9) (FIGURA 14):
  - a. Sobrenadante foi utilizado para determinação de produção de NO e citocina TNF- $\alpha$ .
  - b. Células utilizadas para determinação da peroxidação lipídica (somente nos grupos tratados com TFD e controle)

FIGURA 14 – Eppendorf sendo disposto na centrífuga.



Fonte: Dados da pesquisa, 2012

### 5.13 Avaliação da produção de citocinas (em sobrenadante celular)

Vinte e uma horas após a Luz, TFD, ALA ou LPS os 100 µl de cada poço de todas as placas foram centrifugadas.

A quantificação de TNF nos sobrenadantes foi feita por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), utilizando anticorpos específicos (purificada e biotinilado) e citocinas padrão, de acordo com as instruções do fabricante. O sobrenadante foi disposto em uma placa de ELISA (FIGURA 15). A densidade óptica (OD) foi avaliada em um leitor de microplacas a 450 nm e as concentrações de citocinas calculado a partir da curva padrão.

FIGURA 15: Sobrenadante sendo transferido para placa de ELISA.



Fonte: Dados da pesquisa, 2012

### 5.14 Grupo controle

Neste grupo as células foram avaliadas quanto à produção de citocinas e os valores obtidos, a fim de normalizar os resultados, foram considerados como valores referenciais para células não submetidas a nenhum tratamento. Para tanto, este grupo foi submetido a todas as situações procedimentais que os demais grupos, exceto pelas respectivas condições a serem testadas. Portanto, ao final do recultivo foram coletadas 10 µL destas células para que a viabilidade celular fosse avaliada e o sobrenadante coletado para análise.

### **5.15 Ensaio de peroxidação lipídica (*pellet* celular)**

A fim de se determinar se a terapia fotodinâmica empregada levava as células à peroxidação, aos pellets celulares obtidos a partir da centrifugação (3000 RPM por 15 minutos) foram adicionados 600 µl de água, 100 µl de ácido fosfórico 7% (H<sub>3</sub>PO) (v/v) e 100 µl de uma solução de ácido Tiobarbitúrico 1% (em NaOH 50 mmol/l). A solução, no Eppendorf, foi homogenizada utilizando-se o Vortex e em seguida, aguardou-se 10 minutos. Depois desse intervalo, novamente o Eppendorf foi agitado e em seguida a solução foi aquecida em banho seco (95° C) por 15 minutos. Os valores de absorvância foram coletados em 532 nm em espectrofotometro. Os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (baseados no coeficiente de extinção molar de 1,52 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), correlacionadas com o número de células que gerou a amostra.

A fim de se gerar uma reação positiva de peroxidação lipídica, incluiu-se aos grupos experimentais um grupo o qual as amostras foram submetidas à reação de Fenton. Nele, em relação às amostras celulares, foi descartado o sobrenadante e, no Eppendorf de 2 ml, acrescentado 500 µl de FeSO<sub>4</sub> e 500 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aguardou-se 10 minutos, para depois dispor o Eppendorf na centrífuga (à 3.000 RTM por 15 minutos a 4°C com uma desaceleração igual 9). O sobrenadante foi descartado novamente. O restante é idêntico ao protocolo de peroxidação lipídica, com 600µl de água adicionada dentro do Eppendorf com o pellet, 100 µL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (7%) e 100 µL ácido Tiobarbitúrico. Homogeneização e em seguida aguardado 10 minutos em temperatura ambiente. Vortex por 10 segundos e banho seco 95°C /15 minutos, depois leitura no espectrofotometro em 532 nm.

### **5.16 Determinação dos níveis de NO (sobrenadante celular)**

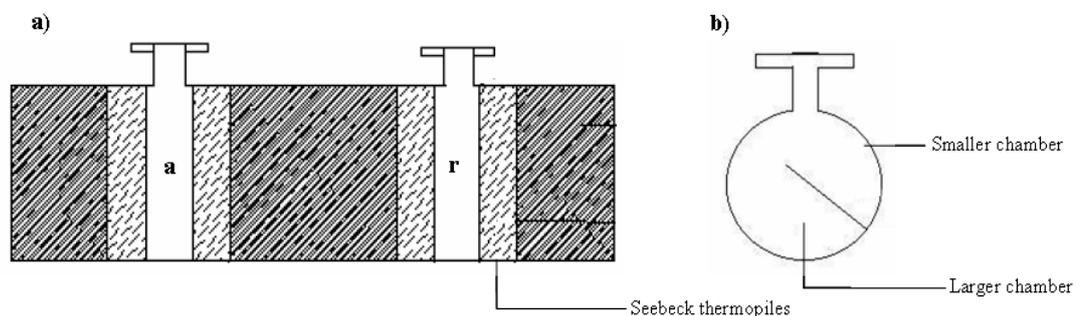
A produção de óxido nítrico foi determinada através da medida de nitritos no sobrenadante de culturas de macrófagos de acordo com descrito por Ding e colaboradores (1988). Assim no Eppendorf com todo o sobrenadante foram acrescentados 400 µL da solução A e 400 µL da solução B, homogeneizou-se e aguardou 10 minutos. Em seguida, as amostras foram lidas no espectrofotometro em 550 nm.

### 5.17 Microcalorimetria

Para a análise de Microcalorimetria as células não foram tratadas em poços e, sim em placas de Petri. Depois esse volume foi dividido em 2 placas contendo 3mL cada uma. Isso porque para essa análise foi necessário maior volume.

Assim, as amostras de células obtidas de cada grupo experimental foram avaliadas quanto às rotas metabólicas, utilizando Dextrose e *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3P)* e inibidores da via glicolítica (Antimicina A e Malonato) (SIROVER, 1997; ROCHA, 2004). O microcalorímetro de condução possui duas câmaras calorimétricas, uma de referência e outra para a amostra (FIGURA 16). Em cada uma das câmaras foi adicionado um “*pool*” de células e nos compartimentos os substratos e inibidores de vias metabólicas (G3P, Antimicina A e Malonato).

FIGURA 16: Apresentação esquemática das câmaras. **a)** Corte transversal com as duas câmaras (a) câmara de amostra (r) câmara referencia, **b)** Corte lateral da câmara calorimétrica.



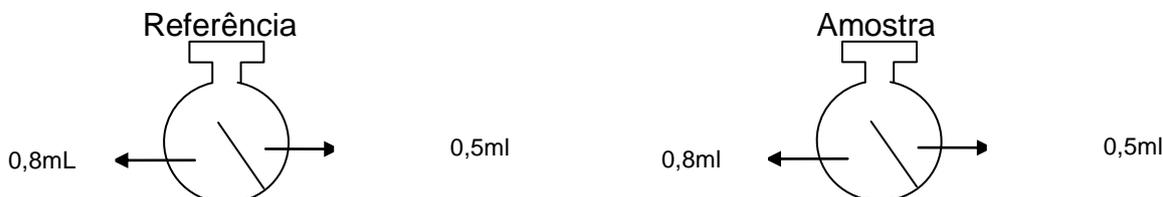
Fonte: VASCONCELOS et.al., 2009.

Para o experimento utilizou-se um registrador eletrônico com base em um computador do tipo PC-XT, dotado de placa especial OMEGA\_WB\_AAI\_B8 de alta resolução (0,8  $\mu$ V) que permitiu a leitura de voltagens nas diversas faixas, cobrindo intervalos de tempo que podem ser estabelecidos de milissegundos a horas.

A calibragem do microcalorímetro foi realizada em duplicata, utilizando a reação de neutralização de um ácido com uma base, no caso o ácido clorídrico e o TRIS (hidroximetilhidroximetano). É um passo importante porque o microcalorímetro reproduz valores muito sensíveis a alterações pequenas que devem foram descartadas na calibragem. Assim, foram preparadas soluções de HCl nas seguintes concentrações: 1º ensaio: 0,001 M, 0,002 M, 0,004 M e 0,010 M e 2º ensaio: 0,5

mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM. (ESQUEMA 2).

ESQUEMA 2: Realização do ensaio microcalorimétrico.



Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Em seguida, os ensaios calorimétricos foram realizados utilizando 12 placas contendo células sem tratamento (controle) e 12 placas contendo células tratadas com TFD. Antes de submeter às células a microcalorimetria, as células foram contadas em contador automático de células Countess Invitrogen®. Os resultados foram obtidos comparando os grupos experimentais entre si de forma a se obter o efeito da diferença metabólica entre os tratamentos através da energia liberada pelos macrófagos. As células tratadas, ou não, sob diferentes condições foram realizados conforme segue abaixo no Quadro 2:

QUADRO 2: Descrição dos grupos e parâmetros analisados nos testes de microcalorimetria de condução

Ensaio	Câmara de Referência	Câmara da Amostra
1º	PBS + Glicose 6 mM	Células + glicose 6 mM
2º	PBS + Glicose 6 mM	Células
3º	PBS + Glicose 6 mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6 mM
4º	PBS + Glicose 6 mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6 mM
5º	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6 mM + Malonato 23 mM
6º	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6 mM + Malonato 23 mM
7º	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6mM + Antimicina 0,3 mM
8º	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6mM + Antimicina 0,3 mM
9º	Células	Células tratadas com TFD + glicose 6 mM
10º	PBS	Células + Glicose 6 mM
11º	PBS	Células Tratadas com TFD + Glicose 6 mM

Fonte: dados da pesquisa, 2012.

### **5.18 Análise estatística**

Os níveis de citocinas (expressos em pg/ml) foram avaliados por análise de variância (ANOVA One-Way), seguido por teste de Newman-Keuls. Estes dados foram analisados com a utilização do programa estatístico Prism 3.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

Os demais valores apresentados são provenientes de triplicatas, expressos em valores médios acompanhados do desvio padrão.

### **5.19 Descarte das células**

As células, meios de cultivo e outros materiais contaminados ou não utilizados nos experimentos foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos e posteriormente descartados.

## 6 RESULTADOS

### i) Determinação da fluência de luz e da dose da pró-droga

A determinação da dose de pró-droga (ALA) na concentração de 150 µg/mL e a fluência de luz em 5 joules/cm<sup>2</sup> estabeleceu-se por manter a viabilidade celular em valores próximos aos grupos de células não tratados e/ou submetidos a tratamentos.

### ii) Determinação da viabilidade celular dos grupos experimentais

A viabilidade celular média encontrada para cada grupo experimental, separadamente, apresentou valores percentuais que, após analisados de maneira comparativa com os demais grupos, renderam valores estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ). Assim, decidiu-se por calcular a média da viabilidade celular de todos estes grupos, encontrando um valor de 79,7 % (TABELA 1).

TABELA 1: Viabilidade celular dos grupos experimentais após respectivos tratamentos.

<i>Poço</i>	<i>Descrição</i>	<i>Viabilidade celular (%)*</i>
A1	Controle	81,8 ± 8,4
A6	Controle + LPS	78,0 ± 5,5
B4	Luz	77,2 ± 8,3
C4	Luz + LPS	77,4 ± 16,3
D1	TFD + LPS	78,0 ± 17,5
D6	TFD	85,8 ± 9,12
Valor médio		79,7 ± 11,15

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

\*Valores provenientes da média de três experimentos distintos realizados em triplicata ( $p < 0,05$ ).

### iii) Determinação da liberação de TNF-α por macrófagos peritoneais estimulados pelo LPS, pela TFD e pelo LPS associado à TFD.

No gráfico 1 estão dispostos dentro de cada coluna os valores, em pg/mL, de TNF- $\alpha$ . Acima de cada coluna estão descritos os valores de p quando comparados os diferentes grupos experimentais com o grupo controle. Os valores desta citocina no grupo onde as células foram tratadas apenas com LPS aumentaram significativamente ( $p=0,029$ ) em relação ao grupo Controle.

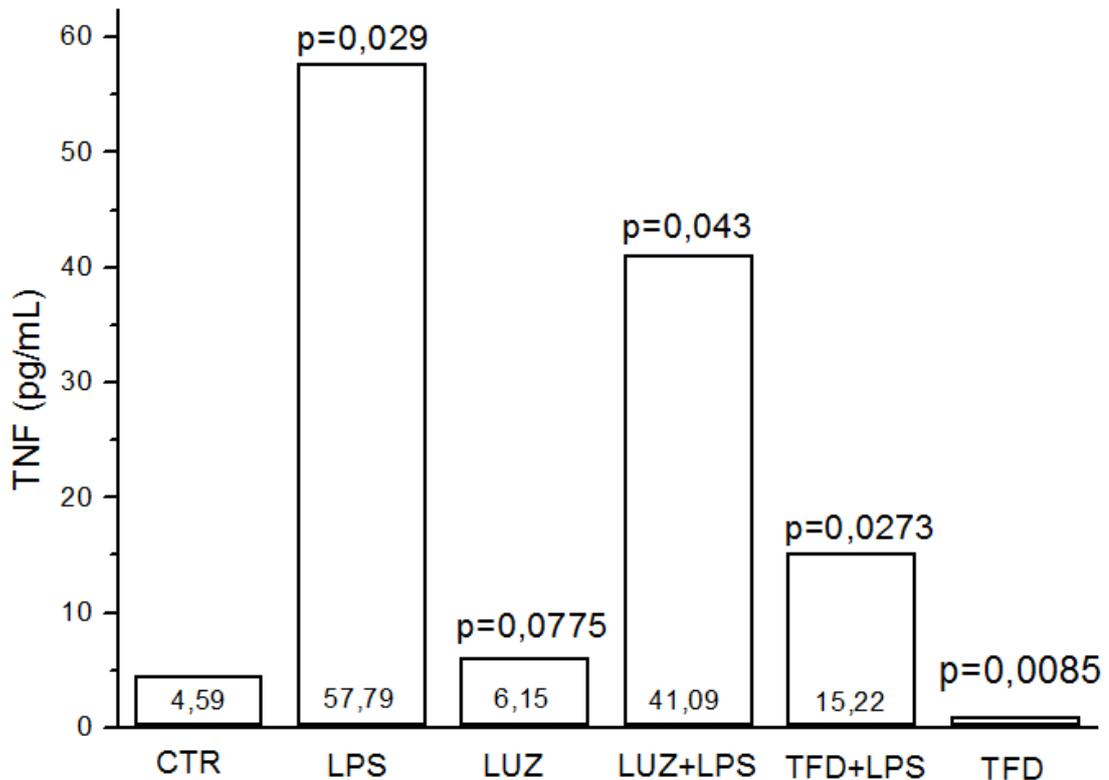
Em relação ao grupo tratado somente com Luz percebe-se que não há diferença significativa ( $p=0,0775$ ) para com o grupo controle, indicando, portanto que, apesar de baixos os valores da citocina expressa neste grupo, somente a luz pudesse ter minimamente alterado a produção desta citocina.

Já para o grupo tratado exclusivamente com TFD, percebe-se que houve um decaimento significativo dos valores desta citocina ( $p=0,0085$ ) comparando com o Controle. Vale ressaltar que para este grupo (TFD) a citocina sequer foi detectada no sobrenadante celular, sugerindo uma alta supressão de sua síntese (abaixo dos níveis de detecção do kit empregado).

Ao comparar-se o grupo Controle com o Grupo LUZ+LPS e com o Grupo TFD+LPS percebe-se que, apesar do LPS presente nestes grupos experimentais estimular a produção desta citocina (vide grupo LPS), há um significativo decaimento na produção da mesma devido aos fatores LUZ+LPS e TFD+LPS ( $p=0,043$  e  $0,0273$ ), respectivamente.

Os testes da toxicidade “*per se*” da droga (ALA) não foram realizados neste presente projeto haja visto que resultados anteriores (dados não mostrados) indicaram que o ALA não altera as propriedades imunoquímicas ou bioenergéticas dos macrófagos.

GRÁFICO 1: Análise comparativa entre concentração de TNF- $\alpha$  produzida pelos grupos experimentais frente ao grupo controle.



Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

**iv) Investigação da produção de óxido nítrico por macrófagos tratados por TFD.**

Nas condições experimentais empregadas, com o uso do reagente de Griess, não foram detectados nitritos ou nitratos em sobrenadante celular, indicando que nestas condições não houve a produção de espécies reativas de nitrogênio detectáveis em nenhum dos grupos experimentais analisados.

**v) Determinação quantitativa dos níveis de peroxidação lipídica causada pela TFD em macrófagos peritoneais.**

A peroxidação lipídica detectada através da técnica do ácido tiobarbitúrico, apesar de pouco sensível, mostrou que os níveis de peroxidação induzidos pela reação de FENTON foram significativamente expressivos ( $p < 0,05$ ) quando comparados com os grupos experimentais (Células tratadas com ALA). Entretanto,

em um experimento paralelo percebemos que para as células tratadas com terapia fotodinâmica mediada por ALA não houve (não detectado) peroxidação lipídica.

**vi) Investigação do metabolismo energético através da microcalorimetria de condução.**

**CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO**

A calibragem do calorímetro foi realizada seguindo tabela 2.

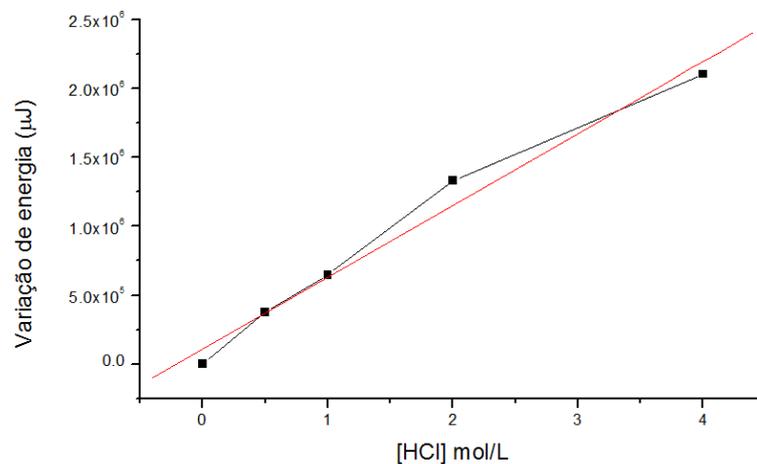
TABELA 2: Resultado dos ensaios calorimétricos referentes à calibração

<i>Concentração HCL</i>	<i>Varição de Energia</i>
0,5 mM	376.932,1 $\mu$ J
1 mM	645.829,0 $\mu$ J
2 mM	1.330.205,9 $\mu$ J
4 mM	2.104.557,8 $\mu$ J

Os valores apresentados são referentes às medias das calibrações.

Os valores da Tabela 2 estão dispostos no Gráfico 2. Nesta plotagem a regressão linear apresentou um  $R=0,9906$  e um valor de  $p=0,00109$ , dando confiabilidade a técnica empregada.

GRÁFICO 2: Dados da calibração do microcalorímetro de condução.



## ENSAIOS BIOLÓGICOS DE MICROCALORIMETRIA DE CONDUÇÃO

Tendo em vista que o equipamento passou a reproduzir resultados com significância satisfatória ( $p= 0,00109$ , vide Gráfico 2), a próxima etapa experimental foi analisar as alterações microcalorimétricas das amostras biológicas.

Para tal, em observância aos resultados anteriores que se mostraram infrutíferos (dados apresentados), decidiu-se que para os ensaios 1,2,3 e 4 (mostrados na Tabela 3) as células fossem colocadas apenas na câmara de amostra, e na câmara de referência foram colocados apenas os reagentes.

TABELA 3: Ensaio termodinâmico com macrófagos.

<i>Ensaio realizado com <math>1,6 \times 10^6</math> cel/mL</i>		
<b>Ensaio</b>	<b>Condição das células</b>	<b>Varição de energia</b>
1	Glicose 6 mM	24.837,0 $\mu$ J
2	Sem glicose	12.863,4 $\mu$ J
3	TFD + glicose 6 mM	9.942,9 $\mu$ J
4	TFD + glicose 6 mM	9.494,2 $\mu$ J

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Descrição: Os resultados médios expressos são provenientes de triplicatas. Entre todos os ensaios a houve diferença estatística ( $p < 0,001$ ).

Os valores obtidos (dispostos na Tabela 3) estão dentro do esperado, pois as células que receberam tratamento com a terapia fotodinâmica apresentaram menores valores de energia liberada que as células que não receberam tratamento, mostrando-se cerca de 60% menor quando comparado às células tratadas com glicose (metabolismo da glicose + metabolismo endógeno) e cerca de 25% menor que as células avaliadas somente quanto ao metabolismo endógeno.

Nos ensaios 5,6,7 e 8 (TABELA 4) foram colocadas células nas 2 câmaras (amostra e referência) para que fosse possível realizar um experimento de resposta direta confrontando as células do grupo controle (sem tratamento) com as células tratadas com TFD.

TABELA 4: Ensaio termodinâmico com macrófagos para o segundo protocolo.

Ensaio	Câmara de Referência	Câmara da Amostra	Relação de células Entre as câmaras (R/A)			Variação de Energia ( $\mu\text{J}$ )
			R	A	R/A	
5	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6 mM + Malonato 23 mM	R	127.552	1,01	1.922,7
			A	126.000		
6	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6 mM + Malonato 23 mM	R	192.000	0,78	518
			A	244.900		
7	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6mM + Antimicina 0,3 mM	R	262.400	0,86	-344
			A	303.400		
8	Células + glicose 6mM	Células Tratadas com TFD + glicose 6mM + Antimicina 0,3 mM	R	1.170.000	1,11	814
			A	1.045.000		
9	Células + glicose 6mM	Células tratadas com TFD + glicose 6 mM	R	151.300	0,86	2.300,7
			A	174.000		
10	PBS	Células + Glicose 6 mM				3.818,5
11	PBS	Células Tratadas com TFD + Glicose 6 mM				1.808,4

Fonte: Dados da Pesquisa, 2012

Os resultados na análise estatística foi realizada entre a média dos resultados com diferença estatística entre os tratamentos  $p < 0,001$ .

A fim de complementar os resultados, foram também associados os inibidores malonato de sódio (inibidor da via glicolítica) e antimicina A (inibidor de cadeia respiratória). Nota-se que a produção média de energia nos grupos 5 e 6 (média = 1220,35  $\mu\text{J}$ ) é inferior (aproximadamente 50% menor) à energia obtida no ensaio 9, onde há uma variação de energia relacionada ao grupo de células controle versus as células tratadas com TFD (2300,7  $\mu\text{J}$ ).

Já para as células tratadas com Antimicina após a TFD (ensaios 7 e 8) o valor médio da variação de energia (235,0  $\mu\text{J}$ ) é somente 10% da variação de energia resultante do ensaio 9.

Além disso, percebe-se ao se fazer uso da TFD (ensaio 11) a variação de energia das células será menor (1808,4  $\mu\text{J}$ ), que os ensaios onde não se faz uso da TFD (Ensaio 10).

## 7 DISCUSSÃO

Zampronio e colaboradores (1994) em seus experimentos aplicavam tioglicolato a 3% (p/v) no peritônio de ratos Wistars com o mesmo perfil de peso e idade e obtiveram o mesmo rendimento extrativo de macrófagos que os animais utilizados neste presente trabalho. Já Evans e colaboradores (1990) relataram que o uso de tioglicolato não foi usado somente para aumentar número de macrófagos coletados do peritônio dos camundongos usados no experimento, mas também por sua habilidade na produção de TNF em resposta a estímulos a LPS. Nesse trabalho, constatou-se que a contagem de células obtidas com o uso, ou não, do tioglicolato era consideravelmente a mesma.

A viabilidade celular foi analisada logo após coleta do lavado peritoneal, após TFD, após o emprego da Luz ou não (controle) e por fim antes da microcalorimetria. Essa análise ocorreu por conta da necessidade de, se manter e, perceber se haviam células viáveis e em número suficiente para futura análise da produção de TNF, NO e microcalorimetria de condução. Assim, se a viabilidade ou o número de células presentes sofresse algum decaimento da ordem exponencial de uma ou duas casas, haveria também um comprometimento dos resultados a serem coletados. Artigos científicos usando TFD se baseiam na viabilidade celular, tanto para comparar reação celular com diferentes exposições à intensidade de luz e concentrações de FS, quanto para verificar suas reações frente a produção de compostos (por exemplo: citocinas) e até que ponto a célula se manteve ativa durante todo processo diferenciado de intensidade e tempo de exposição a luz (EVANS et al. 1990; KAWCZYK-KRUPKA et al., 2011). Kawczyk-Krupka e colaboradores (2011) apresentaram resultados de viabilidade celular, medida através do teste de MTT confirmado pelo vazamento LDH (lactato desidrogenase) liberado a partir de células mortas, avaliados com fluência entre 5, 10 e 30 J/cm<sup>2</sup>. Com 30 J/cm<sup>2</sup> os níveis de LDH eram mais elevadas, senso que a sobrevivência celular após TFD decresceu gradualmente com doses crescentes de luz.

No experimento, para que as mesmas condições de viabilidade celular fossem mantidas, ficou determinado que a fluência de luz de 5 Joules foi suficiente para provocar uma alteração celular e ao mesmo tempo não causar fotodano irreparável aos macrófagos. Segundo Kawczyk-Krupka e colaboradores (2011) em experimento *in vitro* para avaliar a ativação de macrófagos murino (J-774A.1) durante a TFD-ALA irradiado com uma fonte de luz VIS (fonte de ions versátil) (400-750 nm) com 5, 10 e 30 J/cm<sup>2</sup>, em 5 e 10 J/cm<sup>2</sup> a viabilidade celular era comparável com o grupo de controle.

Já na escolha da concentração da pró-droga em uma sequência experimental que apresentou menor toxicidade para a célula, junto com a fluência escolhida, foi a de 150 µM. Em contrapartida, Kawczyk-Krupka e colaboradores (2011) utilizando 5 e 10 J/cm<sup>2</sup> após análise com diferentes concentrações de ALA (125, 250, 500, e 1000 µM) relataram que maior atividade secretora celular foi encontrada em 500 µM.

Assim, os valores determinados neste trabalho tanto para a dose da pró-droga ALA (150 µg/mL) quanto para a fluência de luz aplicada (5 Joules/cm<sup>2</sup>) foram suficientes para levar à alterações da expressão da citocina avaliada, assim como nas alterações bioenergéticas (detectadas através da microcalorimetria). Em contrapartida esta dose de droga e fluência de luz não foram suficientes para provocar nenhum dano fotoxidativo perceptível (especificamente quando se trata de peroxidação lipídica) ou quanto à produção de espécies reativas de nitrogênio. Assim, entende-se que doses ou fluência maiores poderiam talvez levar a danos peroxidativos evidentes e/ou formação de espécies reativas de nitrogênio detectáveis. Sabe-se também que acaso tivéssemos adotado um padrão mais agressivo ao aplicar a TFD (maior dose e fluência) poderia também ter levado a uma toxicidade celular que incorreria na morte dos macrófagos, inviabilizando as avaliações de metabolismo energético (pela microcalorimetria) e também a produção da citocina avaliada.

Desta forma decidiu-se após alguns experimentos prévios e após ter sido constatado na literatura trabalho semelhante (KAWCZYK-KRUPKA, 2011) que veio corroborar com a hipótese aqui proposta de se executar todos os experimentos que envolvessem TFD, somente Luz ou somente a droga, com as doses e fluência previamente acima descritos.

A não produção de NO (nos experimentos realizados neste projeto) contradiz Yamamoto e colaboradores (2006) e Maranhão e colaboradores (2009). Yamamoto e colaboradores (2006) relatam que assim como para as citocinas existe também o estímulo para a geração de NO, que além de ser induzido por várias condições de estresse também é com TFD. Maranhão e colaboradores (2009) relatam que na TFD com uso de drogas específicas ou doadores de NO também pode produzir ERN's, e ainda que com o aumento da produção dessas espécies reativas os resultados de morte celular na TFD podem melhorar. No entanto, para o presente trabalho não se pretendia induzir a morte celular o que, portanto, pode ser explicação para não encontrar produção de NO e que esse dado assim, nesse experimento, é muito satisfatório.

Diferentemente, Kawczyk-Krupka e colaboradores (2011) detectaram a presença de NO no sobrenadante celular. Assim, após uma análise comparativa entre o trabalho desses autores com o presente trabalho, percebe-se que o meio de cultivo não é o mesmo, ou seja, o grupo de Kawczyk-Krupka utilizaram o DMEM suplementado com soro bovino fetal e neste trabalho utilizou-se apenas o RPMI. Estes meios e suplementos podem ter facilitado a produção de espécies reativas de NO haja visto que na constituição dos mesmos existem substratos capazes de permitir a formação de espécies de NO, diferentemente do meio RPMI, que apesar de possuir substratos coincidentes, pode não ter sido suficiente.

Assim, é sabido que a TFD é capaz de estimular a formação de diferentes espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. Entretanto, nas condições experimentais estabelecidas, não foi detectada a produção de espécies de nitrogênio. Entendemos que a produção de espécies de nitrogênio podem sim ocorrer em algumas situações:

- Numa condição atmosférica mais saturada de nitrogênio;
- Na presença de doadores específicos de nitrogênio.

Durante todo o curso experimental, as condições atmosféricas e químicas do meio de cultivo utilizado não se assemelham às condições celulares *in vivo*. Além disso, sabe-se que o ALA é convertido em Protoporfirina IX dentro da mitocôndria (SIMPLICIO et. al., 2001) e sua solubilidade em água é baixa, permitindo assim a inferência de que sua presença fora dos macrófagos é prejudicada.

Destaca-se que a reação de Griess é padrão para a detecção deste tipo de analito e que se pode, portanto estabelecer dois caminhos que levem a explicação de não ter sido detectado ERN's nos meio biológico (a baixa concentração de nitritos e nitratos ou realmente a não produção destas espécies).

Segundo Paulino (2011) “as diferenças na natureza e intensidade da reação inflamatória entre os tecidos normais e cancerosos ainda são desconhecidos. Além disso, a influência de TFD sobre a angiogénese e invasão de células tumorais e de crescimento do tumor requer mais investigação. Portanto, a elucidação da participação da resposta imune em TDF é essencial para reconhecer os mecanismos de ação TFD”.

Um dos principais componentes da membrana exterior de bactérias gram-negativas, e por ser uma endotoxina provoca resposta por parte de sistema imunitário de animais. Segundo Adams e Hamilton (1984) os macrófagos estimulados com LPS são capazes de produzir citocinas, *in vitro* e *in vivo*. Essa afirmação foi comprovada nos resultados deste presente trabalho. O LPS estimula a produção de TNF- $\alpha$  (57,79 pg/mL), sendo o mais expressivo de todos e significativamente maior que o grupo controle ( $p=0,029$ ). Mantendo o uso do LPS e aplicando Luz a concentração da citocina caiu para 41,09 pg/mL, sugerindo portanto que a luz sozinha possa interferir de alguma forma na sinalização ou síntese que levam à produção de TNF- $\alpha$ . Vale, portanto lembrar que Evans e colaboradores (1990) obtiveram resultados que divergem dos valores aqui apresentados, sendo que as condições experimentais de ambos os trabalhos são semelhantes.

Ainda comparando nossos resultados aos apresentados por Evans e colaboradores (1990), os valores aqui obtidos para os grupos experimentais tratados com LPS+Luz e LPS+TFD demonstram claramente a ação tanto da luz quanto da TFD sobre a diminuição da sinalização e/ou síntese que levam a expressão desta citocina, valores estes que também divergem do apresentado em 1999 pelo citado grupo de pesquisadores (EVANS et. al., 1990). Mais interessantemente, quando se avalia apenas a produção de TNF- $\alpha$  no grupo experimental tratado somente com TFD há um completo cessamento da produção desta citocina.

Os experimentos cujos resultados divergem dos resultados aqui apresentados, possam ter ocorrido sem um controle contínuo da temperatura do meio reacional, possibilitando, portanto que um dano termal tenha levado a uma exacerbação do dano celular (*in vitro*), induzindo assim a um aumento da citocina estudada. Para confirmar esta hipótese, portanto, seria necessário conduzir um experimento em que um grupo experimental fosse tratado novamente com TFD e outro fosse submetido a um leve dano termal.

Interessantemente, sabe-se que a partir de diferentes estímulos, os macrófagos ativados podem apresentar alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais importantes na regulação do processo inflamatório e imunológico. E o entendimento de todos os fatores que envolvem este processo é um desafio que carece de ser elucidado.

Quanto à microcalorimetria, em relação aos valores obtidos na calibração, estes estão dentro do esperado, pois na medida em que se utiliza uma concentração maior de HCl ocorre maior liberação de energia pela reação de hidrólise e o equipamento possui sensibilidade suficiente para detectar as diferenças de energia de hidrólise liberadas entre a câmara de referência e a câmara de amostra. Nos ensaios calorimétricos, os valores obtidos também estão dentro do esperado já que as células tratadas com TFD tiveram liberação de energia menor em comparação com as células do grupo controle comprovando que a TFD altera o metabolismo bioenergético dos macrófagos.

Esse valor reduzido de liberação de energia (calor), possivelmente se deve ao fato de que nesse ensaio foi avaliado apenas o metabolismo endógeno da célula, pois não foi injetado na câmara nenhum substrato (glicose) como nos demais ensaios, ou seja, estas células não tinham fonte exógena para obter energia consequentemente houve uma menor atividade metabólica pela célula.

Para as células em que foi avaliado o metabolismo endógeno, estas tiveram uma liberação de energia menor em relação às células que receberam glicose, sugerindo que os macrófagos necessitam de fontes exógenas de energia para o seu metabolismo.

Os valores obtidos (dispostos na Tabela 3) estão dentro do esperado, pois as células que receberam tratamento com a terapia fotodinâmica apresentaram menores valores de energia liberada que as células que não receberam tratamento, mostrando-se cerca de 60% menor quando comparado às células tratadas com glicose (metabolismo da glicose + metabolismo endógeno) e cerca de 25% menor que as células avaliadas somente quanto ao metabolismo endógeno.

A produção de energia notada nos grupos 5 e 6 é menor que a energia produzida pelo ensaio 9 haja visto que entre estes há uma fator interferente, a presença do inibidor da via glicolítica (malonato). Assim, entende-se que houve inibição desta via metabólica pelo malonato, mas aparentemente a TFD não interferiu de forma específica e/ou intensa sobre nesta via pois os resultados indicam que apesar da TFD diminuir a produção de energia (vide ensaio 9), nota-se também que após a administração de malonato ao meio reacional (ensaio 5 ou 6) há uma redução maior ainda na produção de energia.

Assim entende-se que a TFD possa sim ter interferido na via glicolítica dos macrófagos. Mas é importante salientar que se houve realmente alguma interferência, esta foi muito pequena.

Quanto aos resultados energéticos relacionados aos ensaios 7 e 8, estes, por ação inibitória da Antimicina (inibidor da cadeia respiratória), apresentaram valores de energia produzidos menores ainda que aqueles onde o inibidor foi o malonato (via glicolítica). Logicamente pode-se utilizar do mesmo raciocínio para afirmarmos que a TFD pode ter interferido nesta via (cadeia respiratória), mas, se houve, foi muito pequena também.

Comparando os resultados de produção de energia dos ensaios tratados com inibidores da via glicolítica e inibidor da cadeia respiratória, os mesmos vêm reforçar o que já era esperado. A via glicolítica é capaz de produzir normalmente muito menos energia do que a cadeia respiratória (LEHNINGER, 1965), o que consequentemente leva ao entendimento de que células com via glicolítica inibida produzem mais energia do que células com cadeia respiratória inibida.

No ensaio 9 foram utilizadas células nas duas câmaras como nos anteriores, já nos ensaios 10 e 11 foram utilizadas células apenas na câmara de amostra utilizando apenas glicose como substrato para que pudessem ser comparados os valores obtidos, tabela 5.

## 8 CONCLUSÃO

Baseado nos objetivos propostos, a metodologia descrita levou a obtenção de alguns resultados que permitem concluir que a hipótese estava correta. Especificamente pode-se concluir que:

- i) Apesar de terem sido realizados alguns experimentos, a literatura auxiliou na determinação de uma fluência de luz e concentração da pró-droga (ALA) que permitissem a posterior avaliação microcalorimétrica e da produção de TNF- $\alpha$  sintetizados por macrófagos;
- ii) Foi possível investigar a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais e estes resultados contradizem dados da literatura científica;
- iii) Não foi detectada a produção de espécies reativas de óxido nítrico (pela metodologia da Técnica de Griess), possivelmente devido à baixa concentração de células ou pelas condições da constituição química do meio de cultivo que pode não possuir precursores de espécies reativas de nitrogênio;
- iv) A peroxidação lipídica também não foi detectada, possivelmente devido à baixa intensidade da TFD aplicada (dose de pró-droga e fluência da luz);
- v) Através da técnica da microcalorimetria de condução foi possível determinar a produção energética dos macrófagos após TFD, tratados ou não com inibidores específicos da via glicolítica e cadeia respiratória. Percebe-se, portanto que a TFD interfere no metabolismo energético destas células, e portanto, há a hipótese de que se houver morte celular (macrófagos) via TFD mediada por ALA, esta morte se deve à danos em enzimas e / ou organelas responsáveis por estas vias.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisando-se cronologicamente os trabalhos envolvendo terapia fotodinâmica, publicadas nas últimas décadas, percebe-se uma tendência nos mesmos de buscar um maior entendimento das razões científicas que expliquem melhor (bioquímica e fisiologicamente) o que acontece com células, tecidos e órgãos expostos a esta modalidade terapêutica.

Assim, entende-se que de agora em diante, os resultados já obtidos e expostos à comunidade científica serão esmiuçados e detalhados frente às novas técnicas de análise que surgem a cada dia, inclua-se aqui a análise realizada via biologia molecular, microcalorimetria e genômica.

Os resultados apresentados neste trabalho são ainda mínimos quando confrontados com a enormidade de perguntas ainda não respondidas. O que acontece bioquimicamente, geneticamente e fisiologicamente são as novas frentes de pesquisa a fim de elucidar os pontos escuros deste universo de conhecimentos.

Assim, especificamente tratando do que aqui fora apresentado, podem-se inferir sugestões e protocolos experimentais que envolvam uma maior elucidação dos aspectos imunquímicos (análise de mais algumas outras citocinas), bioquímicos e genômicos (analisando com maior profundidade o que acontece a nível molecular o DNA, RNA assim como a proteômica).

## REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. n. 74, v.5, p.656-669, 2001.
- ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **The Annual Review of Immunology**, v.2, p.283-318, 1984.
- AGARWAL, M.L.; CLAY, M.E.; HARVEY, E. J.; EVANS, H.H.; ANTUNEZ, A. R.; OLEINICK, N.L. Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in LSI78Y Mouse Lymphoma Cells. **Cancer Research**, v.1, p 5993-5996, Nov., 1991.
- AL-HALLAK M.H.D.K; SARFRAZ, M.K.; AZARMI, S.; KOHAN, M.H.G.; ROA W.H.; LOBENBERG, R. Microcalorimetric Method to Assess Phagocytosis: Macrophage - Nanoparticle Interactions. **The AAPS Journal**, n.1, v. 13, 2010.
- BAZZANI, C.S.R. **Monitoração da D-glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* por Microcalorimetria de Fluxo**. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Química. Campinas – SP. 1992.
- BOLEAN, M.; PAULINO, T.P.; THEDEI, G.; CIANCAGLINI, P. Photodynamic Therapy using Rose Bengal induces GroEL expression in *Streptococcus mutans*. **Photomed. Photomedicine and Laser Surgery**. V.28, p.79-84, 2010.
- BOTTCHER, H.; FURST, P. A new microcatheter enables microcalorimetric assessment of thermogenesis after stimulation in cell cultures. **J. Biochem, Biophys Methods**, v.32, p. 191-194, 1996.
- BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**. n. 17, v.3, p.173-186, 2002.

- BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2011.
- BRESLAUER, K.J.; FREIRE, E.; STRAUME, M. Calorimetry : a tool for DNA and ligand-DNA studies. **Meth. Enzymol**, v.211, p.533-567, 1992.
- BROWN, G.C.; BORUTAITE, V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxyxynitrite and S-nitrosothiols, **Biochim Biophys Acta**.1658, p 44–49, 2004.
- CARLOS, I.Z.; CARLI, C.B.A.; MAIA, D.C.G.; BENZATTI, F.P.; LOPES, F.C.M.; ROESE, F.M.; WATANABE, M.; MICHELETTI, A.C.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. HONDA, N.K. Efeito imunoestimulante de compostos fenólicos de líquens na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.Vol.19;nº 4;João Pessoa. Oct./Dec.,2009.
- CASTANO AP, MROZ PAND HAMBLIN MR: Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nat Rev Cancer** 6: p 535-545, 2006.
- CHIN, C.M.; FERREIRA, E.I. O Processo de Latenciação no Planejamento de Fármacos. **Química Nova**, 22 (1), p. 75-84, 1999.
- COOPER, C.E. Nitric oxide and iron proteins. **Biochim Biophys Acta**. 1411.290–309, 1999.
- DAI, T.; HUANG YYAND HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 6: 170-188, 2009.
- DALBASTI, T.; CAGLI, S.; KILINC, E.; OKTAR, N.; OZSOZ, M. Online electrochemical monitoring of nitric oxide during photodynamic therapy. **Nitric Oxide**. Dec; 7(4):301-5, 2002.
- DIAS RIBEIRO, A.P.; PAVARINA, A.C.; TRINDADE, F.Z.; INADA, N.M.; BAGNATO VSAND DE SOUZA COSTA, C.A. Photodynamic therapy associating Photogem® and blue LED on L929 and MDPC-23. **Cell Biol Int** 34: 343-351, 2010.
- DING, A. H., NATHAN, C. F., STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J Immunol**, 142: 207 -2412, 1988.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D. KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst.** 90(12): p.889-905, 1998.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre o óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 39, n. 04, p. 343-350, 2003.

EVANS, S., MATTHEWS, W., PERRY, R., FRAKER, D., NORTON, J., PASS, H.I. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. **J Natl Cancer.** Inst. v.82, p.34-39, 1990.

FARMAND, F.; EHDAIE, A.; ROBERTS, C.K.; SINDHU R,K. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. **Environ Res.** May. 98(1):33-9, 2005.

FENG, Y.; OLOMOLAIVE, D.; KEMP, R.B. Thermobiochemical evidence for the rapid metabolic rate in hybridoma cells genetically engineered to overexpress the anti-apoptotic protein bcl-2 in batch culture. **Thermochimica Acta** , v.417 p.207–216, 2004.

FERRARI A.B. **Resposta Imune Celular Frente à Terapia Fotodinâmica.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos - SP. 2008.

Figura 4 disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed6&part=A9639>. Acesso em: 29 de março de 2010.

Figura 7 disponível em:  
[http://cytochemistry.net/cellbiology/medical/practice\\_exam\\_connective\\_tissue.htm](http://cytochemistry.net/cellbiology/medical/practice_exam_connective_tissue.htm). Acesso em: 29 de março de 2010.

FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochen Photobiol.** 54 (5): p.659, 1991.

FUKUDA, H.; CASAS, A.; BATLLE, A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy , **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 37 (2005) 272–276, 2005

GARCES, B.P; FRANÇA, E.G; OLIVEIRA, C.A; PAULA, L.F; MARTINS, J.F.N; SANTOS, R.O; COSTA, T.O; CEOLIN, M.P; SOUZA, G.D; NETO, A.D.A; FERREIRA, F.S. Inativação fotodinâmica de macrófagos de camundongo swiss utilizando a ftalocianina de alumínio como fotossensibilizador. **48° Congresso Brasileiro de Química**. Rio de Janeiro. 2008.

GOLLNICK, S.O.; EVANS, S.S.; BAUMANN, H.; OWCZARCZAK, B.; MAIER, P.; VAUGHAN, L.; WANG, W.C.; UNGE, E.; HENDERSON, B.W. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. **British Journal of Cancer** (2003) 88, 1772 – 1779. 2003

GOLLNICK, S.O.; LIU, X.; OWCZARCZAK, B. Altered Expression of Interleukin 6 and Interleukin 10 As a Result of Photodynamic Therapy *in vivo*. **Cancer research** . Sep 5. 997. 1997.

GROTO, D.; SANTA MARIA, L.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; SCHIMITT, G.; GARCIA, S. C.; POMBLUM, V. J.; ROCHA, J. B. T.; FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quím Nova**. V.32:1. São Paulo, 2009.

GUAN, Y.H.; LLOYD ,P.C.; KEMP, R.B. A calorimetric flow vessel optimised for measuring the metabolic activity of animal cells. **Thermochimica Acta** v.332, 1999.

GUPTA, S., AHMAD, N., MUKHTAR, H. Involvement of nitric oxide during Phthalocyanine (Pc4) Photodynamic Therapy-mediated apoptosis. **Cancer Research**, v.54, p. 1785-1788, 1998.

HARDEN, L.M.; du PLESSIS, I.; POOLE, S.; LABURN, H.P.; Interleukin (IL)-6 and IL-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. **Brain Behav Immun**. 2008 Aug; 22(6):838-49. 2008.

ISSA, M. C.A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Revista Brasileira de Dermatologia**. Vol.85 N° 4 Rio de Janeiro July/Aug., 2010.

KAWCZYK-KRUPKA, A.; CZUBA, Z.; SZLISZKA, E.; KRÓL, W.; SIEROŃ, A. The role of photosensitized macrophages in photodynamic therapy. **Oncology reports** 26: 275-280, 2011.

KEMP, R.B. Calorimetric studies of Heat Flux in animal cells. **Thermochimica Acta**, v.10, p.253-267, 1991.

KEMP, R.B.; GUAN, Y.H. The application of heat flux measurements to improve the growth of mammalian cells in culture. **Thermochimica Acta**, v.349 p.23-30, 2000.

KENNEDY, J.C., MARCUS, S.L., POTTIER, R.H. Photodynamictherapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenousphotosensitization induced by 5-aminolevulinicacid (ALA): mechanisms and clinical results. **J Clin Laser Med Surg**; 14:289–304, 1990.

KOIDE N, NISHIO A, SATO T, SUGIYAMA A; MIYAGAWA S. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Am J Gastroenterol** 99: p 1667-1674, 2004.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res**. v.86, p.694-707, 2007.

LI. B.; CHU, X.;GAO, M; LI, W. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoyanin . **Acta Biochim Biophys Sin**. p 80–89, 2010.

MAGESTE A.B. **Aplicação da Microcalorimetria e do espalhamento de raios-X a baixos ângulos no estudo da interação poli (óxido de etileno) e dodecil sulfato de sódio: efeito de cosolutos iônicos**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa para obtenção do título de Magister Scientiae. Viçosa - MG. 2009.

MALIK R, MANOCHA A AND SURESH DK: Photodynamic therapy - A strategic review. **Indian J Dent Res** 21: 285-291, 2010.

MARES-GUIA, M.; NASCIMENTO, V.V.; LOVRIEN,R.; MELO, M.N Microcalorimetric determination of glucose utilization by Leishmania. **Thermochemica Acta**, v.172, p.203-211, 1990.

MARQUIS, R.E. Applied and ecological aspects of oxidative-stress damage to bacterial spores na the oral microbes. **Sci Prog**. 87: p. 153-177, 2004.

MORTON, C.A; MCKENNA, K.E.; RHODES, L.E. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. **British Journal of Dermatology** 159, 1245–1266, 2008.

NAOUM, J.J.; ALGHENDY, A.A. Laser therapy for the treatment of telangiectasias and reticular veins in the lower extremity. **Methodist Debakey Cardiovasc J**. 5(4):20-4.

NÄSSBERGER, L.; JENSEN, E.; MONTI, M. & FLOREN, C.H. Microcalorimetric investigation of metabolism in rat hepatocytes cultured on microplates and in cell suspensions. **Biochim. Biophys. Acta**, v.882(3), p.353-358, 1986.

NATHAN, C.; XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell Press**. Sep 23;78(6):915-8, 1994.

ORTEL, B.; SHEA, C.R.; CALZAVARA-PINTON, P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. **Frontiers in Bioscience**, 320-335, Jan, 2009.

PARK JH, MOON YH, BANG IS, KIM YC, KIM SA, AHN SGAND YOON JH: Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. **Lasers Med Sci** 25: 705-710, 2010.

PAULINO, T.P. Ação de corantes fotossensíveis em meio homogêneo e micro heterogêneo de lipossomos no controle do crescimento de *Streptococos Mutans*. Tese. **Universidade de São Paulo**, 2006.

PAULINO, T.P., MAGALHÃES, P.P., THEDEI, G., JR., TEDESCO, A.C., CIANCAGLINI, P. Use of visible light-based photodynamictherapy to bacterial

photoinactivation. **Biochemistry and Molecular Biology Education**. 33, 46–49, 2005.

PAULINO, T.P.; RIBEIRO, K.F.; THEDEI, G., JR.; TEDESCO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizerto photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**. 50, 353–359, 2005.

REEVES, K.J.; REED MWAND BROWN, N.J. The role of nitric oxide in the treatment of tumours with aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B** 101: 224-232, 2010

RIBEIRO N.M.; FERRARI, E.F.; CARDOSO, M.A.G.; JÚNIOR, M.B.; SOARES, C.P. Estroma tumoral e terapia fotodinâmica. **XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**. 2009.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HUBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Neurol Clin.**, v.24, p.421-439, 2006.

ROTHWELL, N.J. Autonomic and central control of thermogenesis. In: ROTHWELL, N.J.; STOCK, 1991.

ROVALDI, C.R; PIEVSKY, A.; SOLE, N.A.; FRIDEN, P.M.; ROTHSTEIN, D.M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphirin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. **Antimic Ag Chemoth**. 44(12):p. 3364-3367, 2000.

SATROM, K.D.; MORRIS, M.A.; CRIGGER, LP. Potential retinal hazards of visible-light photopolymerization units. **J Dent Res Mar**. 66(3):731-6, 1987.

SHARMA, S.; JAJOO, A.; DUBE, A. 5- Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin-IX accumulation and associated phototoxicity in macrophages and oral cancer cell lines. **J Photochem Photobiol B: Biol**. v.94, p.156-162, 2007.

SHAWAR, R.; COOPER, B.H. Comparative kinetics of hematoporphirin derivate uptake and susceptibility of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus faecalis* to phorodynamic action. **Photochem Photobiol**. 52 (4): p. 825-830, 1990.

SILVA P.T.; PAPPEN, F.G.; SOUZA, E.M.; DIAS, J.E.; FILHO, I.B.; CARLOS, I. Z.; LEONARDO, R.T. Cytotoxicity evaluation of four endodontic sealers. **Braz Dent J**.

Vol. 19. N°3. Ribeirão Preto. 2008.

SILVA, P.T.; PAPPEN, F.G.; SOUZA, E.M.; DIAS, J.E.; FILHO, I.B.; CARLOS, I.Z.; LEONARDO, R.T. Cytotoxicity evaluation of four endodontic sealers. **Braz. Dent. J.** Vol. 19. N°3. Ribeirão Preto. 2008.

STURTEVANT, J.M. Calorimetry. **Meth. Enzymol**, v.26, p.227-253, 1972.

TOREZAN L.; NIWA, A.B.M.; NETO, C.F. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Rev Bras Dermatol** Vol.84 n5. Rio de Janeiro Sept./Oct., 2009.

TURNBULL AV, RIVIER CL. Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli. **Neuroendocrinology**. v.70, p.186-195, 1999.

VASCONCELOS, A.B; CASTANHEIRA, P.; VARAGO, F.C.; SANTORO, M.M.; LAGARES, M.A. Determination of Optimal Glucose Concentration for Microcalorimetric Metabolic Evaluation of Equine Spermatozoa, Brazilian Arch. **Biol. Tech**. v.52, n. 5: p.1129-1136, 2009.

WADSÖ, I. Progress and problems in microcalorimetric work am mammalian cell systems. **Thermochimica Acta**, v.137, p.1-10, 1988.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**. 42,13–28, 1998.

WEI, L.H.; BAUMANN, H.; TRACY, E.; WANG, Y.; HUTSON, A.; ROSE-JOHN, S.; HENDERSON, B.W. Interleukin-6 trans signaling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling. **Br J Cancer**. 97(11) 1513-1522, 2007.

YAMAMOTO, F.; OHGARI, Y.; YAMAKI, N.; KITAJIMA, S.; SHIMOKAWA, O.; MATSUI, H.; TAKETANI, S. The role of nitric oxide in  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of cancerous cells. **Biochem Biophys Res Comm**. 353. 541-546, 2007.

ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; PELÁ, I.R.; HOPKINS, S.J.; SOUZA, G.E.P. A pre-formed pyrogen factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. **Med Inflamm.**, v.3, p.365-373, 1994.

## ANEXO I



Comitê de Ética em Experimentação Animal

---

Ofício CEEA-009/2011

Uberaba, 25 de maio de 2011

Ilmo. Prof.

**Tony de Paiva Paulino**

**Assunto:** Encaminha processo nº 004/2011, sobre o protocolo de pesquisa "Determinação quantitativa do óxido nítrico e IL-6 em macrófagos tratados *in vitro* com Terapia fotodinâmica".

Prezado Professor,

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à reavaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 18/05/2011, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. J. F. Siqueira Junior**

Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE