

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE MICRO E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
PORFIRINA PARA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)
EM SISTEMAS BIOLÓGICOS**

ANDREZA PEREIRA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

SÃO PAULO

2013

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO CONTENDO
PORFIRINA INCORPORADA EM MICRO E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA TERAPIA
FOTODINÂMICA (TFD) EM SISTEMAS BIOLÓGICOS**

ANDREZA PEREIRA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao curso para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Imunopatologia apresentado à Universidade Paulista – UNIP.

Orientador: Profa Dra Lucia Jamli Abel.

SÃO PAULO
2013

Santos, Andreza Pereira dos.

Avaliação de uma formulação contendo porfirina polimérica micro e nanoencapsulada de porfirina para terapia fotodinâmica (TFD) em sistemas biológicos / Andreza Pereira dos Santos - 2013.

37 f. : il. color.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental da Universidade Paulista, São Paulo, 2013.

Área de Concentração: Imunopatologia.
Orientador: Profª. Dra. Lucia Jamli Abel.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Porfirinas. I. Título. II. Mariano, Mario (orientador).

ANDREZA PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE MICRO E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
PORFIRINA PARA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)
EM SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Lúcia Jamli Abel ___/___/
Universidade Paulista – UNIP

Prof^a Leoni. V. Bonamin ___/___/
Universidade Paulista – UNIP

Prof^a Daiana K. D. Nogueira ___/___/
Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me concedido à vida.

Aos meus pais pelo dom da maternidade e paciência desde meus primeiros passos até esta caminhada de êxito pessoal e profissional.

Ao meus amigos, incansáveis companheiros e estimuladores da minha capacitação profissional e pessoal.

À vida, pela concessão do espaço para realizar meus sonhos e ideais, pelo espírito forte de luta e pela sabedoria de ter aceitado a vida como ela me foi dada.

Agradeço, em especial, a professora Dra. Lúcia Jamli Abel, pela dedicação em me incentivar ao aprendizado constante em relação aos objetivos traçados pelo curso e a prática em educação.

Ao Dr. André Abachi, a professora mestre Daclé Juliane Macrini, que contribuíram nesta caminhada.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) envolve a ativação de substâncias fotossensíveis com uma fonte de luz, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio e de radicais livres visando à destruição dos tecidos alvos. A TFD apresenta resultados satisfatórios para o tratamento do câncer sob o ponto de vista médico, sendo viável para tratamento de doenças como psoríase, vitiligo e melanoma. Estudos envolvendo novos compostos e entender os mecanismos de ação dos agentes fotossensíveis tornam-se imperativos para obtenção de melhores resultados clínicos.

O presente trabalho teve como objetivo analisar e comparar o efeito de uma formulação micro e nanoencapsulada contendo porfirina 3MMe em linhagens de fibroblastos NIH 3T3, melanoma murino B16-F10 e melanócito Melan-A in vitro por meio de indicadores de função e viabilidade celular. Avaliou-se ainda o efeito da formulação micro e nanoencapsulada contendo porfirina 3MMe em modelos experimentais de melanoma murino in vivo. Os resultados mostraram que a citotoxicidade celular foi diretamente proporcional à concentração de porfirina 3MMe e tempo de incubação e irradiação, sendo o tratamento significativamente mais efetivo para as células da linhagem B16-F10 em relação às células da linhagem 3T3 e Melan-A. Não foi observada citotoxicidade celular na presença de porfirina 3MMe na ausência de luz (grupo controle), comprovando a ação fotodinâmica da formulação.

Estudos in vivo mostraram que os animais com melanoma e que receberam a porfirina e foram irradiados apresentaram diminuição significativa da massa tumoral em relação aos demais grupos controles, com presença de focos hemorrágicos e erosão associados à presença de necrose da epiderme, indicando ação fotodinâmica da porfirina 3MMe.

De acordo com os resultados, a formulação de micro e nanocápsulas poliméricas contendo porfirina 3MMe apresentou efeitos citotóxicos in vitro e in vivo, com potencial terapêutico e promissor no tratamento de melanoma pela TFD.

PALAVRAS-CHAVE: Melanoma, Fotossensibilizador, Terapia Fotodinâmica, Porfirinas.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) involves the activation of photosensitive substances with a light source, promoting the release of reactive oxygen species and free radicals seeking the destruction of target tissues. The PDT provides satisfactory results for cancer treatment on the medical point of view and feasible for aesthetic and treatment of diseases such as psoriasis, vitílico and melanoma. In this sense, studies involving new compounds and understanding the mechanism of action these photosensitive agents becomes imperative to achieve better clinical outcomes.

This study aimed to analyze and compare the effect of a micro nanoencapsulated of the porphyrin 3MMe in NIH 3T3 fibroblast lines, B16-F10 murine melanoma and melanocytes lines Melan-A in vitro through indicators of cell viability and function. We evaluated the effect of formulation of micro nanocoated porphyrin 3MMe in experimental murine melanoma in vivo. The results showed that the cytotoxicity was directly proportional to the amount of porphyrin 3MMe and to time of incubation and irradiation, and significantly more effective treatment for cell line B16-F10 than the cell line 3T3 and Melan-A. It was not observe cellular cytotoxicity in the presence of porphyrin (3MMe) and absence of light (control group), proving the photodynamic action of the formulation.

In vivo studies showed that animals with melanoma who received the treatment, showed a significant decrease in tumor mass compared to the other control groups, with the presence of hemorrhagic foci and erosion associated with necrosis of the epidermis indicating the photodynamic action of porphyrin 3MMe.

According to the results, the formulation of polymeric micro and nanocoencapsulates containing porphyrin 3MMe presented cytotoxic effects in vivo and in vivo with promising therapeutic potential in the treatment of melanoma by PDT.

KEYWORDS: Melanoma, photosensitizer, Photodynamic Therapy, Porphyrins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Células sendo irradiadas com laser vermelho (630nm) com tampa (fora do fluxo laminar) e sem tampa (dentro do fluxo laminar)	15
Figura 2 - Paquímetro utilizado na avaliação de medidas da massa tumoral	16
Figura 3 - Crescimento da massa tumoral após os animais receberem injeção subcutânea de células da linhagem B16-F10 (A); Injeções subcutâneas de Porfirina (3MMe) na massa tumoral com tamanho de 14 a 22mm (18 a 27 dias após injeção das células tumorais) (B); Irradiação por 30 minutos com laser vermelho de 630nm (C)	17
Figura 4 - Esquema A – Estrutura molecular da Porfirina, 3MMe -5,10,15-trifenil-20-(3-N-metilpiridínio-il), B - Espectro de absorção com indicação (seta) da janela fototerapêutica em 650nm.....	19
Figura 5 - Fotomicrografia da formulação contendo porfirina 3MMe micro e nanoencapsulada (A) e células da linhagem Melan-A (B) 3T3-NIH (C) aumento de 40X e B16-F10 (D), aumento de 100X.....	20
Figura 6 - Viabilidade (%) de células B16 e 3T3, variando-se a quantidade de células 5×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 cel/poço. As células foram incubadas durante 1h, 3h e 5 h, na presença de porfirina 3MMe (1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M e 1×10^{-8} M) e irradiadas durante 30m com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas com porfirina sem irradiação.....	21
Figura 7 - Viabilidade (%) de células das linhagens B16, 3T3 e Melan-A na concentração de 5×10^3 cels, após incubação na ausência (controle-c) e presença de porfirina 3MMe (1×10^{-6} M) durante 1h, 3h e 5h. Após incubação, as células foram irradiadas durante 30m com laser de 630nm. Como controle, as células foram incubadas com porfirina 3MMe na concentração de 1×10^{-6} M sem irradiação.....	22
Figura 8 - Viabilidade (%) de células B16, 3T3 e Melan-A na concentração 5×10^3 cels, após incubação durante 3h, na presença de porfirina 3MMe nas concentrações de 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M e 1×10^{-8} M. Após incubação, as células foram irradiadas durante 30m com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas com porfirina sem irradiação.....	23
Figura 9 - Comparação da viabilidade (%) de células B16, 3T3 e Melan-A após incubação durante 3h e 5h, com a porfirina 3MMe na concentração de 1×10^{-6} M. Após incubação, as células foram irradiadas durante 30m com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas sem porfirina, e valores de p <0,05 foram considerados significativos.....	24
Figura 10 - Efeito do tempo de irradiação com laser vermelho de 630nm na viabilidade (%) nas células da linhagem B16 e 3T3 após incubação durante 1h, 3h e 5h, com a porfirina 3MMe na concentração de 1×10^{-6} M.....	25
Figura 11 - Viabilidade (%) de células B16 (A) e 3T3 (B) após incubação com a porfirina 3MMe nas concentrações de 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, durante 3h e 5h, com a	

tampa aberta (dentro do fluxo laminar) e fechada (fora do fluxo laminar), com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas sem porfirina.....26

Figura 12 - Volume da massa tumoral (mm^3) após injeção de células tumorais da linhagem B16F10. O tratamento com a porfirina 3MMe foi iniciado quando os tumores alcançaram o tamanho de 14 a 22 mm (18 a 27 dias após injeção das células tumorais). Os camundongos receberam injeções de 100ul da formulação diluídas em PBS com porfirina 3MMe na concentração de 10^{-5} M diluída PBS, ao redor da massa tumoral. Após 3h da injeção da formulação, os animais foram anestesiados e submetidos a irradiação por 30m com laser vermelho de 630nm. ...27

Figura 13 - Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongos tratados e não tratados com porfirina 3MMe e irradiados com laser. Coloração Hematoxilina e Eosina (100X e 400X). **A e B** Tumor (4X); **C** - Tumor + irradiação (4x); **D**- Tumor + Porfirina sem irradiação; **E e F** – Tumor+ Porfirina e irradiado (40x) e (4x), respectivamente.....**Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1. Porfirina 3MMe micro e nanoencapsulada	13
2.2. Linhagens celulares	13
2.3. Teste de citotoxicidade e fototoxicidade.....	14
2.4. Tratamento fotodinâmico.....	14
2.5. Teste de viabilidade celular	15
2.6. Efeito da porfirina 3MMe em modelo de melanoma murino	15
2.7. Análise histológica.....	18
2.8. Análise estatística	18
3. RESULTADOS	19
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de pele corresponde a 25% dos tumores malignos registrados e, apesar de os melanomas representarem apenas 4% das neoplasias malignas da pele, são considerados mais graves por possuir maiores chances de formar metástases (Instituto Nacional do Câncer, 2010). Em 2008, 1.303 pessoas morreram por causa da doença, e quase 6 mil novos casos são estimados para os próximos anos (INCA 2010).

A TFD consiste em uma modalidade terapêutica que envolve a utilização de fotossensibilizador inócuo que normalmente se concentra nas células tumorais e radiação inofensiva de baixa energia (na região de 600 a 750nm), para promover a destruição de tecidos anormais em regiões localizadas (Ficheux et al., 2009). A TFD é utilizada com sucesso no tratamento do câncer, apresentando excelentes resultados sob o ponto de vista médico e estético, alternativa viável de tratamento para doenças da pele, como psoríase, vitílico e melanoma, frente aos efeitos colaterais e eficiência limitada das terapias tradicionais (Kessel et al., 1995; Madsen et al., 2000; Mori et al., 2000; Nakamura et al., 2000). As vantagens da TFD com ação antineoplásica são: (a) possibilidade de tratamento simultâneo de lesões múltiplas e incipientes; (b) tempo de cura relativamente curto; (c) inibição de crescimento tumoral em pacientes imunocomprometidos, como transplantados; (d) boa tolerância do paciente ao tratamento; (e) resultado cosmético excelente (Babilas et al., 2005), além da possibilidade de repetição do tratamento sem acúmulo de toxicidade (Sierón et al., 2003).

Nas células, a fotoativação é capaz de promover a destruição irreversível dos tecidos tumorais por meio de três formas principais: produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando diretamente a morte das células tumorais por apoptose e/ou necrose; efeito antivasicular que pode causar trombose e hemorragia dos vasos tumorais levando à morte das células neoplásicas por privação de oxigênio e nutrientes; e ativação da resposta imune contra as células tumorais pelo processo de inflamação aguda e liberação de citocinas no tumor, resultando em influxo de macrófagos e leucócitos que contribuiriam para a destruição tumoral e estimulariam o sistema imune a reconhecer e eliminar as células neoplásicas (Plaetzer et al., 2003; Castano et al., 2005, Ficheux, 2009). A apoptose por

envolvimento da via do Fas parece ter papel relevante como mecanismo de morte celular promovida pela TFD, com o uso em particular dos fotossensibilizadores tópicos (Wiedmann et al., 2004; Nakaseko et al., 2003).

Quando a região contendo o fotossensibilizador é irradiada por fonte de luz de comprimento de onda apropriado, são geradas espécies reativas, principalmente o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que ataca o tecido, causando a morte celular por necrose (Ruck et al., 1992; Bonnett et al., 1999) ou por indução da apoptose, sendo os efeitos tóxicos restritos apenas à região irradiada (Elsaleh et al., 2000; Alvarez et al., 2000). Diferentemente da radioterapia, na TFD a morte celular é observada em 4h, e o tecido danificado é aparente após 24h. Nos casos de morte necrótica, os efeitos são observados em alguns dias (Pass, 1993; Nowis et al., 2005).

A ação das espécies de oxigênio singlete é confinada ao local onde são geradas, e as estratégias devem ser elaboradas para concentrar o fotossensibilizador tanto quanto possível nos sítios alvos, para maximizar a ação fotodinâmica e minimizar os efeitos colaterais. O efeito fotonecrótico seria induzido indiretamente por meio do dano do sistema vascular periférico ao redor do tumor, privando as células de oxigênio e nutrientes (Allison et al., 2008; Simplício et al., 2002).

A TFD induz resposta inflamatória causada pelo estresse oxidativo, com transdução de sinais que induzem a expressão de genes das proteínas de choque térmico (heat shock protein) e fatores de transcrição NF- κ B (Matroule et al., 1999; Kick et al., 1995; et al., 2000) e AP-1, induzindo a expressão de dezenas de citocinas, moléculas de adesão, moléculas coestimuladoras e genes importantes da resposta imune (Nowis et al., 2005).

Os fotossensibilizadores utilizados se localizariam em diferentes compartimentos da célula, como mitocôndria, lisossomos, retículo endoplasmático, ou mesmo na membrana celular. A TFD é mais destrutiva em nível mitocondrial e lisossomal, com liberação de citocromo c seguido de danos às mitocôndrias, que é o evento primário da apoptose, na qual as caspases estão envolvidas (Lavi et al., 2002; Mak et al., 2004). Os danos causados dependem das doses do fármaco, da irradiação luminosa e localização celular (Granville et al., 1998; Oleinick et al., 2002).

A interação dos fotossensibilizadores com as células e sua capacidade de permear através de membranas e de retenção, além de suas habilidades em produzir espécies citotóxicas são fatores que definem a atividade fotodinâmica dos mesmos. Contudo, a eficiência de um fotossensibilizador *in vivo* depende de sua interação com os componentes do plasma sanguíneo, sua acumulação nos tecidos neoplásicos e sua colocalização intracelular (Webbert et al., 2000; Sibata et al., 2004).

Acredita-se que os principais alvos da ação fotodinâmica encontram-se nas membranas biológicas. Assim, a atividade fotodinâmica, por exemplo, das porfirinas, deve ser determinada em grande parte pelas constantes de associação com as membranas e células em relação aos componentes do plasma sanguíneo (Cernay et al., 1996; Zimmerman et al., 2001).

Na reação de fototoxicidade e ação fotodinâmica estão implicados múltiplos fatores, como classe, dose, via de administração, absorção, seletividade e biodistribuição do fotossensibilizador, tipo de fonte de luz, irradiância (taxa de fluência) e dose (fluência), disponibilidade do oxigênio no tecido alvo e intervalo entre administração do fotossensibilizador e a exposição à fonte de luz (Pass et al., 1993; Dougherty et al., 1978).

Algumas limitações quanto a tempo de uso e persistência no organismo levariam a reações indesejáveis na pele, sendo possível perdurar por semanas ou meses (Moriwaki et al., 2001; Simplício et al., 2002; Tian et al., 2008). Formulações fotossensíveis mais seguras e eficazes são propostas (Triesscheijn et al., 2006; Bechet et al., 2008; Hudson et al., 2005; Reddi et al., 2002; Araki et al., 2000, 2001, 2003).

As porfirinas são compostos orgânicos muito relevantes, amplamente encontrados na natureza e que participam de importantes processos biológicos. Os primeiros a serem utilizados como fotossensibilizantes em terapia fotodinâmica apresentam em sua estrutura um anel cromóforo tetrapirroico cíclico conjugado (anel porfirínico), que confere às porfirinas sua coloração intensa, com forte absorção na região de luz visível. A interação de porfirinas com as células Hela foi demonstrada por Cernay et al., 1996; Nakamura et al., 2000. Nesse trabalho, foram testadas diferentes porfirinas com diferenças significativas na resposta fotodinâmica. Um dos

primeiros agentes fototerapêuticos, denominado Photofrin®, aprovado pelo FDA 20 anos atrás, baseia-se em oligômeros de hematoporfirina constituídos de nove unidades de porfirinas (Allison et al., 2008; Pushpan et al., 2002; Sharman et al., 1999; Ward et al., 1997).

Em geral, as porfirinas e derivados apresentam propriedades fotodinâmicas interessantes; entretanto, sua solubilidade em água é demasiadamente baixa para aplicação direta no tratamento por TFD. Existem muitas maneiras de modificar os fotossensibilizadores lipofílicos e possibilitar seu emprego na terapia fotodinâmica, entre elas utilizando lipossomos (Derycke et al., 2004), micelas (Li et al., 2007; Van Nostrum, 2004), nanopartículas de cerâmica (Roy et al., 2003), nanopartículas de ouro e polímeros nanoparticulados (Ricci et al., 2005).

A encapsulação polimérica representa uma escolha a ser considerada entre as alternativas, porque a cápsula pode ser feita de diferentes polímeros biocompatíveis e com certo grau de ligações cruzadas, permitindo o controle de permeabilidade e resistência mecânica (Torchilin, 2006; Bechet et al., 2008). O polietileno glicol (PEG) seria adicionado para diminuir a interação entre as superfícies das cápsulas e os componentes plasmáticos responsáveis pela ativação de receptores de fagócitos, minimizando a perda de moléculas fotossensíveis pelo processo de opsonização (Konan et al., 2002; Needhan et al., 1992).

Recentemente foi demonstrado pelo grupo de Química Supramolecular e Nanotecnologia da USP que séries de mesoporfirinas catiônicas são sistemas consistentes em decorrência da possibilidade de modulação da relação hidrofilicidade/lipofilicidade, sem alterar significativamente a eficiência na formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Engelmann et al., 2007). Contudo, um grande inconveniente é a baixa solubilidade em água. Entretanto, Deda et al., 2009, descreveram o emprego de uma emulsão de porfirina 3MMe micro e nanoencapsulada pelo método de coacervação (aglomerado de moléculas proteicas envolvidas por água na forma simples). Os resultados com células Hela mostraram que a porfirina 3MMe foi uniformemente dispersa com efeito fototóxico quatro vezes maior que uma emulsão lipossomal, sendo a toxicidade celular superior a 60% na presença de porfirina 3 MMe nanoencapsulada, obtendo-se resultados com mais de 80% das células inativadas após 10m de irradiação com laser de 630nm, com

grande potencial terapêutico para aplicação no tratamento da TFD (Deda et al, 2009).

O objetivo deste trabalho foi analisar e comparar o efeito de uma formulação micro e nanoencapsulada de porfirina 3MMe em células não tumorigênicas de fibroblasto NIH 3T3 e Melan-A, e células tumorais melanoma murino B16-F10, *in vitro*, a partir de indicadores de função e viabilidade celular. Foi avaliado ainda o efeito da formulação em modelos experimentais de melanoma murino *in vivo*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Porfirina 3MMe micro e nanoencapsulada

A porfirina meso (3-N-metil piridínio) (trifenil) porfirina (3MMe) foi sintetizada, caracterizada e incorporada em micro e nanocápsulas poliméricas de atelocolágeno marinho, por meio da técnica de coacervação simples, de acordo com método descrito por Deda et al., 2009. A formulação utilizada neste estudo foi cedida gentilmente pelo grupo do prof. Koiti Araki, do Instituto de Química da USP.

2.2. Linhagens celulares

Células das linhagens não tumorigênicas de fibroblasto (NIH 3T3) e melanócitos (Melan-A), e células tumorigênicas de melanoma murino (B16-F10) foram cultivadas em garrafas na presença de RPMI 1640 (Invitrogen) acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Cutilab), e expandidas em estufa úmida a 37°C em presença de 5% CO₂. Ao atingirem confluência, as células foram lavadas com PBS sem cálcio e magnésio (Invitrogen) e tripsinizadas com solução Tryple Express (Gibco), lavadas com meio de cultura contendo 5% SFB, ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 10% SFB. As células da linhagem de melanócitos Melan-A foram cultivadas e expandidas em garrafas na presença de RPMI 1640 (Invitrogen) pH 6,9 acrescido de 10% SFB (Gibco) e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Cutilab), a 37°C em presença de 5% CO₂, na presença de 200nm de 12-o-tetradecanoyl PMA (Sigma, St Louis, MO), de acordo com o protocolo descrito (Bennet et al., 1987).

A determinação da viabilidade celular foi feita com corante azul de tripan e a contagem das células em Câmara de Neubauer.

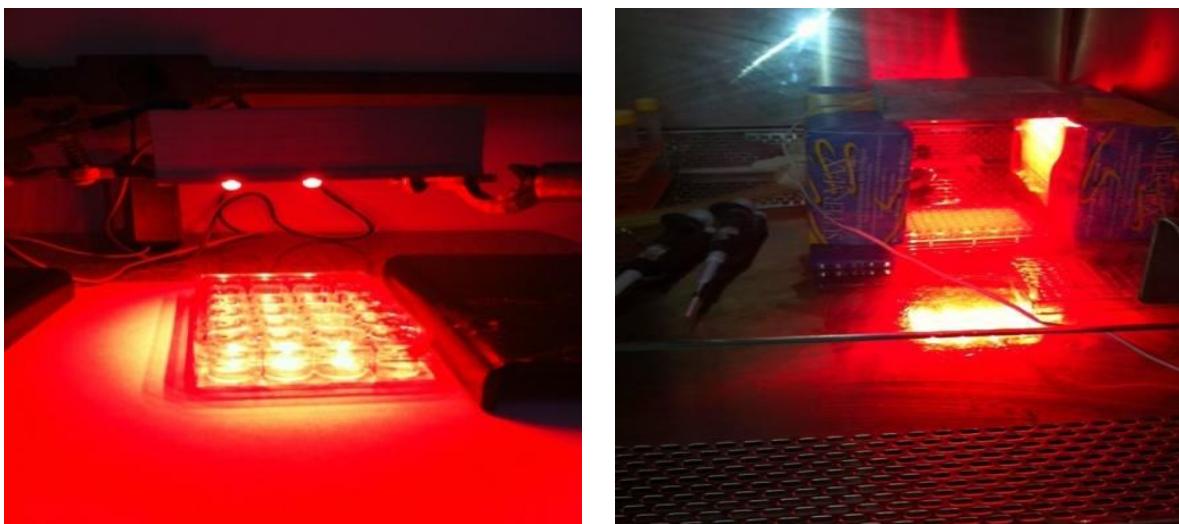
2.3. Teste de citotoxicidade e fototoxicidade

A citotoxicidade e fototoxicidade das formulações contendo diferentes concentrações de 3MMe foram avaliadas em células das linhagens não tumorigênicas de fibroblasto NIH 3T3, Melan-A e melanoma murino B16-F10. As células foram transferidas em diferentes concentrações (5×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 /ml para placa de 96 poços com meio RPMI 1640 5% suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) para adesão das células em estufa de CO_2 , temperatura $37^\circ C$ incubadas overnight. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 100 μL das soluções da porfirina 3MMe em diferentes concentrações, diluídas 100 vezes em meio RPMI sem soro, de maneira que a concentração final em cada poço fosse de $1,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-8}$ mol/L e incubadas em diferentes tempos 1h, 3h e 5hs. Como controle, as células foram cultivadas e incubadas nas mesmas condições sem a presença da porfirina 3MMe.

2.4. Tratamento fotodinâmico

Após o período de incubação com a porfirina 3MMe, as células foram lavadas com solução PBS para remover o excesso da formulação, sendo adicionados 100 μL de PBS e irradiadas com um laser vermelho de 630nm, potência de $70 mW cm^{-2}$, dose de $50 J/cm^2$ (LaserLine) com luz intermitente durante 5m, 10m e 30m. As células foram irradiadas com tampa (fora do fluxo laminar) e sem tampa (dentro do fluxo laminar), e no grupo controle as células não foram irradiadas.

Figura 1 - Células sendo irradiadas com laser vermelho (630nm) com tampa (fora do fluxo laminar) e sem tampa (dentro do fluxo laminar).



2.5. Teste de viabilidade celular

Após a irradiação, as células foram lavadas com PBS, sendo adicionado meio de cultura RPMI 10% SFB e incubadas em estufa de CO₂, temperatura 37°C incubadas overnight. O número de células viáveis foi determinado pelo método do MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), adicionando-se 50µL de uma solução final de 0,5mg/ml. As células foram então incubadas por 4h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, e após esse período foram adicionados 200µL DMSO (Dimetil sulfóxido) em cada poço. A placa foi mantida em agitação para a solubilização dos cristais de formazana por 10m. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 550nm (TECAN). O número de células viáveis foi estimado a partir da absorbância medida considerando 100% viabilidade do controle.

2.6. Efeito da porfirina 3MMe em modelo de melanoma murino

Foram utilizados 24 camundongos C57Bl6 fêmeas com 6-8 semanas de idade, pesando entre 25± 5g; foram mantidos em gaiolas com microisoladores em biotério padrão, com temperatura e umidade controladas, em regime de luz claro e escuro, mantidos com ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos da seguinte forma:

A - Com injeção do tumor (n=12)

- Só com laser (n=3)
- Só formulação (n=3)
- Laser + formulação (n=3)
- Sem nada (n=3)

B - Sem tumor (n=12)

- Só com laser (n=3)
- Só formulação (n=3)
- Laser + formulação (n=3)
- Sem nada (n=3)

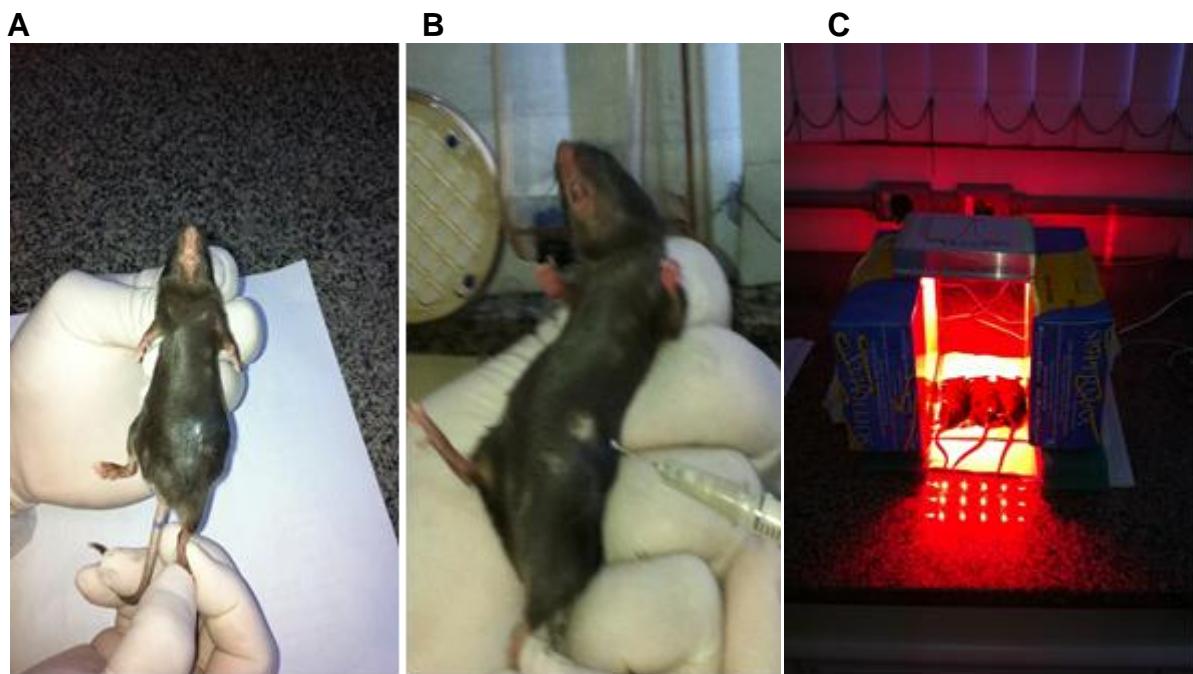
Os animais do grupo A receberam injeção subcutânea no flanco esquerdo de células viáveis da linhagem B16F10 de melanoma murino na concentração de 1 X 10^6 /100ul de meio de cultura completo RPMI (Gibco Life Technologies Grande Island), suplementado com 10% SFB. Animais do grupo controle receberam somente meio de cultura. A massa tumoral surgiu em todos os animais que receberam a injeção de célula de melanoma (n=12), sendo considerados positivos os animais com volume de massa $> 20\text{mm}^3$. O crescimento e volume foram acompanhados três vezes por semana, e o tamanho do tumor determinado com auxílio de um paquímetro, segundo o cálculo $L(W^2)/2$, conforme descrito em Hammond-McKibben et al., 2001.

Figura 2 - Paquímetro utilizado na avaliação de medidas da massa tumoral



O tratamento com a porfirina 3MMe foi iniciado quando os tumores alcançaram o tamanho de 14 a 22 mm (18 a 27 dias após injeção das células tumorais). Os camundongos receberam injeções de 100ul de porfirina (3MMe) na concentração de 10-5M diluída em PBS (1^a e 2^a doses), sendo utilizada pura na 3^a dose, ao redor da massa tumoral. Esse tratamento foi repetido em um intervalo de 3 dias a 7 dias. Após 3h da injeção da formulação, os animais foram anestesiados com solução contendo 300ul Dopalen (cloridrato de quetamina 1,16g, Vetbrands) e 150ul de Rompum (cloridrato de xilasina 2g, Bayer) e 550ul de PBS (Gibco), e irradiados com laser vermelho de 630nm, potência de 70mWcm⁻², dose de 50j/cm (LaserLine) intermitente durante 30m, à distância de 15cm da luz incidente. Os animais do grupo controle foram: (A) irradiados e que não receberam a formulação com e sem tumor; (B) receberam a formulação, mas não foram irradiados com e sem tumor; (C) grupo não recebeu tratamento. Os olhos dos animais foram protegidos com venda plástica.

Figura 3 - Crescimento da massa tumoral após os animais receberem injeção subcutânea de células da linhagem B16-F10 (A); Injeções subcutâneas de Porfirina (3MMe) na massa tumoral com tamanho de 14 a 22mm (18 a 27 dias após injeção das células tumorais) (B); Irradiação por 30 minutos com laser vermelho de 630nm (C).



2.7. Análise histológica

Camundongos foram sacrificados em câmara de CO² após 24h do tratamento de acordo com as regras institucionais. Amostras dos tumores foram fixadas em formalina, incluídas em parafina e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). O material foi analisado em microscópio Nikon Eclipse e imagens capturadas usando câmera Sony Cybershot 3.3mp.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Paulista – UNIP, sob o número 144/12.

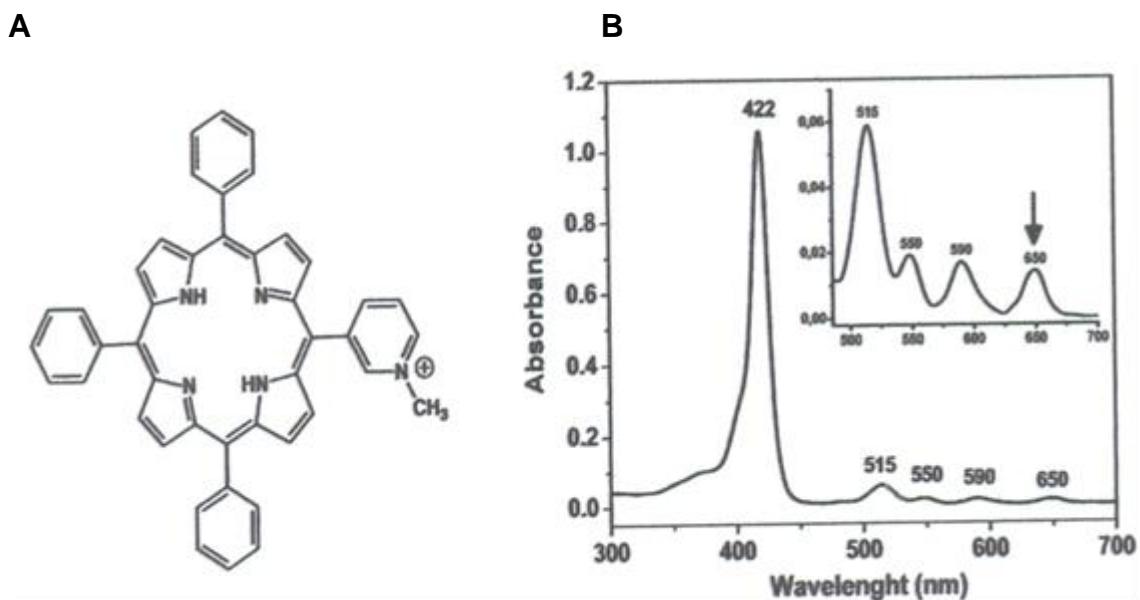
2.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente empregando o software SigmaStat for Windows version 1.0 (2000). Utilizaram-se ANOVA e o método Mann-Withney Rank Sum para comparar os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

Na Figura 4 observamos a estrutura molecular da Porfirina 3MMe (A) e espectro de absorção (B). A Porfirina 3MMe apresentou absorção na região de 650nm, e eficiente rendimento quântico na formação de ${}^1\text{O}_2$ conforme descrito por Engelmann et al., 2007.

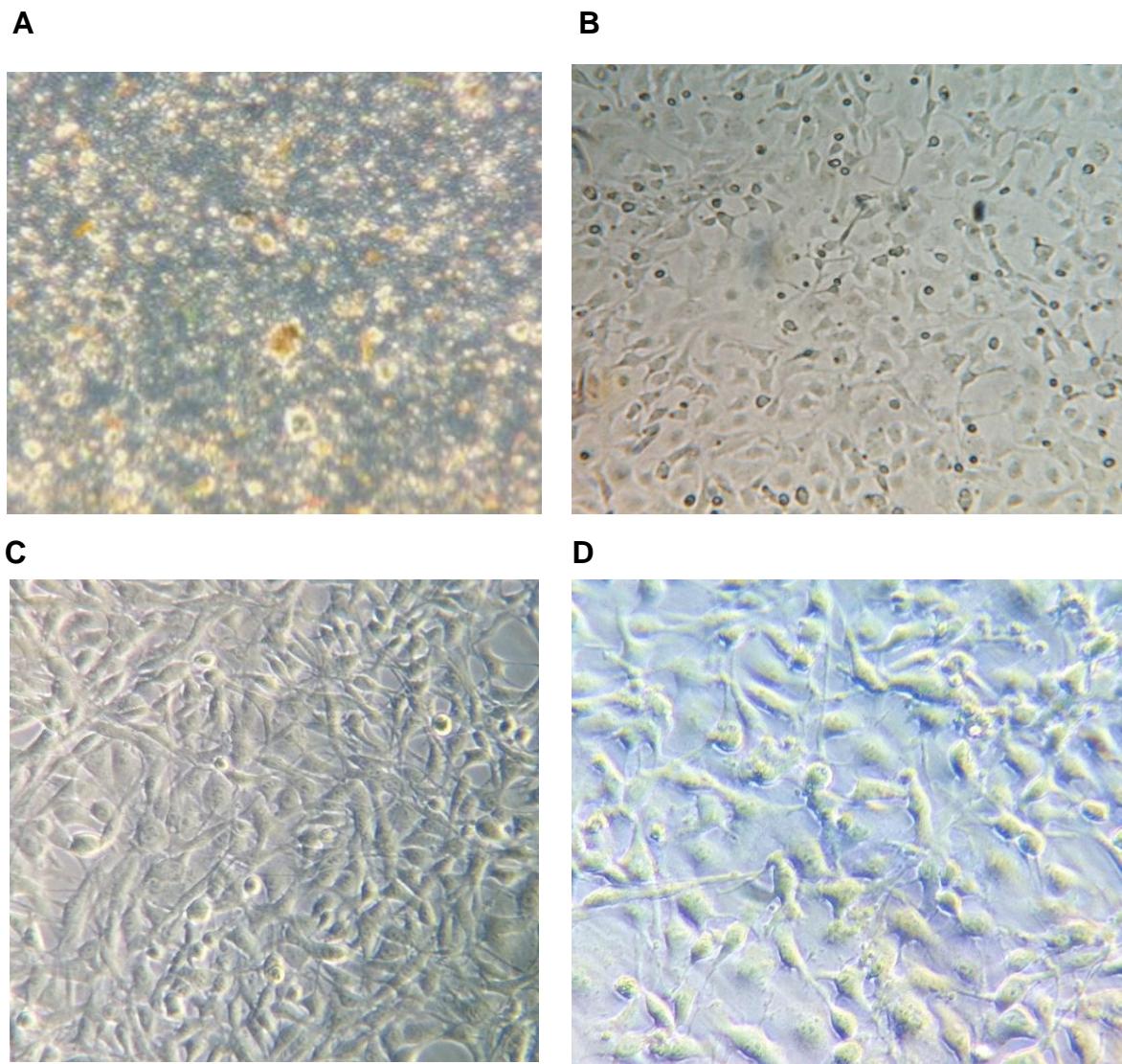
Figura 4 - Esquema **A** – Estrutura molecular da Porfirina, 3MMe -5,10,15-trifenil-20-(3-N-metilpiridínio-il), **B** - Espectro de absorção com indicação (seta) da janela fototerapêutica em 650nm.



Pelo fato de a porfirina 3MMe apresentar baixa solubilidade em água e em meio de cultura, utilizamos a porfirina micro e nanoencapsulada, de acordo com método Deda et al., 2009. A porfirina 3MMe apresentou micro e nanocápsulas com tamanho médio de 700nm (Figura 5 – A).

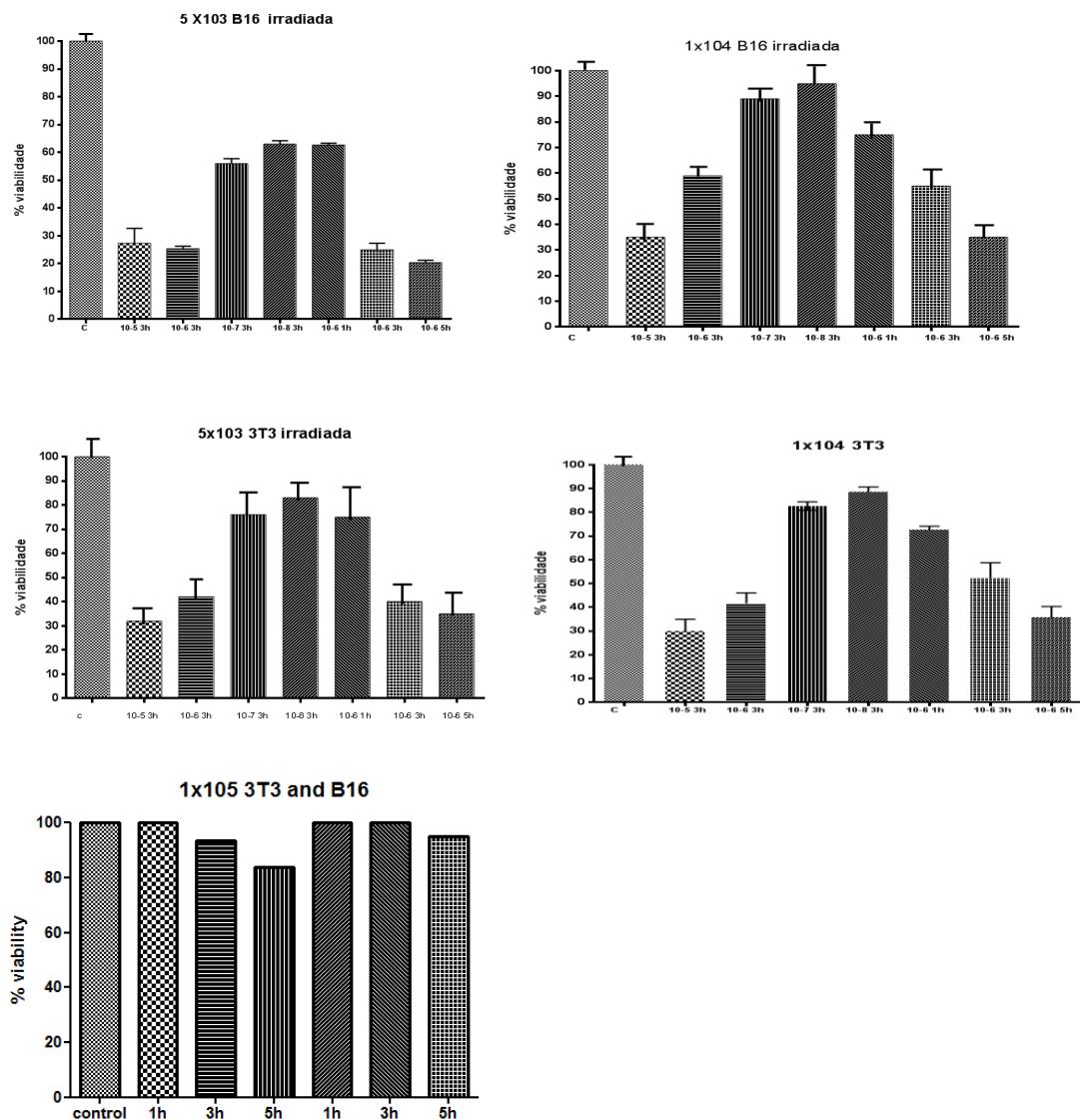
A porfirina 3MMe foi testada com linhagens celulares normais (3T3-NIH, Melan-A) e linhagens tumorigênicas (B16-F10).

Figura 5 - Fotomicrografia da formulação contendo porfirina 3MMe micro e nanoencapsulada (A) e células da linhagem Melan-A (B) 3T3-NIH (C) aumento de 40X e B16-F10 (D), aumento de 100X.



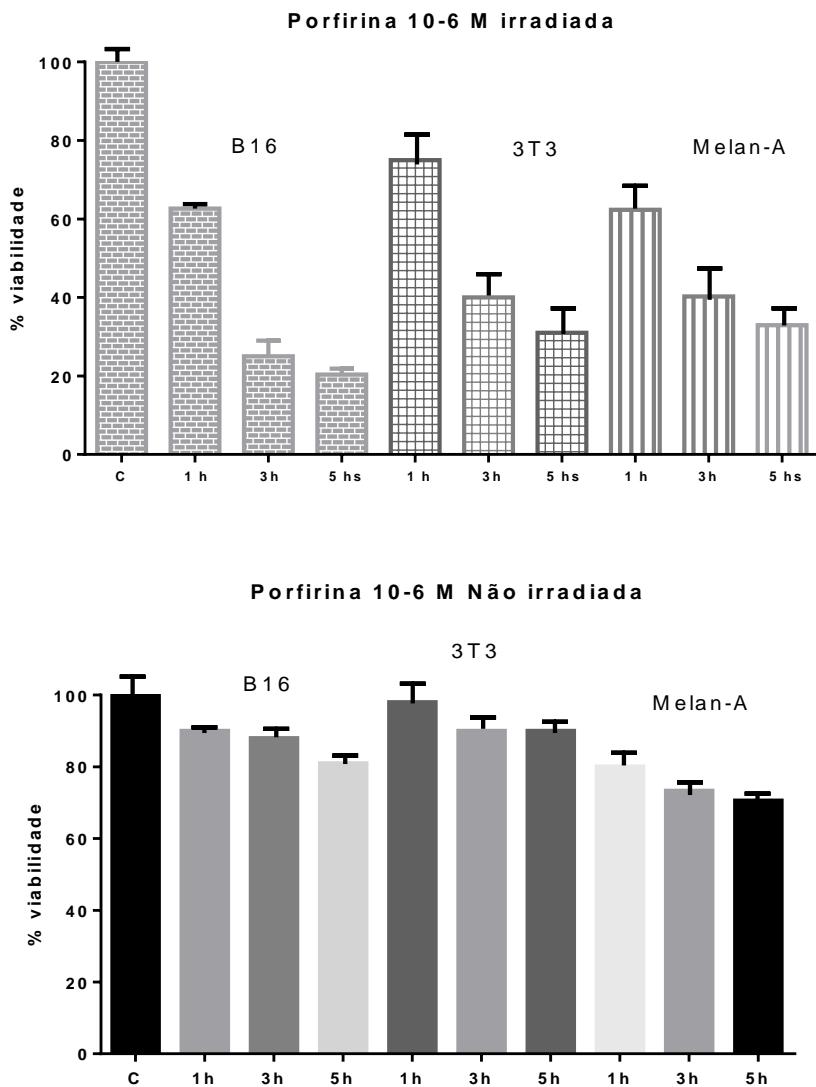
Para padronizar a concentração de células a ser utilizada em cada experimento, realizamos ensaios com as células das linhagens B16 e 3T3 na concentração de 5×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 cel/poço na presença de porfirina 3MMe. Como se observa na Figura 6, o efeito citotóxico foi maior quando se utilizou uma concentração menor de células (5×10^3), mesmo variando-se a concentração de porfirina 3MMe e tempo de incubação. Na condição controle, as células foram incubadas sem a porfirina.

Figura 6 - Viabilidade (%) de células B16 e 3T3, variando-se a quantidade de células 5×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 cel/poço. As células foram incubadas durante 1h, 3h e 5 h, na presença de porfirina 3MMe (1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M e 1×10^{-8} M) e irradiadas durante 30m com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas com porfirina sem irradiação.



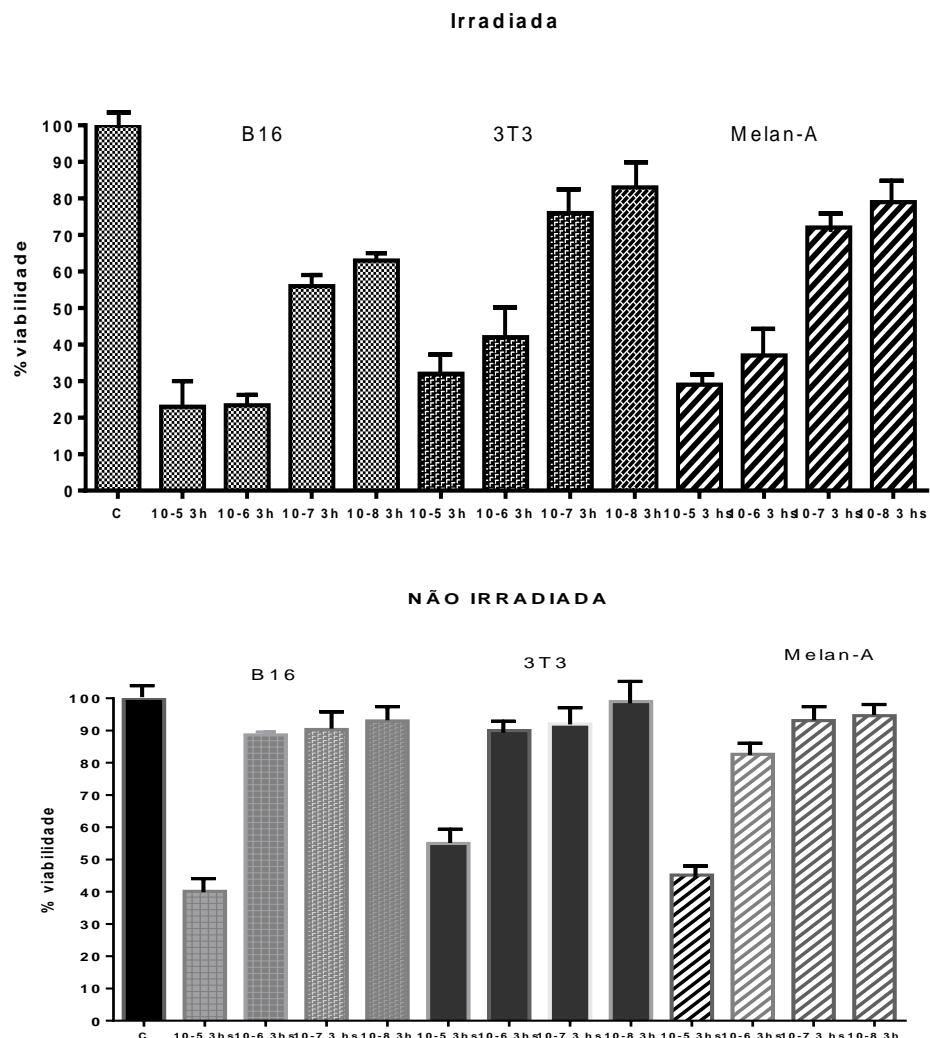
Em relação ao tempo de incubação da porfirina 3MMe na concentração de 10^{-6} M, observamos que o efeito citotóxico foi maior em 3h e 5h em todas as linhagens celulares (B16, 3T3, Melan-A), sendo o efeito maior verificado com as células da linhagem B16. Nas condições controle, não verificamos efeito citotóxico quando as células foram incubadas sem a porfirina e na ausência de irradiação.

Figura 7 - Viabilidade (%) de células das linhagens B16, 3T3 e Melan-A na concentração de 5×10^3 cels, após incubação na ausência (controle-c) e presença de porfirina 3MMe (1×10^{-6} M) durante 1h, 3h e 5h. Após incubação, as células foram irradiadas durante 30m com laser de 630nm. Como controle, as células foram incubadas com porfirina 3MMe na concentração de 1×10^{-6} M sem irradiação.



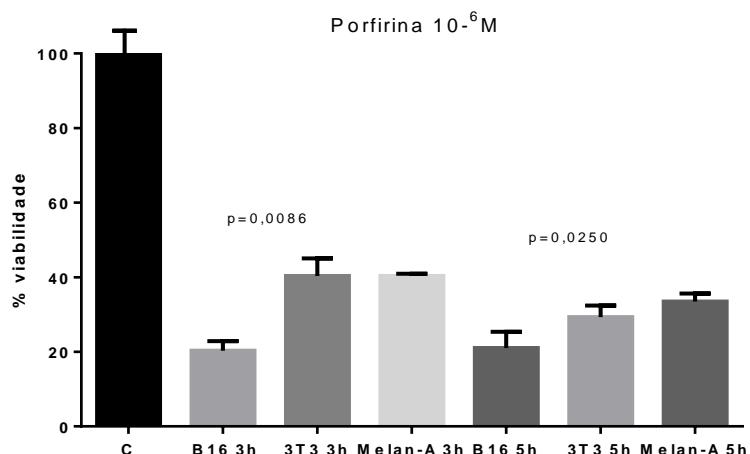
O efeito da ação fotodinâmica da porfirina foi testado incubando-se as células com diferentes concentrações de porfirina (1×10^{-5} M a 1×10^{-8} M) em um período de 3h. Verificamos que o efeito citotóxico foi maior com a porfirina nas concentrações de 1×10^{-5} M e 1×10^{-6} M com as células da linhagem B16 em relação às células das linhagens 3T3 e Melan-A. Na ausência de irradiação, não observamos efeito citotóxico, salvo na presença de altas concentrações de porfirina (10^{-5} M).

Figura 8 - Viabilidade (%) de células B16, 3T3 e Melan-A na concentração 5×10^3 cels, após incubação durante 3h, na presença de porfirina 3MMe nas concentrações de 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M e 1×10^{-8} M. Após incubação, as células foram irradiadas durante 30m com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas com porfirina sem irradiação.



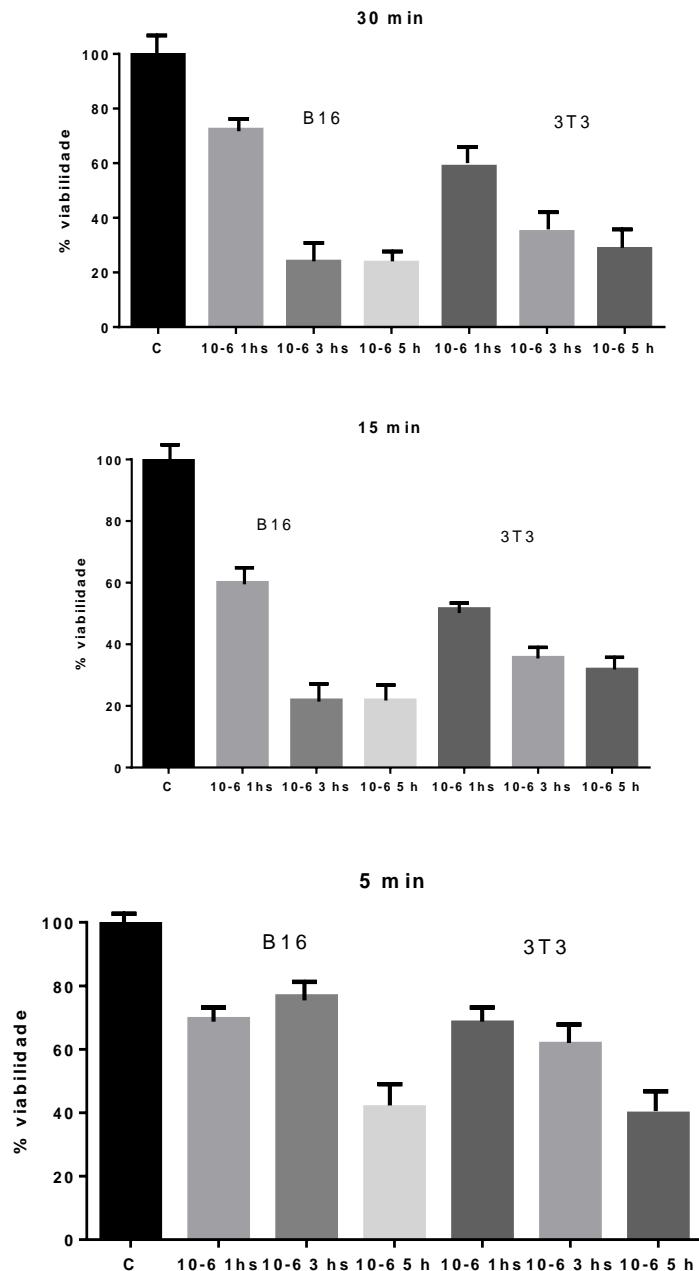
Na Figura 9, verificamos que o efeito citotóxico da porfirina 3MMe na concentração ideal de 10^{-6} M foi significativamente maior nas células da linhagem B16 em relação à 3T3 e Melan-A. Na condição das células incubadas sem a porfirina (controle), não observamos efeito citotóxico.

Figura 9 - Comparação da viabilidade (%) de células B16, 3T3 e Melan-A após incubação durante 3h e 5h, com a porfirina 3MMMe na concentração de 1×10^{-6} M. Após incubação, as células foram irradiadas durante 30m com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas sem porfirina, e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



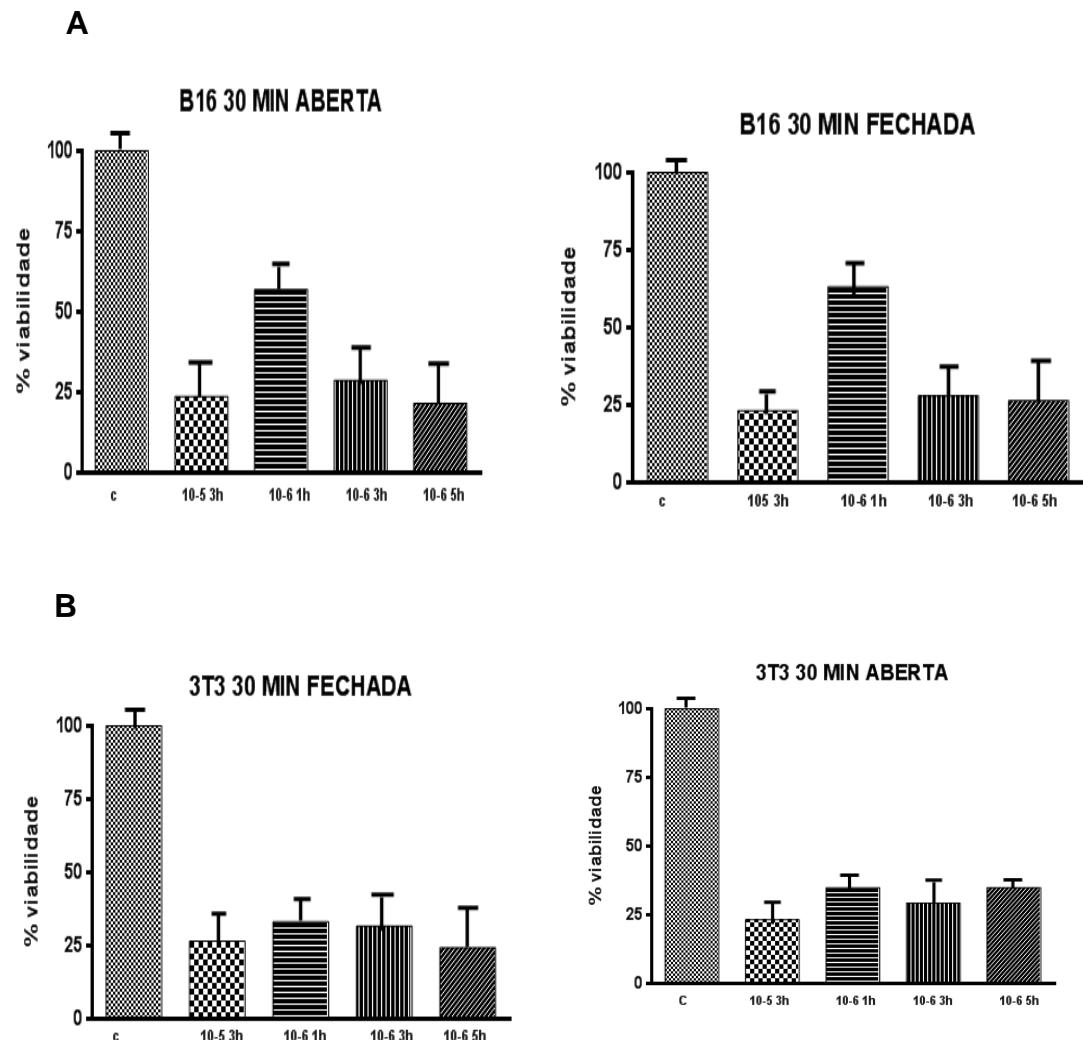
Neste ensaio, não verificamos diferença significativa quando as células foram irradiadas com 30m e 15m. Entretanto, quando as células foram irradiadas somente 5m, o efeito citotóxico diminuiu consideravelmente.

Figura 10 - Efeito do tempo de irradiação com laser vermelho de 630nm na viabilidade (%) nas células da linhagem B16 e 3T3 após incubação durante 1h, 3h e 5h, com a porfirina 3MMe na concentração de 1×10^{-6} M.



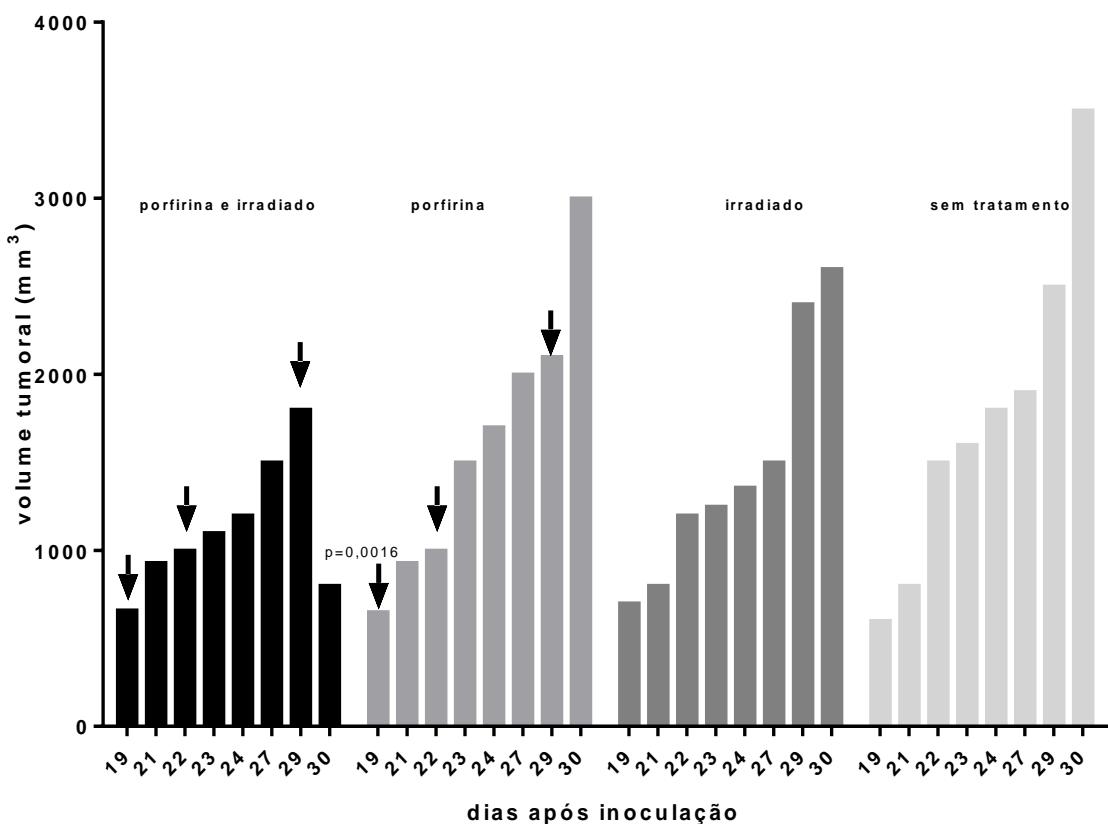
Para verificar se a tampa da placa de cultura tinha interferência na irradiação, realizamos ensaios com as células da linhagem B13 e 3T3 com a tampa aberta e fechada. Como se observa na Figura 10, não houve diferença significativa no efeito citotóxico da irradiação com a tampa aberta e fechada com laser vermelho de 630nm.

Figura 11 - Viabilidade (%) de células B16 (A) e 3T3 (B) após incubação com a porfirina 3MMMe nas concentrações de 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, durante 3h e 5h, com a tampa aberta (dentro do fluxo laminar) e fechada (fora do fluxo laminar), com laser vermelho de 630nm. Como controle, as células foram incubadas sem porfirina.



Após verificar o efeito citotóxico da porfirina in vitro com as células das linhagens B16, 3T3 e Melan-A, camundongos C57Bl6 receberam injeções de porfirina 3MMMe na concentração de 10^{-5} M diluída em PBS (1^a e 2^a doses), sendo utilizada pura na 3^a dose ao redor da massa tumoral. Verificamos que após a 3^a dose, os animais que receberam a porfirina e foram irradiados apresentaram diminuição significativa do volume tumoral em relação ao animais dos grupos controles.

Figura 12 - Volume da massa tumoral (mm^3) após injeção de células tumorais da linhagem B16F10. O tratamento com a porfirina 3MMe foi iniciado quando os tumores alcançaram o tamanho de 14 a 22 mm (18 a 27 dias após injeção das células tumorais). Os camundongos receberam injeções de 100ul da formulação diluídas em PBS com porfirina 3MMe na concentração de 10^{-5} M diluída PBS, ao redor da massa tumoral. Após 3h da injeção da formulação, os animais foram anestesiados e submetidos a irradiação por 30m com laser vermelho de 630nm.



Após 24h da injeção da porfirina, todos os animais foram sacrificados e cortes de tecido foram obtidos a partir da massa tumoral. Como observamos, amostras de animais que receberam a porfirina e foram irradiados apresentaram focos de hemorragia e erosão associados à presença de necrose degenerativa indicando ação fotodinâmica da formulação e morte das células tumorais (Figuras D e E).

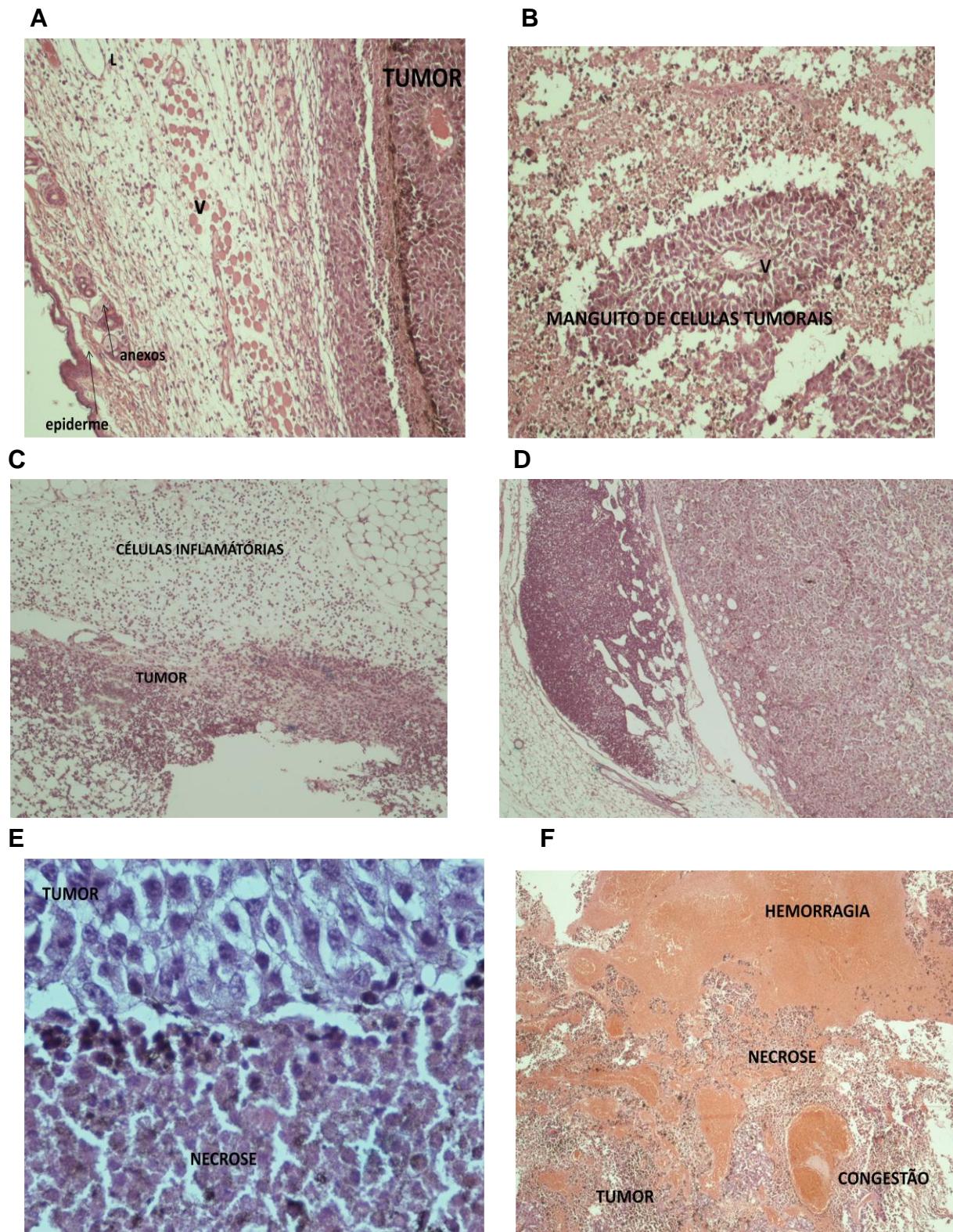


Figura 13 - Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongos tratados e não tratados com porfirina 3MMe e irradiados com laser. Coloração Hematoxilina e Eosina (100X e 400X). **A e B** Tumor (4X), células dispostas em manguito perivascular, vasos linfáticos dilatados; **C** - Tumor + irradiação (4x) presença de células inflamatórias, e tumor; **D**- Tumor + Porfirina sem irradiação; **E e F** – Tumor+ Porfirina e irradiado (40x) e (4x), respectivamente, observa-se hemorragia, focos de necrose, congestão circulatória.

4. DISCUSSÃO

A porfirina utilizada neste estudo revela estrutura anfifílica e espectro de absorção apresentando banda intensa em 422nm, seguida de quatro bandas de menor intensidade na região fototerapêutica entre 500nm e 700nm (Figura 4), e ação fotodinâmica em 630nm. Dadas as suas características hidrofóbicas, a porfirina foi incorporada em micro e nanocápsulas poliméricas de atelocolágeno marinho, por meio da técnica de coacervação simples, visando maior solubilidade, controle de permeabilidade e resistência mecânica.

A utilização de ativos nanoparticulados acrescidos de PEG (polietileno glicol) visando à entrega “inteligente” de drogas está sendo amplamente estudada, principalmente para fármacos hidrofóbicos em tratamentos de doenças infecciosas e cancro (Avgoustakis et al., 2004). A interação de nanopartículas de PEG com PLGA (acido glicolil polilático) mantém baixas concentrações de citocinas proinflamatórias (IL-2, IL6, IL-12p70 e TNF-alfa), quando administrada em camundongos (Semete et al., 2010).

Neste estudo, avaliamos o efeito da porfirina 3MMe em células tumorigênicas (B16-F10) e não tumorigênicas (3T3 e Melan-A) em diferentes concentrações, tempo de incubação e irradiação (Figura 5).

A porfirina mostrou elevada atividade citotóxica quando usada a concentração celular de 5×10^3 cels/poço para as linhagens utilizadas (B16 e 3T3), como mostra a Figura 6, e para a linhagem Melan-A (não mostrado). Em concentrações maiores de células (1×10^4 e 1×10^5), o efeito citotóxico da porfirina diminui consideravelmente, pois não ocorre permeação adequada da formulação em decorrência da superposição das células no poço da placa de cultura. O tempo de incubação da formulação de porfirina tem efeito direto na citotoxicidade celular. Observamos que o efeito citotóxico é maior quando as células são incubadas durante 3h e 5h, com diminuição significativa no tempo de 1h (Figura 7). Na presença de baixas concentrações de porfirina (10^{-8} M, 10^{-7} M), a viabilidade das células da linhagem B16, 3T3 e Melan-A é alta. No entanto, o efeito citotóxico foi maior na presença de concentrações maiores de porfirina 3MMe (1×10^{-6} M) e irradiadas 30m. A

concentração de 1×10^{-5} M foi tóxica para as células, pois na condição controle, sem irradiação, ocorreu diminuição significativa da viabilidade celular (Figura 8).

O efeito citotóxico fotossensibilizante foi significativamente mais evidente nas células B16-F10 em relação às células 3T3 e Melan-A, quando incubadas com a porfirina na concentração ideal de 10^{-6} M durante 3h e irradiadas a 30m (Figura 9).

A atividade fotodinâmica da porfirina 3MMe foi diretamente proporcional ao tempo de irradiação. Como mostra a Figura 10, a ação fototóxica foi significativamente menor em 5m, não havendo diferença no tempo de irradiação em 15m e 30m com laser vermelho de 630nm (Figura 10).

A fotoativação da porfirina em 630nm coincide com comprimentos de onda de maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos, e é considerada vantajosa para fotossensibilizador com uso potencial na TFD, e tempos menores de incubação parecem interferir na atividade fototóxica (Deda et al., 2009).

Para a irradiação das células, respeitou-se a distância de 15cm da luz incidente para obter homogeneidade do espalhamento da luz. Em outros ensaios, as células foram cultivadas com a tampa aberta (dentro do fluxo laminar) e fechada (fora do fluxo); concluímos que a tampa da placa de cultura não interfere na eficiência da irradiação pela luz incidente do laser (Figura 11).

A eficiência fotodinâmica da formulação de porfirina pôde ser comprovada, pois no escuro (condições de controle) não observamos alteração na viabilidade celular, nem tampouco quando as células foram irradiadas na ausência de porfirina.

Um dos principais objetivos da TFD é induzir o efeito neoplásico por um processo de fotossensibilização, com redução da massa tumoral, reduzindo os efeitos colaterais dos tratamentos clássicos, como quimioterapia e radioterapia. Utilizando modelo de melanoma murino, realizamos os testes *in vivo* para verificar o efeito fotossensibilizante da porfirina 3MMe.

Observamos que os animais que receberam a porfirina e foram irradiados apresentaram diminuição significativa da massa tumoral após três doses da formulação ativada com laser, com diferença significativa em relação aos demais grupos controles ($p=0,0016$), nos quais ocorreu crescimento evidente da massa tumoral (Figura 12).

Nos cortes histológicos de pele, o edema, hemorragia e erosão, associados à presença de necrose degenerativa da epiderme, indicam o resultado da ação fotodinâmica e interação da porfirina 3MMe com o laser de 630nm (Figura 13 E, F). As alterações histopatológicas discretas com o uso apenas da formulação sem irradiação nos animais controle (Figura 13 D) sugerem a otimização da ação fotodinâmica da formulação. Nos animais que não receberam tratamento, a massa tumoral apresentou evidente processo inflamatório (Figura 13 A) e manguito perivascular (Figura B), sendo que a irradiação promoveu o aumento do processo inflamatório (Figura C).

Recente trabalho do grupo Deda et al., 2012, mostrou que a encapsulação da porfirina 3MMe incorporada em nanocápsulas poliméricas de atecolágeno marinho modifica a citolocalização pela membrana plasmática, permitindo sua liberação gradual e acúmulo nas mitocôndrias e lissosomas, quando comparada à utilização da porfirina 3MMe diluída em DMSO.

5. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a citotoxicidade celular foi diretamente proporcional à quantidade de porfirina 3MMe e tempo de incubação, sendo o tratamento significativamente mais efetivo para as células da linhagem B16-F10 em relação às células da linhagem 3T3 e Melan-A. Não observamos citotoxicidade celular na presença de porfirina 3MMe na ausência de luz (grupo controle).

Estudos in vivo mostraram que os animais com melanoma, que receberam injeções de porfirina e foram irradiados apresentaram diminuição significativa da massa tumoral em relação aos demais grupos controles, com presença de focos hemorrágicos e erosão associados à presença de necrose da epiderme, indicando ação fotodinâmica da porfirina 3MMe.

De acordo com os resultados, a formulação de micro e nanocápsulas poliméricas contendo porfirina 3MMe apresentou efeitos citotóxicos in vitro e in vivo, com potencial terapêutico e alternativa promissora no tratamento de melanoma pela TFD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON R. R.; MOTA H.C.; BAGNATO V.S.; SIBATA C.H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy state of the art review. *Therapy*, v. 5, p.19-28,2008.
- ALVAREZ, M. G.; YSLAS, E. I.; RIVAROLA, V.; MORI, G.; LA PENNA, M.; SILBER, J.J.; DURANTINI, E.N. *Molecules*, v.5, p.379-380,2000.
- ARAKI, K. ; TOMA, H. E. ; CATALANI, L. H. ; MEDEIROS, M. H. G. . Zinc Tetraruthenated Porphyrin Binding and Photoinduced Oxidation of Calf-Thymus DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 78, p. 269-273, 2000.
- ARAKI, K. ; WINNISCHOFER, H. ; TOMA, H. E. ; MAEDA, H. ; OSUKA, A. ; FURUTA, H. . Acid-Base and Spectroelectrochemical Properties of Doubly N-Confused Porphyrins. *Inorg Chem* v. 40, p. 2020-2025, 2001
- ARAKI, K. ; MAEDA, H. ; FURUTA, H. ; OSUKA, A. ; MAYER, I. ; BAPTISTA, M. S. ; TOMA, H. E. . Doubly N-Confused Porphyrins as Efficient Photosensitizers for Singlet Oxygen Generation. *Chem. Letters*, v. 32, n.3, p. 244-245, 2003.
- AVGOUSTAKIS K. Pegylated poly (lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv*, 1(4) p.321-33. 2004.
- BABILAS P, KARRER S, SIDOROFF A, LANDTHALER M, SZEIMIES RM. Photodynamic therapy in dermatology.an update. *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine* 2005; 21:142-149.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M.L.; GUILLEMIN, F.; BARBARI-HEYOB, M.Nanoparticles as Vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol*. V.26,p. 612-621,2008
- BENNETT D. C.; COOPER P.J; HART I. R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumor promoter for growth. *Int J Cancer* v.,15:39(3),p. 414-418, 1987.
- BONNETT, R.; CHARLESWORTH, P.; DJELAL, B. D.; FOLEY, S.; MCGARVEY, D. J; ANDTRUSCOTT, T. G.J. of the Chem. Soc-Perk Trans. v.2, p.325-328, 1999.
- BRASIL. INCA - Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: www.inca.org.br> Acesso em agosto de 2012.

CASTANO, K.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIM, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one: photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiag Photodyn. Ther., vol. 1, p.279-293, 2004.

CASTANO, K.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIM, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three: photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. Photodiag Photodyn. Ther., vol 2, p 91-106, 2005.

CERNAY, T.; ZIMMERMANN, H. W. Selective photosensitization of mitochondria by the lipophilic cationic porphyrin POR10. J. Photochem Photobiol B. v.34, p.191-196, 1996.

DEDA D. K.; UCHOA A. F.; CARITÁ E.; BAPTISTA M.S.; TOMA H. E.; ARAKI K. A. new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for TFD treatment International Journal of Pharmaceutics 376 76–83,2009.

DEDA D. K.; PAVANI C.; CARITÁ E.; BAPTISTA M.S.; TOMA H. E.; ARAKI K. Control of Cytolocalization and Mechanism of Cell Death by Encapsulation of a Photosensitizer, submitted, 2012.

DERYCKE A. S.; KAMUHABWA A.; GIJSENS A.; ROSKAMS T.; DE VOS D.; KASRAN A.; HUWYLER J.; MISSIAEN L.; DE WITTE P. A. Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AIPcS4 to rat bladder carcinoma cells. J Natl Cancer Inst. Nov v.3; 96(21), p.1620-30, 2004

DOUGHERTY T.J.; KAUFMAN J. E; GOLDFARB A.; WEISHAUPP K. R.; BOYLE D.; MITTLEMAN A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res.v.38p.2628-35, 1978.

DOUGHERTY, T. Photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol. v.58 (6) p.895-900, 1993.

ELSALEH, H.; ROBBINS, P.; JOSEPH, D.; POWELL, B.; GRIEU, F.; MENSO, L.; ACOPETTA, B. Radiother and Oncol v. 56, p.239-244, 2000.

ENGELMANN, F. M. I.; MAYER, D. S.; GABRIELLI, H. E.; TOMA, A. J.; KOWALTOWSKI, K.; ARAKI, M. S.; BAPTISTA, Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. J. Bioenerg Biomembr 39 v.175-p.185, 2007.

FICHEUX, H. Photodynamic therapy: principles and therapeutic indications. Ann. Pharm.Fr., vol.67, p.32-40, 2009.

GRANVILLE, D. J.; LEVY, J. G.; HUNT, D. W. C. Photodynamic therapy induces caspase-3-activation in HL-60 cells, *Cell Death and differentiation* v. 4, p.623-628.1997.

HAMMOND-MCKIBBEN, D.; LAKE, P.; ZHANG, J.; TART-RISHER, N.; HUGO, R.; WEETALL, M. A high-capacity quantitative mouse model of drug-mediated immunosuppression based on rejection of an allogeneic subcutaneous tumor. *J Pharmacol Exp Ther*;v. 297,p.1144-51, 2001.

HUDSON, R.; SAVOIE, H.; BOYLE, R. W. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2 v. 193-196, 2005.

KESSEL, D.; WOODBURN, K.; HENDERSON, B. W.; CHANG, C.K. Sites of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin. *Photochemistry and Photobiology* v.62, p.875-881, 1995.

KICK G.; MESSER G.; GOETZ A.; PLEWIG G.; KIND, P. Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding. *Cancer Res* v. 55:p.2373-9, 1995.

KONAN, Y. N. R.; GURNY, E.; ALLEMANN, State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* v.66 p.89-106 , 2002.

LAVI, A.; WEITMAN, H.; HOLMES, R. T.; SMITH, K. M.; EHRENBERG, B. The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency. *Biophys. J.* v.82.p. 2101-2110, 2002.

LI, B.; MORIYAMA, E. H.; LI, F.; JARVI, M. T.; ALLEN C.; WILSON B. C. Diblock copolymer micelles deliver hydrophobic protoporphyrin IX for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. v.;83(6)p.1505-12,2007.

MADSEN, S.J.; SUN, C.H.; TROMBERG, B.J.; WALLACE, V.P.; HIRSCHBERG, H. *Photochem and Photobiol* v. 72, p.128-134, 2000.

MATROULE, J. Y.; BONIZZI, G.; MORLIERE P. et al. Pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photosensitization activates transcription factor NF-kappaB through the interleukin-1 receptor-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* v.1274,p.2988-3000,1999.

MAK, N. K.; LI, K. M.; LEUNG, W. N.; WONG, R. N. S.; HUANG, D. P.; LUNG, M. L.; LAU, Y. K.; CHANG, C. H. K. Involvement of both endoplasmic reticulum and mitochondria in photokilling of nasopharyngeal carcinoma cells by the photosensitizer Zn-BC-AM. *Biochem. Pharmacol* v.68, p.2387-2396, 2004.

MORI, H.; SAKATA, I.; HIRANO, T.; OBANA, A.; NAKAJIMA, S.; HIKIDA, M.; KUMAGAI, T. *Japan J of Canc Res* v.91, p.753-759, 2000.

MORIWAKI, S.I.; MISAWA, J.; YOSHINARI, Y.; YAMADA, I.; TAKIGAWA, M.; TOKURA, Y. Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin (TM)). *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed* v.17, p.241–243, 2001.

NAKAMURA T, FUKUI H, ISHII Y, FUJITA M, HORI K, EJIRI K, EJIRI M, FUJIMORI T. Shape-memory alloy loop snare for endoscopic photodynamic therapy of early gastric cancer. *Endoscopy*. v.32(8):p.609-13,2000.

NAKASEKO H, KOBAYASHI M, AKITA Y, TAMADA Y, MATSUMOTO Y., Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses. *Br J Dermatol.* v.148(1):p.122-7, 2003.

NEEDHAN, D.; MCINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* v.1108 p.40-48, 1992.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J.; Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* v.52:p.339-52, 2005.

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

PASS, H. I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst.* v.85:p.443-56, 1993.

PUSHPAN, S. K.; VENKATRAMAN, S.; ANAND, V. G.; SANKAR J.; PARMESWARAN, D.; GANESAN S.; CHANDRASHEKAR, T. K. *Curr. med. chem anti-cancer agents* v.2 p.187- 207,2002.

PLAETZER, K.; KIESSEICH, T.; ERWANGER, T. V.; KRAMMER, B.; KRAMMER, B. The modes off cell death induced by PDT, an overview. *Med.Laser. Appl.*, vol 18, p.7-19, 2003.

ROY, I.; OHULCHANSKY, T. Y.; PUDAVAR, H. E.; BERGEY, E. J.; OSEROFF, A. R.; MORGAN, J.; DOUGHERTY, T. J.; PRASAD, P. N. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc.* v.125 (26):p.7860-5, 2003.

REDDI, E.; CECCON, M.; VALDUGA, G.; JORI, G.; BOMMER, J. C.; ELISEI, F.; LATTERINI, L.; MAZZUCATO, U. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol.* v 75,p. 462-470,2002.

RICCI, E. J.; LUNARDI, L. O.; NANCLARES, D. M.; MARCHETTI, J. M. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *Int J Pharm.* v. 288(2):p.235-44, 2005.

RUCK, A.; KOLLNER, T.; DIETRICH, A.; STRAUSS, W.; SCHNECKENBURGER, H. Fluorescence formation during photodynamic therapy in the nucleus of cells incubated with cationic and anionic water-soluble photosensitizers. *J. of Photochem and Photobiol B*, v. 12, p.403- 412, 1992.

SEMETE, KALOMBO L.; VENTER JD.; KATATA L.; RAMALAPA B.; VERSCHOOR JA.; SWAI H. In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1;249(2):158-65. 2010.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* v. 4 p.507-517,1999.

SIERON A, ADAMEK M, KAWCZYK-KRUPKA A, MAZUR S, ILEWICZ L. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied delta-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. *J. Oral Pathol Med.* 32(6):330-6, 2003

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysical and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J of Pharmac Sci* v. 23, p.131-138,2004.

SIMPILCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Photodynamic therapy: pharmacological aspects, applications and news from medications development. *Quimica Nova* v.25, p.801-807,2002.

TIAN, Y. Y.; WANG, W. Progress in photodynamic therapy on tumors lasers Phys v.18, p.1119-1123, 2008.

TORCHILIN, V.P.Multifunctional nanocarriers.Adv Drug Delivery Rev 58 p.1532-1555, 2006.

Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, Stewart F.A.Photodynamic therapy in oncology. Oncologist, v 11, n 9, p.1034-1044, 2006.

VAN NOSTRUM, C. F. Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. Adv Drug Deliv Rev. v.;56(1):p.9-16,2004.

WARD T.; MOONEY D.; FLYN, N. G.; MCHALE, A. P. Eletric field – enhanced activation of hematoporphyrin derivate: effects on a human tumour cell line Cancer Letter v. 113, p.145-151,1997.

WEBBERT, J.; HERMAN, M.; KESSEL, D.; FROMM, D. Photodynamic treatment of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. Recent advances in techniques and results. Langenbecks Arch of Surg v.385, p.299-304,2000.

WIEDMANN MW, CACA K.; General principles of photodynamic therapy (**PDT**) and gastrointestinal applications. Curr Pharm Biotechnol. V. 5(4): p.397-408. 2004.