

Mafalda Sofia Laranjo Cândido

FOTOSSENSIBILIZADORES PARA TERAPIA E IMAGEM EM ONCOLOGIA

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada pela Senhora Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Senhor Professor Doutor Arménio Coimbra Serra e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mafalda Sofia Laranjo Cândido

**FOTOSENSIBILIZADORES
PARA TERAPIA E IMAGEM EM ONCOLOGIA**

Julho 2014



Capa:

Imagem das células humanas de carcinoma colorretal WiDr após incubação com o fotossensibilizador BBr2HPP (vermelho), obtida por microscopia confocal. Os núcleos estão corados com Hoechst. Ampliação 630x.

Tese de Doutoramento na área científica de Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada pela Senhora Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Senhor Professor Doutor Arménio Coimbra Serra e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, financiada por bolsa de doutoramento atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/44957/2008).



A Faculdade de Medicina não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta tese.
(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artigo 108, parágrafo único)

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado na Unidade de Biofísica e no Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida - IBILI da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

PREFÁCIO

A terapia fotodinâmica constitui uma inovadora abordagem para a destruição de estruturas celulares que consiste na utilização conjunta de luz e de moléculas com capacidade de absorver denominadas fotossensibilizadores. Trata-se de uma terapia minimamente invasiva, com efeitos secundários reduzidos e com efeito terapêutico resultante da associação de três componentes não tóxicos individualmente: fotossensibilizador, luz e oxigénio. As suas aplicações clínicas são diversas, desde o tratamento de doenças oftalmológicas até à aplicação em oncologia. No entanto, a sua utilização clínica mantém-se atualmente limitada pela reduzida quantidade de fotossensibilizadores comercialmente disponíveis e pelo restrito número de aprovações para terapêutica oncológica, facto possivelmente decorrente da escassez de ensaios clínicos utilizando a terapia fotodinâmica. Neste sentido, o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores para tratamento de tumores malignos torna-se imprescindível de modo a ampliar a utilização da terapia fotodinâmica em oncologia.

Este projeto surge no sentido de responder a esta necessidade, já abordada em trabalhos prévios a esta dissertação, focados no desenvolvimento e na caracterização de novos compostos fotossensibilizadores com propriedades ideais para terapia fotodinâmica. O trabalho atual vem aprofundar o estudo de um novo fotossensibilizador, com uma avaliação inicial das suas características físico-químicas. Na presença de características reveladoras de um potencial terapêutico, foi necessária a avaliação dos seus efeitos *in vitro* em células tumorais, nomeadamente pelo estudo dos mecanismos subcelulares da terapia fotodinâmica com base neste composto. Como fase sequencial aos estudos *in vitro*, e perante resultados promissores, foram realizados estudos *in vivo*, avaliação de extrema importância no âmbito de estudos pré-clínicos, para comprovar o potencial do novo fotossensibilizador na terapêutica oncológica e valorizar o seu efeito com o aumento da complexidade do sistema biológico.

Embora a terapia fotodinâmica esteja associada a efeitos secundários limitados, facto justificado pela aplicação local de luz visível, a fotossensibilização da pele e outros tecidos verifica-se após a administração dos compostos. A galopante evolução tecnológica que se experiencia atualmente permite uma otimização da administração local de tratamentos, com uma tendência crescente para a sua adaptação a cada doente em particular. Para esta abordagem, é de todo o interesse a existência de uma imagem auxiliar à orientação diagnóstica e planificação do tratamento. A medicina nuclear constitui um método minimamente invasivo que permite a obtenção de imagem metabólica após a administração de concentrações reduzidas de um radiotraçador. Neste projeto, paralelamente, foi desenvolvido um procedimento de marcação de um fotossensibilizador com um radionuclídeo. Sendo o tecnécio-99 metastável o mais utilizado em medicina nuclear, foram estudadas as características químicas adequadas para a marcação com o radionuclídeo

mencionado. Os estudos de radioquímica foram realizados com o objetivo de otimizar a marcação do fotossensibilizador, sendo essencial a caracterização da sua biodistribuição, realizada neste projeto com estudos em animais.

Este projeto surge, deste modo, com duas vertentes paralelas e igualmente importantes. Por um lado, a investigação de novos agentes para terapia fotodinâmica com efeito biológico, no sentido de amplificar a aplicação desta modalidade terapêutica em Oncologia, por outro lado, a marcação de fotossensibilizadores com radionuclídeos no sentido de iniciar a prática de medicina personalizada no contexto da terapia fotodinâmica, com maximização de efeito terapêutico e minimização de efeitos secundários para cada caso em específico. Assim, foi possível com este projeto identificar as características fulcrais de agentes fotossensibilizadores para a obtenção de um efeito terapêutico elevado e para a marcação eficaz com radionuclídeos, incrementando-se o conhecimento necessário para a formulação do composto ideal para terapia fotodinâmica, que proporcione a possibilidade de, no futuro, contribuir, em simultâneo, para ambas as vertentes.

Este trabalho só foi possível devido a contributos fundamentais que não podem deixar de ser realçados. À custa de uma equipa multidisciplinar que se alicerçou unidireccionalmente na junção da síntese química, passando pelos estudos *in vivo* e *in vitro* foi possível idealizar uma perspetiva com aplicação prática.

Em primeiro lugar, como orientadora principal deste projeto, os mais sinceros agradecimentos à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Professora Catedrática da mesma Faculdade. Agradeço o papel fundamental na orientação do meu percurso na investigação científica, a atenção, a disponibilidade e autoconfiança que sempre me transmitiu. Reitero o orgulho em ter podido dispor dos seus ensinamentos que marcarão inevitavelmente a minha atitude na ciência e na vida.

Ao Professor Doutor Arménio Coimbra Serra, co-orientador deste trabalho, agradeço o contributo decisivo nos estudos de síntese química e os momentos de discussão científica que proporcionou que permitiram uma visão ampliada dos resultados obtidos, com um cunho que lhe é particular e é fulcral na investigação científica.

Ao Professor Doutor António Manuel de Albuquerque Rocha Gonçalves, mentor do interesse na terapia fotodinâmica, agradeço os ensinamentos e disponibilidade.

À Professora Doutora Marta Piñeiro, agradeço por toda a disponibilidade e apoio demonstrados nos estudos de fotoquímica e biodistribuição, pela orientação científica informal, pela paciência, bom humor e incentivo constante.

À Professora Doutora Lina Carvalho, por proporcionar os estudos de anatomia patológica, pela ajuda na interpretação histológica que constituiu contributo importante para este trabalho.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e à Mestre Ana Cristina Gonçalves pelo apoio nos estudos de citometria de fluxo, empenho e disponibilidade constantes.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, minha amiga pessoal, pela disponibilidade e colaboração permanentes e imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Mestre João Casalta Lopes pela ajuda na análise estatística e ajuda na interpretação dos resultados obtidos, pela sua amizade e incentivo permanentes e incondicionais.

Agradeço a colaboração prestada na realização do trabalho experimental dos Mestres Pedro Santos, Kathleen Santos, Ricardo Teixo, Marta Braga e dos Licenciados Gonçalo Brites e Ana Isabel Ferreira que sempre pautaram pelo empenho e dedicação.

Aos alunos de Doutoramento do Serviço de Biofísica, Maria João Carvalho, Salomé Pires, Catarina Mamede, Ana Brito, Fernando Mendes, Sara Ferreira e Siri Paulo reconheço a partilha de um ambiente de trabalho salutar, os incentivos diários e a ajuda prestada no trabalho laboratorial.

À Doutora Filipa Baptista agradeço pelo apoio na aquisição das imagens de microscopia confocal.

Pelo suporte financeiro individual agradeço a Bolsa atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/44957/2008). Ao CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia) pelo financiamento disponibilizado aos projetos Marcação com ^{99m}Tc de Sensibilizadores para Imagiologia do Tratamento Fotodinâmico (CIMAGO 27/09) e Localização Subcelular de Sensibilizadores para Terapia Fotodinâmica contra o cancro (CIMAGO 08/12) e, que permitiu a obtenção de parte dos resultados apresentados nesta dissertação.

ÍNDICE

PREFÁCIO.....	ix
ÍNDICE	13
RESUMO	19
ABSTRACT.....	21
PARTE I – CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA.....	23
CAPÍTULO I – FUNDAMENTOS E POTENCIALIDADES DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	25
Fundamentos da Terapia Fotodinâmica.....	27
Fotofísica e fotoquímica da terapia fotodinâmica.....	31
Importância do fotossensibilizador.....	33
Derivados da Hematoporfirina.....	36
Ácido 5-aminolevulínico.....	38
meta-Tetrahidroxifenilclorina.....	40
mono-L-aspartil-clorina eó.....	41
Derivado mono-ácido da benzoporfirina.....	42
Importância das fontes de iluminação.....	43
Importância da presença de oxigênio.....	45
Aplicação clínica.....	47
CAPÍTULO II – MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	53
Mecanismos de citotoxicidade.....	53
Apoptose.....	56
Autofagia.....	58

Necrose	60
Efeito da PDT nos vasos sanguíneos	63
Inflamação e imunidade.....	65
Combinação com outras estratégias terapêuticas	69
CAPÍTULO III – FOTOSSENSIBILIZADORES E IMAGEM.....	75
CAPÍTULO IV – OBJETIVOS E CONTEXTO EXPERIMENTAL.....	81
PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL.....	83
SECÇÃO A – TERAPÊUTICA.....	85
CAPÍTULO V – ESTUDOS DE QUÍMICA	87
Material e Métodos.....	87
Síntese e caracterização do fotossensibilizador	87
Rendimento quântico de oxigênio singleto	88
Resultados	89
Discussão	92
CAPÍTULO VI – ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	95
Material e Métodos.....	95
Culturas Celulares.....	95
Tratamento Fotodinâmico.....	96
Estudos de citotoxicidade	96
Atividade Metabólica.....	96
Viabilidade Celular	98
Captação e localização subcelular	98
Estudos de captação.....	99
Localização subcelular.....	99
Morte celular.....	100
Vias de Morte.....	101
Potencial de membrana mitocondrial	101
Expressão de proteínas	102

Alterações no núcleo celular.....	104
Ciclo celular.....	104
Ensaio de cometas.....	105
Stresse oxidativo.....	106
Oxigénio singlete e radical superóxido.....	106
Produção intracelular de anião superóxido.....	107
Produção intracelular de peróxidos.....	107
Superóxido dismutase.....	108
Glutatião reduzido.....	108
Análise Estatística.....	109
Resultados.....	110
Citotoxicidade.....	110
Captação e localização subcelular.....	114
Vias de Morte Celular.....	119
Alterações no núcleo celular.....	127
Stresse oxidativo.....	131
Discussão.....	138
CAPÍTULO VII — ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	153
Material e Métodos.....	153
Desenvolvimento do modelo animal.....	153
Tratamento fotodinâmico.....	154
Análise histopatológica.....	155
Estudos de biodistribuição.....	155
Resultados.....	158
Terapia Fotodinâmica <i>in vivo</i>	158
Estudos de biodistribuição.....	164
Discussão.....	168
SECÇÃO B — IMAGEM.....	175

CAPÍTULO VIII — ESTUDOS DE QUÍMICA.....	177
Material e Métodos.....	177
Síntese e caracterização do fotossensibilizador.....	177
Resultados	179
Discussão	180
CAPÍTULO IX — ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	183
Material e Métodos.....	183
Marcação do 2CPP com ^{99m} Tc.....	183
Controlo de qualidade.....	183
Estabilidade no soro sanguíneo humano.....	185
Determinação do coeficiente de partição.....	185
Estudos de captação.....	186
Avaliação da fototoxicidade	186
Análise estatística.....	187
Resultados	187
Discussão	190
CAPÍTULO X — ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	193
Material e Métodos.....	193
Desenvolvimento do modelo animal	193
Estudos de biodistribuição	193
Resultados	194
Discussão	195
PARTE III — CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	199
PARTE IV — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	203
PARTE V — SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS	235
PARTE IV — ANEXOS	243
ANEXO I — NOMENCLATURA DE COMPOSTOS TETRAPIRRÓLICOS.....	245
ANEXO II — ESPETROS DE RMN E DE MASSA DO FOTOSSENSIBILIZADOR BBr2HPC	249

ANEXO III – ESPETROS DE RMN DO FOTOSSENSIBILIZADOR 2CPP	253
ANEXO IV – ESPETROS DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO COMPOSTO BBr2HPP.....	257
ANEXO V – OUTROS ESPETROS DE MASSA.....	261

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *photodynamic therapy*) é uma terapêutica que depende da administração de um fotossensibilizador que, por si só, não tem efeito farmacológico, e da sua posterior ativação por irradiação, com luz visível de comprimento de onda adequado do local a tratar. Como consequência da fotoativação do fotossensibilizador, ocorre produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) que determinam a morte celular. Pelo seu modo de ação, a PDT está associada a poucos efeitos secundários. Esta reduzida manifestação de efeitos secundários, deve-se não só ao facto do efeito citotóxico ocorrer apenas no local de ativação pela luz, mas também devido ao local de acumulação ser principalmente o tumor, dado que os fotossensibilizadores tipicamente se acumulam nas células tumorais, pelo que a PDT apresenta elevada seletividade.

No contexto clínico, a PDT é utilizada em oftalmologia, em dermatologia e também em oncologia. No entanto, a sua utilização no tratamento de cancro mantém-se limitada, possivelmente, devido ao baixo número de fármacos aprovados e também ao baixo número de aprovações para terapêutica oncológica.

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver novos fotossensibilizadores para PDT. Pretendeu-se desenvolver um fotossensibilizador com elevado potencial terapêutico, caracteriza-lo do ponto de vista fotoquímico, verificar o seu efeito fotodinâmico em várias linhas celulares tumorais, contribuir para esclarecer as suas vias moleculares de atuação e estudar o seu potencial terapêutico *in vivo* e biodistribuição. Paralelamente, pretendeu-se desenvolver outro fotossensibilizador passível de ser complexado com tecnécio-99 metastável (^{99m}Tc), otimizar um procedimento de marcação simples e reprodutível e estudar a biodistribuição do complexo. Esta vertente, de associação da PDT à medicina nuclear, pode proporcionar a maximização do efeito terapêutico pela identificação do momento de captação máxima pelo tumor.

Para a concretização destes objetivos utilizaram-se diversas metodologias desde a síntese química, estudos *in vitro*, em que se recorreu a diversas metodologias das quais são exemplo, a microscopia confocal, a citometria de fluxo, o western blot e marcação radioativa e a microcromatografia ascendente em camada fina, até aos estudos *in vivo*.

Foi possível sintetizar o fotossensibilizador BBr2HPC, com características fotoquímicas adequadas à utilização em terapêutica, nomeadamente, uma banda com elevada absorção a 645 nm. O valor de IC_{50} deste fotossensibilizador nas linhas celulares humanas de carcinoma colorretal, carcinoma do esófago e melanoma melanocítico foi na ordem de nanomolar, o que aponta para um efeito terapêutico promissor. Verificou-se que o fotossensibilizador BBr2HPC é captado pelas células de carcinoma colorretal e de carcinoma do esófago e que se acumula nas mitocôndrias, nos lisossomas e no retículo endoplasmático, mas não penetra no núcleo celular. Após a fotossensibilização verificou-se que o tipo de morte celular ativado, apoptose ou necrose, é influenciado pela concentração do fotossensibilizador e tipo de célula tumoral. Várias ROS estão implicadas no efeito fotodinâmico do fotossensibilizador BBr2HPC e os mecanismos citoprotetores não parecem ser suficientes para inibir os danos celulares.

Os estudos *in vivo* comprovaram o efeito terapêutico significativo do tratamento fotodinâmico, baseado no fotossensibilizador BBr2HPC, particularmente quando administrada uma concentração de 2 mg/kg e irradiação após 24 horas, em que se observaram casos de resposta patológica completa. A eliminação deste fotossensibilizador é hepatobiliar e urinária e o tempo de eliminação aponta para um perfil de segurança favorável numa fase pré-clínica.

Na perspectiva do desenvolvimento de um fotossensibilizador com propriedades adequadas à aplicação diagnóstica, sintetizou-se e caracterizou-se o 2CPP. Este fotossensibilizador foi caracterizado e complexado com ^{99m}Tc , após o desenvolvimento de uma metodologia de marcação radioquímica simples e reprodutível que permitiu obter uma formulação com uma eficiência de marcação superior a 92%, estável no tempo *in vitro* e em soro sanguíneo humano. Este fotossensibilizador, também apresenta um perfil de eliminação hepatobiliar e urinário e apresenta potencial para estudos de imagem.

Com este trabalho, foi possível concretizar o objetivo de desenvolver um fotossensibilizador com intuito terapêutico, caracterizar as suas vias subcelulares de atuação e verificar o seu desempenho pré-clínico que se revelou extremamente promissor. Paralelamente, a utilização de fotossensibilizadores complexados com radioisótopos constituiu uma abordagem de medicina personalizada em PDT, através da medicina nuclear, com potencialidade teranóstica e de seguimento.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) relies on the administration of a photosensitizer, which by itself has no pharmacological effect, and its subsequent activation by irradiation with visible light of appropriate wavelength. As a result of photoactivation reactive oxygen species (ROS) are produced leading to cell death. By its mode of action PDT is associated with few side effects. This is due, not only because of the cytotoxic effect that occurs only at the site of activation by light, but also because photosensitizers typically accumulate in tumor cells; therefore PDT exhibits high selectivity.

In the clinical context PDT is used in ophthalmology, dermatology and also in oncology. However, its use in the treatment of cancer is limited, possibly due to the low number of approved drugs and the low number of approvals for cancer therapy.

This work aimed to develop new photosensitizers for PDT. It was intended to develop a photosensitizer with high therapeutic potential, evaluate its photochemical characteristics, assess its photodynamic effect in several tumor cell lines, contribute to clarify its molecular pathways and to study its therapeutic potential *in vivo* and biodistribution. In parallel, we intended to develop another photosensitizer that could be labelled with metastable technetium-99 (^{99m}Tc), to optimize a simple and reproducible procedure for labelling and to study the biodistribution of the complex. This approach of joining PDT and nuclear medicine might allow us to maximize the therapeutic effect by identifying the time at which the maximum uptake by the tumor occurs.

To achieve these goals we used different methodologies, from chemical synthesis, *in vitro* studies, in which several methodologies were used, such as confocal microscopy, flow cytometry, western blot, radioactive labeling and thin layer microchromatography, to *in vivo* studies.

It was possible to synthesize the photosensitizer BBr2HPC with appropriate photochemical characteristics to use in therapy, particularly a high absorption band with 645 nm. The IC_{50} value of the photosensitizer in human colorectal carcinoma cell lines, esophageal carcinoma and melanocytic melanoma was on the nanomolar range, which indicates a promising therapeutic effect. BBr2HPC photosensitizer uptake by colorectal carcinoma and esophageal carcinoma cells was showed subcellular localization in the mitochondria, the endoplasmic reticulum and the lysosomes; however the compound do not seem to be able to enter the cell nucleus. After photosensitization it was found that the type of activated cell death, apoptosis or necrosis, is affected by the concentration of photosensitizer and type of tumor cell. Several ROS are implicated in the photodynamic effect induced by the photosensitizer BBr2HPC and cytoprotective mechanisms seem insufficient to prevent cell damage.

In vivo studies have shown significant therapeutic effect of the photosensitizer in the photodynamic treatment based on BBr2HPC, particularly when a concentration of 2 mg/kg was administered and irradiation took place 24 hours after, after which some cases of complete pathologic response were observed. This photosensitizer has

hepatobiliary and urinary elimination and its elimination time points to a favorable safety profile in a preclinical phase.

In the view of developing a photosensitizer with properties suitable for diagnostic application, 2CPP was synthesized and characterized. This photosensitizer was characterized and complexed with ^{99m}Tc , after the development of a simple and reproducible method for radiochemical labeling that yielded a formulation with a labelling efficiency superior to 92%, stable in time in vitro and in human blood serum. This photosensitizer also presents a hepatobiliary and urinary elimination profile and has potential for imaging studies.

This work allowed to achieve the goal of developing a photosensitizer with therapeutic intent, characterize its subcellular pathways of action and check its pre-clinical performance, which revealed extremely promising. Similarly, the use of photosensitizers complexed with radioisotopes might provide a personalized medicine approach to PDT using nuclear medicine, with applications in theranostics and follow-up.

PARTE I – CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

CAPÍTULO I — FUNDAMENTOS E POTENCIALIDADES DA TERAPIA FOTODINÂMICA

O cancro é uma palavra singular que inclui uma diversidade de doenças que têm em comum uma divisão celular descontrolada, consequência de alterações nos mecanismos de proliferação e regulação celular. O cancro distingue-se pela independência às restrições presentes nos tecidos normais. A célula tumoral não obedece às regras complexas de arquitetura e função que regem a morfologia habitual e comportamento celular num tecido e é insensível às barreiras anatómicas das membranas celulares adjacentes e membranas basais. Como parte do seu comportamento invasivo, as células tumorais, ao atingir um vaso linfático ou capilar, são capazes de penetrar na sua parede, migrar para locais remotos onde a possibilidade de extravasamento, aderência e colonização permita a formação de metástase. Na ausência de um evento interveniente, e passado o tempo suficiente, as alterações anatómicas e funcionais consequentes determinam a morte (Hong *et al*, 2010).

O cancro constitui uma das principais causas de morte no mundo. Em 2012 registaram-se 14,1 milhões de novos casos, 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de pessoas afetadas (no período de 5 anos após o diagnóstico) em todo o mundo (Ferlay *et al*, 2013). Os mapas de incidência e mortalidade por cancro estimados para o ano de 2012 estão representados na Figura 1. A transformação de uma célula normal numa célula tumoral é um processo que envolve várias etapas que dependem da interação da genética de cada indivíduo com três categorias principais de carcinógenos, nomeadamente, físicos, como a luz ultravioleta ou a radiação ionizante, químicos, como alguns componentes do tabaco ou de alguns alimentos, e biológicos, consequentes a algumas infeções bacterianas ou virais. Assim, constituem principais fatores de risco para o desenvolvimento de cancro, hábitos tabágicos, dietas alimentares pobres e desequilibradas, consumo de álcool, adoção de estilos de vida sedentários ou infeções crónicas como hepatite B ou C, entre outras (Murphy *et al*, 2012; World.Health.Organization, 2014).

A incidência do cancro aumenta com a idade. Em 2030 estima-se que 70% dos doentes com cancro terá mais de 65 anos, consequência natural do aumento da esperança média de vida, que está associado à necessidade de mais cuidados de saúde (Gianni *et al*, 2001). O envelhecimento está associado a uma série de eventos a nível molecular, celular e fisiológico que influenciam a carcinogénese e a progressão tumoral. Foram propostas três teorias para a explicar a associação da incidência de cancro com a idade. A primeira hipótese suporta que esta associação é consequente da duração da carcinogénese, ou seja, a maior prevalência em indivíduos mais velhos reflete a exposição mais prolongada a agentes cancerígenos (Anisimov, 2007). A segunda hipótese propõe que as

alterações fisiológicas normais relacionadas com a idade são favoráveis à indução de neoplasias ou à proliferação de células malignas pré-existentes. (Anisimov, 1983, 2003). A terceira teoria propõe que o fenótipo mais propenso a neoplasmas de indivíduos mais velhos se deve aos efeitos combinados das mutações cumulativas, disfunção dos telómeros, silenciamento epigenético e ambiente estromal alterado (DePinho, 2000).

O progresso na investigação médica básica permitiu melhor compreensão da biologia do tumor e a conceção de novas gerações de fármacos dirigidos a alvos moleculares, no entanto poucas exceções mostram alterações notáveis nos resultados do tratamento e o número de novos medicamentos anticancro aprovados é baixo (Agostinis *et al*, 2011). Apesar dos esforços no sentido de melhorar os tratamentos disponíveis, a resposta a longo prazo de doentes tratados cirurgicamente, com radioterapia e quimioterapia mantêm-se sub-ótima, pois a falta de seletividade destas terapêuticas resulta geralmente em efeitos secundários graves (Yoo & Ha, 2012). Estes factos dão ênfase à necessidade de explorar terapêuticas emergentes, como a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *photodynamic therapy*). Apesar da sua utilização limitada, a PDT está aprovada para o tratamento de doenças neoplásicas e não malignas, e é considerada uma terapêutica de sucesso no tratamento de vários tipos de cancro (Serra *et al*, 2008a; Agostinis *et al*, 2011).

A PDT é uma terapêutica pouco invasiva que produz citotoxicidade seletiva nas células tumorais. O procedimento depende da administração de um fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*), que por si só é inativo, seguido da sua irradiação com luz de comprimento de onda correspondente à banda de absorção do fármaco. A presença de oxigénio é fundamental para que a reação fotodinâmica, com origem nos estados excitados do fotossensibilizador, tenha sucesso. Como consequência da reação fotodinâmica pode ocorrer morte celular diretamente, ou de modo indireto por lesão da vasculatura tumoral ou mesmo pela indução de uma reação inflamatória local (Plaetzer *et al*, 2009). Vários estudos clínicos mostraram que a PDT pode ser curativa, particularmente, no caso de tumores pouco avançados. Por outro lado, sabe-se que pode prolongar a sobrevivência no caso de tumores inoperáveis e melhorar a qualidade de vida do doente (Agostinis *et al*, 2011).

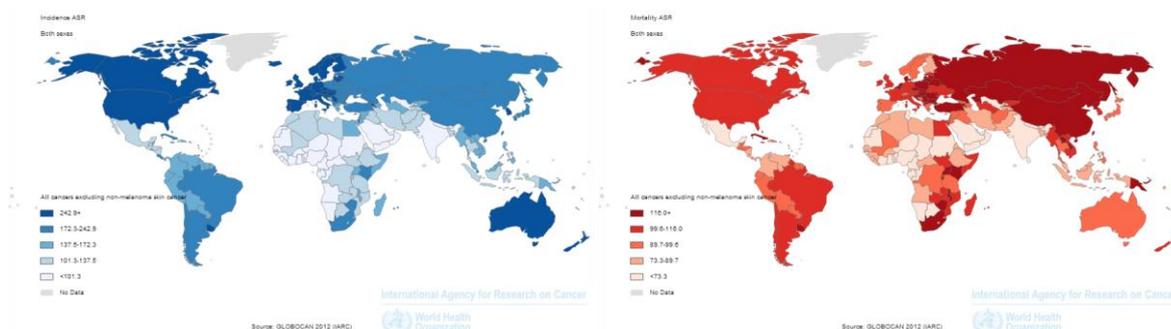


Figura 1: Mapa de incidência (à esquerda) e mapa de mortalidade (à direita) por cancro estimadas para o ano de 2012. Retirado de GLOBOCAN 2012 (<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx#> consulta a 15 de Maio de 2014).

São várias as características da terapia fotodinâmica que a tornam uma terapêutica interessante, como baixa toxicidade para os tecidos normais, ausência de efeitos secundários sistêmicos, ausência de mecanismos de resistência adquirida, bom resultado cosmético e baixa limitação da função dos órgãos afetados, sobretudo, no ponto de vista de combinação com outras terapêuticas (Agostinis *et al*, 2011).

Foi com a descoberta acidental, no princípio do século XX, em que o estudante de medicina Oscar Raab verificou que a combinação de luz de elevada intensidade com um corante como o laranja de acridina, sobre uma preparação de paramécias, provocava a morte que se iniciou a investigação da reação fotodinâmica (Ackroyd *et al*, 2001). Em conjunto, Raab e os seus professores verificaram que este acontecimento era devido a uma reação fotoquímica dependente de oxigénio (Allison, 2014). Em poucos anos foram descritos os primeiros estudos clínicos da aplicação da PDT, tendo por base moléculas corantes, no tratamento principalmente de cancro da cabeça e pescoço ou da pele (Triesscheijn *et al*, 2006). Apesar do sucesso com que estes estudos foram descritos, o interesse na PDT diminuiu, com a progressiva redução do número de trabalhos publicados. No entanto, neste período, foi descrita também a possibilidade de usar a fluorescência do fotossensibilizador para tornar o tumor visível, e portanto, a possibilidade de aplicar a reação fotodinâmica para diagnóstico (Allison, 2014). Foi a partir dos anos 70 que Dougherty redescobriu a PDT e redefiniu esta terapêutica com ensaios clínicos bem-sucedidos. Os resultados da administração de derivados da hematoporfirina (HpD), seguida de iluminação com luz vermelha, em mais de 100 doentes com cancros da pele e da bexiga, constituíram evidências que contribuíram para a aceitação e a generalização desta terapia (Triesscheijn *et al*, 2006; Allison, 2014). Em 1993, a PDT baseada em HpD foi aprovada pela primeira vez no Canadá, para o tratamento de cancro da bexiga, tendo sido posteriormente aprovada também nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa (Plaetzer *et al*, 2009). Assim, há cerca de duas décadas, esta foi a primeira terapêutica aprovada que consiste na combinação de um fármaco com um dispositivo (Agostinis *et al*, 2011).

Atualmente, apesar de estar aprovada para várias indicações em vários países, o uso clínico da PDT é limitado. A simplicidade do mecanismo de ação desta terapêutica está comprometida pela necessidade de uma abordagem multidisciplinar para a sua implementação. A investigação básica progrediu grandemente na compreensão dos mecanismos biológicos e bioquímicos inerentes a esta terapêutica, no entanto há ainda muito por esclarecer (Yoo & Ha, 2012).

Fundamentos da Terapia Fotodinâmica

A PDT é uma terapêutica pouco invasiva, que depende da administração de um fotossensibilizador que é posteriormente ativado localmente, pela irradiação com um feixe de luz de comprimento de onda adequado e que corresponde ao seu espectro de absorção. Na presença de oxigénio molecular, o fotossensibilizador ativado pela luz inicia uma sequência de reações fotoquímicas e fotobiológicas que produzem espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), capazes de provocar a morte celular. Assim, a PDT assenta na combinação de

três componentes que, por si só, não têm efeito citotóxico, o fotossensibilizador, a luz e o oxigênio, mas que combinados adequadamente produzem a reação fotodinâmica.

Do ponto de vista de aplicação clínica a PDT é uma terapêutica realizada em dois procedimentos sequenciais. O fotossensibilizador é administrado de forma intravenosa, distribui-se por todo o organismo e acumula preferencialmente no tumor. Os mecanismos responsáveis por esta acumulação preferencial não estão completamente esclarecidos pois dependem grandemente da natureza do fotossensibilizador, no entanto vários trabalhos apontam para algumas hipóteses explicativas, que serão discutidas mais à frente. Após um período de tempo variável e ajustado à retenção pelo tumor e ao tempo de eliminação natural do fotossensibilizador, pelos tecidos/órgãos não alvo, é realizada a irradiação. A irradiação é feita preferencialmente com luz de comprimento de onda adequado para a penetração nos tecidos, o que torna a cor vermelha preferencial, e correspondente à capacidade de absorção do fotossensibilizador utilizado. Após a irradiação, o tumor é destruído e o tecido regenera-se com alguma cicatrização (Ortel *et al*, 2009). A irradiação pode ser feita em praticamente qualquer órgão do corpo pela utilização de dispositivos flexíveis de fibra ótica (Agostinis *et al*, 2011). Estas particularidades das quais a PDT está dependente conferem-lhe uma dupla seletividade: a retenção preferencial do fotossensibilizador pelas células tumorais e a aplicação da luz de forma direcionada à região a tratar (Anand *et al*, 2012). A dupla seletividade desta terapêutica permite minimizar os danos nos tecidos adjacentes (Agostinis *et al*, 2011). Para além destas características, a PDT tem outras vantagens adicionais em relação às terapêuticas convencionais, já que pode ser usada antes ou após a quimioterapia, radioterapia ou cirurgia sem comprometer estes tratamentos e o tempo de recuperação é reduzido. A PDT não é genotóxica e a repetição do tratamento não resulta em toxicidade cumulativa. É um tratamento pouco invasivo, que requer uma única administração e uma única irradiação. Esta terapia, em muitas situações clínicas, pode ser realizada em regime de ambulatório, como atualmente acontece com a radioterapia e a quimioterapia, no entanto, nestas duas situações os períodos de tratamento são muito mais longos. Para além disso, pode dizer-se que as interações medicamentosas não ocorrem, já que nem o fotossensibilizador nem a irradiação interferem com outros fármacos anti-neoplásicos, o que permite a combinação com outras metodologias de tratamento, o que aliás tem vindo a ser crescentemente sugerido ao nível da investigação pré-clínica (Gomer *et al*, 2006; Verma *et al*, 2007). Outra vantagem da PDT é que o tratamento pode ser repetido em caso de recorrência tumoral ou de aparecimento de novo tumor primário numa área previamente tratada, sem risco de dano dos tecidos normais circundantes ou de desenvolvimento de resistência à terapia, mecanismos habitualmente associados às terapêuticas convencionais. Este segundo tratamento, de acordo com a abordagem convencional, torna-se complicado tanto para a cirurgia como para a quimioterapia e a radioterapia (Hopper, 2000; Triesscheijn *et al*, 2006). Conjuntamente, o excelente resultado cosmético torna esta terapêutica adequada para tratar casos de cancro da pele. Não se verificam alterações significativas da temperatura dos tecidos e a preservação do tecido conjuntivo proporciona fibrose mínima, o que proporciona a manutenção da integridade anatómica e mecânica mesmo no caso de órgãos ocos (Agostinis *et al*, 2011). A PDT poupa a arquitetura dos tecidos porque não danifica elementos fibrilares como o colagénio e a elastina e preserva a

matriz que serve de suporte à regeneração do tecido, o que permite também a recuperação sem formação de cicatriz (Grant *et al*, 1997; Verrico *et al*, 2001). Uma vantagem da limitada penetração da luz é a proteção dos tecidos normais circundantes em relação à fototoxicidade. Os comprimentos de onda utilizados na terapêutica podem induzir morte celular num raio máximo de 10 mm da zona iluminada (Triesscheijn *et al*, 2006). Em contraste, a cirurgia e a radioterapia podem ser altamente mutiladoras das estruturas circundantes da área a tratar. Doentes com tumores inoperáveis, que esgotaram outras opções terapêuticas, também podem usufruir de melhorias na sua qualidade de vida através da PDT (Agostinis *et al*, 2011). Vários ensaios clínicos têm demonstrado que a PDT tem uma baixa taxa de morbilidade (Hopper, 2000).

A natureza localizada do tratamento fotodinâmico deve ser sempre tida em conta pois, se por um lado contribui para as suas limitações, na medida em que não permite tratar doença disseminada, por outro lado pode também ser uma oportunidade de estabelecer uma terapêutica de sucesso contra o cancro uma vez que, a atuação apenas na região do tumor minimiza os efeitos secundários típicos das terapêuticas anticancro convencionais. Apesar das limitações no tratamento da doença avançada ou disseminada, mesmo nestes casos, a PDT pode melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência do doente (Brown *et al*, 2004). Para a doença inicial, a PDT é uma terapêutica com numerosas vantagens, pois a sua seletividade minimiza os efeitos secundários e um único procedimento pode resultar na extinção do tumor (Brown *et al*, 2004). No entanto, e uma vez que as lesões metastáticas são a causa mais frequente de morte de doentes com cancro, vários trabalhos de investigação têm como foco o desenvolvimento de condições ótimas de PDT capazes de induzir imunidade sistémica (Agostinis *et al*, 2011).

Os efeitos adversos da PDT relacionam-se com a ocorrência de dor durante alguns protocolos de tratamento e a fotossensibilização persistente da pele após tratamento que tem sido contornada pelos fotossensibilizadores mais recentes (Agostinis *et al*, 2011). A principal limitação da PDT é a necessidade dos doentes permanecerem em luz fraca durante algum período de tempo e de evitarem a exposição direta aos raios solares. No entanto, para reduzir a fotossensibilidade da pele e minimizar outros efeitos secundários é importante ter em conta a concentração do fotossensibilizador, a potência e a energia da luz administrada (Plaetzer *et al*, 2009).

Apesar de a PDT estar aprovada para várias doenças oncológicas e não malignas, a recorrência do tumor continua a ser uma das principais limitações desta terapêutica. Possivelmente, os fatores que influenciam negativamente a ação da PDT são a distribuição não homogênea da luz e a acumulação insuficiente de fotossensibilizador nas células tumorais. O oxigénio é um dos três parâmetros chave da PDT, que ocorre à custa do gasto desta molécula, pelo que o aparecimento de áreas hipóxicas após a PDT é provável. A PDT pode lesar diretamente o tecido tumoral com o concomitante consumo de oxigénio ou provocar danos indiretamente através de destruição vascular o que, por si só, pode causar depleção de oxigénio. A existência de hipoxia no microambiente tumoral, promove um sinal, habitualmente mediado pelo fator de transcrição induzido pela hipoxia 1 (HIF-1, do inglês *hypoxia-inducible factor 1*), que favorece a produção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), o qual constitui um interruptor da angiogénese. Esta relação entre a PDT e a angiogénese foi estabelecida pela primeira vez por Ferrario e colegas que mostraram que a associação com

anti-angiogénicos pode melhorar a eficácia terapêutica da PDT (Ferrario *et al*, 2000, 2002; Vittar *et al*, 2013). A expressão de HIF-1, induzida por hipoxia, contribui para a menor eficácia da PDT. Uma elevada expressão intrínseca de HIF-1, foi associada a uma baixa taxa de resposta completa após a PDT. Surpreendentemente, mesmo na ausência de hipoxia, podem ocorrer efeitos mediados pela ativação do HIF-1 α , os quais podem estar relacionados com o aumento das ROS. Este aumento das ROS está também envolvido na regulação do HIF-1, através da ativação dos componentes da sinalização a montante, tais como a p38 (do inglês, *P38 mitogen-activated protein kinases*) e a ERK/MAP (do inglês, *extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated protein*) cinase, o que leva a um aumento na sua transcrição. Do ponto de vista da investigação fundamental, o HIF-1 está no centro de uma via de sinalização que condiciona a dinâmica do microambiente do tumor e que pode ter um impacto importante no resultado clínico da PDT. A combinação de PDT com inibidores da angiogénese demonstrou em estudos pré-clínicos, o aumento do efeito terapêutico (Vittar *et al*, 2013).

Tendo em conta os fatores que estão na base da PDT, é possível desenvolver vários regimes de tratamento de acordo com a escolha do fotossensibilizador e as características da fonte de luz, tais como, o comprimento de onda, a duração da irradiação, a forma de irradiar, se contínua ou intermitente, a disponibilidade de oxigénio, e o tipo de tumor. A fisiologia tumoral é fundamental na definição da resposta terapêutica (Anand *et al*, 2012). O fotossensibilizador, selecionado de acordo com o tipo de lesão neoplásica a tratar, é administrado ao doente, e passado o tempo suficiente para se atingir a concentração máxima no interior das células tumorais, é realizada a irradiação com luz de comprimento de onda apropriado. A luz deve penetrar até ao local onde se encontra o tumor, ou não terá os efeitos desejados. Complementarmente, quanto mais elevada for a concentração de oxigénio no tumor melhor será o resultado. No entanto, o sucesso desta terapêutica tem grande dependência da substância fotossensível (Agostinis *et al*, 2011). Um dos aspetos mais promissores da PDT é a constatação, através de modelos animais, que muitas das substâncias fotossensíveis são retidas nos tumores em concentrações mais elevadas do que nos tecidos normais. Quando os fotossensibilizadores têm baixa seletividade para as células tumorais é necessário ultrapassar este problema, para o que foram propostas várias soluções. Uma das soluções propostas é a imunoconjugação, ou seja, combinar o fotossensibilizador com um anticorpo monoclonal específico para um alvo celular sobreexpresso no tecido. Alguns estudos *in vitro* já demonstraram a utilidade dos fotossensibilizadores imunoconjugados para alvos específicos, cuja lista continua a expandir-se, incluindo o antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*), o antígeno CD20 (CD20, do inglês *B-lymphocyte antigen*), o recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*), o recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2, do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*), várias interleucinas e fragmentos específicos de tumor de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv, do inglês *single-chain variable fragment*). No entanto, ainda não existem estudos clínicos que utilizem estes fotossensibilizadores (Qiang *et al*, 2008).

A dosimetria na PDT é fundamental para assegurar uma distribuição da energia uniforme sobre o tecido alvo e permite avaliar também o efeito sobre os tecidos normais circundantes ao tumor. A dosimetria adequada

equaciona a concentração igualmente adequada de fotossensibilizador, a luz e também a disponibilidade de oxigênio. A necessidade de otimização destes parâmetros poderá ser uma das limitações à utilização generalizada desta terapêutica, por isso, o desenvolvimento de ferramentas de planeamento constitui uma mais-valia.

Fotofísica e fotoquímica da terapia fotodinâmica

Após ativação pela luz, a molécula fotossensibilizadora passa do estado fundamental para o estado excitado de vida curta. Este processo está na origem da reação fotodinâmica que pode ter vários desfechos, e está representado na Figura 2. A maioria dos fotossensibilizadores no seu estado fundamental tem eletrões com spins opostos localizados na orbital molecular energeticamente mais favorável, ou seja, os eletrões perfazem um spin total de 0 com multiplicidade de 1, a configuração energética mais baixa possível. A absorção de um quantum de luz com energia apropriada conduz à transferência de um eletrão para um estado de maior energia, que significa a passagem do fotossensibilizador ao estado excitado singleto ($^1PS^*$). Este fotossensibilizador excitado é muito instável e por isso pode voltar ao estado fundamental (1PS). Como cada estado excitado pode ocorrer em vários níveis vibracionais, a primeira hipótese é a passagem do eletrão para o nível de energia vibracional mais baixo. Este processo é designado por relaxamento vibracional e ocorre com emissão de energia sob a forma de calor. Pode também ocorrer a passagem de um eletrão de um estado excitado para o estado fundamental por emissão de um fóton de fluorescência. A emissão de fluorescência é possível apenas na transição do estado singleto para o estado fundamental, pelo que o comprimento de onda de fluorescência, não depende do comprimento de onda de excitação e é sempre menor que este. A diferença entre o comprimento de onda máximo de excitação e o comprimento de onda máximo de emissão designa-se por desvio de Stokes e deve-se à perda de energia (Castano *et al*, 2004). Neste caso não ocorre a reação fotodinâmica com efeito terapêutico, no entanto esta propriedade pode potencialmente ser aproveitada para diagnóstico através da obtenção de imagens de fluorescência (Celli 2010, Lovell 2010). Se o fotossensibilizador passar do estado excitado singleto a um estado excitado tripleto ($^3PS^*$), para posteriormente formar um estado tripleto mais estável com spin invertido de um dos eletrões desemparelhados, através de cruzamento intersistema, poderá estimular as reações fotodinâmicas do tipo I e do tipo II.

A reação do tipo I envolve a interação do estado excitado tripleto com substratos celulares e formação de radicais livres. Detalhadamente, ocorre transferência de eletrões e/ou iões H^+ de modo a formar radicais anião (substrato *) ou catião (substrato $^{+*}$), respetivamente, que por sua vez, podem reagir com o oxigênio e formar ROS. Esta reação, frequentemente, resulta na formação de aniões superóxido, O_2^{*-} , por transferência de um eletrão do estado excitado tripleto para o oxigênio molecular. Os aniões superóxido, em sistemas biológicos, reagem com a água de forma a produzir peróxido de hidrogénio, H_2O_2 . O peróxido de hidrogénio pode passar através das membranas celulares e, deste modo, pode provocar danos que não são confinados a um compartimento e, por este motivo, são muito relevantes. Em concentrações mais elevadas o anião superóxido pode formar radicais hidroxilo, OH^* , com um potencial *redox* $E_0 = 1,35$ V, altamente reativos, que atacam e oxidam qualquer molécula

biológica. Na presença de íons metálicos como o cobre ou o ferro podem também ser produzidos radicais hidroxilo pela reação de Fenton (Juaranz *et al*, 2008; Ortel *et al*, 2009; Plaetzer *et al*, 2009; Agostinis *et al*, 2011; Yoo & Ha, 2012).

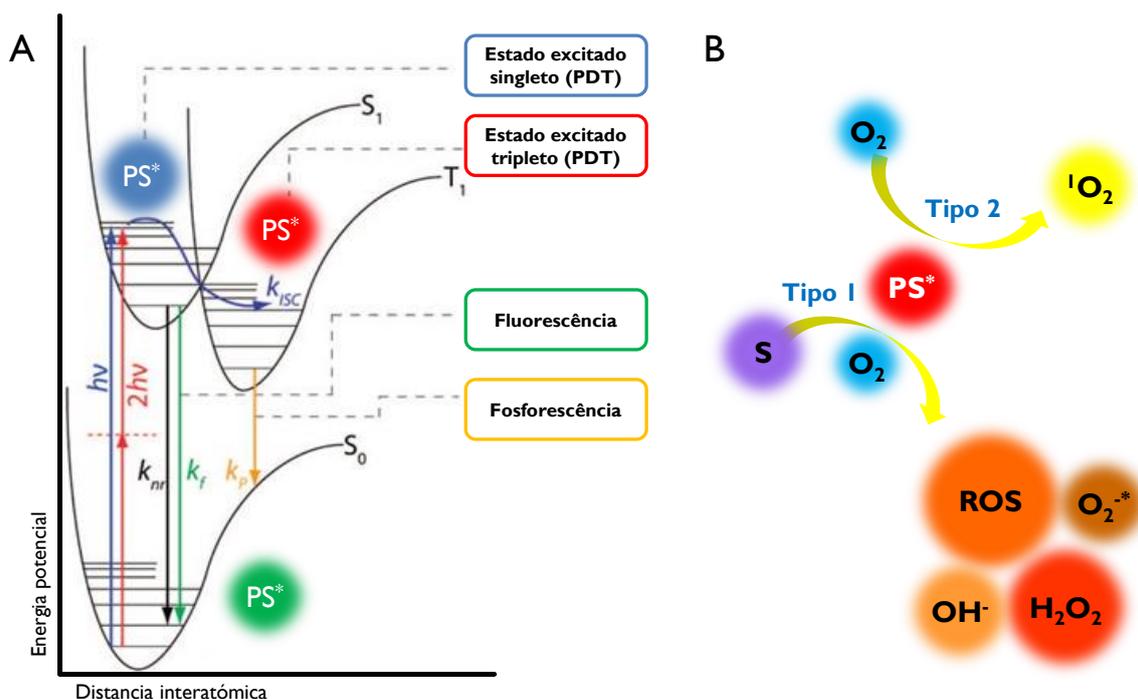


Figura 2: A) Diagrama de energia de Perrin-Jablonski para um fotossensibilizador (PS). A absorção de um fóton ($h\nu$) leva à excitação eletrônica para os estados singlete (S₁) ou tripleto (T₁). No estado singlete, o fotossensibilizador pode reagir com moléculas vizinhas, ou transitar para o estado excitado tripleto, T₁, por cruzamento intersistema (ISC, do inglês, *intersystem crossing*) ou relaxar, S₀, com dissipação de energia (nr). B) Reações do tipo I e II. O estado tripleto é o estado de maior duração, conseqüentemente, medeia as reações biológicas e fotoquímicas que levam à produção de espécies radicais através da transferência de elétrons para o oxigênio ou outros substratos celulares aceptores de elétrons, reação do tipo I, ou à transferência de energia para moléculas de oxigênio com formação de oxigênio singlete (¹O₂), reação do tipo II. O mecanismo fotodinâmico mediado por ¹O₂ é o mais importante para a citotoxicidade induzida pela PDT. Adaptado de Celli *et al*, 2010 e de Dai *et al*, 2012.

A reação do tipo II envolve a transferência direta de energia entre o fotossensibilizador no estado tripleto e o oxigênio molecular, no seu estado tripleto fundamental, o que leva à produção de oxigênio singlete, ¹O₂ (Juaranz *et al*, 2008; Ortel *et al*, 2009; Plaetzer *et al*, 2009; Agostinis *et al*, 2011; Yoo & Ha, 2012). De acordo com o que está descrito, a maior parte das reações fotodinâmicas assentam na reação do tipo II. No entanto, ambas podem ocorrer em simultâneo mas a predominante está na dependência das propriedades do fotossensibilizador, dos substratos intracelulares, entre outros fatores (Juaranz *et al*, 2008; Plaetzer *et al*, 2009; Robertson *et al*, 2009; Yoo & Ha, 2012). Assim, pode-se afirmar que o principal produto da PDT é o oxigênio singlete, que corresponde ao estado eletrônico do oxigênio de excitação mais baixa, espécie altamente reativa (Robertson *et al*,

2009; Yoo & Ha, 2012). Apesar da sua elevada reatividade no contexto de um sistema biológico o oxigénio singleto tem um tempo de vida e raio de ação limitados, por esse motivo, as primeiras moléculas a sofrer os danos da formação do oxigénio singleto são as que estiverem próximas do seu local de formação (Anand *et al*, 2012; Yoo & Ha, 2012).

Durante todo este processo, a molécula fotossensibilizadora regenera-se e pode funcionar de forma catalítica, ou seja, podem produzir-se vários ciclos de formação de oxigénio singleto por cada molécula de fotossensibilizador (Brown *et al*, 2004).

Importância do fotossensibilizador

O fotossensibilizador constitui, possivelmente, o mais importante componente da PDT, e considera-se que o resultado terapêutico está grandemente centrado na sua estrutura química. Conforme descrito, o fotossensibilizador é a molécula que absorve energia de comprimento de onda específico e a transforma em energia útil (Yoo & Ha, 2012). Dada a sua importância, vários investigadores reviram e enumeraram as características do fotossensibilizador ideal (Triesscheijn *et al*, 2006; Ortel *et al*, 2009; Agostinis *et al*, 2011; Allison, 2014). A molécula fotossensibilizadora deve ter elevada capacidade de efetivar a reação fotodinâmica, ou seja, deve ter um elevado rendimento de produção de oxigénio singleto, no contexto de um sistema biológico, após ativação por luz adequada. Associadamente, o fotossensibilizador deve também ser inócuo na ausência de luz, para evitar possíveis efeitos secundários sistémicos.

Relativamente à síntese, deve ser uma substância pura e não uma mistura, de modo a evitar variabilidade entre lotes, deve ser fácil de preparar para que a sua comercialização seja exequível e deve ser estável de modo a permitir o seu armazenamento e transporte. A formulação deve permitir uma administração segura e sem dor, passível de ser realizada de modo oral, ou tópico ou intravenoso. Do ponto de vista farmacocinético deve concentrar-se rapidamente na lesão para permitir que a irradiação seja o mais precoce possível e deve ser eliminado rapidamente de modo a minimizar quaisquer efeitos indesejáveis. A molécula deve ainda ser preferencialmente anfífilica, de modo à sua distribuição ser adequada sem recurso a sistemas de transporte (Allison, 2014). Uma outra característica muito importante é a presença de um elevado pico de absorção de luz entre 600 e 800 nm, isto é, de cor vermelha, que garante um bom compromisso entre a penetração da luz nos tecidos (que aumenta com o comprimento de onda) e a energia suficiente nos fotões, de modo a obter estados excitados com energia suficiente para poderem originar um rendimento substancial de ROS (Agostinis *et al*, 2011).

As moléculas com forte absorvância no vermelho de comprimento de onda longo proporcionam um resultado terapêutico superior. A maioria das moléculas fotossensibilizadoras tem por base uma estrutura tetrapirrólica, semelhante à da protoporfirina contida na hemoglobina, como é o caso das porfirinas e das clorinas, ou são estruturalmente relacionadas com ela, como é o caso das bacterioclorinas e das ftalocianinas (Agostinis *et al*, 2011). Para além do macrociclo heterocíclico, estas moléculas podem conter um átomo central metálico como o

ferro ou o magnésio. A presença de um sistema de elétrons π garante-lhes um elevado poder de absorção, o que as torna atrativas para aplicação em medicina. Na natureza existem várias porfirinas responsáveis por controlar processos de oxidação-redução (O'Connor *et al*, 2009).

Para além das características físicas e fotoquímicas favoráveis do macrociclo tetrapirrólico é também favorável a sua capacidade intrínseca de se acumular seletivamente nos tumores. Os fotossensibilizadores, particularmente os do tipo porfirínico, têm tendência a acumular preferencialmente em células tumorais, o que foi demonstrado em vários estudos (Jori, 1989; Jori & Reddi, 1993; Hamblin & Newman, 1994a; Boyle & Dolphin, 1996; Larroque *et al*, 1996; Woodburn *et al*, 1998; Qiu *et al*, 2014). Os mecanismos responsáveis por este facto estão pouco esclarecidos, no entanto, vários autores desenvolveram estudos que apontam algumas hipóteses (Brown *et al*, 2004). Uma possibilidade é a preponderância nos tumores de vasos com alterações morfológicas como soluções de continuidade e com trajeto tortuoso devido à neovascularização e à ausência de drenagem linfática, pelo que a permeabilidade e retenção são maiores (Agostinis *et al*, 2011). Outra hipótese explicativa é o facto de alguns dos compostos mais eficazes ligarem preferencialmente aos recetores da lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), que estão frequentemente sobreexpressos nas células tumorais (Maziere *et al*, 1990; Kessel *et al*, 1991; Jori & Reddi, 1993; Agostinis *et al*, 2011). Muitos tipos de células tumorais sobreexpressam o recetor de LDL apoB/E (Apolipoproteína B/E), o que deverá constituir uma resposta à biossíntese de lípidos necessários ao ritmo acelerado de extensão das membranas celulares de que depende o crescimento tumoral rápido (Korbelik, 1992; Yuan *et al*, 1993; Allison *et al*, 1994). Há ainda autores que defendem que os fotossensibilizadores são mantidos juntamente com outras macromoléculas no espaço extracelular devido à baixa drenagem linfática dos tumores (Roberts & Hasan, 1992) ou que o pH baixo, frequentemente encontrado no citoplasma tumoral, é responsável pela ionização de fotossensibilizadores que, conseqüentemente, tornam-se mais hidrofílicos e ficam retidos no interior da célula (Pottier & Kennedy, 1990).

Os fotossensibilizadores que têm a estrutura tetrapirrólica como base, costumam ser classificados como de primeira, segunda e terceira geração. Estas gerações estão relacionadas não só com questões históricas mas também com a abordagem conceptual que resultou no seu desenvolvimento (Senge, 2012). Os fotossensibilizadores da primeira geração incluem o derivado da hematoporfirina (HpD, do inglês, *hematoporphyrin derivative*) e o Photofrin[®], o primeiro PS aprovado para uso clínico, após os trabalhos de Dougherty. Os fotossensibilizadores da segunda geração, que incluem o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA, do inglês *5-aminolevulinic acid*), a hipericina, derivados da benzoporfirina, ftalocianinas, entre outros, como o Foscan[®] e o Verteporfin[®], foram desenvolvidos de forma a eliminar alguns problemas das moléculas da primeira geração, como a fotossensibilidade prolongada da pele e a absorção de luz para os comprimentos de onda com baixa capacidade de penetração nos tecidos. Assim, estes fotossensibilizadores surgem como substâncias quimicamente puras, com características espectrais otimizadas, que absorvem luz de comprimento de onda mais longos de maior penetração nos tecidos, e com elevado rendimento quântico de formação de oxigénio singlete. Os pressupostos para a obtenção de compostos de segunda geração são fundamentalmente de índole química. Os fotossensibilizadores de segunda geração permitiram obter excelentes

resultados no tratamento fotodinâmico de vários tipos de cancro e alguns estão aprovados para uso clínico. No entanto, há sempre espaço para melhoramentos, no caso dos fotossensibilizadores, particularmente no que concerne às características farmacológicas. A terceira geração de substâncias fotossensíveis geralmente traduz-se por modificações, como conjugados biológicos (fotossensibilizadores conjugados com lipossomas ou anticorpos) que melhoram a acumulação seletiva do fotossensibilizador no tecido tumoral e, atualmente, representam uma área de investigação ativa (Huang *et al*, 2008; Byrne *et al*, 2009; Anand *et al*, 2012; Senge, 2012).

A lipofilicidade influencia as propriedades dos fotossensibilizadores, e é determinante para a captação celular e para a localização intracelular dos compostos. A estrutura primária, os grupos substituintes, a possibilidade de complexação com iões metálicos e a carga, determinam propriedades moleculares tais como a polaridade, a solubilidade, a farmacocinética e a distribuição subcelular. Também determinam a energia do estado tripleto e a capacidade de formar oxigénio singleto após irradiação (Greer, 2006). A solubilidade é igualmente uma característica de grande importância. A anfifilicidade assegura não só o transporte na corrente sanguínea, sem formação de precipitados ou agregados, como a penetração eficaz na bicamada lipídica da membrana celular. Um bom fotossensibilizador não deve ter tendência a formar agregados pois isso reduziria a sua capacidade de absorver luz e de passar ao estado tripleto. Em relação à farmacocinética, a seletividade para as células tumorais relativamente às outras células pode ser aumentada através da utilização de algumas estratégias. Tal como referido, foram realizados estudos em que o fotossensibilizador é covalentemente ligado a moléculas que têm alguma afinidade para o tumor ou para recetores específicos expressos pelas células tumorais. Estas moléculas incluem os anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, somatostatina, ácido fólico, entre outros (O'Connor *et al*, 2009; Agostinis *et al*, 2011).

Após a reação fotodinâmica o ideal é que a eliminação do fotossensibilizador seja a mais rápida possível, de modo a minimizar o período de fotossensibilidade generalizada. O fotossensibilizador pode ser degradado por ação da luz, fenómeno designado por *photobleaching*. Este efeito era considerado como indesejável, mas poderá ser positivo na medida em que torna a dosimetria da luz menos crítica e minimiza a possibilidade de a reação fotodinâmica ser excessiva. A degradação e o metabolismo celular também não podem formar produtos tóxicos. É fundamental que o fotossensibilizador não seja mutagénico nem produza moléculas com essa característica quer antes quer após a irradiação. Esta característica depende essencialmente da tendência para não se acumular no núcleo e, na maior parte dos casos, esta tendência não se verifica. A PDT não costuma causar danos no DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*), provocar mutações ou induzir a carcinogénese (Yang *et al*, 1993; Leist & Nicotera, 1997; O'Connor *et al*, 2009; Agostinis *et al*, 2011) e nenhum dos fotossensibilizadores aprovados até agora se acumula no núcleo (Triesscheijn *et al*, 2006; Anand *et al*, 2012).

Atualmente existem poucas moléculas aprovadas para esta terapêutica que estão sumariadas na tabela I. Existem mais algumas moléculas em ensaios clínicos e a estrutura química de muitas delas baseia-se na estrutura química de porfirinas e de clorinas.

Tabela 1: Localização intracelular principal dos fotossensibilizadores aprovados para uso clínico.

Fotossensibilizador	Nomes Comerciais	Estrutura	Indicações ^{1,2}	Aprovações ^{1,2}	Localização subcelular preferencial ¹
mistura polimérica de éteres e ésteres da hematoporfirina	Photofrin [®] Photogem [®] Photosan [®] Hematoporphyrin Injection [®]	porfirina	bexiga, cérebro, ductos biliares, esôfago, pulmão, ovário	Mundial	Associado a membranas lipídicas
ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) éster metílico do 5-ALA	Levulan [®] (a) Metvix [®] (b)	precursor de porfirina	bexiga, cérebro, esôfago, pele	(a) Mundial (b) Europa	
meta-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC) ou temoporfin	Foscan [®]	clorina	cabeça e pescoço, cérebro, pulmão, pele	Europa, América do Sul, Ásia	Mitocôndria e Reticulo Endoplasmático
mono-L-aspartil-clorina e6 (NPe6) ou talaporfin	Laserphyrin, Talaporfin Sodium [®]	clorina	pulmão	Ásia	Lisossomas
derivado mono-ácido da benzoporfirina	Verteporfin [®] , Visudyne [®]	clorina	oftalmologia, pâncreas e pulmão	Mundial (para degenerescência macular relacionada com a idade)	Mitocôndria

¹(Agostinis *et al*, 2011) ²(Allison, 2014)

Derivados da Hematoporfirina

Como referido, a primeira geração de substâncias fotossensibilizadoras são as hematoporfirinas, os seus derivados e formas purificadas. O derivado de hematoporfirina, é uma mistura de vários monómeros, dímeros e oligómeros da hematoporfirina. De acordo com o processo de produção utilizado, o produto final pode ter diferentes quantidades desses subcomponentes, no entanto todos os subcomponentes são necessários à atividade e as várias formas aparentam ter um comportamento semelhante. Descreveu-se que esta mistura pode localizar-se preferencialmente em tumores, não é tóxica na ausência de luz e pode ser preparada facilmente em solução aquosa. No entanto, a seletividade para os tecidos tumorais verifica-se apenas 48 a 72 horas após administração e a fotossensibilidade da pele pode durar vários dias o que significa que o doente tem de permanecer em ambiente controlado no que diz respeito à exposição à luz por um período prolongado (Triesscheijn *et al*, 2006).

O fotossensibilizador que Dougherty usou nos seus estudos clínicos em 1970 é um derivado purificado de hematoporfirina, posteriormente designado por Photofrin[®], e continua a ser muito utilizado em PDT (Allison, 2014).

Em 1993, o Photofrin[®], cujo componente principal está representado na Figura 3, foi o primeiro fármaco aprovado para PDT antitumoral no Canadá e, posteriormente, nos EUA, América do Sul, Europa e Ásia. Mais tarde

surgiram outros fármacos constituídos por derivados purificados do HpD e que apresentam melhor efeito em alguns tipos de tumores, nomeadamente o Photogem[®], o Photosan[®], e a Hematoporphyrin Injection[®].

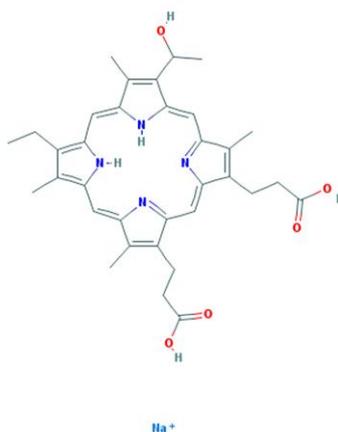


Figura 3: Estrutura química do éter de hematoporfirina, também designado por Photofrin[®]. A molécula representada constitui o componente purificado do derivado de hematoporfirina, que consiste numa mistura de porfirinas oligoméricas. Foi o primeiro composto a ser aprovado para utilização em PDT. Retirado de PubChem Compound, CID 3086257.

O Photofrin[®] tem sido cada vez mais usado em diversas aplicações, no entanto é um fotossensibilizador com várias limitações (Agostinis *et al*, 2011; Anand *et al*, 2012; Senge, 2012). O Photofrin[®], apesar de purificado, a sua composição continua a ser uma mistura de várias porfirinas, apresenta vários picos de absorção, sendo o de 630 nm o mais fraco. No entanto, por ser o comprimento de onda maior, capaz de penetrar mais profundamente nos tecidos, este sensibilizador é ativado por luz deste comprimento de onda (630 nm). Devido ao baixo coeficiente de absorção que se obtém são necessárias fluências de energia de 100 a 200 J/cm. As doses terapêuticas deste fármaco, cuja administração é feita por via intravenosa, são de 2 a 5 mg/kg (Triesscheijn *et al*, 2006; Yano *et al*, 2011). A iluminação segue a administração em 48 horas e é geralmente indolor e bem tolerada. O baixo rendimento de formação de oxigénio singleto após irradiação com luz de 630 nm obriga a uma exposição mais prolongada à luz. Além disso, apesar de este fármaco acumular preferencialmente em tumores pulmonares ou gastrointestinais numa razão 1,5 vezes superior aos tecidos circundantes normais, uma parte do fotossensibilizador fica retido na pele durante várias semanas, o que, tendo em conta a sua demorada eliminação, pode resultar em fotossensibilidade da pele durante quatro a doze semanas (Allison, 2014).

O Photofrin[®] está aprovado, em diferentes países, cada qual com as suas indicações específicas, para o tratamento de cancro da bexiga, mama, pulmão, esófago, gástrico, colo do útero e ovário (Juarranz *et al*, 2008; O'Connor *et al*, 2009; Yoo & Ha, 2012). Por exemplo, o cancro pulmonar ou esofágico com obstrução são indicações aprovadas nos EUA (Allison, 2014).

Hur *et al.* mostraram que a qualidade e a esperança de vida são maiores em doentes tratados com PDT do que submetidos a esofagectomia (Wolfsen, 2002; Qiang *et al.*, 2006). São poucos os estudos publicados referentes à utilização da PDT no tratamento de câncros do estômago e do cólon (Wolfsen, 2002; Qiang *et al.*, 2006; Spinelli *et al.*, 2006). Naturalmente, sendo a cirurgia o tratamento de primeira linha, as indicações para estes tipos de cancro limitam-se a doentes que não têm indicação cirúrgica. No entanto, foram reportados alguns casos de sucesso (Nakamura *et al.*, 2003). Vários ensaios clínicos têm confirmado a elegibilidade da PDT em casos de colangiocarcinoma (Ortner, 2001; Wiedmann & Caca, 2004; Mitton & Ackroyd, 2008), carcinoma da bexiga (Manyak & Ogan, 2003; Mitton & Ackroyd, 2008), cancro do pulmão de não pequenas células e, para tratamento paliativo de câncros obstrutivos da árvore traqueobrônquica (Chen *et al.*, 2006; Moghissi *et al.*, 2000; Usuda *et al.*, 2006).

Ácido 5-aminolevulínico

O uso do ácido 5-aminolevulínico, cuja estrutura química está representada na Figura 4, constitui uma abordagem completamente diferente que tem sido utilizada quer no tratamento, quer no diagnóstico de cancro. Em vez de uma molécula fotossensibilizadora é administrado um pró-fármaco, molécula que está virtualmente presente em todas as células humanas (Davila, 2011). O 5-ALA por si só não produz efeito fotodinâmico, mas é um precursor do heme e inicia uma via que resulta na produção de protoporfirina IX (PpIX), cuja acumulação em células tumorais resulta em sensibilidade tumoral. O heme, por si, não é um bom fotossensibilizador devido à curta duração dos seus estados excitados, mas o seu precursor imediato, a protoporfirina IX, é um fotossensibilizador eficiente. O heme é sintetizado a partir da glicina e da succinil coenzima-A. O passo limitante na via de biossíntese é controlado por um mecanismo de feedback negativo no qual a concentração de heme regula a produção de 5-ALA. No entanto, este feedback pode ser contornado pela adição excessiva às células, de 5-ALA exógeno. A resposta celular é a produção de protoporfirina IX a uma velocidade mais rápida do que a enzima ferroquelatase pode convertê-la em heme. Portanto, a protoporfirina IX tem atividade fotodinâmica dependente da ferroquelatase, enzima que muitas vezes está diminuída nas células tumorais (Anand *et al.*, 2012).

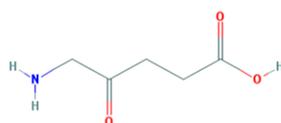


Figura 4: Estrutura química do ácido 5-aminolevulínico. O composto constitui um intermediário da síntese do heme e a sua metabolização resulta na acumulação de protoporfirina IX, que constitui um fotossensibilizador eficiente. Retirado de PubChem Compound, CID 137.

Com isto, o 5-ALA mostra uma maior acumulação nos tecidos tumorais em comparação com outros fotossensibilizadores administrados por via intravenosa. Os altos níveis de acumulação deste fotossensibilizador, ou

seja, da protoporfirina IX após administração, são geralmente alcançados em poucas horas, o que constitui uma das maiores vantagens do 5-ALA em relação a outros fotossensibilizadores.

O espectro de absorção da protoporfirina IX é muito semelhante ao do Photofrin[®] e normalmente também é ativada por luz de 630 nm. No entanto, o 5-ALA-PDT tem uma depuração mais rápida, o que limita o período de fotossensibilidade a um ou dois dias (Triesscheijn *et al*, 2006; Josefsen & Boyle, 2008).

Este fármaco é comercializado sob o nome de Levulan[®] para o tratamento da queratose actínica, uma lesão pré-cancerosa da pele. A aplicação tópica deste pró-fármaco atua contra algumas patologias dermatológicas e é eficiente em basaliomas superficiais e linfomas cutâneos das células-T (Krammer & Plaetzer, 2008). Por se tratar de uma molécula altamente hidrofílica, tem dificuldade de entrar nas células, por esse motivo, foram desenvolvidos ésteres alquílicos do 5-ALA. O Metvix[®] é um metil-éster do ácido 5-aminolevulínico (metil-ALA) que foi aprovado em 2001 para uso tópico contra melanoma não melanocítico, basaliomas e queratose actínica. O Hexvix[®] e o Benzvix[®] são ésteres metil e benzil do 5-ALA. O Hexvix[®] está aprovado nos EUA para o diagnóstico dos tumores da bexiga e seu tratamento, e o Benzvix[®] encontra-se em estudos clínicos para cancro gastro-intestinal (Nyst *et al*, 2009).

Pelas suas características, principalmente a possibilidade de aplicação tópica, o 5-ALA tornou-se o pró-fármaco fotodinâmico mais usado no cancro da pele. No entanto, pela sua possibilidade de penetração em apenas 1 a 2 mm no tecido, talvez um pouco mais no caso do éster metílico do 5-ALA, apenas lesões superficiais podem ser tratadas. Ao contrário do derivado de hematoporfirina, este fármaco foi desenvolvido para ser administrado também por via oral ou tópica. A possibilidade de ser administrado topicamente evita a consequente fotossensibilidade geral da administração sistémica, ao passo que a possibilidade de administração oral ou intravenosa está na base da fotossensibilidade variável de 24 a 72 horas mas permite o tratamento de lesões mais profundas (Morton *et al*, 2002; Allison, 2014).

A aprovação internacional do 5-ALA para o tratamento de queratose actínica foi obtida na sequência de vários ensaios clínicos com taxas de resposta completa de 70 a 89 % (Allison *et al*, 2006; Marmur *et al*, 2004). Relativamente ao metil-ALA, ensaios clínicos em doentes com basalioma nodular ou superficial demonstraram a eficácia e a segurança deste fármaco, o que levou à sua aprovação para uso tópico (Soler *et al*, 2001). Na Europa, o metil-ALA está indicado para basalioma superficial e para a queratose actínica. Este pró-fármaco está também disponível na América do Sul e Ásia (Allison, 2014)

Decorrem também ensaios clínicos com PDT baseado em 5-ALA sistémico para o tratamento da doença de Barrett e, como pode ser aplicado intravesicalmente, no tratamento do cancro da bexiga. Nestes estudos registaram-se boas taxas de remissão e ausência de efeitos secundários substanciais (Berger *et al*, 2003; Szygula *et al*, 2004; Skyrme *et al*, 2005). A PDT baseada em 5-ALA foi utilizada como terapia adjuvante para tratar glioblastomas após remoção cirúrgica e nestes doentes observou-se melhoramentos na qualidade de vida e sobrevivência (Stummer *et al*, 2008; Stylli e Kaye, 2006).

meta-Tetrahidroxifenilclorina

A segunda geração de fármacos para PDT surge nos anos 90 com o objetivo de ultrapassar as limitações do derivado de hematoporfirina através da obtenção de outros derivados porfirínicos. Como referido, pretendia-se produzir substâncias quimicamente puras, com características fotoquímicas superiores, incorporando grupos químicos que aumentassem o carácter anfífilo e que aumentassem a captação celular. A meta-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC, do inglês *meta-tetrahydroxyphenylchlorin*) também designada por temoporfina, é um fotossensibilizador muito mais potente que o derivado de hematoporfirina ou que a protoporfirina IX, devido ao maior rendimento de formação de oxigénio singleto. O seu espectro de absorção apresenta uma banda mais favorável a 652 nm, que permite a iluminação com luz de comprimentos de onda mais longos, com maior poder de penetração nos tecidos, e que requer fluências mais baixas para obter o efeito fotodinâmico.

O Foscan[®], nome comercial para a m-THPC, cuja estrutura química está representada na Figura 5, foi licenciado na União Europeia em 2001 como tratamento paliativo ou local de doentes com cancro avançado da cabeça e do pescoço, que não responderam a terapêuticas prévias e que não tinham a indicação para a quimioterapia ou radioterapia (Qiang *et al*, 2006). O Foscan[®] está também licenciado na América do Sul e na Ásia para o cancro espinhocelular da cabeça e pescoço em que outros tratamentos falharam (Allison, 2014). Atualmente está aprovado em vários países para o tratamento de cancro do pulmão, próstata, pâncreas e pele (Triesscheijn *et al*, 2006; Agostinis *et al*, 2011; Yoo & Ha, 2012).

A administração deste fármaco é feita por via intravenosa em concentrações variáveis entre 10 e 20 mg/kg, com irradiação 24 a 96 horas após administração. Vários estudos indicam que a eficácia terapêutica do Foscan é 100 vezes superior à do derivado de hematoporfirina para a mesma intensidade fototerapêutica. No entanto, este fármaco mantém o longo período de eliminação até 6 semanas (Allison *et al*, 2005; Triesscheijn *et al*, 2006; Josefsen & Boyle, 2008; O'Connor *et al*, 2009; Allison & Sibata, 2010; Yano *et al*, 2011). Associadamente, pelo facto da sua ação fotodinâmica ser tão elevada, em situações de iluminação excessiva podem resultar efeitos indesejados como formação de fibrose ou processos de cicatrização irreparáveis ou até, aparecimento de fístulas que podem estar associadas a mortalidade (Allison, 2014). Assim, apesar de trazer algumas vantagens, particularmente do ponto de vista fotoquímico, tem também algumas desvantagens associadas principalmente à sua aplicação clínica.

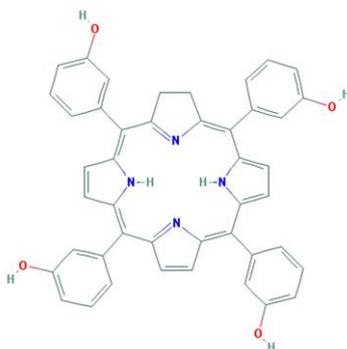


Figura 5: Estrutura química da meta-tetrahidroxifenilclorina, também designada por Foscan®. O Foscan® constitui um dos fotossensibilizadores de segunda geração mais eficazes, no entanto a sua utilidade clínica ainda é limitada. Retirado de PubChem Compound, CID 60751.

mono-L-aspartil-clorina e6

A mono-L-aspartil-clorina e6 (Npe6), representada na Figura 6, de nome comercial Laserphyrin Talaporfin Sodium®, também designada apenas por talaporfina, é um fotossensibilizador de segunda geração, solúvel em água e com um tempo de acumulação no tumor muito baixo. Apresenta uma banda de absorção máxima a 664 nm, o que permite a maior penetração da luz nos tecidos em relação aos fármacos referidos até agora. A NPe6 tem elevado rendimento de formação de oxigénio singleto e, por isso, permite a realização do tratamento de forma relativamente rápida. É capaz de se concentrar no tecido alvo em cerca de 4 horas após a injeção, o que a torna muito conveniente, pois o tratamento completo poder ser concretizado em apenas um dia. O tratamento é realizado numa concentração de 0,5 a 3,5 mg/kg com iluminação de 150 J/cm². A fotossensibilidade da pele continua a ser um problema, apesar de a duração ser de apenas 3 a 7 dias (Yano *et al*, 2011; Allison, 2014).

Este fotossensibilizador foi aprovado para o uso no diagnóstico e tratamento de estágios iniciais de cancro do pulmão, no Japão, onde a PDT é recomendada como opção de tratamento. Devido à sua seletividade, esta molécula pode ser usada não só para PDT mas também para diagnóstico fotodinâmico baseado na fluorescência. Vários ensaios clínicos em doentes com cancro do pulmão em estágios iniciais confirmaram os excelentes efeitos anti-tumorais da PDT baseada neste fotossensibilizador, e foram obtidas respostas completas em mais de 85 % dos casos (Usuda *et al*, 2006). Assim, este fármaco passou a estar na frente do tratamento de lesões pulmonares, na Ásia, e está associado a elevadas taxas de resposta completa com morbilidade mínima (Allison, 2014).

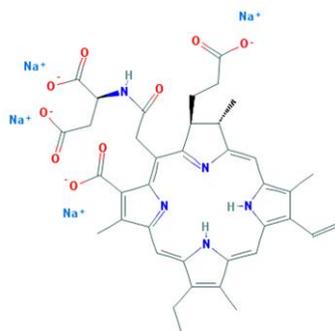


Figura 6: Estrutura química da mono-L-aspartil clorina e6. Retirado de PubChem Compound, CID 5488036.

Derivado mono-ácido da benzoporfirina

O derivado mono-ácido da benzoporfirina, representado na Figura 7, foi desenvolvido para o tratamento da degenerescência macular relacionada com a idade. Embora não tenha sido desenvolvido para o tratamento oncológico, tem a vantagem de ser eliminado rapidamente e não provocar fotossensibilidade da pele por mais de 24 horas. É comercializado sob os nomes Verteporfin[®] ou Visudyne[®] (Brown *et al.*, 2004). O derivado mono-ácido da benzoporfirina apresenta uma forte absorção nos 690 nm. A administração do Visudyne[®] é feita por via intravenosa, 0,3 mg/kg. A irradiação realiza-se 3 a 5 horas após a injeção com luz de comprimento de onda de 690 nm, 50 J/cm² de energia. Este fotossensibilizador tem tendência a acumular-se no tecido endotelial.

Depois de ensaios clínicos com esta porfirina, concluiu-se que a rápida eliminação e a síntese complicada constituem limitações deste composto. Foi aprovado para o tratamento de basaliomas e continua a ser testado em ensaios clínicos para outros tipos de cancro e para a psoríase (Waterfield *et al.*, 2008).

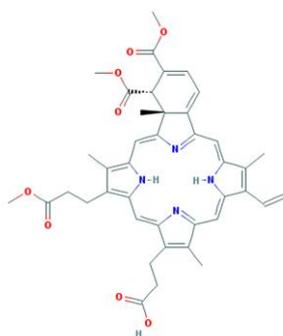


Figura 7: Estrutura química do Verteporfin[®] ou derivado da benzoporfirina. Este fotossensibilizador é utilizado para eliminar a formação anormal de vasos sanguíneos a nível do olho, associada a doenças como a degenerescência macular relacionada com a idade. Retirado de PubChem Compound 5362420.

Importância das fontes de iluminação

Como já vimos, a iluminação é uma componente importante da PDT. Neste contexto, a luz azul penetra menos eficientemente no tecido, enquanto a luz vermelha e infravermelha penetram mais profundamente, tal como representado na Figura 8. A região entre 600 e 1200 nm é frequentemente chamada de janela ótica do tecido. No entanto, as radiações de maior comprimento de onda podem não ter energia suficiente para gerar oxigênio singleto (Agostinis *et al*, 2011). A luz azul, na ordem dos 400 nm, também pode ser utilizada, com o objetivo de tratar lesões cutâneas superficiais, de modo a minimizar lesões nos tecidos subjacentes (Allison, 2014). Para que o efeito fototerapêutico seja eficaz, a luz tem que irradiar de forma adequada o tecido a tratar. É fundamental compreender a forma como a luz se propaga através dos tecidos e quais os efeitos associados aos processos de refração, reflexão, absorção e dispersão. Estes processos, no contexto de um sistema biológico, ocorrem simultaneamente, no entanto a extensão de cada um deles está dependente do tipo de tecido e do comprimento de onda da luz utilizado. Os tecidos biológicos são meios túrbidos em que o feixe de luz sofre dispersão, diminuindo assim a direccionalidade do mesmo. A absorção deve-se principalmente a cromóforos endógenos existentes nos tecidos, tais como a hemoglobina, a mioglobina e os citocromos, que podem diminuir o processo fotodinâmico por competição com o fotossensibilizador no processo de absorção (Sibata & Colussi, 2000; Plaetzer *et al*, 2009; Robertson *et al*, 2009).

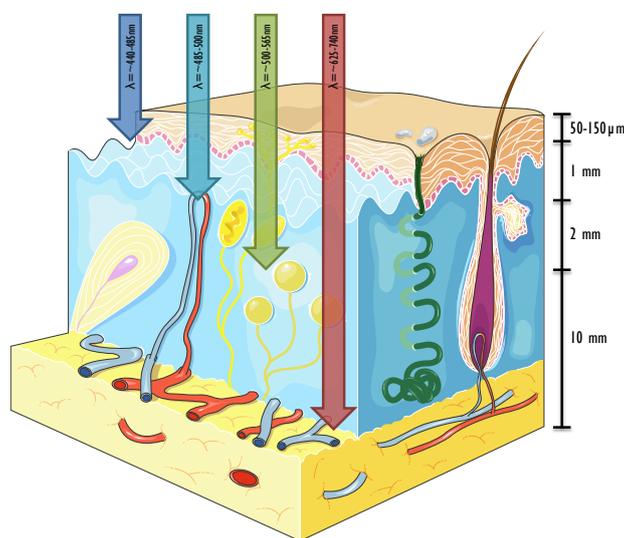


Figura 8: Penetração da luz nos tecidos. O esquema representa um corte da epiderme-derme. As setas representam o poder de penetração de luz de diferentes comprimentos de onda. A luz azul, 400 a 470 nm, penetra menos eficientemente nos tecidos, enquanto a luz vermelha ou infravermelha com comprimentos de onda >600 nm pode penetrar até 1cm. Esquema adaptado Agostinis *et al*, 2011 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Do ponto de vista teórico, qualquer fonte de luz pode ser utilizada como aplicador de radiação em PDT. As primeiras fontes de luz utilizadas eram lâmpadas convencionais que não produziam luz homogênea e cujo *output* era definido através de filtros (Triesscheijn *et al*, 2006; Mitton & Ackroyd, 2008). Com esta modalidade de irradiação as intensidades de luz emitidas desta forma são baixas e os locais a irradiar ficam restritos ao de fácil acesso, como a pele (Sibata & Colussi, 2000; Triesscheijn *et al*, 2006). O desenvolvimento de lasers para esta aplicação foi um importante marco na PDT. Hoje, são as fontes de luz mais usadas. Os lasers produzem luz homogênea de comprimento de onda quase único que permite calcular facilmente a fluência. A este respeito, os lasers de diodo têm numerosas vantagens, pois são relativamente baratos, pequenos e móveis, não necessitam de sistemas de refrigeração externos, têm dosimetria automatizada e recursos de calibração, longo tempo de vida e são muito fiáveis. Adicionalmente, a luz produzida pode com facilidade ser levada através de uma fibra ótica até localizações mais inacessíveis do organismo (Mitton & Ackroyd, 2008; Agostinis *et al*, 2011). Estes sistemas estão licenciados na Europa (Juzeniene *et al*, 2004; Mitton & Ackroyd, 2008). Os díodos emissores de luz (LED, do inglês *light-emitting diode*) são fontes de luz alternativas, com larguras de banda relativamente estreitas e espectrais de alta-fluência (Agostinis *et al*, 2011; Anand *et al*, 2012).

A escolha da fonte de luz depende da natureza e da localização da lesão. É de reiterar que o comprimento de onda tem que coincidir, o mais possível, com o espectro de absorção do fármaco escolhido de modo a produzir a máxima concentração de oxigénio singleto (Mitton & Ackroyd, 2008). A eficácia clínica da PDT depende da dosimetria, que se traduz na dose total de luz irradiada sobre o tecido, no tempo de exposição à luz e, no modo de irradiação de luz (única, fracionada ou mesmo metronómica). O ritmo de fluência também afeta a resposta (Agostinis *et al*, 2011). À semelhança do que acontece com os fármacos, os sistemas de iluminação para PDT, constituem um dispositivo médico que também é alvo de aprovação para a sua utilização clínica (Allison, 2014).

A tecnologia de fibras óticas adaptou-se às necessidades da PDT, que requer sistemas de entrega de luz direcionados e que garantam uma distribuição homogênea. As fibras óticas atuais permitem, virtualmente, a irradiação de luz, de comprimento de onda e fluência, adequados a tumores localizados em praticamente qualquer parte do corpo (Triesscheijn *et al*, 2006). A extremidade das fibras óticas pode ser adaptada às características da lesão. Uma fibra ótica com uma microlente na ponta pode distribuir a luz uniformemente sobre uma superfície lisa. Um difusor esférico isotrópico pode ser localizado no centro de uma cavidade e levar a luz a toda a sua superfície. Um difusor cilíndrico, em que existem vários comprimentos disponíveis, pode ser usado para irradiar superficialmente um lúmen cilíndrico ou intersticialmente um órgão alvo (Huang *et al*, 2008). Balões insufláveis, cobertos no seu interior com um material para dispersão da luz e construídos para encaixar num órgão, também estão comercialmente disponíveis. Atualmente, é possível implantar uma fonte de luz em órgãos sólidos profundos sob orientação da imagem (Agostinis *et al*, 2011). Um avanço adicional à tecnologia de lasers foi o desenvolvimento de dispositivos incorporados para auxiliar no cálculo dos parâmetros de tratamento. Desta forma, a quantidade de luz utilizada em terapia tornou-se mais uniforme, fundamental em ensaios clínicos multicêntricos, onde o tempo de tratamento é essencial para obter bons resultados e ausência de morbilidade (Allison, 2014).

Para além da aplicação de luz monocromática, a excitação dos fotossensibilizadores com dois fótons, ou seja, a absorção de fótons de dois comprimentos de onda diferentes, também tem sido testada e mostrou-se como uma alternativa para melhorar a reação fotodinâmica em especial para tratar pequenas lesões profundas (Huang *et al*, 2008).

Importância da presença de oxigénio

O oxigénio desempenha uma função fundamental no processo da PDT e a sua disponibilidade no tecido tem um efeito importante no resultado do tratamento.

O oxigénio singleto, 1O_2 , formado como resultado da reação fotodinâmica é, na maior parte dos casos, a ROS mais importante deste processo (Jiménez-Banzo *et al*, 2008). A importância desta espécie deve-se às suas características químicas, nomeadamente, a capacidade de oxigenar ou oxidar inúmeros grupos funcionais orgânicos. Assim, a sua produção, no contexto de uma célula, pode iniciar cascatas de eventos que caracterizam a apoptose ou então infligir danos locais suficientes para levar à morte por necrose (da Silva *et al*, 2012). Existe muita controvérsia em relação ao seu tempo de meia-vida biológico e, conseqüentemente, à distância de difusão das espécies transitórias de oxigénio. As primeiras estimativas foram obtidas através de estudos de *photobleaching* ou por avaliação de fosforescência, em que se concluiu que o tempo de vida intracelular do oxigénio singleto seria curto, entre 10 a 300 ns, o que corresponderia a um percurso de 10 a 55 nm no interior da célula (Agostinis *et al*, 2011; Anand *et al*, 2012; da Silva *et al*, 2012). Mais recentemente, a avaliação da fosforescência por microscopia e com recurso a laser permitiu concluir que o tempo de vida intracelular do oxigénio singleto era superior com valores de 600 ns a 3 μ s (O'Connor *et al*, 2009; da Silva *et al*, 2012), o que deverá corresponder a coeficiente de difusão de 2 a 4×10^{-6} $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ e a um raio de ação de cerca de 100 nm (Hatz *et al*, 2008; da Silva *et al*, 2012). Para além destes dados, sabe-se que o comportamento do oxigénio singleto é influenciado pelo ambiente no qual é produzido, pelo fotossensibilizador que desencadeia a sua produção e pelo tipo de célula (da Silva *et al*, 2012).

Apesar das incertezas no que concerne ao raio de ação do oxigénio singleto, o dano fotodinâmico irá ocorrer próximo da localização intracelular do fotossensibilizador. Devido a estas características, a PDT torna-se uma terapêutica seletiva pelos efeitos locais que produz (Robertson *et al*, 2009). Por outro lado, a molécula fotossensibilizadora deve estar localizada próximo do seu alvo no momento de irradiação (Hopper, 2000; Triesscheijn *et al*, 2006; Robertson *et al*, 2009). A localização subcelular dos fotossensibilizadores é crítica na mediação da resposta citotóxica à PDT e é determinada pelas propriedades químicas da molécula, formulação, concentração, microambiente da lesão e também pelo fenótipo das células alvo. A membrana plasmática, membranas intracelulares e organelos como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, os lisossomas, a mitocôndria e mesmo o núcleo foram identificados como alvos subcelulares de muitas substâncias fotossensibilizadoras. Alguns fármacos distribuem-se largamente nas membranas destes organelos, outros especificamente em lisossomas e mitocôndrias, outros ainda

redistribuem-se durante o período de irradiação (Huang *et al*, 2008). Entre os fotossensibilizadores mais comuns na literatura, o derivado da hematoporfirina está associado principalmente às membranas lipídicas, a NPe6 que acumula nos lisossomas, o Verteporfin[®] que tem como alvo as mitocôndrias e a meta-tetrahidroxilfenilclorina que pode acumular nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, ou em ambos, enquanto a ftalocianina Pc4 tem um amplo espectro de afinidade sendo as mitocôndrias descritas como alvo primário (Agostinis *et al*, 2011). Os padrões de localização também podem estar na dependência dos diferentes tipos celulares.

Uma consequência inerente à PDT é a hipoxia tumoral, que pode ocorrer diretamente pelo consumo de oxigênio durante o tratamento, ou indiretamente, pela destruição da vascularização tumoral (Kushibiki *et al*, 2013). Foi demonstrado que concentrações decrescentes de oxigênio se correlacionam com reações fotodinâmicas menos eficazes (Mitton & Ackroyd, 2008) e que tumores em condição de hipoxia são resistentes à PDT. Parece pois que a presença de oxigênio no tumor é fundamental para que as reações ocorram. Esta relação verifica-se igualmente para as regiões em hipoxia as quais tendem a não responder à PDT. A pressão parcial de oxigênio tende a ser variável nos tumores sólidos e está na dependência da vasculatura tumoral e da taxa de difusão e/ou consumo de oxigênio. A taxa de consumo de oxigênio durante a irradiação também deve ser tida em conta uma vez que uma luz de elevada intensidade pode levar a um consumo do mesmo superior ao aporte, o que resulta numa depleção temporária. Consequentemente, num tumor que vai ser sujeito a PDT, podemos considerar que existem dois tipos de hipoxia, aquela que resulta de células hipóxicas pré-existentes, que resultam do desenvolvimento fisiológico do tumor e que existem em muitos tumores sólidos e a hipoxia que a PDT, por si própria, pode induzir devido à rápida depleção local de oxigênio (Anand *et al*, 2012). A hipoxia constitui um estímulo à angiogênese através da estabilização do HIF-1 α . O HIF-1 α faz parte de um complexo heterodimérico que é rapidamente degradado em condições de normoxia. Foram identificados vários genes que respondem à presença deste complexo, entre eles o do VEGF, o da eritropoetina e do GLUT-1 (do inglês, *glucose transporter 1*). Foi documentado que a PDT pode levar a expressão de VEGF e estímulos angiogénicos, que podem contribuir para a sobrevivência tumoral e para ressurgimento do tumor, o que pode ser visto como uma desvantagem da PDT (Kushibiki *et al*, 2013).

A formação de ROS e a eficácia da PDT podem ser afetadas pela pressão parcial de O₂ intratumoral, pela saturação em O₂ da hemoglobina e pelo microambiente dos tumores sólidos. Assim, a monitorização da oxigenação dos tecidos tumorais durante a reação fotodinâmica é importante para compreender os mecanismos fisiológicos básicos e a dosimetria da PDT. Foram propostas várias metodologias para evitar a hipoxia causada pela reação fotodinâmica, como por exemplo, a redução da taxa de fluência ou a irradiação fracionada em intervalos alternados de luz e de escuro (Huang *et al*, 2008; Anand *et al*, 2012). Estas técnicas servem para promover a oxigenação tissular e a reperfusão tumoral, e assim, compensar a depleção de oxigênio causada pela reação fotoquímica. Apesar de ter sido reportada alguma melhoria da resposta tumoral após o controlo da oxigenação dos tecidos, também foram reportadas algumas limitações. A redução da fluência e o fracionamento da dose de luz apenas considera a depleção de O₂, e não as células hipóxicas pré-existentes e, para além disso, obriga ao aumento do tempo de tratamento (Huang *et al*, 2008).

Ensaios clínicos em que a PDT foi aplicada em câmaras com O₂ hiperbárico demonstraram melhorias significativas da resposta ao tratamento. A hiperoxigenação mostrou aumentar o período de sobrevivência em doentes com carcinoma do esófago. Outros estudos pré-clínicos mostraram que a hiperoxigenação normobárica é tão eficaz, senão mais, do que a oxigenação hiperbárica (Huang *et al*, 2003). Esta hiperoxigenação pode oxigenar células hipóxicas pré-existentes o que as torna mais suscetíveis à PDT e, simultaneamente, compensar a depleção de oxigénio resultante da reação fotodinâmica (Huang *et al*, 2008; Mitton & Ackroyd, 2008).

Aplicação clínica

A aplicação clínica da PDT principiou em dermatologia (Allison, 2014), especialidade médica em que esta terapêutica é de mais fácil utilização. A PDT pode ser uma opção útil no tratamento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas da pele. Uma vez que, pelo limitado poder de penetração da luz, os efeitos ocorrem principalmente na camada superficial, esta terapêutica é útil principalmente no tratamento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas da superfície cutânea, das mucosas e tumores com origem na superfície de cavidades como o mesotelioma pleural ou a carcinomatose peritoneal disseminada (Agostinis *et al*, 2011). Também é útil no tratamento de esófago de Barret, colangiocarcinoma e outros tipos de cancros que serão discutidos de seguida. A PDT surge ainda como uma terapêutica que pode ser combinada com a cirurgia, irradiando o leito tumoral e aumentando a probabilidade de controlar a doença (Agostinis *et al*, 2011).

A possibilidade de recorrer a fármacos aplicados de forma tópica e o fácil acesso à lesão são, possivelmente, facilitadores do uso da PDT nas doenças da pele. Foram também importantes vários ensaios clínicos que mostraram que a PDT tópica baseada em ALA e metil-ALA tem resultados comparáveis à cirurgia e à radioterapia no tratamento de queratose actínica e doença de Bowen, com resultado cosmético superior no caso do tratamento fotodinâmico, em que a pele adquire um aspeto saudável e sem cicatrizes (Anand *et al*, 2012; Allison, 2014). Os fármacos mais utilizados são o ALA e seus ésteres derivados. A PDT está aprovada nos EUA, Canadá e Europa para o tratamento de queratose actínica e aprovada na Europa e Canadá para o tratamento do basotelioma. A sua eficácia terapêutica também já foi demonstrada no tratamento da doença de Bowen (carcinoma espinhocelular *in situ*), no entanto com uma taxa de recorrência de 50% (Agostinis *et al*, 2011).

O tratamento fotodinâmico tópico com ALA e metil-ALA evita a fotossensibilidade prolongada ou sistémica da pele e permite a realização do tratamento em um só dia, normalmente com um intervalo de apenas algumas horas entre a administração e a irradiação. No entanto, este tratamento é adequado apenas para lesões superficiais uma vez que a administração tópica permite a absorção do fármaco apenas 1 a 2 mm em profundidade na pele (Allison, 2014).

No tratamento da queratose actínica, com PDT baseado em ALA e metil-ALA tópico, obtiveram-se resultados satisfatórios com resposta completa superior a 75%. Esta terapêutica foi comparada com a crioterapia e com 5-fluoracilo em creme e apesar dos resultados dos tratamentos serem comparáveis a PDT resultou em melhor

resultado cosmético (Agostinis *et al*, 2011). No caso do carcinoma basocelular superficial e nodular, a PDT com 5-ALA está indicada. No entanto, um ensaio clínico mostrou que o tratamento com Photofrin® fornece resposta completa de 92% aos seis meses e recorrência inferior a 10% aos 4 anos, enquanto na terapêutica com ALA apesar do resultado inicial comparável, a recorrência foi de 71% (Agostinis *et al*, 2011).

Nas neoplasias do sistema nervoso central, o controle local da doença é fundamental para aumentar a sobrevivência (Bechet *et al*, 2014). Os tumores cerebrais captam o fotossensibilizador numa razão tumor/tecido elevada e por isso são bons candidatos a PDT. Assim, a PDT foi avaliada como um tratamento adjuvante a realizar durante a cirurgia. O doente é submetido à administração sistêmica de Photofrin®, e após 48 horas, é colocada cirurgicamente uma fibra ótica na cavidade deixada pela remoção tumoral (Allison, 2014). Foram tratadas diversas lesões cerebrais com PDT, nomeadamente glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meningiomas, melanomas, metástases pulmonares e adenomas pituitários, e os resultados iniciais foram encorajadores (Agostinis *et al*, 2011). Um estudo do Royal Melbourne Hospital tratou 375 doentes com 5mg/kg de Photofrin® e irradiação após 24 horas. A sobrevivência média foi superior a 14 meses e 28 a 41% dos doentes sobreviveram 2 anos, no caso do glioblastoma multiforme. No caso dos doentes portadores de astrocitoma anaplástico a sobrevivência foi superior a 66 meses e 57 a 73% dos doentes sobreviveram mais de 3 anos (Agostinis *et al*, 2011). A eficiência do ALA nos tumores cerebrais foi comparada com a cirurgia convencional e os resultados foram uma sobrevivência média de 16,7 e de 11,8 meses, respetivamente (Agostinis *et al*, 2011). As terapias convencionais, nomeadamente, cirurgia, quimioterapia e radioterapia, têm uma sobrevivência mediana de 15 meses. Por isso, e apesar dos resultados acerca da PDT serem limitados, estes são encorajadores.

Mais recentemente a propriedade de fluorescência dos fotossensibilizadores foi usada para demarcar o tumor dos tecidos normais que não fluorescem. Potencialmente a ressecção guiada por fluorescência está associada a recuperação mais rápida uma vez que é eliminado menos tecido normal. Num estudo em que foi usada fluorescência guiada por ALA a sobrevivência duplicou quando comparada com a resposta tumoral sem PDT (Allison, 2014).

Os cancros da cabeça e pescoço são um grupo de doenças que inclui os carcinomas da boca, faringe, laringe, ouvido, na sua maioria, com origem nas mucosas. A PDT pode potencialmente controlar estas doenças com menos efeitos secundários que outras abordagens terapêuticas, nomeadamente a perda da função de deglutição, do gosto ou da fala (Anand *et al*, 2012). A PDT tem sido usada no tratamento de cancro da cabeça e pescoço em casos avançados e em doentes com doença recorrente em que as outras terapêuticas falharam (Allison, 2014). Várias instituições publicaram pequenos estudos clínicos da aplicação da PDT para cancro da cabeça e pescoço, nos quais a terapêutica tem sido bem-sucedida, especialmente em carcinomas iniciais da cavidade oral, faringe e laringe com preservação das funções vitais, fala e deglutição. O maior estudo reportado incluiu 300 doentes tratados ao longo de 15 anos com Photofrin®. As lesões tratadas incluíram cavidade oral, faringe laringe, sarcoma de Kaposi, melanoma e carcinoma espinho-celular. O tratamento mais comum consistiu numa posologia de 2 mg/kg, fornecidos 48 horas antes da irradiação com laser de Nd:YAG (do inglês, *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) com 50 a 75 J/cm². Os doentes tratados com Photofrin® tiveram boa resposta ao tratamento e os casos de recorrência

foram resolvidos com a repetição do tratamento. As complicações registradas limitaram-se a fotossensibilidade da pele e dor local durante o tratamento (Agostinis *et al*, 2011). O resultado cosmético e a preservação de órgãos são notáveis, quer no tratamento com Photofrin[®] quer com Foscan[®]. Lesões nodulares até 2 cm de diâmetro também podem ter resposta positiva (Allison, 2014). Os resultados dos ensaios clínicos realizados até ao momento incentivam que a PDT pode vir a ser uma terapêutica primária e alternativa para doentes com tumores iniciais da cabeça e pescoço.

A PDT tem sido cada vez mais usada nos tumores das vias aéreas e da cavidade torácica. A combinação de Photofrin[®] administrado sistemicamente com luz orientada por via broncoscópica é bastante eficaz (Anand *et al*, 2012). Os primeiros ensaios clínicos realizaram-se em doentes com lesões obstrutivas e sem outras opções terapêuticas e em vários casos obteve-se elevada resposta com recuperação da função respiratória. Além disso, associadamente à radioterapia é possível prolongar a sobrevivência (Allison, 2014). Além do tratamento paliativo, a PDT também é útil em doentes com cancro inicial de localização central que não têm indicação cirúrgica. Nestes casos, a PDT mediada por Photofrin[®] forneceu respostas completas superiores a 70 % e, com o fotossensibilizador de segunda geração Talaporfin, a taxa de resposta completa foi de 94,3 % em lesões inferiores a 1 cm de diâmetro e de 90,4% em lesões de maiores dimensões (Agostinis *et al*, 2011). Com estes e outros resultados, a PDT tornou-se terapêutica de primeira linha no Japão para o tratamento de tumores em estágio inicial e com localização central (Allison, 2014).

No tratamento de cancro com disseminação pleural, a média da sobrevida dos doentes tratados com cirurgia, quimioterapia e radioterapia é de seis a nove meses. Num ensaio clínico de fase I, a combinação do tratamento cirúrgico com PDT mediada por Photofrin[®], permitiu controlar a doença pleural até seis meses e aumentar a sobrevida para 21,7 meses (Agostinis *et al*, 2011).

O mesotelioma maligno é um tumor multifocal agressivo com taxas de sobrevivência muito baixas. O tratamento fotodinâmico realizado em bloco operatório tornou-se uma forma de abordar esta doença, até aqui sem opções terapêuticas (Anand *et al*, 2012). As evidências de que a PDT pode ser opção nestes doentes tornam necessário realizar ensaios clínicos neste sentido (Allison, 2014).

No esófago distal é frequente a metaplasia do epitélio escamoso em colunar, como consequência de refluxo gástrico, patologia designada por esófago de Barrett, e que predispõe ao progresso de displasias de baixo grau, para displasia de alto grau e posteriormente adenocarcinoma (Davila, 2011; Anand *et al*, 2012). O esófago de Barrett constitui um fator de risco primário ao desenvolvimento de adenocarcinoma do esófago. A PDT surge como uma alternativa à esofagectomia, tendo sido usada com sucesso em alguns casos (Anand *et al*, 2012). Nos EUA, o único fotossensibilizador aprovado pela FDA para esta condição é o Photofrin[®], no entanto, principalmente na Europa, o 5-ALA e o Foscan[®] também já foram usados (Davila, 2011). A PDT é considerada o tratamento com melhor relação custo-benefício no esófago de Barrett com displasia de alto grau em comparação com a vigilância e com a cirurgia radical (Allum *et al*, 2011).

A PDT foi utilizada inicialmente como tratamento paliativo no cancro obstructivo do esófago (Davila, 2011; Allison, 2014). A displasia e as lesões associadas ao esófago de Barrett são maioritariamente superficiais e extensas sendo, por isso, ideais para o tratamento fotodinâmico já que a esofagectomia distal está associada a maior morbidade e uma taxa de mortalidade de 3 a 5%. Os efeitos adversos mais comuns são a fotossensibilidade temporária da pele e a estenose esofágica, particularmente, no tratamento com Photofrin® (Agostinis *et al*, 2011).

Para além do esófago, a PDT já foi aplicada a vários outros tumores do trato gastrointestinal, nomeadamente, estômago, duodeno, pólipos do cólon, colangiocarcinoma e pâncreas. Em muitos casos a ausência de estudos randomizados não permite confirmar a eficácia desta terapêutica (Agostinis *et al*, 2011). No caso do colangiocarcinoma a recessão é impossível para a maior parte dos doentes. Nestes doentes a PDT permitiu a drenagem biliar com melhoria da qualidade de vida e da sobrevivência (Agostinis *et al*, 2011; Allison, 2014).

O uso de PDT para o tratamento do cancro da bexiga está aprovado no Canadá e em alguns países da Europa. A anatomia da bexiga e a apresentação dos seus tumores de forma superficial e multifocal pode ser adequada para a realização de PDT. De modo geral, observou-se resposta aos 2-3 meses, em 50 a 80 % dos doentes. Apesar de a maior parte dos doentes serem tratados com PDT apenas após outras terapêuticas com bacillus Calmette-Guérin (BCG), um estudo comparou o tratamento único com Photofrin® com vários tratamentos com BCG e verificou que as terapêuticas são equivalentes. A associação da PDT com o BCG ou com a mitomicina B pode ter efeito sinérgico (Agostinis *et al*, 2011).

Uma vez que mesmo no tratamento do cancro da próstata em estágios iniciais, a terapêutica cirúrgica e radioterapia estão associadas a elevada morbidade devido à proximidade de estruturas como a bexiga, nervos e do reto, a PDT pode ser uma opção em que a limitada penetração da luz pode constituir uma vantagem. Já foram realizados alguns estudos clínicos com fotossensibilizadores de segunda geração no cancro da próstata. (Agostinis *et al*, 2011).

A PDT também já foi usada em ginecologia no carcinoma espinhocelular do colo do útero. Foram usados o creme tópico de ALA e Photofrin® endovenoso. Foram reportadas taxas de ablação da lesão de 90-100% com uma ou várias sessões de PDT. Taxas equivalentes foram reportadas para o tratamento do carcinoma da vulva e da vagina (Allison, 2014).

Desde que o Photofrin® foi licenciado, a investigação em PDT constitui uma área científica dinâmica que evolui no sentido de consolidar e de garantir o uso desta terapêutica contra o cancro. Pretende-se desenvolver fotossensibilizadores com melhores propriedades óticas, físicas e químicas e, em simultâneo, compreender a resposta dos tumores a esta terapêutica.

A PDT já provou ter numerosas vantagens em relação às terapêuticas convencionais, pois, é pouco invasiva, é seletiva e tem poucos efeitos secundários. No entanto, apesar de ser uma terapia reconhecida em numerosos países, todas as indicações clínicas têm de passar por ensaios clínicos que comprovem a sua eficácia e potenciais efeitos secundários. No caso da PDT os processos de aprovação clínica são mais complicados porque é necessário ter em conta não só a aplicação do fármaco mas todo o sistema de aplicação de luz. Esta combinação de fármaco

com dispositivos médicos constitui na realidade um grande obstáculo ao processo de aprovação. Para além disso, em alguns tipos de cancro falta realizar ensaios clínicos multicêntricos que comprovem definitivamente os benefícios desta terapêutica. O futuro da PDT pode certamente beneficiar se a dosimetria, nomeadamente cálculo da dose de luz entregue ao tumor e aos tecidos circundantes, a concentração de fotossensibilizador e de oxigénio no tumor, for otimizada. A iluminação insuficiente pode traduzir-se no fracasso do tratamento, enquanto a irradiação excessiva pode ter consequências nos tecidos normais. A questão da dosimetria é comum a outras terapêuticas disponíveis como ablação por radiofrequência, terapia com microondas e crioterapia. Em contraste, a dosimetria em radioterapia está bem definida e esta terapêutica é utilizada de modo crescente (Allison, 2014).

Recentemente, Mathias Senge referiu que o potencial da PDT é evidente quando pensamos no sucesso do Photofrin[®] e nos seus derivados no tratamento de cancro não “por causa”, mas “apesar” das suas propriedades (Senge, 2012). Esta premissa descreve a motivação dos investigadores para melhorar as propriedades dos fotossensibilizadores existentes ou para desenvolver novas moléculas para a PDT.

CAPÍTULO II — MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Mecanismos de citotoxicidade

A causalidade dos efeitos citotóxicos provocados pela PDT é multifatorial pois depende de vários fatores como o fotossensibilizador, o momento de irradiação e as características da luz, as características bioquímicas e fisiológicas do tumor, ou a concentração de oxigênio disponível (Agostinis *et al*, 2011). O balanço destes parâmetros influencia a extensão dos vários mecanismos, representados na Figura 9, que podem contribuir para a eliminação do tumor. A formação de ROS pode levar diretamente à morte das células tumorais, pela ativação de vias de morte celular como a apoptose, a necrose e também o processo de autofagia. Outra possibilidade é o efeito indireto sobre o tumor, consequente da lesão da vasculatura tumoral, que isola o tumor do aporte de oxigênio e nutrientes fundamentais à sua sobrevivência (O'Connor *et al*, 2009; Plaetzer *et al*, 2009; Robertson *et al*, 2009). Além destes mecanismos, a PDT pode também estimular a resposta imune que, potencialmente, pode contribuir para a regressão tumoral local e à distância (Castano *et al*, 2006; Yoo & Ha, 2012). Entre a reação fotodinâmica inicial e a resposta terapêutica ocorre uma sequência de efeitos moleculares que determinam o resultado imediato ao nível do tecido e o resultado terapêutico a longo prazo. Estes eventos afetam a expressão genética, a neovasculatura, as vias de morte, e a imunidade tumoral (Ortel *et al*, 2009).

A PDT direcionada para o cancro resulta na destruição de células num processo dependente da produção de radicais oxidativos que é capaz de ativar as vias de morte celular (Huang *et al*, 2008). Assim, a consequência desejada da PDT é a citotoxicidade letal que pode terminar em morte celular. A apoptose é o tipo de morte celular mais comumente induzido pela PDT. A permeabilização da membrana externa mitocondrial, após o dano fotodinâmico, é controlada por proteínas da família BCL-2 (do inglês, *B-cell leukemia/lymphoma*) e, em grande parte, é independente da p53. Os fotossensibilizadores associados à mitocôndria podem induzir a libertação de caspases ativadoras e outras moléculas pró-apoptóticas. A sinalização da fototoxicidade não é dependente apenas da via das caspases e pode, simultaneamente envolver outras proteases como as calpaínas e outras vias não apoptóticas. A rutura da membrana lisossomal ou a libertação de catepsinas ocorre como resultado de fotooxidação dos lisossomas. A inibição ou a deficiência da via das caspases, habitualmente, desloca a morte celular para a necrose. Apesar dos mecanismos não estarem completamente esclarecidos, hoje sabe-se que também a necrose pode ser iniciada por via de transdução de sinal. Alguns eventos relacionados com esta via são a ativação de RIP1 (proteína de interação com receptor 1, do inglês, *receptor-interacting protein 1*), o excesso de produção de

ROS tanto na mitocôndria como no lisossoma e a concentração intracelular elevada de cálcio. Tanto os danos fotooxidativos da mitocôndria como a concentração intracelular elevada de cálcio podem promover a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e favorecer a morte por necrose. A lesão fotooxidativa também pode desencadear autofagia, uma via de degradação lisossomal e de reciclagem de proteínas e de organelos. Este processo pode ser protetor e estar relacionado com a sobrevivência, no entanto pode terminar em morte e, no caso da PDT, vários estudos consideram que é um mecanismo que pode ser desencadeado. De facto, os fotossensibilizadores que interferem com os lisossomas podem comprometer a execução do processo autofágico (Agostinis *et al*, 2011).

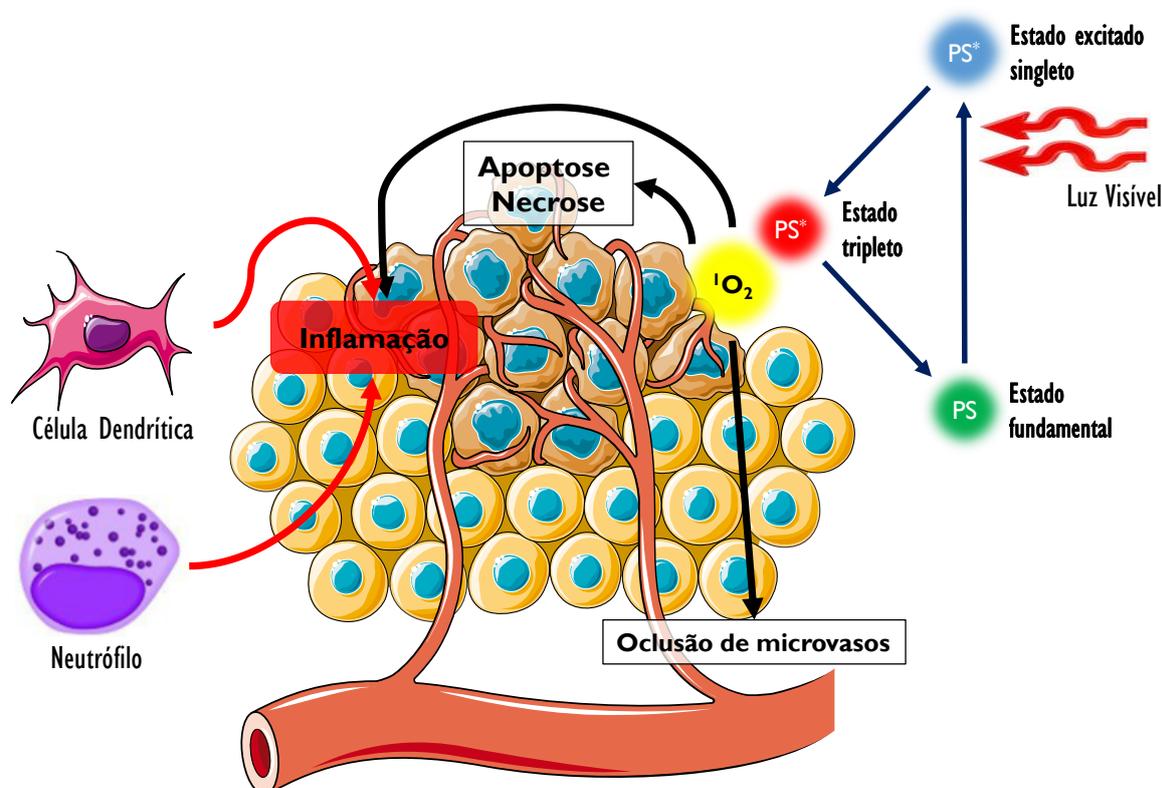


Figura 9: Mecanismos de ação da PDT no tumor. O fotossensibilizador absorve luz e passa ao estado excitado singlete e ao estado excitado tripleto. Este tripleto é capaz de transferir energia para o oxigênio molecular e formar oxigênio singlete. Esta espécie pode interagir diretamente com as células tumorais, levando à sua morte por necrose ou apoptose, ter como alvo a vasculatura tumoral, e induzir uma resposta inflamatória aguda que atrai leucócitos como os neutrófilos e células dendríticas. Esquema adaptado de Castano *et al*, 2006 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

O tipo de morte que predomina depende das características do tratamento, principalmente do fotossensibilizador, da sua concentração, da potência da fonte de luz e da energia total da luz recebida (Buytaert *et al*, 2007; Ortel

et al, 2009; Agostinis *et al*, 2011; Yoo & Ha, 2012). Características bioquímicas e fisiológicas como o genótipo celular, a localização subcelular do fotossensibilizador e a pressão parcial de oxigênio também podem ser determinantes (Huang *et al*, 2008).

Os mecanismos de morte celular são acompanhados de alterações morfológicas características que estão representadas na Figura 10.

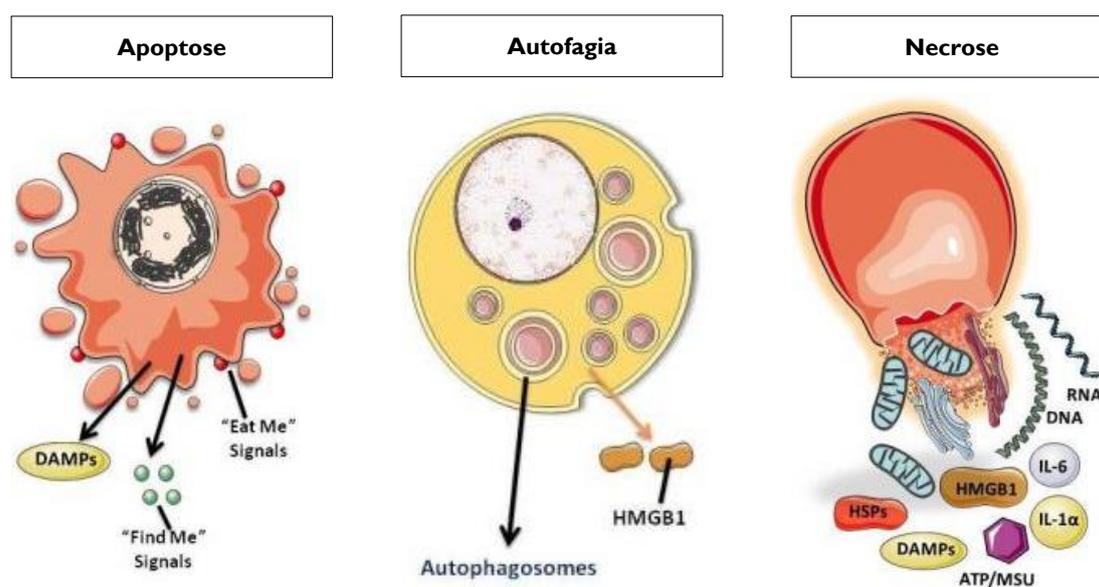


Figura 10: Principais vias de morte celular ativadas após a PDT, características morfológicas e relação com o sistema imune. Durante a apoptose a morfologia caracteriza-se por redução do volume celular, picnose, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, formação de *blebbings* na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos. A morte celular com o processo de autofagia é notável pela extensa acumulação de vacúolos de membrana dupla, designados autofagossomas, no citoplasma. As características da necrose diferem dos outros tipos de morte celular e incluem tumefação do citoplasma e dos organelos, com perda de integridade da membrana plasmática. Adaptado de Agostinis *et al*, 2011.

A apoptose é caracterizada morfológicamente por condensação de cromatina, fragmentação do DNA, picnose, formação de *blebbings* ao nível da membrana plasmática e posterior formação de corpos apoptóticos. As células em apoptose produzem sinais que proporcionam a sua fagocitose por células fagocíticas. O processo de autofagia constitui forma de promover a sobrevivência celular em ambiente adverso e de renovação pela remoção de organelos lesados, metabólitos tóxicos ou patogêneos intracelulares, e pode resultar em morte. A autofagia caracteriza-se por uma vacuolização massiva do citoplasma e formação de estruturas de dupla membrana chamadas autofagossomas, que sequestra organelos e componentes citoplasmáticos, e adiciona-os aos lisossomas, o que resulta na sua degradação. A morte por necrose é morfológicamente caracterizada por vacuolização do citoplasma, intumescimento e ruptura da membrana plasmática, o que resulta em reação inflamatória devido à liberação do conteúdo celular e moléculas pró-inflamatórias. Classicamente, a necrose é vista como o resultado de danos

patológicos ou de uma catástrofe bioenergética com depleção do ATP para um nível incompatível com a sobrevivência da célula (Kroemer *et al*, 2009; Yoo & Ha, 2012).

Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular altamente estudado que tem um papel fundamental no desenvolvimento e na homeostase celular em vários processos fisiológicos e patológicos. O bloqueio ou o comprometimento da apoptose pode levar a danos irremediáveis, associados a várias doenças como o cancro ou as doenças degenerativas, pelo que existem vias redundantes para preservar esta função celular crítica (Lodish *et al*, 2008; Ortel *et al*, 2009). Assim, a apoptose é regulada por diversas vias de sinalização e existem numerosos estudos que caracterizaram os mecanismos pelos quais a apoptose ativa uma série de vias metabólicas numa célula em morte (Yoo & Ha, 2012).

Tendo em conta as suas características, a indução de apoptose é o objetivo da maior parte dos regimes usados em PDT. Foram descritas duas vias apoptóticas, a via intrínseca, associada à mitocôndria, e a via extrínseca, associada a recetores de morte da membrana celular. Ambas as vias convergem num passo crítico de ativação das caspases, uma família de proteases específica de aspartato dependentes de cisteína, que são executoras da apoptose (Plaetzer *et al*, 2005; Buytaert *et al*, 2007). Sabe-se que a PDT pode ativar as diferentes vias apoptóticas mas a hierarquia de eventos moleculares é controversa e pode ser diferente de acordo com a localização do fotossensibilizador e do protocolo de tratamento. A alteração do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta \Psi m$) parece ser o evento central e início do processo. Esta etapa pode ser consequente da fotossensibilização da mitocôndria, mas é também sensível ao aumento de iões de cálcio no citoplasma, como resultado da fotossensibilização do retículo endoplasmático. A maior parte dos fotossensibilizadores não se localiza apenas num organelo celular e pode associar-se a vários tipos de membranas. Neste caso, a fotossensibilização direta da mitocôndria pode ter um efeito sinérgico com os danos introduzidos pelo aumento de cálcio, resultantes da fotossensibilização do retículo endoplasmático (Buytaert *et al*, 2007; Yoo & Ha, 2012).

A via extrínseca depende de recetores da membrana celular, nomeadamente, o recetor para o TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*), para o TRAIL (do inglês, *TNF related apoptosis inducing ligand*) ou para o FAS (do inglês, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*). Estes recetores caracterizam-se pela presença de um domínio intracelular de morte, que pode contribuir para a formação de um complexo intracelular oligomérico sinalizador da indução de morte, o complexo DISC (do inglês, *intracellular death-inducing signaling complex*). Este complexo é responsável pelo recrutamento e ativação das pró-caspases 8 e 10, que resulta em ativação por clivagem proteolítica. As caspases 8 e 10 ativadas clivam as pró-caspases 3 e 7 que executam o programa apoptótico. Esta via apoptótica não requer a permeabilização da membrana mitocondrial. Simultaneamente, as caspases 8 e 10 podem ativar a proteína BID (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*) da família Bcl-2 que ativa a via intrínseca da apoptose (Ortel *et al*, 2009; Yoo & Ha, 2012).

A via dominante de atuação da apoptose mediada por PDT é a intrínseca. A via intrínseca da apoptose é induzida por vários fatores, entre os quais o próprio desenvolvimento celular, estímulos ambientais, stresse, danos no DNA, choque térmico, privação de nutrientes, ou citotoxicidade. Vários mecanismos da apoptose foram associados a ativação desta via pela PDT, sendo que alguns deles estão esquematizados na Figura 11.

Estes eventos incluem perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de fatores apoptóticos presentes no espaço intermembranar mitocondrial para o citosol, nomeadamente, o citocromo-C, o Smac/DIABLO (do inglês, *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point*), a HtrA2 (do inglês, *high temperature requirement protein A2*), o AIF (do inglês, *apoptosis inducing factor*) e a endonuclease G. Após liberação no citoplasma, o citocromo-C associa-se a Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease activating factor*) com formação do apoptossoma heptamérico que integra a pró-caspase 9, levando à sua clivagem e ativação. A ativação da caspase 9 leva à ativação de outras caspases a jusante na cascata sinalizadora, nomeadamente as caspases 3 e 7, que levam a cabo a apoptose. Paralelamente, o Smac/DIABLO e o Omi/HtrA2 promovem a apoptose por antagonismo a IAP, (do inglês, *inhibitor of apoptosis proteins*). As proteínas AIF, uma flavoproteína que está ancorada à membrana mitocondrial interna, e a endonuclease G também contribuem para o processo apoptótico com translocação para o núcleo e mediação da condensação da cromatina (Ortel *et al*, 2009; Yoo & Ha, 2012).

A integridade da membrana externa mitocondrial depende da família de proteínas pró e anti-apoptóticas Bcl-2 (Yoo & Ha, 2012). Tanto as proteínas pró-apoptóticas como as anti-apoptóticas estão implicadas na apoptose induzida pela PDT (Ortel *et al*, 2009; Yoo & Ha, 2012). As proteínas anti-apoptóticas são particularmente sensíveis aos danos fototóxicos quando o retículo endoplasmático e a mitocôndria estão implicados. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 demonstrou propriedades protetoras em relação à apoptose induzida pela PDT e, a utilização de agonistas da Bcl-2 associados ao tratamento fotodinâmico mostrou aumentar a eficiência da indução de apoptose (He *et al*, 1996; Xue *et al*, 2008). A implicação de Bcl-2 e Bcl-xL foi observada em várias linhas celulares humanas de cancro, quando tratadas com o fotossensibilizador PC 4 (do inglês, *phthalocyanine 4*) que liga preferencialmente à mitocôndria e retículo endoplasmático. Além disto, um análogo deste fotossensibilizador que se localiza nos lisossomas causou danos inferiores na Bcl-2 nas células MCF-7c3 (Yoo & Ha, 2012). A meta-tetrahidroxifenilclorina ou Foscan[®], que se localiza principalmente no retículo endoplasmático, lesou a Bcl-2 de extratos totais mas não a da fração mitocondrial (Marchal *et al*, 2007; Yoo & Ha, 2012). No caso do fotossensibilizador 9-capronilotetraquis(metoxifenil)porfírico, que também se localiza no retículo endoplasmático, verificou-se diminuição de Bcl-2, superior na fração do retículo endoplasmático do que na da mitocôndria. Perante estes resultados foi proposto que a família Bcl-2 pode constituir um alvo molecular da PDT servindo como mediadora do processo de morte celular (Yoo & Ha, 2012).

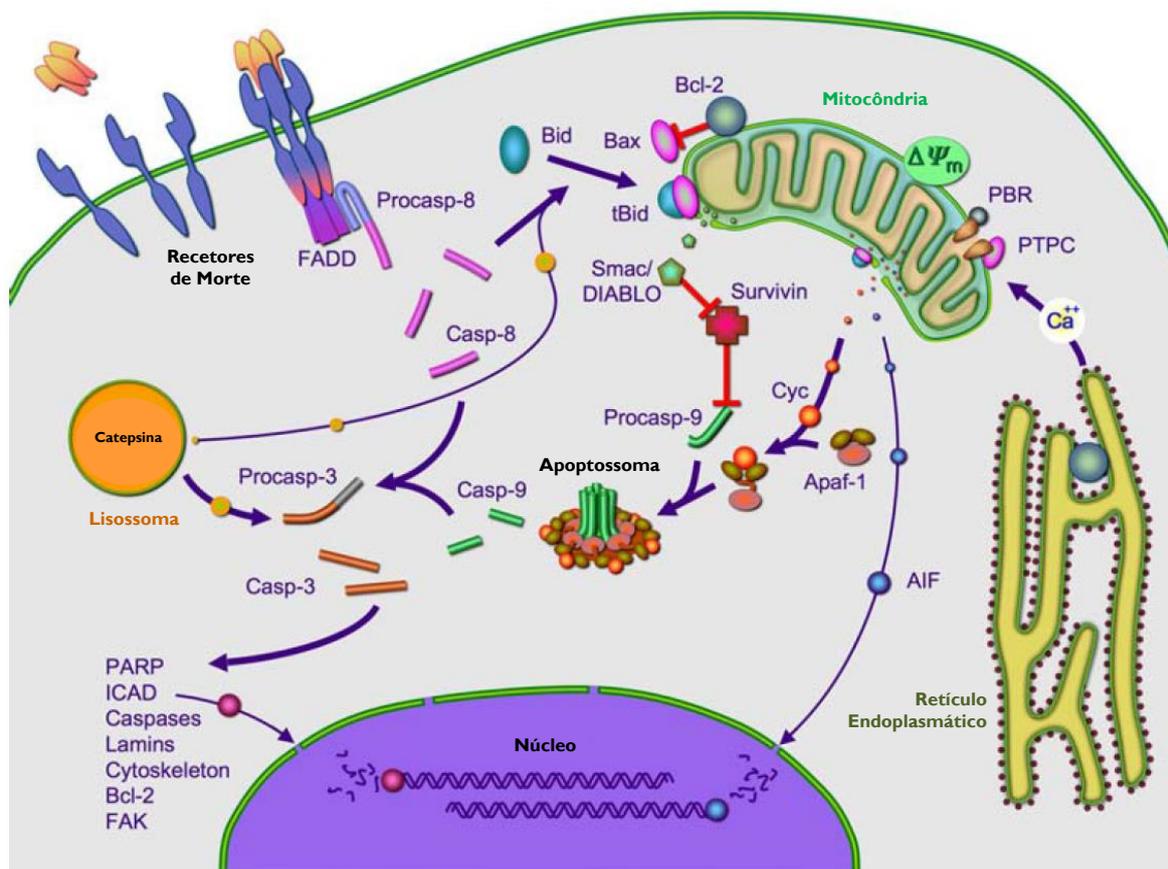


Figura 11: Representação esquemática de alguns passos e componentes da apoptose que foram associados com a PDT. A apoptose pode ser ativada pela via extrínseca, que envolve recetores da membrana plasmática, ou pela via intrínseca, em que a mitocôndria tem um papel central. Ambas as vias convergem em mecanismos que podem envolver a ativação da família das caspases. Abreviaturas: Apaf-1, fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1, do inglês *apoptotic protease activating factor 1*; AIF, fator inibidor da apoptose, do inglês *apoptosis inhibiting factor*; Bcl-2, proteína de linfoma de células B 2, do inglês *B cell leukemia-2 protein*; BID e BAX: membros da família de proteínas Bcl-2; Casp, caspases; Cyc, citocromo C, do inglês *cytochrome C*; FADD: proteína associada ao Fas com um domínio de morte, do inglês *Fas-associated protein with death domain*; FAK, cinase de adesão focal 1, do inglês *focal adhesion kinase 1*; ICAD, inibidor da deoxiribonuclease ativada por caspase 3, do inglês *inhibitor of caspase 3 activated DNase*; PARP, poli-ADP ribose polimerase; Procasp, procaspase; PBR, recetor periférico da benzodiazepina, do inglês *peripheral benzodiazepine receptor*; PTPC, complexo do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, do inglês *permeability transition pore complex*; Smac/DIABLO, segundo ativador mitocondrial de caspase/ inibidor de ligação a proteínas inibidoras da apoptose com baixo ponto isoelétrico, do inglês *Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*; $\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial. Retirado de Ortel *et al*, 2009.

Autofagia

A autofagia é um processo rigidamente controlado em que componentes celulares, inclusive organelos inteiros, são captados para vesículas membranares que se fundem com lisossomas para degradação e reaproveitamento dos seus componentes (Kroemer *et al*, 2009). Este procedimento é fundamental nos processos de desenvolvimento, de homeostase e ocorre também em casos de doenças humanas e como resposta celular à privação de nutrientes

(Klionsky, 2005). A autofagia pode ser ativada para fornecer elementos para a síntese de proteínas durante uma circunstância de privação de nutrientes e também pode ser usada para degradar proteínas defeituosas ou organelos lesados. Assim, a autofagia tem uma função pró-sobrevivência que pode terminar em morte no caso das terapias anticâncer baseadas na formação de ROS. Esta via pode distinguir-se morfológicamente pelo surgimento de vesículas de dupla membrana, designadas por autofagossomas. Os autofagossomas fundem-se com os lisossomas, formando autolisossomas, onde os componentes celulares e organelos são degradados pelas enzimas lisossomais ácidas. Os três tipos de autofagia, macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas, definem-se pelo caminho que os componentes marcados para degradação fazem até aos lisossomas. Na macroautofagia, os conteúdos celulares e organelos são englobados por autofagossomas e entregues aos lisossomas. Na microautofagia, os componentes celulares são captados diretamente por invaginação da membrana lisossomal. Finalmente, na autofagia mediada por chaperonas, os componentes são entregues ao lisossoma por uma cascata de transporte mediada por recetores (Yoo & Ha, 2012).

A autofagia, que pode ser ativada por vários sinais de stresse, incluindo o stresse oxidativo, foi descrita como uma via que pode levar à morte celular após a PDT, e está esquematizada de modo simplificado na Figura 12.

Na resposta à PDT a autofagia pode constituir um processo de sobrevivência sem sucesso na preservação da viabilidade. Este processo é iniciado em resposta à alta reatividade das ROS produzidas, com o objetivo de remover os organelos lesados ou agregados de proteínas que não possam ser removidos pela via da ubiquitina. A persistência do processo de autofagia pode levar a uma falha energética e metabólica que provoca a morte celular. A autofagia pode também representar uma tentativa da célula remover organelos lesados pela geração de ROS. Provavelmente, devido à elevada importância atribuída à apoptose e à celeridade do processo, a autofagia como resposta à reação fotodinâmica só foi recentemente postulada (Ortel *et al*, 2009). Nestes estudos, concluiu-se que a autofagia se torna mais prevalente e detetável nos casos em que a maquinaria apoptótica está prejudicada ou quando se utilizam baixas doses de PDT (Kessel *et al*, 2006). Ainda não foi determinado se a autofagia é uma ocorrência regular na PDT nem quais os mecanismos de interação com a apoptose. No entanto, o processo de autofagia tem potencialmente implicações para o desenvolvimento da imunidade tumoral após PDT, pelo facto de a exposição de antígenos ser uma consequência natural do processamento lisossómico (Ortel *et al*, 2009).

Foi demonstrada a indução de autofagia após o tratamento com hipericina em fibroblastos embrionários de murino que não expressam as proteínas pró-apoptóticas BAX (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) e BAK (do inglês, *Bcl-2 homologous antagonist killer*) (Buytaert *et al*, 2007; Yoo & Ha, 2012). A autofagia pode ser ativada por fotossensibilizadores que se localizam nos lisossomas, como a NPe6, no retículo endoplasmático, como a hipericina e o porfírico CPO, e nas mitocôndrias, como é o caso do Foscan® e do Verteporfin®, e tanto no retículo endoplasmático como nas mitocôndrias, como o fotossensibilizador PC4. A dinâmica entre autofagia

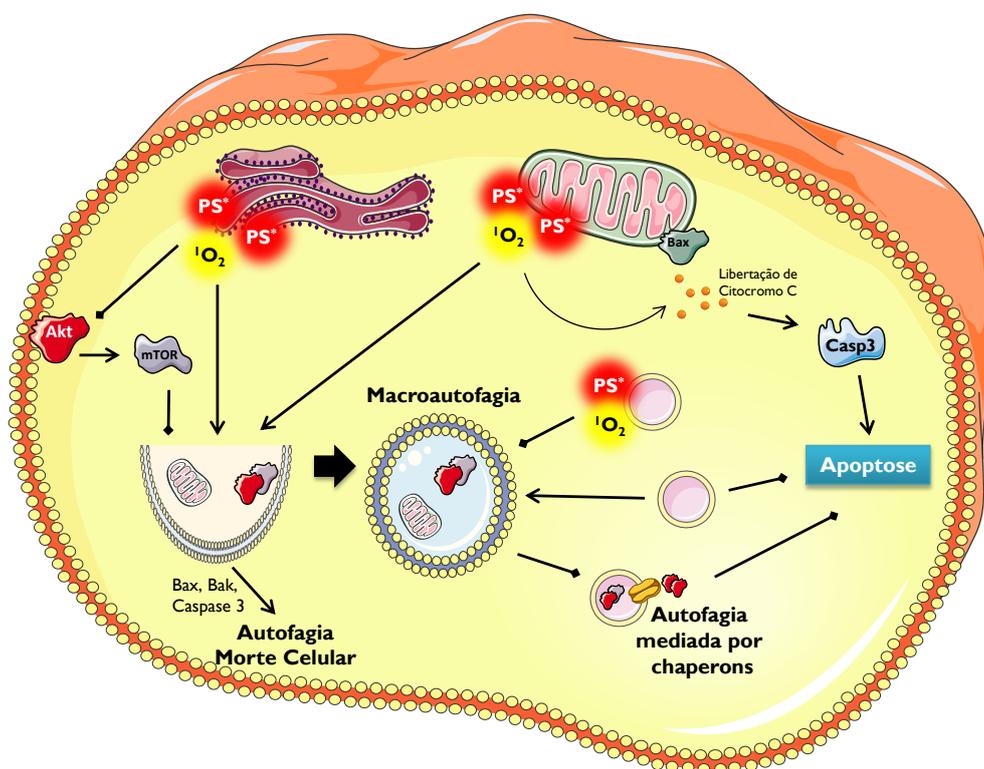


Figura 12: Indução de autofagia pela terapia fotodinâmica. Os alvos moleculares dos fotossensibilizadores são definidos pelo seu local de ação primário, o que pode resultar em estimulação ou inibição da autofagia. Fotossensibilizadores que acumulam na mitocôndria e têm como alvo a proteína Bcl-2 ou que acumulam no retículo endoplasmático levando à inibição da via da mTOR podem promover a autofagia. Por outro lado, quando os lisossomos são fotossensibilizados ocorre inibição do processo autofágico. A autofagia pode resultar num processo de citoproteção da apoptose e da autofagia resultante em morte celular ou num processo de morte celular. Esquema adaptado de Dewaele *et al*, 2010 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

e apoptose na PDT são dependentes do tipo de célula, da natureza do fotossensibilizador e da dose de luz (Yoo & Ha, 2012). O fotossensibilizador porfírico CPO induziu em simultâneo autofagia e apoptose que se comprovou através de condensação da cromatina, perda do potencial de membrana mitocondrial e conversão de LC3-I (do inglês, *microtubule-associated protein light chain 3 I*) em LC3-II (do inglês, *microtubule-associated protein light chain 3 II*) após danos no retículo endoplasmático. Também no caso das células humanas A431 de carcinoma escamoso, o tratamento com o Foscan[®] produziu características de autofagia e de apoptose (Yoo & Ha, 2012).

Necrose

A necrose é uma forma de morte celular, habitualmente descrita como violenta e de rápida degeneração que afeta populações generalizadas de células. Caracteriza-se pelo edema celular, pela devastação dos organelos e pelo rompimento da membrana plasmática, levando à libertação do conteúdo intracelular e, consequentemente, inflamação (Ortel *et al*, 2009; Robertson *et al*, 2009).

A necrose, até há pouco tempo, era considerada uma morte celular acidental ou descontrolada consequente à hipoxia aguda ou à cistemia, com rápida depleção de ATP (do inglês *adenosine triphosphate*) a um nível incompatível com a sobrevivência. No entanto, várias evidências indicam que este tipo de morte constitui uma via regulada por um conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos (Kroemer *et al*, 2009), esquematizados de forma simplificada na Figura 13.

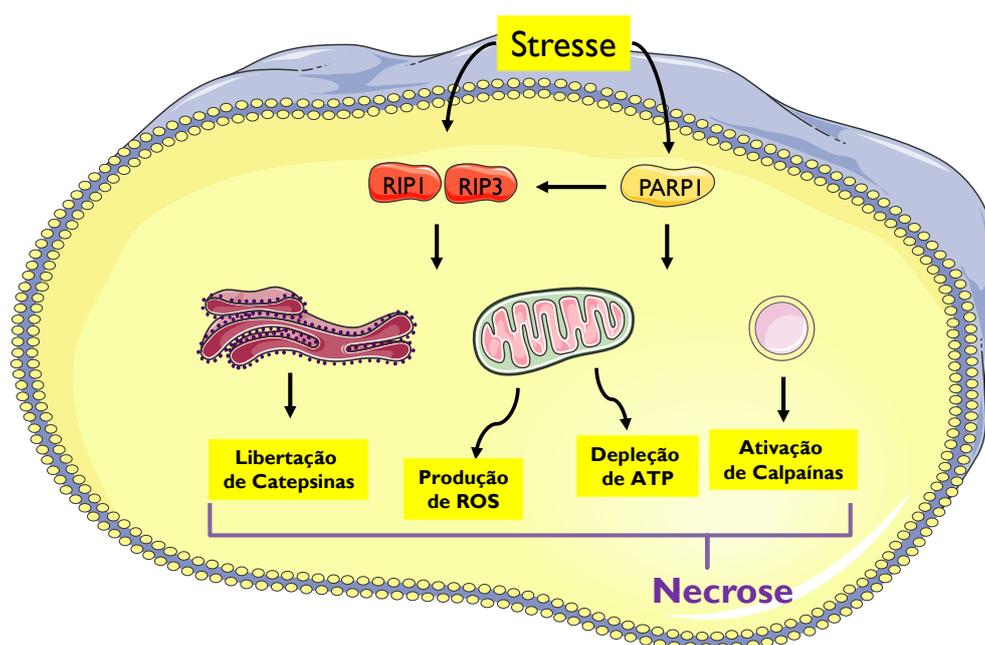


Figura 13: Vias de Necrose. A necrose pode ser iniciada por vários estímulos. A ativação de receptores de morte como o Fas e o TNFR, ou stresse, que pode ser consequência da terapia fotodinâmica, induz a interação e ativação de cinases RIP1 e RIP3 ou outros mecanismos de transdução de sinal. A PARP1 também é comumente ativada em ambiente de necrose. Como consequência ocorre liberação de catepsinas, aumento de produção de ROS, depleção de ATP e ativação de calpains. Esquema adaptado de Hou *et al*, 2013 e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Os principais reguladores da necrose são as proteínas relacionadas com a via do TNF, com o RIP-1 e com a ciclofilina D (Golstein & Kroemer, 2007). Também intervêm proteínas como as PARP (do inglês, *Poly-ADP ribose polymerase*), as calpains e as catepsinas, no entanto não foi estabelecida nenhuma associação firme destes marcadores com a terapia fotodinâmica (Buytaert *et al*, 2007). Comprovou-se que os receptores de domínio de morte, (TNFR1, Fas/CD95 e TRAIL-R) e do tipo Toll (por exemplo, TLR3 e TLR4) provocam necrose, em particular, na presença de inibidores de caspase (Kroemer *et al*, 2009). Diversos mediadores, organelos e processos bioquímicos têm sido implicados na morte celular por necrose, no entanto não está estabelecido como é que se relacionam. Os acontecimentos observados incluem alterações mitocondriais, como desacoplamento, produção de ROS e

permeabilização da membrana mitocondrial, alterações lisossomais como resultado da produção de ROS pela reação de Fenton e permeabilização da membrana lisossomal, alterações nucleares como por hiperativação da PARP-1 e hidrólise concomitante de NAD⁺ (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*), degradação de lípidos após a ativação de fosfolipases, lipoxigenases e esfingomielinases, aumento da concentração citosólica de cálcio (Ca²⁺) que resulta em sobrecarga mitocondrial e ativação de calpaínas e catepsinas. (Kroemer *et al*, 2009).

O efeito diferencial mais importante da necrose *versus* a apoptose e a morte com autofagia é que a necrose provoca a inflamação do tecido (Castano *et al*, 2006). A morte por necrose provocada pela PDT tem sido associada a elevadas concentrações de fotossensibilizador ou a elevadas doses de luz, e tem sido descrita como evitável. No entanto, dada a possibilidade de ser acompanhada por resposta inflamatória, esta via pode ser vantajosa. (Kushibiki *et al*, 2013). Conceptualmente, a inflamação aguda é um processo favorável, uma vez que pode impulsionar a resposta imune antitumor (Korbelik, 2006), o que será discutido mais adiante.

Uma vez que a morte por necrose está associada a perda de integridade da membrana plasmática e rápida depleção de ATP, pode ocorrer como consequência da PDT com fotossensibilizadores que acumulam na membrana plasmática (Gollnick & Brackett, 2010).

As vias celulares referidas podem estar simultaneamente envolvidas na resposta ao PDT, no entanto os mecanismos de *crosstalk* entre estas vias metabólicas ainda não estão esclarecidos (Kushibiki *et al*, 2013). De um modo geral, as evidências experimentais mostram uma larga heterogeneidade entre os mecanismos que levam à morte celular mediada pela PDT. Os avanços na compreensão da biologia molecular da PDT contribuem para a racionalização dos protocolos de tratamento e para a escolha dos fotossensibilizadores, porém a avaliação destes parâmetros depende principalmente da resposta clínica à terapêutica (Huang *et al*, 2008). É postulado que o tipo de morte alterna entre a apoptose e a necrose quando a intensidade do tratamento fotodinâmico é excessivo e promove rápida lise celular em vez da morte celular organizada e programada (Yang *et al*, 1993; Leist & Nicotera, 1997; Dougherty *et al*, 1998; Robertson *et al*, 2009). Esta transição da apoptose para a necrose pode dever-se a um grande aumento na concentração de cálcio no citosol ou, em alternativa, a elevada depleção de ATP como consequência da formação de ROS. A autofagia, que pode ocorrer, como referido, como mecanismo citoprotetor ou como mecanismo que termina em morte, pode ser concomitante à ativação da via apoptótica (Yoo & Ha, 2012).

Nos últimos anos, houve um aumento da compreensão do papel da sinalização intracelular em resposta à PDT, e, particularmente, nas vias de indução de apoptose. Ambas as vias apoptóticas, a extrínseca, que envolve recetores celulares e a caspase 8, e a intrínseca, em que a função mitocondrial é perturbada, podem ser ativadas (Moor, 2000; Kolárová *et al*, 2007; Kuimova *et al*, 2007). Recentemente, demonstrou-se que a autofagia poderá ser um processo induzida por PDT, que pode terminar em morte, particularmente, quando os fotossensibilizadores se localizam no retículo endoplasmático (Kessel & Reiners, 2007; O'Connor *et al*, 2009). A destruição direta das

células tumorais, que produz morte por necrose, é causada por danos irreversíveis na membrana plasmática e nos organelos intracelulares como a mitocôndria, os lisossomas, o aparelho de Golgi, ou o retículo endoplasmático (Kushibiki *et al*, 2013).

As ROS formadas destroem o tumor como consequência de múltiplos mecanismos, que podem envolver várias moléculas. Os fotossensibilizadores que acumulam na mitocôndria podem causar danos a componentes mitocondriais anti-apoptóticos, incluindo na BCL-2 e BCL-XL, e iniciar a liberação de caspases ativadoras. Os fotossensibilizadores que acumulam nos lisossomas ou no retículo endoplasmático podem induzir a ativação de caspases mediada pela proteína BAX. Outro evento importante é a liberação de fatores de necrose como a Hsp70 (do inglês, *heat shock protein 70*), que se encontra significativamente aumentada após o stresse. A PDT induz a rápida liberação de citocromo C, o que inicia a cascata apoptótica através da ativação de diferentes caspases. A Hsp70 liga-se diretamente ao domínio de recrutamento de Apaf-1 e impede o seu recrutamento e oligomerização com a pró-caspase 9. A Hsp70 intracelular pode, não só, inibir a morte celular por apoptose, mas também promover a formação de complexos estáveis com os antigénios tumorais citoplasmáticos. Estes antigénios podem estar expressos na superfície tumoral ou escapar das células em morte por necrose e interagir com células apresentadoras de antigénios e, assim, estimular a resposta imunitária antitumoral (Yoo & Ha, 2012; Kushibiki *et al*, 2013).

Alguns estudos mostraram que a PDT pode induzir a expressão de determinados miRNA (do inglês, *micro ribonucleic acid*). É o caso de miRNA específicos da apoptose cuja expressão aumenta nas células HeLa em resposta ao tratamento com a NPe6. O miRNA-210 está consistentemente aumentado em condições de hipoxia e o miRNA-296 pode estar relacionado com a angiogénese. Estes resultados sugerem que estes mi-RNA podem constituir marcadores da eficiência da terapêutica e, por outro lado, a sua inibição pode contribuir para um resultado terapêutico superior (Kushibiki *et al*, 2013).

Efeito da PDT nos vasos sanguíneos

A PDT pode não ter só as células tumorais como alvos preferenciais da sua atuação. A manutenção e crescimento tumoral dependem de vasos que fornecem oxigénio e nutrientes. Vários trabalhos mostraram que a PDT, em determinadas condições, pode ter um efeito alvo preferencial ao nível dos vasos sanguíneos. Os danos na microvasculatura tumoral podem prevenir a formação de novos vasos sanguíneos e aumentar a eficácia do tratamento ao causar o colapso da microcirculação e hipoxia tissular severa (Bhuvanewari *et al*, 2009).

A investigação no desenvolvimento de moléculas fotossensibilizadoras tem estado focada principalmente na obtenção de moléculas com elevada seletividade para as células tumorais, no entanto, o interesse na terapia fotodinâmica direcionada para a vascularização do tumor também tem vindo a aumentar. Com esta abordagem, o momento ideal para a iluminação deixa de ser quando a concentração do fármaco é elevada no tumor em relação aos tecidos normais, mas sim quando a concentração da molécula fotossensibilizadora é mais elevada no sangue (Triesscheijn *et al*, 2006). Nesta modalidade, pretende-se que o fotossensibilizador tenha seletividade mínima para

o tumor e rápida depuração. A irradiação ocorre enquanto o fármaco ainda circula nos compartimentos vasculares e pretende-se provocar a trombose e oclusão de microvasos, de forma a induzir a ablação tumoral pela supressão do aporte de nutrientes e oxigénio. Assim, a morte celular tumoral resulta de danos noutra tipo de células, nomeadamente, nas células endoteliais (Triesscheijn *et al*, 2006).

Uma vez que a alteração entre os eventos da reação fotodinâmica que ocorrem nas células tumorais ou nos vasos sanguíneos está na dependência da distribuição do fotossensibilizador nestes compartimentos, esta condição pode ser manipulada através da variação do intervalo de tempo entre a administração do fármaco e o momento de exposição à luz. Antes de ser internalizado pelas células, o fotossensibilizador está maioritariamente confinado nos vasos sanguíneos e, se se realizar a irradiação neste momento, os efeitos ocorrem ao nível da vasculatura (Vittar *et al*, 2013). Esta abordagem tem o potencial de eliminar as células tumorais devido ao papel fundamental do aporte sanguíneo na sobrevivência, crescimento e invasão dos tumores sólidos. O tratamento pode ser realizado com concentrações inferiores de fármaco e num mais curto espaço de tempo (Vittar *et al*, 2013).

Os danos vasculares da PDT, primeiramente referidos em 1963, traduzem-se em vários efeitos fisiológicos, nomeadamente, observou-se vasoconstricção dos vasos do tumor seguido de respostas heterogéneas, como eventual estagnação do fluxo do sangue, aparecimento de hemorragia e, em vasos de maior diâmetro, a formação de agregados de plaquetas e de trombos dentro do lúmen dos vasos. Devido às suas interações vasculares eficientes, a PDT é usada também para lesões não neoplásicas tais como o tratamento da neovascularização da córnea e da coróide e na degenerescência macular relacionada com a idade. Neste caso, o Verteporfin[®] é absorvido pelo endotélio neovascular de forma rápida e seletiva e, após irradiação, é possível atingir oclusão angiográfica completa pela trombose vascular (Schmidt-Erfurth & Hasan, 2000). O tratamento com Verteporfin[®] também afeta vasos linfáticos associados a tumores, sendo capaz de eliminar as células tumorais intralinfáticas e, desta forma, minimizar as vias de metastização (Vittar *et al*, 2013).

Vários estudos implicaram o endotélio como um alvo primário da PDT *in vivo*. Os trabalhos de Gomer mostraram que células endoteliais de bovino podem ser mais fotossensíveis do que células musculares lisas ou fibroblastos, e este incremento da fotossensibilidade não estava relacionado com maior captação ou retenção do fármaco (Gomer *et al*, 1988). West *et al*. mostraram até que as células endoteliais podem ser mais sensíveis do que células tumorais humanas de adenocarcinoma do cólon (West *et al*, 1990).

Várias novas moléculas fotossensibilizadoras têm sido estudadas como potenciais fármacos para PDT com seletividade para a vasculatura. O 2-(1-hexiloxietil)-2-divinil-pirofeoforbide-a demonstrou citotoxicidade vascular superior ao Photofrin[®] em xenotransplantes de cancro escamoso do esófago (Wu *et al*, 2013).

O fotossensibilizador TOOKAD[®] foi utilizado no tratamento fotodinâmico, direcionado para a vasculatura de 85 doentes com cancro da próstata, e verificou-se que o tratamento com 4 mg/kg e irradiação com 200 J/cm resultou em biópsia negativa, após 6 meses, em 80% dos doentes tratados com este regime (Azzouzi *et al*, 2013). Num outro estudo, na análise das biópsias realizadas 6 meses após o tratamento de 56 doentes com o mesmo

fotossensibilizador, foi possível observar cicatrizes fibróticas bem marcadas e raras ou inexistência de glândulas atroficas, necrose de coagulação e leve inflamação (Eymerit-Morin *et al*, 2013).

Com o propósito de melhorar a eficácia da PDT com seletividade para a vasculatura, desenvolveram-se fotossensibilizadores direcionados para marcadores da angiogênese tumoral. Uma estratégia é a utilização de fotossensibilizadores conjugados a anticorpos ou a moléculas que reconhecem a vasculatura tumoral. É um caso o do anticorpo L19, contra a ED-B-fibronectina que, quando conjugado a um fotossensibilizador, pode aumentar a atividade antitumoral. O péptido arginina-glicina-ácido aspártico tem afinidade para integrinas e glicoproteínas sobreexpressas na superfície das células endoteliais, por isso a sua conjugação com um fotossensibilizador pode resultar em apoptose preferencialmente da neovasculatura. Também os lipossomas catiónicos, como transportadores, foram considerados eficazes para este propósito por melhorar a interação do fármaco com as células endoteliais (Vittar *et al*, 2013). O direcionamento dos fotossensibilizadores para os recetores da somatostatina 2 (SST2, do inglês, *somatostatin receptor 2*) mostrou-se mais eficaz, com ablação dos vasos sanguíneos do tumor, e verificou-se que o octreótido constitui uma opção segura com baixas taxas de recorrência e elevada resposta a longo prazo (Starkey *et al*, 2013).

Inflamação e imunidade

A PDT provoca frequentemente reação inflamatória aguda que se apresenta como edema na região submetida a tratamento. Esta reação é consequência do stresse oxidativo induzido pela terapia fotodinâmica, que provoca uma reação imunitária, que pretende lidar com a integridade e a homeostasia do local afetado (Agostinis *et al*, 2011). A PDT inicialmente foi considerada uma terapêutica de ação anti-inflamatória local, no entanto, vários estudos mostraram que pode ser também responsável por um efeito sistémico que se traduz por neutrofilia sistémica, indução de proteínas da fase aguda, aumento dos níveis de complemento e libertação sistémica de citocinas pró-inflamatórias. A PDT é eficaz a desencadear resposta imunitária contra o tumor, localmente, e por isso, pode ativar tanto o sistema imune inato com o adaptativo (O'Connor *et al*, 2009; Brackett & Gollnick, 2011; Mroz *et al*, 2011). Comprovou-se também que a depleção ou a inibição das células inflamatórias compromete o resultado do tratamento (Agostinis *et al*, 2011). Este processo é comum tanto para fotossensibilizadores que atuam diretamente nas células tumorais como para os que atuam ao nível da vasculatura do tumor.

Numerosos estudos clínicos demonstraram que a terapia fotodinâmica pode influenciar resposta imune adaptativa em várias formas. Alguns regimes de tratamento podem potenciar a resposta adaptativa imunitária enquanto outros podem levar a imunossupressão (Agostinis *et al*, 2011; Mroz *et al*, 2011). Ainda não estão descritos na totalidade os mecanismos precisos que levam a cada uma destas respostas, no entanto sabe-se que estão relacionados com o sistema imunitário, área tratada e o tipo de fotossensibilizador.

Os casos de imunossupressão estão relacionados com tratamento de áreas cutâneas de grande superfície. Alguns estudos de hipersensibilidade por contacto demonstraram que, após a PDT, a imunidade poderia estar diminuída.

Uma vez que a imunossupressão mediada pela PDT tem sido testada maioritariamente no modelo de hipersensibilidade de contacto, os efeitos são frequentemente comparados com os da irradiação UV, conhecida por ser supressora tanto na fase de indução como de sensibilização. Foram propostos vários mecanismos para essa supressão, como é o caso da possível depleção das células de Langerhans ou a regulação aberrante da secreção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenios. A própria produção de ROS, inerente à reação fotodinâmica, também pode neutralizar a capacidade de produzir respostas imunes e, eventualmente, induzir tolerância. Existem também evidências de que as células em apoptose libertam citocinas imunossupressoras, tais como TGF- β (do inglês *transforming growth factor β*) e IL-10 (Interleucina 10). O tratamento pode causar um aumento de VEGF que pode ser imunossupressor pela inibição da função e da diferenciação das células dendríticas (Mroz *et al*, 2011).

A eficácia da PDT parece estar relacionada com uma indução de imunidade antitumoral e mostra melhorar a eficácia da PDT *in vivo* (O'Connor *et al*, 2009; Agostinis *et al*, 2011). Estudos realizados em ratinhos imunodeprimidos mostraram que a reconstituição deste sistema melhora a resposta à PDT (Agostinis *et al*, 2011). O tratamento de tumores em ratinhos scid (do inglês, *severe combined immunodeficiency*) não foi protetor mesmo com uma dose equivalente à curativa em ratinhos Balb-c (Brackett & Gollnick, 2011). O aumento da atividade antitumoral foi associado com a infiltração de linfócitos CD8+, neutrófilos, e aumento de mediadores inflamatórios, nomeadamente o TNF- α , a IL-1 β (Interleucina-1 β), a IL-6 (Interleucina-6), a IL-10, os tromboxanos, as prostaglandinas, os leucotrienos e a histamina (Ortel *et al*, 2009). Foi demonstrado que o controlo do crescimento de tumores fora da área de tratamento está dependente da existência de um sistema imunitário intacto e é mediado por células CD8+ (Kabingu *et al*, 2007). Alguns estudos demonstraram que o tratamento de tumores em murinos resultava no desenvolvimento de memória imunitária (Brackett & Gollnick, 2011). A ativação do complemento também é preponderante na resposta à PDT pois, em modelos animais em que o complemento foi bloqueado, observou-se uma menor taxa de cura após o tratamento com vários fotossensibilizadores (Korbelik, 2006).

Apesar da resposta inicial ser equiparada em doentes imunocompetentes e imunodeprimidos, a longo prazo, os doentes imunodeprimidos têm maior propensão a desenvolver novas lesões. Biópsias de doentes com neoplasia vulvar que expressam moléculas de histocompatibilidade *major* de classe I (MHC I, do inglês, *major histocompatibility class I*) responderam melhor ao 5-ALA-PDT do que os casos em que MHC I estava ausente (Brackett & Gollnick, 2011). De salientar o tratamento de angiossarcoma multifocal de cabeça e pescoço que resultou no aumento da infiltração de células imunitárias em tumores distantes não tratados e foi acompanhado de regressão tumoral (Agostinis 2011).

A inflamação induzida pela PDT é um processo independente da especificidade de antígenios, orquestrado pelo sistema imune inato. A reação fotodinâmica é eficaz na formação de sinais de alarme designados moléculas associadas a padrões de morte (DAMP, do inglês, *damage associated molecular patterns*, e CDAMP, do inglês, *cell death associated molecular patterns*), que constituem sinais quimiotáticos que são detetados pelo sistema de

imunidade inato. Um dos membros da família DAMP é a proteína nuclear de ligação ao DNA HMGB1 (do inglês, *high-mobility group box 1*) que se pode ligar a receptores TLR (do inglês, *Toll-like receptors*) e ativar a resposta imunitária. O início deste processo inflamatório é marcado por alterações do microambiente tumoral, consequentes da libertação e expressão de moléculas pró-inflamatórias e de mediadores da resposta aguda, que se torna permeável a proteínas do sangue e a células inflamatórias (Mroz *et al*, 2011). As células inflamatórias, neutrófilos, mastócitos, monócitos/macrófagos e as células dendríticas rapidamente invadem a massa tumoral e podem atuar contra as células tumorais (Qiang *et al*, 2008; Agostinis *et al*, 2011). A resposta inflamatória aguda é o principal processo efetor de proteção envolvido neste contexto e tem como objetivo neutralizar a fonte de DAMP e CDAMP, remover células lesadas, repor a homeostasia e a função normal do tecido afetado. A ativação do sistema do complemento também parece ser importante, uma vez que funciona como mediador direto da inflamação e também estimula as células a libertar mediadores secundários da inflamação como as citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, G-CSF (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*), tromboxanos, prostaglandinas, leucotrienos, histamina e fatores de coagulação (Mroz *et al*, 2011). A lesão e disfunção da vascularização do tumor tratado frequentemente terminam em oclusão vascular, que contribui para confinar o tecido tumoral danificado até que seja removido por fagocitose, evitando assim a propagação da lesão (Agostinis *et al*, 2011).

A exposição à PDT resulta na ativação prolongada dos genes *c-fos* e *c-jun* que formam heterodímeros que regulam a expressão da proteína ativadora API (do inglês *activator protein 1*). A ativação de API é crítica para a proliferação, diferenciação e inflamação. Como resposta à ativação de API são produzidos mediadores da inflamação (Ortel *et al*, 2009). Entre as citocinas envolvidas na regulação do processo inflamatório, as mais importantes são a IL-1 β e a IL-6 mas também o TNF- α e moléculas de adesão como a E-selectina e a ICAM-1 (do inglês, *Inter-Cellular Adhesion Molecule*) estão envolvidas (Qiang *et al*, 2008; Bhuvanewari *et al*, 2009). Um estudo clínico mostrou que doentes submetidos a PDT adjuvante apresentam um aumento de IL-1 β , IL-6, IL-8 (Interleucina 8) e IL-10 (Qiang *et al*, 2007). O bloqueio da função de várias moléculas de adesão foi comprovado ser prejudicial. No entanto, de modo controverso, o bloqueio de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e o TGF- β pode melhorar significativamente os índices de cura após PDT (Agostinis 2011). O envolvimento das citocinas, na resposta imune induzida pela PDT, mostra que a modulação desta terapêutica para a ativação de mediadores inflamatórios e imunitários, pode resultar não só na destruição do tecido tumoral, mas pode também contribuir para a eliminação de células tumorais no organismo e para ativar o sistema imunitário contra o cancro, prevenindo possíveis recorrências ou metástases (Qiang *et al*, 2008; Gollnick & Brackett, 2010).

A PDT ativa a imunidade humoral e a mediada por células, no entanto a importância da resposta humoral não é clara. A PDT tem sido relacionada com a ativação de células dendríticas pelas células tumorais mortas e lesadas e implicada na sua maturação. As células dendríticas são as mais potentes células apresentadoras de antígenos. Há evidências de que estas células, após PDT, se tornam capazes de apresentar antígenos do tumor e ativar linfócitos capazes de destruir células distantes, positivas para esses antígenos (Mroz *et al*, 2011). As células dendríticas são fundamentais para a ativação das células-T CD8⁺ e para a indução da imunidade anti-tumoral.

Hipotetizou-se que as células dendríticas ativam as células-T CD8⁺ em nódulos linfáticos após migração para estes locais. A formação de células-T CD8⁺ e de memória é frequente mas nem sempre ocorre e pode estar na dependência da presença e da ativação de células-T CD4⁺. (Agostinis *et al*, 2011).

O tipo de morte celular também pode influenciar o mecanismo de ativação da imunidade. Foi demonstrado que, após morte por necrose, as células dendríticas são capazes de ativar eficientemente células-T CD4⁺ e células-T CD8⁺. Por outro lado as células apoptóticas levam à ativação apenas de células-T CD8⁺, no entanto as células-T CD4⁺ podem ser importantes para a atividade das primeiras. A eficácia da PDT está diminuída na ausência de células-T CD8⁺ (Agostinis *et al*, 2011).

A incubação de células tumorais tratadas com PDT com células dendríticas imaturas levou à sua maturação, ativação e capacidade de estimular as células-T (Kushibiki *et al*, 2013). Células dendríticas imaturas cocultivadas com células C26 tratadas com PDT fagocitaram eficazmente as células tumorais, adquiriram características de células maduras e produziram quantidades elevadas de IL-12 (Interleucina-12) (Kushibiki *et al*, 2013). Lisados de células tumorais tratadas por PDT induziram a secreção, pelas células dendríticas, de IL-1 α (Interleucina-1 α), IL-1 β e IL-6 (Brackett & Gollnick, 2011). Por outro lado, células dendríticas submetidas a lisados de células tumorais tratadas, inibiram o crescimento de tumores mamários EMT6 e também mostraram efeito contra tumores sólidos estabelecidos (Kushibiki *et al*, 2013). A ativação das células dendríticas por células tratadas poderá ocorrer através da libertação de DMAP e CDAMP que são imunoestimulatórios ao interagir com PRR (do inglês, *pattern recognition receptors*) expressos por células de imunidade inata. A Hsp70 é um DAMP cujo nível de expressão se correlaciona com a maturação e extensão da inflamação (Brackett & Gollnick, 2011).

Para a formação de imunidade antitumoral, a apresentação de antígenos é fundamental e as células dendríticas expostas a péptidos, proteínas, genes ou lisados derivados de células tumorais, assim como células dendríticas fundidas com células tumorais, têm sido estudadas como vacinas anticâncer. Os ensaios clínicos mostraram que a vacinação é bem tolerada e capaz de ativar respostas de células-T específicas contra o tumor, com regressão da doença metastática. As células dendríticas maduras são críticas para a ativação de células-T CD8⁺ e para a indução de imunidade antitumor (Kushibiki *et al*, 2013).

Com os estudos realizados até aqui, surge a hipótese de que, em resposta à PDT, as células dendríticas são ativadas e migram para os nódulos linfáticos próximos do tumor onde é estimulada a ativação das células-T. Esta hipótese, que sugere que a PDT pode atuar de modo semelhante às vacinas antitumorais, tem sido corroborada por diversos estudos que utilizam uma ampla variedade de modelos de tumor e de fotossensibilizadores (Agostinis *et al*, 2011). Este ponto de vista abre portas à PDT no que concerne a doença metastática. Uma maior compreensão da resposta imunitária prevê o desenvolvimento de mecanismos úteis para melhorar a eficácia do tratamento clínico com PDT. O entendimento dos mecanismos pelos quais a PDT aumenta a imunidade antitumoral pode permitir o desenvolvimento de protocolos capazes de eliminar o tumor primário e aumentar a imunidade sistêmica de modo a controlar a doença disseminada.

Combinação com outras estratégias terapêuticas

Em oncologia, a combinação de várias modalidades terapêuticas sem toxicidade cumulativa constitui uma estratégia importante para potencializar o resultado terapêutico. Na maioria dos casos, uma única forma de tratamento não é capaz de curar o cancro. No caso da PDT, tanto a sensibilização das células tumorais como a interferência com mecanismos de proteção das células ao tratamento são abordagens que podem melhorar o resultado terapêutico (Agostinis *et al*, 2011). Além disto, uma vez que a citotoxicidade está na dependência de formação de ROS de forma localizada, não há qualquer impedimento à combinação desta terapêutica com outras terapêuticas convencionais. A combinação com a cirurgia, como tratamento neoadjuvante ou adjuvante, e com a quimioterapia e radioterapia são opções que não trazem risco de resistência cruzada, no entanto há poucos estudos clínicos que demonstrem o resultado da combinação da PDT com as terapêuticas convencionais (Agostinis *et al*, 2011).

No caso dos tumores sólidos, a cirurgia, na maior parte dos casos, constitui a primeira e principal abordagem terapêutica. No entanto, mesmo após cirurgia há sempre risco de existirem células tumorais remanescentes que podem promover a recidiva. A administração de um fotossensibilizador antes da cirurgia e iluminação posterior do local afetado pode ser utilizada para identificar as células tumorais, procedimento comumente referido como foto-diagnóstico. Um exemplo desta abordagem foi a utilização de Verteporfin[®] e obtenção de imagens de fluorescência de células de cancro do ovário por microendoscopia (Zhong *et al*, 2009). Além disso, no momento da cirurgia pode ser realizada PDT no leito do tumor. Foi demonstrado que a combinação de PDT com a cirurgia resulta em redução significativa de aparecimento de metástases, promove o desenvolvimento da resposta imunitária antitumoral e diminui a taxa de recidivas de tumor em vários tipos de cancro (Firczuk *et al*, 2011).

A resposta à PDT em combinação com a quimioterapia foi estudada com vários quimioterapêuticos, tais como antraciclinas, os compostos de platina, os antimetabolitos, os inibidores de microtúbulos e outros. As interações observadas podem ser sinérgicas, neutras ou antagonistas, de acordo com o fármaco, o intervalo de tempo entre a administração do fotossensibilizador e a aplicação da PDT, o quimioterapêutico e o tipo de tumor (Firczuk *et al*, 2011). Demonstrou-se que a combinação da PDT com a quimioterapia pode ser bem tolerada (Nahabedian *et al*, 1988). No que respeita à associação com agentes alquilantes do DNA, a combinação de cisplatina com a PDT mediada por 5-ALA foi estudada *in vitro* e *in vivo* no cancro da cabeça e pescoço. O regime de combinação demonstrou ser mais citotóxico que qualquer um dos fármacos administrado isoladamente, mesmo com menores concentrações e verificou-se redução dos efeitos secundários inerentes à quimioterapia (Ahn *et al*, 2014). Obtiveram-se resultados positivos também na combinação de cisplatina com PDT baseada em Photofrin[®], em células de linfoma de ratinho e em células de adenocarcinoma do esófago, onde se observou efeito citotóxico aumentado e apoptose (Postiglione *et al*, 2011). Outros estudos demonstraram o efeito sinérgico da PDT em combinação com compostos de platina (Mao *et al*, 2009; Compagnin *et al*, 2010; Ge *et al*, 2011; Wei *et al*, 2013).

A doxorubicina, cujo mecanismo de ação depende da intercalação no DNA e da inibição da topoisomerase II, foi estudada em combinação com vários fotossensibilizadores e em diversos tipos de cancro. A associação com 5-ALA contribuiu para controlar o crescimento de xenotransplantes em ratinhos (Nahabedian *et al*, 1988; Postiglione

et al, 2011). Estudos *in vitro* relativos ao tratamento de sarcoma uterino resistente à quimioterapia resultaram em efeito sinérgico, com diminuição da atividade e expressão das proteínas MDR-1 (do inglês *multidrug resistance protein 1*) e P-gp (do inglês *P-glycoprotein 1*) (Cheung *et al*, 2013). A combinação da doxorrubicina com a PDT foi também avaliada num modelo de cancro resistente à quimioterapia, através de utilização um sistema de transporte de fármacos constituído por nanopartículas. Verificou-se inibição significativa da proliferação celular, aumento da apoptose e maior sobrevivência dos ratinhos (Postiglione *et al*, 2011). A mitomicina C é um antibiótico antitumoral que inibe a síntese de DNA. A sua combinação com a PDT baseada em Photofrin® é particularmente eficaz no tratamento de fibrossarcoma de ratinho e de carcinoma do cólon de rato. No caso da combinação com a PDT baseada em 5-ALA, verificaram-se efeitos muito promissores em várias linhas celulares de cancro da bexiga, incluindo em células resistentes à terapêutica com mitomicina C (Postiglione *et al*, 2011).

As topoisomerasas são enzimas responsáveis por modificar a estrutura do DNA de modo a permitir a transcrição e a replicação. A sua inibição constitui uma importante estratégia no tratamento de vários tipos de cancro, que resulta em alteração do ciclo celular, quebras simples e duplas na cadeia do DNA e morte celular. Fármacos como o irinotecano e o ectoposido também foram avaliados em combinação com a PDT, o que resultou em efeito sinérgico que se traduz por inibição do crescimento, perda significativa de potencial clonogénico, paragem do ciclo celular e fragmentação do DNA (Postiglione *et al*, 2011).

O metotrexato, um inibidor da síntese de DNA, que apresenta efeito indutor da diferenciação celular, também em combinação com a PDT baseada em 5-ALA, resultou no aumento da concentração intracelular de protoporfirina IX (Sinha *et al*, 2006; Anand *et al*, 2009). Relativamente aos quimioterapêuticos que atuam ao nível do citoesqueleto, como os inibidores de microtúbulos de que são exemplos a vincristina e o taxol também foram estudados em combinação com a PDT *in vivo*, tendo sido comprovado um efeito sinérgico com a vincristina administrada antes da reação fotodinâmica (Ma *et al*, 1996). O paclitaxel em baixa concentração também contribuiu para aumentar a citotoxicidade da PDT mediada pelo Verteporfin® *in vitro* (Park *et al*, 2008).

Além da quimioterapia, a PDT também pode ser combinada com a radioterapia, o que resulta num duplo efeito em que a PDT sensibiliza as células tumorais à radioterapia e a radioterapia aumenta a eficácia anticâncer da PDT, que potencia o efeito antitumoral (Agostinis *et al*, 2011). Os danos provocados por estas duas terapêuticas são distintos. Após a PDT são comuns os danos ao nível das membranas celulares enquanto a radioterapia induz lesões significativas ao nível do DNA. Luksiene e colaboradores demonstraram numa série de trabalhos que a combinação destas terapêuticas leva a um efeito aditivo em que o fármaco atua como fotossensibilizador e também como radiosensibilizador (Luksiene *et al*, 1999, 2006a, 2006b; Luksiene, 2004). Posteriormente, vários autores confirmaram os potenciais efeitos positivos desta combinação terapêutica, também em estudos clínicos (Nyst *et al*, 2012; Gui *et al*, 2013; Lo *et al*, 2013; Sazgarnia *et al*, 2013; Bechet *et al*, 2014).

Vários estudos têm confirmado a importância de manter a boa oxigenação dos tecidos para assegurar o efeito antitumoral da PDT. O oxigénio hiperbárico tem efeitos benéficos em vários tratamentos oncológicos e, quando combinado com a PDT, diminui a condição de hipoxia e aumenta a morte celular. Associadamente, a administração

de ferro ou de transferrina, importante para a produção de ROS, podem ter um efeito sinérgico (Al-Waili & Butler, 2006). A associação da PDT com oxigênio hiperbárico ou com emulsões perfluoradas, que aumentam a oxigenação dos tecidos, ou a administração de eritropoietina, uma citocina capaz de promover a renovação dos eritrócitos, mostraram induzir efeitos superiores do que unicamente com a PDT (Firczuk *et al*, 2011).

A combinação com fármacos capazes de promover a captação ou a retenção do fotossensibilizador pelas células tumorais pode constituir uma estratégia para melhorar o resultado terapêutico. Esta abordagem depende da conjugação do fotossensibilizador com moléculas direcionadas para as células tumorais e pode ser particularmente importante quando as características morfológicas do tumor requerem a iluminação de uma área extensa, o que torna necessário maior seletividade (Agostinis *et al*, 2011). A combinação com péptidos apresenta vantagens pelo seu pequeno tamanho, síntese simples e alta afinidade para os recetores. Foram utilizadas sequências peptídicas com afinidade para os recetores como a hormona libertadora de gonadotropina, o recetor 2 do VEGF e a neuropilina-1 (Verma *et al*, 2007).

A expressão de recetores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês, *low-density lipoproteins*) específicos está aumentada em diversos tipos de células tumorais e por isso podem aumentar a seletividade de fármacos para o tumor, inclusivamente de fotossensibilizadores (Polo *et al*, 2002). Vários fotossensibilizadores foram conjugados a LDL e, com estes estudos, ficou demonstrado o potencial em aumentar a eficácia e seletividade da PDT (Hamblin & Newman, 1994b; Schmidt-Erfurth *et al*, 1994, 1997; Marotta *et al*, 2011).

Foram estudadas várias estratégias com o objetivo de aumentar a acumulação de fotossensibilizador nas células tumorais. De modo similar ao efeito do metotrexato, já descrito, a vitamina D, por ser uma molécula promotora da diferenciação, foi avaliada na acumulação de protoporfirina IX e confirmou-se a sua ação potenciadora da PDT baseada em 5-ALA (Sato *et al*, 2007; Verma *et al*, 2007; Anand *et al*, 2011, 2012)

A proteína ABCG2 (do inglês, *ATP-binding cassette protein G2*), associada à multirresistência a fármacos, pode influenciar a captação e retenção de fotossensibilizadores (Robey *et al*, 2005; Morgan *et al*, 2010). O bloqueio da sua função pode ser conseguido através de inibidores de tirosina cinase, como é o caso do imatinib. Foi possível aumentar a concentração intracelular de vários fotossensibilizadores (Protoporfirina IX, Photofrin[®], Photochlor[®], Verteporfir[®] e Pheophorbide a[®]) por este mecanismo e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica (Liu *et al*, 2007; Morgan *et al*, 2010). Outras proteínas associadas à multiresistência a fármacos foram implicadas na retenção intracelular de fotossensibilizador. É o caso da proteína MRP1, cuja inibição com proadifen levou ao aumento da concentração do fotossensibilizador hipericina nas células de carcinoma do cólon HT-29 (Jendzelovský *et al*, 2009).

Algumas estratégias de combinação da PDT com outros fármacos visam minimizar possíveis mecanismos citoprotetores e aumentar a formação de ROS. Esta estratégia pode ser relevante no caso de tumores de maior dimensão, em que as células tumorais que se encontram mais no interior do tumor recebem doses de luz inferiores ao ideal e, por esse motivo, a inibição de enzimas que participam na neutralização de ROS, através de inibidores seletivos, pode melhorar o resultado. Assim, verificou-se que as enzimas responsáveis pela eliminação de ROS, como a heme oxigenase I (HO-1), superóxido dismutase (SOD), a cataláse e a glutatona, a ferroquelatase e a NOS (do

inglês *nitric oxide synthase*) constituem um importante mecanismo citoprotector que limita a ação da PDT. A inibição da proteína HO-1 após PDT com complexo de zinco da protoporfirina IX levou ao aumento significativo da citotoxicidade (Nowis *et al*, 2006). A inibição da SOD, com dietilditiocarbamato de sódio, demonstrou aumentar a fotossensibilização cutânea e, com metoxiestradiol, aumentou significativamente a atividade antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo* (Firczuk *et al*, 2011). A inibição das outras enzimas referidas também potencia o efeito da PDT (Agostinis *et al*, 2011).

Os antioxidantes podem, em determinadas circunstâncias, ter um efeito pró-oxidante. Verificou-se que o ascorbato combinado com a PDT baseada em Photofrin[®] aumenta a produção de radicais livres e diminui sobrevivência das células de vários tipos de cancro. O efeito cooperativo também foi observado no caso da associação de ascorbato com a PDT baseada em 5-ALA. Em combinação com benzoporfirina em células HL60, o efeito sinérgico foi explicado pela ativação de uma cascata iniciada pela reação do ascorbato com o oxigénio singleto, para formar peróxido de hidrogénio. Esta espécie estimula a atividade da mieloperoxidase que gera espécies mais oxidantes. Assim, os autores concluíram que esta associação, em células que expressam níveis elevados de mieloperoxidase, resulta em elevada fototoxicidade, devido a formação aumentada de peróxido de hidrogénio e outras espécies citotóxicas (Postiglione *et al*, 2011).

Após a reação fotodinâmica, as proteínas intracelulares podem ser alvo de uma série de modificações que resultam em perda de estrutura terciária e da agregação, nomeadamente, fragmentação, *cross-linking* ou carbonilação. As proteínas oxidadas pela PDT tornam-se substratos de chaperonas moleculares, como o caso das proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*), que ajudam no enrolamento e impedem a agregação das primeiras. O efeito fotodinâmico provoca o aumento da expressão de várias HSP. A inibição da função da HSP-90 com um análogo potenciou o efeito citotóxico *in vitro* e *in vivo* (Firczuk *et al*, 2011). No caso das proteínas carboniladas, uma vez que a principal via de eliminação é a do proteassoma, a combinação de inibidores desta via com a PDT pode resultar em efeito terapêutico superior. A combinação com os inibidores bortezomib ou PSI (do inglês, *proteasome inhibitor*) levou a um retardamento significativo do crescimento tumoral, com 60 a 100% de respostas completas (Szokalska *et al*, 2009). A combinação de PDT com fármacos de baixa toxicidade (como a aspirina) resultou numa inibição prolongada da atividade do proteassoma e apoptose mesmo em células tumorais resistentes a este tipo de morte celular (Chiaviello *et al*, 2010). No caso da PDT direcionada para a vasculatura, a combinação com o inibidor bortezomib levou a maior acumulação de proteínas ubiquitinadas e apoptose das células endoteliais, ou seja, melhor resultado terapêutico (Li *et al*, 2013). Uma vez que tanto a PDT e como os inibidores do proteassoma são terapêuticas aprovadas, esta combinação é de importância clínica significativa e aguarda novos estudos (Firczuk *et al*, 2011).

Uma das principais desvantagens da PDT pode ser a estimulação da angiogénese como resultado da geração de hipoxia e indução de fatores como a COX-2 (ciclooxigenase-2) e VEGF. Por esse motivo, a combinação com o tratamento antiangiogénico é uma outra abordagem que pode ser promissora (Pizova *et al*, 2012). O bevacizumab, em combinação com a PDT com base em hipericina, melhorou a resposta de xenotransplantes de bexiga em

ratinho. Verificou-se neste caso redução da expressão de VEGF e de outras proteínas angiogênicas (angiogenina, bFGF, EGF, IL-6 e IL-8) (Postiglione *et al*, 2011). A combinação da PDT com anticorpos monoclonais contra o VEGF reduziu o volume do tumor e aumentou a sobrevivência dos animais (Firczuk *et al*, 2011). No caso da inibição do recetor do VEGF com anticorpos monoclonais contra o VEGFR-1 e VEGFR-2 verificou-se redução do crescimento do glioblastoma e sobrevivência prolongada dos ratinhos. No caso da combinação com o TNP-470, um fármaco antiangiogênico, verificou-se a inibição da indução de VEGF e a diminuição do volume tumoral de forma mais pronunciada (Verma *et al*, 2007).

Como referido, a PDT pode induzir a expressão de COX-2, que tem como resultado, a diminuição da eficácia da terapêutica, pelo que a sua inibição, pode constituir uma importante estratégia terapêutica. A administração de inibidores da COX-2 após a reação fotodinâmica levou a resposta tumoral completa. A associação de nimesulida a PDT, baseada em 5-ALA, em linhas celulares de carcinoma oral escamoso levou à inibição do crescimento tumoral e melhor resultado terapêutico (Postiglione *et al*, 2011). Vários trabalhos demonstraram interações antitumorais sinérgicas entre a PDT e inibidores da COX-2 (Firczuk *et al*, 2011).

Ferrario *et al*. realizaram vários trabalhos com o objetivo de melhorar o resultado da PDT. Relativamente à combinação com inibidores da COX-2, verificou-se o aumento da fotossensibilização *in vitro* e melhor resposta *in vivo* pela diminuição de fatores angiogênicos e moléculas inflamatórias (Ferrario *et al*, 2005). Estes autores concluíram também que o *targeting* de proteínas substrato da Hsp-90, como a survivina, pode contribuir para melhorar a eficácia da PDT (Ferrario *et al*, 2007). Noutro trabalho, concluíram que a HSP-90 está envolvida na modulação da resposta à PDT e que a combinação com um inibidor desta proteína contribui para uma melhor resposta a longo prazo (Ferrario & Gomer, 2010). Mais recentemente, concluíram que a combinação com epigallocatequina galato, um polifenol constituinte do chá verde, contribuiu para o aumento da apoptose e diminuição da expressão de moléculas pró-sobrevivência e pró-angiogénese no microambiente tumoral (Ferrario *et al*, 2011).

A ação da PDT a nível do sistema imunitário proporcionou que muitas abordagens biomodulatórias estão relacionadas com a utilização de mediadores da inflamação e da imunidade. No caso do Photofrin[®], várias combinações foram testadas. A combinação com fatores estimuladores de granulócitos potenciou o resultado terapêutico através de maior redução do crescimento tumoral e de aumento da sobrevivência dos ratinhos. A combinação com a citocina recombinante humana TNF- α teve um efeito aditivo porém com toxicidade sistémica significativa e, por esse motivo, a utilização de agentes que estimulam a sua síntese, como o ácido 5,6-dimetilxantenona acético também foi testada. Os ativadores do complemento, nomeadamente, o zimosano, a estreptoquinase e a uroquinase, melhoraram o resultado terapêutico mas com efeitos secundários severos. A combinação com β -glicanos levou ao desenvolvimento de uma área necrótica maior (Pizova *et al*, 2012). A γ -inulina, um ativador do complemento, e o IFN- γ (do inglês, *interferon* γ), uma citocina que estimula a atividade fagocitária dos macrófagos e das células dendríticas, e aumenta a capacidade de processamento e de apresentação de antígenos, foram considerados promissores. Com esta combinação verificou-se diminuição da

recorrência do tumor e taxas de cura mais elevadas (Pizova *et al*, 2012). A combinação da PDT com a transferência de células dendríticas imaturas em ratinho é superior a qualquer uma das terapêuticas sozinhas e pode ter efeito também a nível do controlo da doença disseminada (Pizova *et al*, 2012).

Várias moléculas foram utilizadas como transportadores para fotossensibilizadores, tais como as lipoproteínas de baixa densidade, anticorpos, nanopartículas ou polímeros. A natureza da interação entre a estrutura de transporte e o fotossensibilizador depende das suas características físicas e pode ser mediada por ligações de hidrogénio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, retenção física e emparelhamento iónico (Verma *et al*, 2007). A complexação química entre o fotossensibilizador hematoporfirina e um anticorpo monoclonal, neste caso, dirigido para o miossarcoma, revelou uma série de problemas, nomeadamente, a baixa fototoxicidade do conjugado, a limitada penetração em tumores sólidos pouco vascularizados e ainda problemas técnicos relacionados com a reação de acoplamento, uma vez que a maior parte dos fotossensibilizadores são hidrofóbicos e lipofílicos, com alguma tendência para agregar em solução aquosa, enquanto os anticorpos são moléculas hidrofílicas (Pizova *et al*, 2012). Foram preparados conjugados de BPD e verteporfina com o anticorpo C225 contra um domínio do EGFR, um recetor comumente sobreexpresso em células tumorais, utilizando duas estratégias: a polietilenoglicosilação do anticorpo, que aumenta a solubilidade do imunconjugado e reduz a agregação, e a utilização de um sistema de solventes, água e dimetilsulfóxido (1:1), que previne a agregação e a formação de interações não covalentes, no entanto, os resultados terapêuticos foram pouco encorajadores (Selbo & Hasan, 2010). A conjugação com fragmentos de anticorpos pode ser superior em termos de velocidade de penetração e especificidade para o tumor, tendo sido demonstrados resultados *in vitro*, 70 vezes superiores aos do fotossensibilizador não conjugado (Pizova *et al*, 2012).

Os lipossomas constituem transportadores de fotossensibilizadores eficientes e seguros. Diversas formulações foram exploradas para tratamento e diagnóstico. Dependendo do seu carácter mais ou menos hidrofílico os fotossensibilizadores podem ser transportados quer na bicamada lipídica quer no núcleo aquoso o que, em termos de aplicação tópica, resulta em melhor penetração e, no caso da administração sistémica prolonga o tempo de circulação. A membrana lipossomal possibilita a conjugação com múltiplos ligandos de modo a melhorar as propriedades farmacocinéticas, farmacológicas e eficiência terapêutica, assim como direccionar para alvos sobreexpressos nos tumores. A encapsulação em lipossomas permite ainda controlar a libertação seletiva do fotossensibilizador e, assim, minimizar os efeitos secundários de fotossensibilidade (Derycke, 2004; Jin & Zheng, 2011).

Outro sistema de transporte são as nanopartículas que foram utilizadas para encapsular fotossensibilizadores no núcleo hidrofóbico. A camada exterior pode ser hidrofílica, constituída por polietilenoglicol (PEG) e, pode ser direccionada para alvos tumorais através de biomoléculas como anticorpos, aptameros ou péptidos (Verma *et al*, 2007).

CAPÍTULO III — FOTOSSENSIBILIZADORES E IMAGEM

Ao longo de todas as fases de tratamento do cancro são utilizadas várias técnicas de obtenção de imagem biomédica. A imagem constitui uma parte essencial dos protocolos de tratamento da doença oncológica e pode fornecer informação morfológica, estrutural, metabólica e funcional (Fass, 2008). Os recentes avanços das tecnologias de aquisição de imagem, o desenvolvimento de fármacos de diagnóstico e a fusão de metodologias de imagem biomédica, permitem observar eventos ao nível celular e molecular (Pandey *et al*, 2005). A imagem molecular é também extremamente útil na determinação do resultado terapêutico. Estes recursos podem também, do ponto de vista da investigação biomédica, contribuir para o desenvolvimento de novas terapêuticas, através do conhecimento da biodistribuição e da farmacocinética de medicamentos.

O desenvolvimento de compostos que permitam a obtenção de imagem e que tenham propriedades terapêuticas tem sido bastante investigado pela comunidade científica (Ethirajan *et al*, 2011). A teranóstica é um conceito recente que define a combinação de uma modalidade terapêutica e de uma modalidade de diagnóstico com a obtenção de imagem. Assim, é utilizado apenas um complexo numa dada concentração que funciona simultaneamente como traçador para obtenção de imagem e como terapêutica (Kelkar & Reineke, 2011).

O uso de porfirinas, clorinas e bacterioclorinas como fotossensibilizadores para PDT, apresentam vantagens únicas devido à capacidade de serem retidas no tecido tumoral, capacidade de produzir oxigénio singleto após exposição a radiação de comprimento de onda adequado e características de fluorescência que podem ser utilizadas para a sua deteção. Assim, a acumulação seletiva destes compostos no tecido tumoral, constitui uma vantagem que pode ser utilizada para obtenção de imagem, de modo minimamente invasivo (Ethirajan *et al*, 2011). Logo, os fotossensibilizadores, pelas suas propriedades espectrais e seletividade para as células tumorais, podem ser utilizados como sondas em imagem ótica (Ethirajan *et al*, 2011). Fotossensibilizadores baseados na porfirina mostraram ser capazes de detetar lesões na bexiga que não foram detetadas por cistoscopia convencional (Ethirajan *et al*, 2011). O Photofrin[®] é retido seletivamente nos tecidos tumorais em relação à maior parte das células normais, exceto no fígado, baço e rim. No caso do Photofrin[®], para deteção por imagem de metástases por imagiologia de fluorescência, são necessárias concentrações 80 a 90% inferiores às concentrações terapêuticas (Ethirajan *et al*, 2011). No entanto, a maior parte destes compostos, com afinidade para o tecido tumoral, apresenta uma diferença pequena entre as bandas de absorção e de emissão perto do infra-vermelho. Esta propriedade limita a utilização destas moléculas para estudos de imagiologia de fluorescência, uma vez que a

penetração da luz nos tecidos é eficiente apenas entre os 700 e 900 nm, zona do espectro em que a luz penetra vários centímetros no tecido, e são necessários compostos com o mínimo de autofluorescência nesta região espectral (Ethirajan *et al*, 2011). Assim, têm sido realizados esforços no sentido de obter agentes de imagem específicos do tumor através da preparação de conjugados, quer para imagem de fluorescência, quer para as outras metodologias disponíveis.

As imagens óticas, nomeadamente, imagiologia de fluorescência e de bioluminescência, tornaram-se importantes ferramentas na investigação biomédica. Estas técnicas permitem visualizar processos fisiológicos e patofisiológicos a nível celular e molecular com elevada especificidade, em vários modelos animais. Esta tecnologia é de fácil utilização e é reconhecida pela sua sensibilidade. No entanto, devido às características de absorção e de dispersão da luz nos tecidos, a sua resolução espacial é baixa e permite apenas a visualização a uma profundidade de alguns centímetros no tecido. Assim, esta tecnologia pode ter utilidade apenas para obter imagem em pequenos animais e, eventualmente na clínica, em situações particulares ou no decorrer de uma cirurgia. Atualmente, estão clinicamente aprovados dois compostos para imagem de fluorescência, a indocianina verde (ICG, do inglês *indocyanine green*) e o 5-ALA (Müller *et al*, 2013).

O desenvolvimento de sondas moleculares de emissão perto do infra-vermelho com elevada especificidade, seletividade e estabilidade é desejável para a obtenção de imagem (Pandey *et al*, 2005). Uma possibilidade para a obtenção de seletividade em oncologia é o recurso a alvos sobreexpressos nas células tumorais e explorá-los como alvos terapêuticos. No entanto, a conjugação de um emissor de fluorescência com moléculas para as quais as células tumorais são ávidas, como anticorpos, dendrímeros ou nanopartículas, muitas vezes apresentam problemas como, baixo rendimento na conjugação, proporção desconhecida de emissor de fluorescência ligado, processo de *quenching* da fluorescência, agregação dos conjugados, desestabilização no meio biológico, baixas taxas de difusão para o tumor, rápida captação ou eliminação pelo fígado e eventuais reações imunogénicas (Pandey *et al*, 2005).

A ressonância magnética nuclear depende da utilização de agentes de contraste para distinguir os tecidos normais dos tecidos tumorais. A seletividade para o tumor dos agentes de contraste disponíveis, depende de perturbações na permeabilidade vascular dos neovasos associados aos pequenos focos de células tumorais metastáticas, em particular nos gânglios linfáticos pouco aumentados ou normais (Ethirajan *et al*, 2011). Porfirinas associadas a átomos paramagnéticos foram avaliadas como agentes de imagem. A gadoporfirina-2, um meio de contraste com base em gadolínio, é captada preferencialmente pelos tecidos em necrose, pelo que poderia ser útil para a obtenção de imagem tumoral. No entanto, seria de particular importância obter um agente direcionado para as células tumorais metabolicamente ativas. Pandey e colaboradores desenvolveram uma série de trabalhos no sentido de obter um agente bifuncional para PDT e imagem por ressonância magnética nuclear. O composto HPPH (do inglês, *3-(10-hexyloxyethyl)-3-devinylpyropheophorbide-a*) está atualmente em ensaios clínicos de fase II e provoca baixa fotossensibilidade cutânea (Ethirajan *et al*, 2011). As nanopartículas de poliacrilamida também foram utilizadas para transportar um agente de contraste juntamente com o fotossensibilizador Photofrin[®], em que o direcionamento foi assegurado pelo péptido RGD. A encapsulação do fotossensibilizador tem vantagens,

nomeadamente a redução da fotossensibilidade cutânea e do tempo que medeia entre a administração e a irradiação, que pode passar de 24 para 1 hora. Este sistema foi avaliado em modelo animal de gliossarcoma e teve efeito terapêutico promissor (Kelkar & Reineke, 2011).

A medicina nuclear fornece informação funcional dos tecidos, de forma não invasiva, através da marcação de traçadores de determinadas vias metabólicas com isótopos radioativos. Os compostos marcados com radionúcleos emissores de partículas beta (β^-) têm sido usados principalmente para estudos *in vitro*, e os emissores de radiação gama ou de positrões são apropriados para imagens *in vivo*, com recurso a tomografia por emissão de fóton único (SPECT, do inglês *single photon emission computed tomography*) ou tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) (Ali & Lier, 2010).

As porfirinas e seus derivados foram estudados no sentido de se complexar com radionúcleos, quer para verificar o seu potencial como agentes de imagem, quer para conhecer a sua biodistribuição, identificar os órgãos-alvo, estudar a sua farmacocinética e as vias de excreção, e otimizar os protocolos de tratamento (Ali & Lier, 2010; Kadish *et al*, 2010).

Através da marcação dos compostos com carbono-14, Obwegeser e colegas compararam a biodistribuição do Foscan[®] com o 5-ALA num modelo animal de glioma e concluíram que para este caso específico os fotossensibilizadores apresentam biodistribuição distinta, sendo o primeiro adequado para tratamento e o segundo para diagnóstico (Obwegeser *et al*, 1998), uma vez que em PDT é assumido que os tempos de irradiação do tumor correspondem ao momento de maior concentração de fotossensibilizador nas células tumorais. Cramers e colaboradores estudaram a influência da concentração de fotossensibilizador no tumor, tecidos circundantes e plasma na resposta à terapêutica. Para isso, recorreram a um modelo animal de mesotelioma a que administraram o fotossensibilizador Foscan[®] marcado com carbono-14. Curiosamente, os autores não encontraram uma correlação significativa entre o resultado terapêutico e a concentração no tumor, no entanto, verificaram uma correlação significativa com a concentração plasmática (Cramers *et al*, 2003). Também através da marcação com carbono-14, Blant e colaboradores concluíram que os locais de acumulação do Foscan[®] até às 24h, são o fígado, os rins, o endotélio e a neoplasia (Blant *et al*, 2002).

Com o objetivo de desenvolver agentes bifuncionais para PDT e medicina nuclear, Pandey e colaboradores conjugaram o fotossensibilizador HPPH a um ligando aminoetanotiol. A biodistribuição do complexo marcado com tecnécio-99 metastável (^{99m}Tc) mostrou elevada concentração do traçador no tumor, todavia, o curto tempo de meia-vida do radioisótopo não permitiu obter imagens satisfatórias, uma vez que a acumulação máxima do complexo no tecido tumoral será às 24h (Pandey *et al*, 2005; Ethirajan *et al*, 2011). Contudo, a utilização de um isótopo de tempo de vida mais longo poderá permitir conhecer melhor a biodistribuição em tempos mais tardios. Estudos com o mesmo composto marcado com iodo (¹²⁴I) foram promissores *in vitro* e *in vivo*, com 100% de resposta completa em ratinhos tratados com 1,5 $\mu\text{M}/\text{Kg}$ e 128 J/cm^2 24h após a injeção, e foi possível obter imagens PET e de fluorescência (Pandey *et al*, 2005).

Ao longo dos últimos anos, realizaram-se alguns estudos em que os fotossensibilizadores foram marcados com ^{99m}Tc . O ^{99m}Tc é, possivelmente, o radioisótopo mais utilizado em medicina nuclear, devido às suas características favoráveis, nomeadamente, disponibilidade, preço, tempo de meia-vida de 6 horas e energia de 140 KeV, ideais para a aquisição de imagens através da câmara gama (Saha, 1998; Kadish *et al*, 2010). Vários estudos em que fotossensibilizadores de base tetrapirrólica foram marcados com ^{99m}Tc demonstraram a retenção no tumor (Wong *et al*, 1983; Shetty *et al*, 1995; Chatterjee *et al*, 1997). Quando o Photofrin[®] foi marcado com ^{99m}Tc utilizando o cloreto estanhoso como agente redutor, foi possível atingir uma eficiência de marcação superior a 95% e estabilidade *in vivo*. A biodistribuição revelou acumulação no fígado, nos pulmões, nos rins e no baço após 30 minutos e excreção urinária (Fakhar-e-Alam *et al*, 2010a). O fotossensibilizador Photosan também foi marcado com ^{99m}Tc com eficiência superior a 90% e os estudos de biodistribuição mostraram que o complexo é captado preferencialmente no tecido tumoral (Babbar *et al*, 2000).

O fotossensibilizador de base clorina hidrossolúvel T34BCPC (de base porfirina, do inglês, *5,10,15,20-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl]chlorin*), foi marcado com ^{99m}Tc e os estudos de biodistribuição comprovaram acumulação preferencial em tumores mamários e em glioma e excreção pelas vias hepatobiliar e urinária (Murugesan *et al*, 2002).

O radionuclídeo rénio-188 (^{188}Re) também já foi utilizado para marcar porfirinas. Este isótopo tem um tempo de meia-vida de 17 horas. Durante o seu decaimento radioativo, emite partículas β^- , que garantem a possibilidade de realizar radioterapia metabólica e raios gama de 155 keV, adequados para aquisição de imagem através de uma câmara gama (Volkert *et al*, 1991; Saha, 1998). Assim, um fotossensibilizador marcado com este radionuclídeo, além das suas propriedades terapêuticas fotodinâmicas, pode ainda potencialmente ser usado como traçador e como fármaco para radioterapia metabólica.

Num estudo com um fotossensibilizador porfirínico (5,10,15,20-tetrakis[3,4-bis(carboximetileneoxi)fenil]porfirina) marcado com ^{188}Re obteve-se uma eficiência de 98% e estabilidade razoável. Os estudos em modelo animal foram realizados em ratinhos portadores de linfoma do timo e de fibrossarcoma. A retenção tumoral foi satisfatória com atividade elevada no sangue, fígado e rim às 24h. Os resultados terapêuticos foram promissores e mostraram que o linfoma do timo é comparavelmente mais sensível do que o fibrossarcoma (Sarma *et al*, 2010). Outro fotossensibilizador porfirínico, (T34CPP, meso-tetrakis[3,4-bis(carboximetileneoxi)fenil]porfirina) também foi marcado com ^{188}Re e a biodistribuição revelou baixa retenção nos órgãos vitais, exceto no fígado, e elevada razão tumor/músculo e tumor/sangue. Os autores concluíram que o composto é candidato a estudos de radioterapia metabólica (Jia *et al*, 2008).

Para além da marcação com ^{99m}Tc e ^{188}Re , vários derivados de porfirina foram também marcados com gálio-68, ^{68}Ga , de modo a permitir a aquisição de imagem do tumor através de microPET e confirmar a estabilidade dos complexos *in vitro* e *in vivo* (Zoller *et al*, 2013). A biodistribuição de fotossensibilizadores tetrafenil-porfirina marcados com ^{67}Ga revelou que os complexos são eliminados maioritariamente por via urinária com baixa captação pelo fígado (Fazaeli *et al*, 2011).

No desenvolvimento de fotossensibilizadores, um sistema de avaliação *in vivo* da farmacocinética, assim como a determinação dos órgãos alvo, é fundamental. Shi e colaboradores desenvolveram um complexo porfirina-ácido fólico como agente teranóstico para terapêutica e para imagem ótica. Posteriormente avaliaram também a transformação como traçador PET por marcação com cobre-64 (^{64}Cu) e verificaram que o complexo acumula nos tumores que expressam o recetor folato com razão tumor-músculo elevada ($8,88 \pm 3,60$) após 24h. A marcação com ^{64}Cu é uma estratégia interessante para transformar fotossensibilizadores em traçadores para PET, viasto que assegura a biodistribuição favorável, a farmacocinética e a captação tumoral seletiva (Shi *et al*, 2011). Mukai e colaboradores também propuseram a radiomarkação dos fotossensibilizadores, de base porfirina, com o cobre-64 (Mukai *et al*, 2013). Os autores, anteriormente citados, estudaram um complexo de porfirina associado a BBN, um análogo da bombesina que interage com recetores GRP (do inglês, *gastrin release peptide*). Os estudos por PET mostraram que o complexo acumula no fígado e nos rins, circula no sangue durante um longo período de tempo, e distribui uma baixa concentração no tumor (Mukai *et al*, 2013). Os compostos MPC5(n), (fotossensibilizadores de base ftalocianina, do inglês, *sulfonated metallo phthalocyanines*) marcados com ^{64}Cu são bons traçadores para PET. A biodistribuição mostrou diferenças entre os vários derivados e apenas os compostos anfífilicos foram detetados no tumor (Ranyuk *et al*, 2011).

A marcação de porfirinas com radionuclídeos para obtenção de imagem em Medicina Nuclear, pela sua marcação com emissores gama ou emissores de positrões, tem sido alvo de diversos estudos. No entanto, esta área de investigação ainda carece de maior desenvolvimento, sendo necessária a marcação de diferentes porfirinas que permitam a sua utilização em ambas as vertentes diagnóstica e terapêutica.

CAPÍTULO IV — OBJETIVOS E CONTEXTO EXPERIMENTAL

A terapia fotodinâmica é uma das opções terapêuticas em oncologia, com várias potencialidades e interesse crescente, que pode encadear o diagnóstico e o tratamento. O conhecimento dos seus mecanismos de ação e a otimização de estudos experimentais são essenciais à sua aplicação na prática clínica. Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver novos fotossensibilizadores para otimizar a aplicação da terapia fotodinâmica.

Deste modo, pretendeu-se sintetizar e estudar um novo fotossensibilizador, o BBr2HPC, tendo em conta os conhecimentos já adquiridos neste grupo de investigação. A caracterização sob o ponto de vista fotoquímico, encontra-se no capítulo V. Após este patamar, tornou-se essencial estudar o potencial terapêutico, inicialmente através de estudos *in vitro* tendo como alvo diversos tipos de células tumorais. Com este objetivo foram realizados estudos para avaliar o seu efeito, assim como as vias moleculares de atuação que poderiam estar envolvidas. Neste sentido, estudou-se também a captação e a localização subcelular, as vias de morte celular, as repercussões a nível nuclear, bem como o stresse oxidativo a que as células em estudo ficariam sujeitas. A realização destes objetivos propostos está patente no capítulo VI.

De modo a estudar o potencial efeito *in vivo* numa fase pré-clínica, no capítulo VII concretizou-se o objetivo de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica baseada no fotossensibilizador BBr2HPC na progressão tumoral de xenotransplantes. A terapia fotodinâmica é reconhecidamente um procedimento com efeitos secundários escassos, uma vez que a irradiação é limitada ao local alvo de tratamento. Reforçando o intuito de aplicação clínica foram realizados estudos de biodistribuição, com o objetivo de esclarecer a possibilidade de aparecimento de efeitos secundários e prever eventual toxicidade.

Simultaneamente, sabendo que determinados fotossensibilizadores exibem uma elevada seletividade para as células tumorais, a associação com a medicina nuclear pode possibilitar a aplicação de um meio complementar de diagnóstico. Assim, pretendeu-se desenvolver um fotossensibilizador com potencial de marcação com o radioisótopo tecnécio-99 metastável, o que se cumpriu no capítulo VIII. No capítulo IX, cumpriu-se o objetivo de otimizar o procedimento de marcação radioativa do fotossensibilizador previamente sintetizado. Mais uma vez, auxiliando-nos do contexto inerente aos estudos *in vivo*, foram feitos estudos de biodistribuição com o intuito de prever esta potencial utilização com um método não invasivo, patente no capítulo X.

PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL

SECÇÃO A – TERAPÊUTICA

CAPÍTULO V — ESTUDOS DE QUÍMICA

Material e Métodos

Antes da sua utilização os solventes foram purificados recorrendo a métodos usuais. O diclorometano foi seco sobre CaH_2 e destilado. O clorofórmio foi neutralizado com alumina ativa neutra. O pirrol foi destilado antes de ser utilizado. Para a cromatografia em coluna foi utilizada sílica-gel 60 (0,035=0,070mm) da Fluka. O 3-hidroxibenzaldeído (Sigma-Aldrich) foi recristalizado em água. O 2-bromo-5-hidroxibenzaldeído foi preparado através da bromação em ácido acético, tal como descrito (Beja *et al*, 2000). O 9,10-dimetilantraceno (DMA; Sigma-Aldrich) foi utilizado sem purificação adicional.

Os espectros de ressonância magnética nuclear protónica (RMN 1H) foram obtidos recorrendo a espectrómetro Bruker Advance II de 400 MHz. O padrão interno utilizado foi o tetrametilsilano (TMS). De acordo com a convenção habitual apresenta-se o desvio químico em partes por milhão (δ , ppm). A primeira letra dentro do parêntesis representa a multiplicidade do sinal, que pode ser sob a forma de singleto (s), duplete (d), tripleto (t) ou multiplete (m), a seguir apresenta-se a integração do sinal (o número de prótons a que corresponde) e, finalmente, a atribuição do sinal. Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro Thermo Finnigan LCQ Advantage com ionização por electrospray (ESI). Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram registados num espectrofotómetro Hitachi U-2001 e num Shimadzu UV-2100. Os espectros de fluorescência foram obtidos num espectrofotómetro Spex Fluorolog 3.

Síntese e caracterização do fotossensibilizador

A síntese de 5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)clorina, que passará a ser designada por BBr2HPC, realiza-se por redução da correspondente porfirina. Para a síntese da porfirina adicionou-se 3,4 mmol de dipirrilmetano e 4,1 mmol de 2-bromo-5hidroxibenzaldeído num balão com 650 ml de diclorometano. Esta solução foi agitada durante 20 minutos à temperatura ambiente em atmosfera de azoto. Posteriormente adicionaram-se 3,5 mmol de ácido trifluoracético e deixou-se a reagir durante a noite para maximizar o rendimento de reação. Neutralizou-se com trietilâmina e adicionou-se 5,1 mmol de dicianodictloroquinona (DDQ). O produto de reação foi avaliado por espectroscopia de visível-ultravioleta de modo a avaliar o aparecimento da banda Soret até à obtenção de um

valor máximo. Após a evaporação a porfirina foi purificada por cromatografia em gel de sílica, utilizando diclorometano e acetato de etilo ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 60/40) como eluente. Obteve-se um sólido violeta.

Num balão 90 mg da porfirina foram dissolvidos em 7 ml de piridina e colocados num banho a 110 °C. Cerca de 360 mg de carbonato de potássio foram adicionadas ao balão. Após dissolução, quantidades de cerca de 50 mg de tosil-hidrazida foram adicionadas e, ao mesmo tempo, foi controlada por espectrometria de visível, a reação até que ocorresse a conversão completa da porfirina à bacterioclorina. Posteriormente, destilou-se a piridina sob vácuo e adicionou-se acetato de etilo ao resíduo para separar os sais. À solução resultante adicionou-se em pequenas porções, sob agitação, 100 mg de p-cloranil até observar a conversão da bacterioclorina em clorina. O produto final foi lavado com solução de hidrogenossulfato de sódio, água e solução de ácido clorídrico a 0,1 M). Secou-se a fase orgânica sobre sulfato de sódio, evaporou-se e isolou-se o produto por cromatografia de coluna em gel de sílica, utilizando inicialmente uma fase móvel de acetato de etilo/diclorometano, numa proporção de 50/50, que foi progressivamente substituída por metanol/diclorometano até uma proporção de 10/90. A fração verde foi evaporada e recristalizada em diclorometano/metanol. Foram obtidos 50 a 70 mg de produto final.

A análise por ressonância magnética nuclear em clorofórmio deuterado (CDCl_3) apresentou os seguintes sinais: 9,33 (s, 1H, H meso); 9,10 (d, 1H, J = 4,5 Hz, H_α , H_β); 9,00 (s, 1H, H meso); 8,94 (d, 1H, J = 4,2 Hz, H_α , H_β); 8,79 (d, 1H, J = 4,5 Hz, H_α , H_β); 8,66 (d, 1H, J = 4,6 Hz, H_α , H_β); 8,48 (d, 1H, J = 4,2 Hz, H_α , H_β); 8,29 (d, 1H, J = 4,2 Hz, H_α , H_β); 7,58 - 7,53 (m, 2H, Ar); 7,42 - 7,30 (m, 4H, Ar); 7,16 - 7,07 (m, 2H, Ar); 4,69 (sl, 2H, H_β - clorina); 4,28 (sl, 2H, H_β - clorina); - 1,94 (sl, 2H, NH). A espectrometria de massa com ionização de electrospray do composto apresentou um valor de $[\text{MH}]^+$ 654,414.

Todos os estudos foto-físicos foram realizados utilizando soluções do fotossensibilizador BBr2HPC em metanol. Os coeficientes de extinção foram calculados através da lei de Beer-Lambert, com soluções de concentração a 1×10^{-4} a 1×10^{-7} M. Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando soluções de concentração 1×10^{-7} M.

Para a medição do rendimento quântico de fluorescência foi preparada uma solução do composto em tolueno com uma absorvância de 0,02 obtida por excitação a 417 nm. Esta solução foi purgada com azoto e mantida no escuro até ao momento da medição. Utilizou-se o rendimento quântico fluorescência da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) igual a 0,10 como valor de referência (Pineiro *et al*, 1998).

A quantificação espectralfluorimétrica foi realizada com recurso a uma curva de calibração com concentrações entre 4×10^{-6} e 6×10^{-9} M. Com os dados experimentais foi possível realizar um ajuste linear no *software Origin 8.0* e obter a equação da curva construída.

Rendimento quântico de oxigénio singleto

Utilizou-se a foto-oxidação do 9, 10-dimetilantraceno (DMA) para determinar o rendimento quântico da formação de oxigénio singleto dos sensibilizadores, utilizando a fotólise no estado estacionário. Um mililitro de solução de DMA na concentração de 1×10^{-4} M, e 2 ml de solução sensibilizadores com absorvância igual a 417 nm foram

misturados numa célula de quartzo com um caminho de 1 cm. A amostra foi saturada em ar e mantida sob agitação magnética, de forma a obter irradiação uniforme em toda a amostra. A irradiação foi realizada com uma lâmpada de halogéneo de 50 watts, a radiação infravermelha foi filtrada recorrendo a um filtro de água de 5 cm de espessura, e filtros de comprimentos de onda adequados (400 a 600 nm) foram selecionados para filtrar a radiação visível não desejada. Os espectros de absorção de DMA e da solução de sensibilizador correspondem à sobreposição dos espectros dos componentes em separado. A foto-oxidação do DMA foi acompanhada pela diminuição da absorvância no comprimento de onda de 375nm em etanol. Todas as soluções foram utilizadas imediatamente após a preparação.

Os rendimentos quânticos do oxigénio singleto para os sensibilizadores foram obtidos através da relação entre os declives da região linear do gráfico semi-logarítmico para o decaimento da absorção do DMA ($\ln A_0/A$) *versus* tempo, obtido por ajuste através do método dos mínimos quadrados quando medidos através de soluções do fotossensibilizador e soluções referência em condições semelhantes. O desvio padrão dos dados de cinética, calculado para as diferentes amostras preparadas foi inferior a 10%.

Resultados

A estrutura química do fotossensibilizador BBr2HPC sintetizado está representada na Figura 14. O macrociclo terapirrólico 5,15-bis(2-bromo-3-hydroxyfenil)porfirina, precursor da síntese do fotossensibilizador BBr2HPC foi obtido com um rendimento de reação de 11%. O fotossensibilizador BBr2HPC foi obtido com um rendimento de 60%.

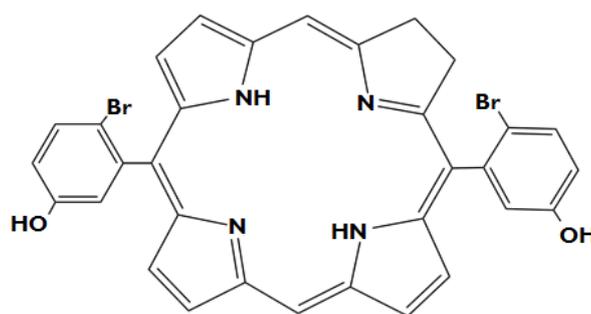


Figura 14: Estrutura química do fotossensibilizador BBr2HPC.

A espectrometria de massa do composto BBr2HPC ($C_{32}H_{22}N_4O_2Br_2$) apresentou um valor de $[MH]^+$ 654,414 para um valor teórico de $[M]^+$ 654,3507. O espectro de ressonância magnética nuclear protônica apresentou os sinais: 9,10 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H_α , H_β), 8,94 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H_α , H_β), 8,79 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H_α , H_β) correspondentes aos seis hidrogênios dos pirróis que não foram modificados e os sinais 4,69 (sl, 2H, H_β clorina), 4,28 (sl, 2H, H_β clorina) correspondentes aos hidrogênios do pirrol que sofreu a redução. Tal como foi referido, os valores correspondem ao desvio químico em partes por milhão (δ , ppm), a primeira letra dentro do parêntesis representa a multiplicidade do sinal, a seguir apresenta-se a integração do sinal e, finalmente, a atribuição do sinal.

Os espectros de absorção, de emissão de fluorescência e de excitação de fluorescência estão representados na Figura 15. O espectro de absorção do fotossensibilizador em metanol mostra dois tipos de transições diferentes, entre 395 e 605 nm. Observa-se banda Soret, típica deste tipo de compostos, correspondente a uma transição B(0,0) em 405 nm e as bandas Q em 502, 529, 595 e 645 nm. O coeficiente de absorção das bandas é de $8,3 \times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$, $1,0 \times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$, $5,9 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$, $5,5 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$ e $1,5 \times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$, respetivamente. Para concentrações entre 1×10^{-7} a 1×10^{-4} M a absorvância está de acordo com lei de Beer-Lambert.

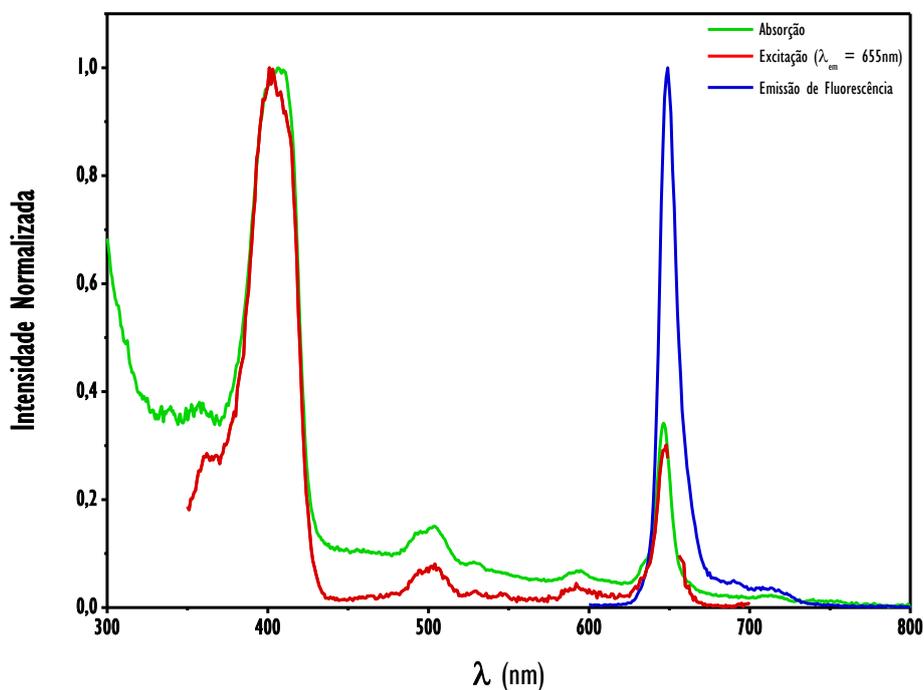


Figura 15: Espectros de absorção e de emissão de fluorescência do BBr2HPC. Os valores máximos de absorção e de emissão de fluorescência foram normalizados a 1 utilizando o Software *Origin 8*. Os resultados expressam a média de três experiências independentes.

O espectro emissão de fluorescência apresenta duas bandas em 649 e 715 nm. A primeira transição apresenta um desvio de Stokes de 4 nm, característico deste tipo de macrociclos. O rendimento quântico de fluorescência foi de 0,02. O espectro de excitação de fluorescência utilizando como comprimento de emissão 649 nm, mostra elevada correspondência com o espectro de absorção confirmando a origem da luz emitida.

A linearidade observada entre a emissão de fluorescência e a concentração do fotossensibilizador BBr2HPC foi a base do desenvolvimento da metodologia da quantificação espectralfluorimétrica do fotossensibilizador utilizadas nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os espectros e emissão de fluorescência e as retas de calibração obtidas com os valores experimentais estão representados na Figura 16.

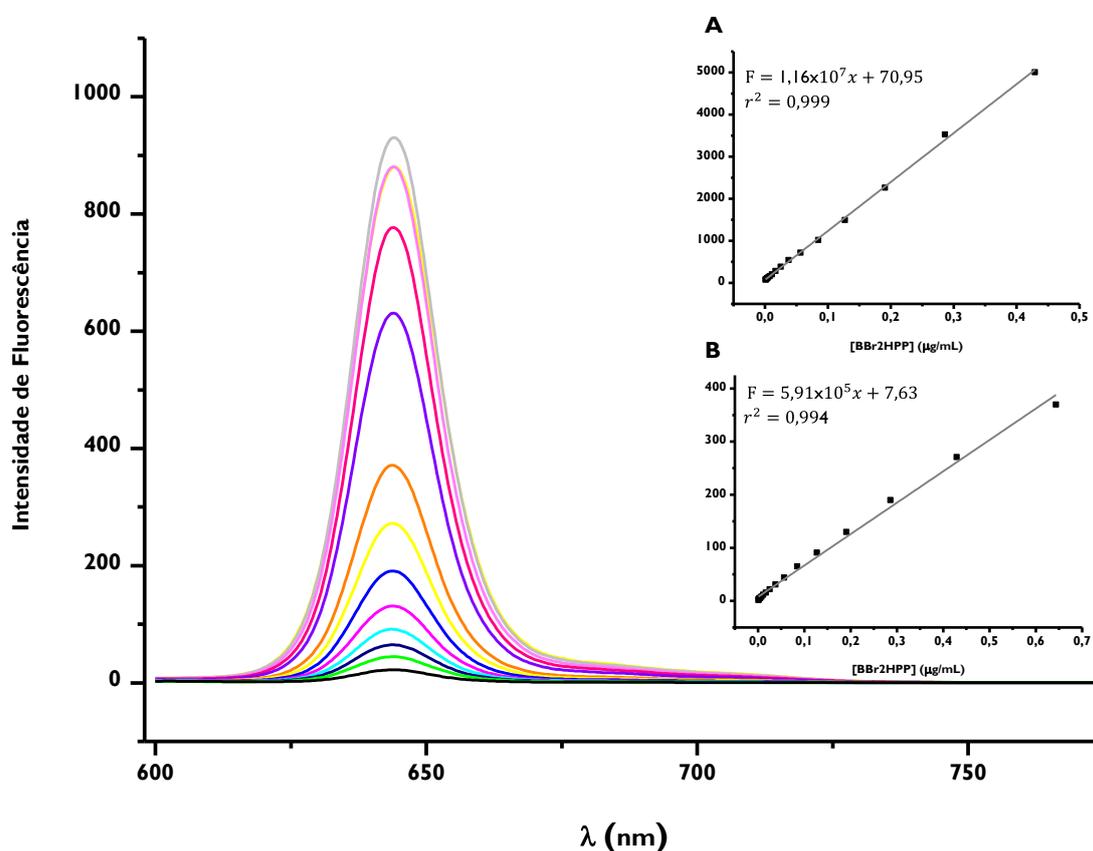


Figura 16: Espectros de intensidade de fluorescência de uma série de soluções de concentração conhecida de BBr2HPC utilizados para construir as curvas padrão. Utilizou-se uma solução de fotossensibilizador em metanol de concentração conhecida e diluiu-se sucessivamente até atingir o limite de detecção do espectrômetro de fluorescência utilizado. A medição da intensidade de fluorescência foi realizada tendo em conta o comprimento de onda de absorção de 405 nm e o comprimento de onda de emissão de fluorescência de 645 nm. A: Curva de calibração obtida por ajuste linear entre a concentração de fotossensibilizador e a área debaixo da curva do pico dos 645 nm. B: Curva de calibração obtida por ajuste linear entre a concentração de fotossensibilizador e a altura do pico dos 645 nm.

O ajuste linear entre a concentração do fotossensibilizador e a área debaixo da curva do pico dos 645 nm permitiu definir a seguinte curva de calibração:

$$F = 1,16 \times 10^7 x + 70,95$$

e o ajuste linear entre a concentração de fotossensibilizador e a altura do pico dos 645nm permitiu definir a seguinte curva de calibração:

$$F = 5,91 \times 10^5 x + 7,63$$

em que F corresponde à intensidade de fluorescência e x corresponde à concentração em $\mu\text{g/ml}$.

O rendimento quântico da formação de oxigénio singlete, ϕ , foi medido por fotólise no estado estacionário utilizando DMA como alvo, obtendo-se um valor de $0,88 \pm 0,08$.

Discussão

O fotossensibilizador BBr2HPC, representado na Figura 14 foi sintetizado adaptando uma metodologia desenvolvida anteriormente (Laranjo, 2010; Serra *et al*, 2010). Em primeiro lugar o macrociclo terapirrólico 5,15-bis(2-bromo-3-hydroxyfenil)porfirina, reagente fundamental para a obtenção do fotossensibilizador, foi sintetizado utilizando uma metodologia em dois passos, a síntese do dipirrilmetano e a sua condensação com o aldeído (Laranjo, 2010; Serra *et al*, 2010). É este produto que após redução com diimida origina a correspondente clorina. A clorina foi obtida utilizando como agente redutor a p-tuloenosulfonilhidrazida, reagente clássico para este tipo de reações que envolvem a introdução de dois hidrogénios na estrutura do macrociclo tetrapirrólico (Whitlock *et al*, 1969).

Esta metodologia baseia-se no carater não aromático das duas ligações duplas em anéis pirrólicos em posições opostas no macrociclo tetrapirrólico, habitualmente designados como B e D. Este tipo de redução que permite a transformação da porfirina em clorina e em bacterioclorina não é seletiva. As mesmas condições de reação permitem obter a forma reduzida da clorina e a forma reduzida da bacterioclorina, pelo que é necessário o seguimento da reação ao longo do tempo de modo a evitar a formação da bacterioclorina. Nos casos em que o máximo de formação da clorina coincide com a formação da bacterioclorina esta pode ser reoxidada através da

utilização de oxidantes como a dicianodiclороquinona, no entanto, a obtenção deste tipo de compostos com elevado grau de pureza é difícil pelo que é sempre possível conter alguma quantidade de porfirina.

A caracterização química do fotossensibilizador BBr2HPC é concordante com a obtida no caso de clorinas mesosubstituídas (Pineiro *et al*, 2001).

Tal como característico destes compostos a banda Q de maior comprimento de onda tem um coeficiente de absorção muito superior ao das outras bandas Q e ao da correspondente porfirina (627nm: $5,27 \times 10^2$; ver anexos Figura 74) (Laranjo, 2010; Serra *et al*, 2010). A redução do pirrol do macrociclo tetrapirrólico proporciona características fotoquímicas que estão intimamente relacionadas com a utilização deste composto como fotossensibilizador para PDT. A banda Q de absorção localizada dentro da janela terapêutica apresenta um desvio para o vermelho do comprimento de onda do máximo de 18 nm em relação à porfirina correspondente, o que é significativo em relação à penetração da luz nos tecidos, esquematizada na Figura 8. Além disto, o coeficiente de extinção aumenta 10 vezes o que significa que 10 vezes mais fótons são absorvidos da fonte de luz e portanto há melhor aproveitamento da irradiação. Para concentrações entre 1×10^{-7} e 1×10^{-4} M não se observou nenhum desvio à lei de Beer-Lambert, o que indica que o fotossensibilizador não tem tendência para formar agregados.

Estas características do espectro de absorção, favoráveis no que concerne à utilização do composto como fotossensibilizador para PDT, refletem-se no espectro de emissão. Apesar de, tal como característico destes compostos, o desvio de Stokes ser pequeno, neste caso de 4 nm, a banda de emissão de fluorescência mais intensa também apresenta um desvio para o vermelho em relação à porfirina correspondente, com um máximo em 654 nm. Este valor é significativo quando temos em consideração que pretendemos realizar determinações da clorina em ambientes biológicos e que, por exemplo, os pigmentos próprios do sangue emitem antes dos 650 nm. O espectro de excitação de fluorescência, referente à banda de emissão máxima, apresenta correspondência com o espectro de absorção, o que confirma a origem dos fótons de emissão e verifica a pureza do composto. O rendimento quântico de fluorescência aumenta em relação à porfirina correspondente, no entanto, sem diminuição no rendimento de formação de ROS, em particular de oxigénio singleto. O rendimento quântico da formação de oxigénio singleto é significativamente superior em relação a correspondente porfirina (Laranjo, 2010; Serra *et al*, 2010).

Do ponto de vista fotoquímico, o composto BBr2HPC tem características apropriadas para a utilização como fotossensibilizador em PDT e que são superiores às da porfirina correspondente. Pretende-se esclarecer se o mesmo acontece *in vitro* e *in vivo*.

CAPÍTULO VI — ESTUDOS *IN VITRO*

Material e Métodos

Culturas Celulares

Após a síntese e caracterização do composto BBr2HPC pretendeu-se avaliar a sua citotoxicidade e potencial efeito terapêutico como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica no tratamento de cancro. Assim, neste trabalho utilizaram-se três linhas celulares humanas de diferentes tecidos tumorais, uma de cancro colorretal, uma de cancro do esófago e uma de melanoma. A linha celular de adenocarcinoma colorretal designa-se por WiDr e a linha celular de melanoma designa-se por A375. Ambas foram obtidas à *American Type Culture Collection* (ATCC, CCL-218 e CRL-1619, respetivamente). A linha celular de carcinoma do esófago designa-se por OE19 e foi obtida à *European Collection of Cell Cultures* (ECCC, JROECL19). As linhas celulares foram descongeladas e propagadas em cultura aderente de acordo com as recomendações dos fornecedores. Assim, para todos os estudos, as linhas celulares foram mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 95 % de ar e 5 % de CO₂ em incubadora HeraCell 150. Para as linhas celulares WiDr e A375 utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Sigma F7524), 250 µM de piruvato de sódio (Gibco 11360), e 1 % de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml estreptomicina; Sigma A5955). Para a linha celular OE19 utilizou-se o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI, Sigma R6504), suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 1 mM de piruvato de sódio e 1 % de antibiótico.

Para a realização dos estudos *in vitro* foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para isso, as culturas celulares foram incubadas com 2 ml de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25 % (Sigma T4049) durante cinco minutos a 37 °C para que ocorra a separação celular. De seguida, para inativar a tripsina, adicionaram-se 5 ml de meio de cultura e centrifugou-se a suspensão celular a 200 G durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R). Após a centrifugação, os *pellets* foram suspensos num volume conhecido de meio de cultura. Procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular corada com azul de tripano, em câmara de *neubauer*, num microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS 100) com ampliação de 100 vezes. Após a contagem, o volume das suspensões celulares foi ajustado com meio de cultura, de forma a obter a concentração celular pretendida para cada estudo.

Tratamento Fotodinâmico

O fotossensibilizador BBr2HPC foi solubilizado numa concentração de 1 mg/ml numa mistura ternária de água (H₂O), polietilenoglicol 400 (PEG₄₀₀) e etanol (EtOH) (50:30:20, v/v/v) sendo obtidas as concentrações desejadas por diluições sucessivas no mesmo solvente. Para todos os estudos prepararam-se diluições do fotossensibilizador de concentração tal que permitiu administrar sempre um volume de 1% em relação ao volume de meio de cultura em que as culturas celulares foram incubadas.

As culturas celulares submetidas ao tratamento fotodinâmico foram incubadas sempre durante 24 horas com as concentrações pretendidas de fotossensibilizador. Após este período de tempo, realizou-se uma lavagem com tampão de fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662), com pH a 7,4, que garantiu que todo o fotossensibilizador não internalizado pelas células fosse removido, e colocaram-se em meio de cultura novo. Em todos os estudos as culturas foram irradiadas com um fluxo de fótons de 7,5 mW/cm² até atingir um total de 10 J. A irradiação para o tratamento fotodinâmico foi realizada recorrendo a uma fonte de luz fluorescente equipada com um filtro vermelho ($\lambda_{cut\ off} < 560\text{nm}$). As taxas de fluência da luz foram medidas com um radiómetro (Gigahertz-Optic, X97).

A avaliação pelas metodologias descritas de seguida foi realizada 2 horas e 24 horas após o tratamento fotodinâmico.

Estudos de citotoxicidade

Após síntese e caracterização do fotossensibilizador BBr2HPC pretendeu-se avaliar a sua citotoxicidade nas células tumorais humanas referidas (WiDr, A375 e OE19), de modo a comprovar o seu potencial efeito terapêutico.

Atividade Metabólica

Para avaliar o efeito dos fotossensibilizadores na atividade metabólica das células foi realizado o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Este composto é reduzido por células metabolicamente ativas devido à ação das enzimas desidrogenases, principalmente através da ação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a succinato desidrogenase ou succinato-coenzima Q redutase. As desidrogenases têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor azul escura que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectralfotométricos. Assim, este método constitui uma forma indireta de avaliar a função mitocondrial da célula (Lodish *et al*, 2008) e a quantidade de cristais de formazano obtidos é diretamente proporcional à atividade metabólica da célula.

Para a realização deste estudo foram preparadas suspensões celulares das células WiDr, OE19 e A375. A concentração celular de cada suspensão foi ajustada a 8×10^5 células/ml com meio de cultura respetivo de cada

linha celular. As suspensões foram distribuídas por placas de 48 poços, contendo cada poço um volume final de 600 μL . Estas placas foram incubadas durante a noite de forma a permitir a adesão das células às mesmas.

O sensibilizador BBr2HPC foi administrado em concentrações variáveis entre 1 μM e 10 μM . Em todos os ensaios foram realizados dois controlos: culturas celulares não tratadas e culturas celulares sujeitas ao veículo de administração do sensibilizador, neste caso a solução $\text{H}_2\text{O}/\text{PEG}_{400}/\text{EtOH}$ (50/30/20, v/v/v). A análise da atividade metabólica foi realizada às 2 e às 24 horas após o tratamento fotodinâmico.

Para a avaliação da atividade metabólica o meio das culturas celulares foi aspirado e procedeu-se a uma lavagem com PBS, de cada poço. Posteriormente, em cada poço, colocaram-se 100 μL de uma solução de MTT (0,5 mg/ml; Sigma M2128) em PBS, com pH de 7,4, e incubou-se no escuro a 37 °C durante 4 horas. De forma a solubilizar os cristais de formazano obtidos, acrescentou-se a cada poço 100 μL de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação durante 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi, posteriormente, homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços (Sarstedt 83.1835), e a absorvância foi quantificada a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotómetro Biotek® Synergy HT.

Uma vez que na terapia fotodinâmica a seletividade está na dependência da irradiação, para avaliar a toxicidade do sensibilizador sintetizado, realizou-se a avaliação da atividade metabólica numa linha celular humana não tumoral previamente exposta ao sensibilizador. A linha celular escolhida foi de fibroblastos designada por HFF1, também adquirida à ATCC. Esta linha celular foi recebida, descongelada e cultivada em cultura aderente de acordo com as recomendações do fornecedor. A linha celular foi mantida a 37 °C numa atmosfera humidificada com 95 % de ar e 5 % de CO_2 em incubadora HeraCell 150. Utilizou-se meio de cultura DMEM suplementado com 15 % de soro bovino fetal, 250 μM de piruvato de sódio e 1 % de antibiótico.

Para a realização dos estudos de citotoxicidade, as células foram incubadas em placas de 48 poços com o fotossensibilizador de acordo com o mesmo procedimento já descrito e o ensaio do MTT foi realizado de acordo com a metodologia referida anteriormente.

A atividade metabólica foi expressa como percentagem da atividade metabólica das culturas submetidas ao tratamento fotodinâmico em relação à atividade metabólica das culturas tratadas apenas com o veículo de administração do sensibilizador. Este procedimento permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar a concentração dos sensibilizadores que inibe a atividade metabólica das culturas em 50 % (IC_{50} , do inglês *half maximal inhibitory concentration*). Os resultados obtidos foram analisados, processados no programa OriginPro 8.0 e ajustados a uma curva sigmoide de acordo com a equação:

$$AM = \frac{100}{1 + e^{(\log x_0 - \log C) \times p}}$$

onde AM representa a atividade metabólica, C a concentração, p o declive da região central da sigmoide e x_0 o IC_{50} . Foram obtidos os intervalos de confiança a 95 % para o IC_{50} a partir dos parâmetros obtidos pelo ajuste da curva ($\log x_0$ e respetivo erro padrão).

Viabilidade Celular

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) permite avaliar a viabilidade celular por correlação com o conteúdo proteico total. A sulforrodamina B é um corante arroxeadado, aniónico e com afinidade para os aminoácidos, aos quais se liga de forma electrostática e dependente do pH. Sob condições ácidas liga-se aos aminoácidos das proteínas celulares e, sob condições alcalinas, pode ser extraído. Após fixação, solubilização e medição por métodos espectrofotométricos, os resultados obtidos correlacionam-se com o número de células através do conteúdo proteico total (Papazisis *et al*, 1997; Voigt, 2005; Vichai & Kirtikara, 2006).

Para a realização deste estudo prepararam-se suspensões celulares com 10^6 células/ml das linhas celulares WiDR, A375 e OE19, que se distribuíram por placas de 24 poços e que se incubaram durante a noite de forma a permitir a adesão das células ao substrato. O sensibilizador BBr2HPC foi administrado nas concentrações de 5 nM, 50 nM, 200 nM e 500 nM. Em cada estudo realizaram-se dois controlos, um com células não tratadas e outro com o veículo de administração do sensibilizador. O tratamento fotodinâmico foi realizado como descrito anteriormente, e o ensaio do SRB foi realizado 2 e 24 horas após irradiação.

Para a realização do ensaio do SRB, descartou-se o meio de cultura, efetuou-se uma lavagem com PBS e deixou-se secar. Adicionaram-se 200 μ L de ácido acético 1 % em metanol e incubou-se durante 1 hora à temperatura de 4 °C. Após este período retirou-se o metanol e deixou-se secar à temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 μ L de uma solução de 0,4 % de sulforrodamina B (Sigma S9012) em 1 % de ácido acético e incubou-se durante 1 hora ao abrigo da luz. Após este período de tempo, lavou-se a placa de modo a remover o excesso de SRB e, após secagem da placa adicionaram-se 200 μ L de TRIS-NaOH (pH=10). A leitura da absorvância foi feita com o comprimento de onda de 540 nm, com um filtro de referência de 690 nm, num espectrofotómetro Biotek[®] Synergy HT. Os resultados são expressos como percentagem do conteúdo proteico das culturas submetidas ao tratamento fotodinâmico em relação ao conteúdo proteico das culturas tratadas apenas com o veículo de administração do sensibilizador.

Captação e localização subcelular

De forma a caraterizar a ação intracelular do fotossensibilizador BBr2HPC realizaram-se estudos de captação e de localização subcelular do composto. Tendo em conta as suas propriedades fotoquímicas, cuja caraterização foi anteriormente descrita, foi possível avaliar a concentração de composto através da quantificação da emissão de

fluorescência. Para a realização destes e dos estudos subsequentes optou-se por utilizar apenas as linhas celulares de carcinoma colorretal WiDr e de carcinoma do esôfago OE19.

Estudos de captação

Com o propósito de conhecer a concentração de fotossensibilizador que é efetivamente internalizada pelas células, realizaram-se estudos de captação. Para tal, as culturas celulares foram incubadas durante 24 horas com uma concentração conhecida de fotossensibilizador e, após este período, realizou-se uma lavagem com o propósito de remover todo o fotossensibilizador presente no exterior das células. Finalmente, as células foram lisadas, de modo a libertar o seu conteúdo, com um solvente adequado à máxima solubilização do fotossensibilizador, o metanol. Para a deteção do BBr2HPC utilizaram-se as bandas com máximo de absorção com o comprimento de onda de 405 nm e a banda de emissão de fluorescência com máximo a 645 nm.

A quantificação da concentração de fotossensibilizador presente em cada amostra foi calculada com base nas curvas padrão obtidas anteriormente e descritas no capítulo V.

Para a realização dos estudos de captação prepararam-se placas de 6 poços com 1×10^5 células por poço. As células foram incubadas com BBr2HPC na concentração de $1 \mu\text{M}$ durante 1, 2, 6, 24 e 48 horas. Após estes períodos de incubação, o meio de cultura foi descartado e as células foram submetidas a uma lavagem com PBS gelado (4°C). Para completa degradação e rutura das células, foram adicionados 3 ml de metanol a cada poço. O conteúdo de cada poço foi recolhido para tubos devidamente identificados, que foram centrifugados a 1000 G. Os sobrenadantes foram mantidos no escuro a 4°C até ao momento da leitura. A intensidade de fluorescência dos sobrenadantes foi medida no espectrómetro de fluorescência PerkinElmer LS45.

Localização subcelular

A localização subcelular de um fotossensibilizador está altamente relacionada com o local onde ocorrem os primeiros danos provocados pela terapia fotodinâmica e, conseqüentemente, com o resultado terapêutico. O fotossensibilizador BBr2HPC *per se* pode ser observado pelas suas propriedades óticas e a colocação com determinados organelos pode ser avaliada pela marcação destes com sondas específicas. Neste estudo, foi possível avaliar a colocação do fotossensibilizador com o núcleo, o complexo mitocondrial, os lisossomas e o retículo endoplasmático, com recurso às sondas Hoechst 33252 (Sigma B1155), MitoTracker[®] Green FM (Life Technologies[™] M-7514), LysoTracker[®] Blue DND-22 (Life Technologies[™] L-7525) e ER-Tracker[™] Green (Life Technologies[™] E34251), respetivamente.

Utilizaram-se placas de 12 poços, nas quais se introduziu uma lamela previamente autoclavada em cada poço. Nestas placas, distribuíram-se as suspensões celulares com 1×10^6 células/ml e incubaram-se durante a noite para permitir a adesão das células ao substrato. Posteriormente, as culturas foram incubadas com $1 \mu\text{M}$ de BBr2HPC

durante 24 horas. Após este período, as culturas foram submetidas a duas lavagens com PBS, de modo a remover todo o fotossensibilizador no exterior das células, e procedeu-se à marcação dos organelos.

As culturas celulares que foram marcadas com o corante nuclear Hoechst 33252 foram incubadas com uma solução de 5 µg/ml da sonda em PBS durante 15 minutos no escuro. As culturas celulares que foram marcadas com a sonda MitoTracker® Green FM foram incubadas com uma solução de 200 nM da sonda em PBS durante 30 minutos, a 37°C, no escuro. As culturas celulares que foram marcadas com a sonda LysoTracker® Blue DND-22 foram incubadas com uma solução de 75 nM da sonda em PBS durante 1 hora, a 37°C, no escuro. As culturas celulares que foram marcadas com a sonda ER-Tracker™ Green foram incubadas com uma solução de 1 µM da sonda durante 30 minutos a 37 °C. Neste último caso todas as lavagens e incubações foram realizadas em PBS com cálcio e magnésio, tendo a solução a seguinte composição: 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 8,1 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011), 1,47 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662), 0,9 mM de CaCl₂ (Sigma, C4901), 4,92 mM de MgCl₂ (Sigma, M8266), e pH a 7,4). Após as incubações com as respectivas sondas as culturas celulares foram lavadas com PBS e, uma vez que as preparações eram frescas, as lamelas foram montadas sobre lâminas, observadas ao microscópio e fotografadas de imediato.

Todas as observações e aquisição de imagens foram obtidas num sistema de microscopia confocal Carl Zeiss MicroImaging LSM 710. As imagens obtidas foram posteriormente analisadas no *software ImageJ* (Abràmoff, 2004; Schneider *et al*, 2012). Todas as imagens obtidas foram analisadas com o *plugin Colocalisation Test* (van Steensel *et al*, 1996; Fay *et al*, 1997) para avaliar a existência de colocalização através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. O coeficiente de Pearson varia entre -1 e 1, sendo -1 correspondente a correlação negativa, 0 a ausência de correlação e 1 a correlação positiva. Neste trabalho, em todas as imagens com um coeficiente de Pearson igual ou superior a 0,8 foi determinado o valor de colocalização. Para isso utilizou-se o *plugin Colocalization Threshold* que analisa as imagens de acordo com o método de colocalização de Costes (Costes *et al*, 2004) e teve-se em conta os valores dos índices de colocalização de Manders, tMI, que representam a percentagem de pixéis vermelhos, correspondentes ao fotossensibilizador, que se colocaram com os pixéis verdes ou azuis, correspondentes às sondas utilizadas. Os resultados foram apresentados como a média e o intervalo de confiança a 95 % da percentagem de colocalização do fotossensibilizador com cada organelo.

Morte celular

De modo a caracterizar as vias de morte celular implicadas no processo fotodinâmico realizaram-se estudos de citometria de fluxo e avaliou-se a expressão de proteínas relevantes por western blot.

Vias de Morte

A viabilidade e tipos de morte celular foram avaliados por citometria de fluxo. A citometria de fluxo permite contar, examinar e classificar células ou outras partículas microscópicas suspensas em meio líquido. Esta técnica permite analisar de forma rápida, várias características físicas e químicas de células em suspensão, através de um aparelho de detecção ótico-eletrônico. Para avaliar a morte celular consequente da terapia fotodinâmica, utilizou-se a dupla marcação com a anexina V (AnV) ligada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com o iodeto de propídeo (IP), que permitem quantificar a viabilidade celular distinguindo os diferentes tipos de morte celular, a necrose e a apoptose. A anexina V permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois este fluorocromo liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. De forma complementar, o iodeto de propídeo é um corante que se intercala no DNA das células, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou em necrose. Desta forma, é possível distinguir quatro grupos de células: as células vivas, que se apresentam negativas tanto para a marcação com a anexina V como para a marcação com o iodeto de propídeo, as células em apoptose, que se apresentam positivas para a marcação com a anexina V e negativas para a marcação com o iodeto de propídeo, as células que se encontram em apoptose tardia/necrose, que se apresentam positivas para as duas marcações, e as células em necrose, que se apresentam negativas para a marcação com a anexina V e positivas para a marcação com o iodeto de propídeo.

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico, com o fotossensibilizador nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. A análise foi realizada 2 e 24 horas após o tratamento fotodinâmico.

Utilizaram-se 10^6 células de cada condição, obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 300 G durante 5 minutos. O *pellet* foi incubado com 100 μ L de tampão de ligação (constituído por 0,01 M de HEPES [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl_2 [Sigma, C4901]), 2,5 μ L de An-V FITC (Immunostep ANXVFKIT Immunotech) e 1 μ L de IP (KIT Immunotech), durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação, adicionaram-se 400 μ L de PBS e analisou-se no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Para a análise e quantificação da informação utilizou-se um *software* específico (*Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software*) que corre em computador dedicado. Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose.

Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado usando uma sonda fluorescente, o JC-1 (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*). O JC-1 é um catião lipofílico que existe em duas formas, em monómeros (M) e em agregados (A), consoante o estado de polarização/despolarização da membrana mitocondrial, emitindo fluorescência com comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana é

elevado, forma agregados que emitem fluorescência vermelha (590 nm). Por sua vez, à medida que o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos em que a membrana se encontra despolarizada, o JC-1 é excluído da mitocôndria e mantém-se no citoplasma sob a forma de monômeros, que emitem fluorescência verde (529 nm). Assim, a razão entre a fluorescência verde e vermelha (M/A, razão monômeros/agregados), determinada por citometria de fluxo, fornece uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (St John *et al*, 2006; De Proost *et al*, 2008).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. A análise foi realizada 2 e 24 horas após o tratamento. Aproximadamente 10^6 células foram centrifugadas com PBS durante 5 minutos a 200 G e, posteriormente, suspensas em 1 ml do mesmo tampão. As suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura de 37 °C e ao abrigo da luz com 1 µl de JC-1 (Sigma T4069), preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5 mg/ml e, posteriormente diluído, de modo a obter uma concentração final de 5 µg/ml. De seguida, a suspensão foi novamente lavada com PBS e ressuspensa em 400 µL do mesmo tampão. A deteção foi efetuada no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) com o comprimento de onda de excitação de 488 nm. Os resultados obtidos correspondem à média de intensidade de fluorescência (MIF) para os agregados e para os monômeros, tendo-se calculado posteriormente a razão M/A para cada condição experimental.

Expressão de proteínas

O western blot permite detetar proteínas específicas numa determinada amostra de homogeneizado de tecido ou num extrato celular. As proteínas de uma amostra são inicialmente separadas por eletroforese em gel, separação feita com base no ponto isoelétrico das proteínas, peso molecular, carga elétrica ou uma combinação destas características. O tipo mais frequente de eletroforese recorre à separação das proteínas, tendo em conta o tamanho do polipeptídeo quando desnaturado. Para isto são utilizados géis de poliacrilamida e soluções desnaturantes com dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*). Esta substância é um detergente capaz de conferir carga negativa às proteínas, o que permite a sua separação mediante o seu peso molecular através do eletrodo positivo do gel de poliacrilamida. Quando se aplica uma diferença de potencial no gel, as proteínas migram ao longo deste com diferentes velocidades. As proteínas de menores dimensões migram mais rápido através do gel, pelo que se vão localizar no fundo do gel, enquanto as proteínas de maiores dimensões migram mais lentamente pelo que se vão localizar no topo do gel. Após a migração das proteínas, faz-se a sua transferência para uma membrana de nitrocelulose ou difluoreto de polivinilideno (PVDF), onde são analisadas e detetadas, com recurso a anticorpos específicos para a proteína alvo. Durante esta etapa, é introduzido na amostra um anticorpo primário, com o objetivo de marcar as proteínas com antígenios. Uma vez marcadas as proteínas, estas podem ser facilmente identificadas com recurso a um anticorpo secundário, que se vai ligar especificamente ao anticorpo primário. O

western blot raramente apresenta falsos positivos. Esta técnica foi utilizada para determinar a alteração da expressão das proteínas P53, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 e Lâmina B1.

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC nas concentrações de 5 nM, de 50 nM e de 200 nM. A análise foi realizada 24 horas após o tratamento.

Para a preparação dos extratos de proteína total foi descartado o meio de cultura e foram feitas 3 lavagens com PBS. Em seguida, adicionou-se uma solução de RIPA (tampão de radioimunoprecipitação) suplementada com um cocktail de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche) e 1 mM de DTT (do inglês, *dithiothreitol*). Com a ajuda de um raspador soltaram-se as células da superfície do frasco e colocou-se o conteúdo num microtubo. Após agitação no vórtex, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 35 % (Sonicador VibraCell, modelo VC50 Sonic and Materials inc. USA). As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14000 G e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, devidamente identificados, que foram guardados a -80 °C.

Para a determinação da quantidade da proteína usou-se o método de BCA (*Bicinchononic acid*, BCA™ *protein assay kit*, Pierce). Posteriormente as amostras foram desnaturadas a 95 °C durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante constituída por Tris na concentração de 100 mM, glicina na concentração de 100 mM, SDS a 4 %, ureia na concentração de 8 mM e azul de bromofenol a 0,01 %.

Para a realização da eletroforese polimerizaram-se géis de acrilamida que foram colocados na tina de corrida com tampão apropriado (Bio-Rad 161-0772) e procedeu-se à disposição das amostras e do padrão de pesos moleculares (Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-Rad). Depois de terminada a eletroforese, onde se usou um potencial constante de 150 V, os géis foram colocados em contato direto com membranas de PVDF (membrana de fluoreto de polivinilideno, Millipore) previamente ativadas em metanol. O sistema de transferência foi preparado e a reação ocorreu a um potencial de 100 V e tempo variável de acordo com a proteína de interesse, em tampão CAPS na concentração de 100 mM, com pH de 11 (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*, Sigma). Terminada a transferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de TBST-BSA a 4 % (Tris-Buffered Saline Tween-20), à temperatura ambiente. Cerca de 1 hora depois, incubaram-se as membranas durante a noite com os anticorpos primários a 4 °C e sob agitação constante.

Para a deteção da P53 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-P53 (D07) preparado em ratinho (sc-47698, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou uma banda a cerca de 53 kDa. Para a deteção da Caspase 3 utilizou-se o anticorpo policlonal anti-Caspase 3 (H277) preparado em coelho (sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou uma banda a cerca de 32 kDa, correspondente à procaspase 3, e uma banda a cerca de 17 kDa, que corresponde a uma subunidade da caspase 3. Para a deteção da Caspase 8 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-Caspase 8 (5F7) preparado em ratinho (IM3148, Immunotech), que detetou uma banda a cerca de 55 kDa. Para a deteção da Caspase 9 utilizou-se o anticorpo policlonal anti-Caspase 9 (H170) preparado em coelho (sc-8355, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou uma banda a cerca de 46 kDa, que corresponde à procaspase 9,

e uma banda a cerca de 35 kDa que corresponde à caspase 9 ativada. Para a detecção da Lâmina B1 utilizou-se o anticorpo policlonal anti-Lâmina B1 H90 preparado em coelho (sc-20682, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou uma banda a cerca de 67 kDa.

No dia seguinte efetuaram-se lavagens com TBS-T a 1 %, e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário apropriado, sob agitação constante e à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora. Utilizaram-se os anticorpos secundários apropriados para cada anticorpo primário (anti-mouse: RPN5781 GE Healthcare; anti-rabbit: sc-2007 Santa Cruz Biotechnology, Inc.). As lavagens foram repetidas e as membranas foram depois incubadas com substrato enzimático (ECF Western Blotting Reagent Pack, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

Alterações no núcleo celular

De modo a caracterizar o efeito do tratamento fotodinâmico não só no DNA mas igualmente no núcleo celular, realizaram-se estudos de citometria de fluxo para caracterizar as fases do ciclo celular, realizou-se o ensaio cometa e determinou-se a expressão da proteína estrutural nuclear Lâmina B1 por western blot (procedimento descrito acima).

Ciclo celular

De forma a determinar possíveis alterações do ciclo celular foi utilizado iodeto de propídeo (IP), corante comumente utilizado para análise de DNA e do ciclo celular por citometria de fluxo. Uma vez que este corante tem a capacidade de se ligar ao DNA, intercalando-se na dupla cadeia da macromolécula, a quantidade de corante ligado é proporcional à quantidade de DNA. Assim, é possível a quantificação do conteúdo de DNA, o que nos permite conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular. As células podem ser classificadas como células em fase G2 e M, G0, G1 e S (Douglas *et al*, 1995; Kalejta *et al*, 1997).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. A análise foi realizada 2 e 24 horas após o tratamento.

A avaliação foi feita através de *PI/RNase solution* (Immunostep PI/RNase). Para este ensaio as células foram centrifugadas a 200 G durante 5 minutos, e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 µl de etanol a 70 % com o tubo em agitação no vórtex e incubaram-se os tubos durante 30 minutos a 4°C. Lavaram-se as células com 2 ml de PBS e centrifugaram-se a 200 G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500 µl de *PI/RNase solution* e incubaram-se durante 15 minutos no escuro a 37 °C. A detecção foi feita no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) e utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

Os resultados são apresentados sob a forma percentagem de células na fase G1 ou G0, na fase S ou nas fases G2 e M.

Ensaio de cometas

A eletroforese em microgel de agarose, também conhecida como o ensaio de cometa, é uma técnica simples e sensível para a detecção de danos no DNA ao nível da célula eucariota. É reconhecida como uma técnica padrão não só para a avaliação de danos a nível do DNA, mas também para a reparação e a genotoxicidade de compostos. Consiste no isolamento de células numa suspensão de agarose e eletroforese de DNA obtendo-se, após coloração, células com aspeto de cometa, em que a cabeça corresponde à localização do núcleo e a cauda corresponde à migração de DNA, a qual é proporcional à extensão dos danos. Esta técnica foi primeiramente descrita por Östling & Johanson (Ostling & Johanson, 1984), e era realizada em condições de pH neutro o que permitia apenas verificar danos de DNA a nível de cadeias da dupla hélice. Mais tarde, uma modificação permitiu obter também a informação acerca de danos numa única cadeia da dupla hélice do DNA, nomeadamente, a realização do procedimento em condições alcalinas (Tice *et al*, 2000; Olive & Banáth, 2006).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador nas concentrações de 5 nM, de 50 nM e de 200 nM. A análise foi realizada 24 horas após o tratamento.

Com este propósito, revestiram-se previamente lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha) com uma camada de agarose utilizando uma solução 1 % de agarose (Sigma A2790). Preparou-se a agarose que formará uma segunda camada nas lâminas, agarose de baixo ponto de fusão (Sigma A9414) a 1 %. Esta agarose como tem um ponto de fusão mais baixo, permite adicioná-la ainda líquida às células a 37 °C, uma temperatura que não lesa as células. As suspensões foram centrifugadas a 500 G durante 5 minutos, lavadas com PBS e diluídas de modo a obter suspensões celulares com 5×10^4 células/ml. Num microtubo homogeneizaram-se cuidadosamente as suspensões celulares com a solução de agarose e colocaram-se 500 μ l sobre as lâminas já revestidas.

Após a solidificação da segunda camada de agarose, colocaram-se as lâminas em solução de lise constituída por NaCl na concentração de 2,5 M, EDTA na concentração de 100 mM, Trizma Base na concentração de 10 mM, 1 % de Triton X-100 e 10 % de DMSO, durante a noite, à temperatura de 4 °C, para promover a destruição da membrana citoplasmática.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese, constituído por NaOH na concentração de 300 mM e EDTA na concentração de 1 mM, com $\text{pH} > 13$, durante uma hora, para que as células adquirissem características alcalinas. A eletroforese foi realizada com tensão de 254 V e corrente de 600 mA durante 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram depois submetidas a uma solução de neutralização constituída por Trizma Base na concentração de 0,4 M, com pH de 7,5, posteriormente coradas com brometo de etideo na concentração de 20 μ g/ml e deixadas secar.

As observações foram realizadas num microscópio Motic AE31 equipado com sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II. As imagens foram adquiridas em câmara Moticom 5000 Cooled acoplada a computador dedicado com o *software* Motic Images Advanced 3.2 de forma a se obterem no mínimo 100 exemplares de cometas de cada condição de tratamento, em pelo menos três experiências independentes.

Em todas as imagens adquiridas, os cometas foram processados com o *software* CometScore™ 1.5 (TriTek Corp.), que analisa cada cometa individualmente para vários parâmetros como o comprimento da cauda, a área da cauda, a percentagem de DNA na cauda e o momento da cauda. Para este estudo selecionou-se o momento da cauda que correlaciona o comprimento da cauda com a percentagem de DNA na cauda, através do produto entre estes dois parâmetros.

Stresse oxidativo

O stresse oxidativo é fundamental na reação fotodinâmica, pelo que se estudou a implicação de várias ROS na PDT, baseada no fotossensibilizador BBr2HPC, e também de algumas defesas antioxidantes que podem ter um papel citoprotetor, eventualmente limitante do resultado terapêutico.

Oxigénio singleto e radical superóxido

O oxigénio singleto é frequentemente considerado a ROS mais importante na PDT. Na impossibilidade de avaliar diretamente a sua concentração intracelular após a PDT baseada no fotossensibilizador BBr2HPC, realizaram-se estudos na presença de um inibidor desta espécie. Utilizou-se a azida de sódio que constitui um *quencher* desta espécie reativa. Do mesmo modo realizaram-se estudos na presença de D-manitol que constitui um *scavenger* do radical hidroxilo.

Para a realização deste estudo, adaptou-se um protocolo desenvolvido por Obata *et al.* (Obata *et al.*, 2009), pelo que foram preparadas suspensões celulares das linhas de carcinoma colorretal e de carcinoma do esófago, que foram distribuídas por placas de 48 poços. As culturas celulares foram incubadas durante 24 horas com o fotossensibilizador nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. Antes da irradiação, o meio foi substituído por meio de cultura, sem fotossensibilizador, suplementado com 1 mM de azida de sódio (Sigma 71290) ou com 4 mM de D-manitol (Sigma M4125). As placas foram irradiadas com 10 J como descrito anteriormente e, após 30 minutos, o meio foi substituído por meio de cultura sem inibidores e sem fotossensibilizador. A avaliação da atividade metabólica foi realizada 24 horas após o tratamento fotodinâmico, através do ensaio MTT descrito anteriormente.

Produção intracelular de anião superóxido

A avaliação da produção de radical superóxido foi efetuada por citometria de fluxo com recurso à sonda DHE. Este composto atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido em etídeo, composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no DNA permanecendo no interior da célula. Esta reação é relativamente específica para o radical superóxido, uma vez que só se verifica com oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso (Zhao *et al*, 2005).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. A análise foi realizada 2 e 24 horas após o tratamento.

Utilizaram-se aproximadamente 10^6 células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 200 G durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado uma vez com PBS. De seguida, o *pellet* foi suspenso em 1 ml de PBS e adicionaram-se 5 μ l de DHE (Sigma Aldrich, D7008), de forma a obter uma concentração final de 5 μ M. Incubou-se durante 15 minutos a 37 °C e a suspensão foi lavada com PBS, centrifugada a 300 G durante 5 minutos e suspensa em 400 μ l do mesmo tampão. A deteção foi feita no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação às culturas celulares controlo, às quais se atribuiu o valor 1.

Produção intracelular de peróxidos

A expressão intracelular de peróxidos também foi determinada por citometria de fluxo através da oxidação intracelular da sonda não fluorescente DCFH₂-DA (do inglês, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Este composto lipossolúvel entra nas células e acumula-se principalmente no citosol, onde é desacetilado por esterases intracelulares sob a forma de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este produto não fluorescente é oxidado na presença de peróxidos com formação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que é facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522 nm quando excitada com luz de comprimento de onda de 498 nm. A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio (Tarpey *et al*, 2004; Dikalov *et al*, 2007).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. A análise foi realizada 2 e 24 horas após o tratamento.

Assim, centrifugou-se uma suspensão celular com aproximadamente 10^6 células a 200G durante 5 minutos e adicionou-se PBS para lavar. O *pellet* foi suspenso em 1 ml de PBS e foi incubado durante 45 minutos, sem luz, a 37 °C com 5 μ M de DCFH₂-DA (Molecular probes, Invitrogen). A suspensão foi lavada com PBS, centrifugada a 200 G durante 5 minutos e suspensa em tampão. Posteriormente, foi feita a deteção por citometria de fluxo no

citômetro FACSCalibur (BD Biosciences) e utilizado o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados são obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação às culturas celulares controle, às quais se atribuiu o valor 1.

Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável pela catalização da dismutação do $O_2^{\cdot -}$ que dá origem a H_2O_2 e O_2 , e que é um dos mecanismos antioxidantes mais importantes. Para avaliação da atividade desta enzima foi utilizado o SOD Assay Kit-WST (Sigma, 19160, Switzerland).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. Após 2 e 24 horas, foi descartado o meio de cultura e foram feitas 3 lavagens com PBS. Em seguida, adicionou-se uma solução de RIPA e, com a ajuda de um raspador, soltaram-se as células da superfície do frasco e colocou-se o conteúdo num microtubo. Após agitação no vórtex, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 35 %, centrifugadas durante 15 minutos a 14000 G e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, devidamente identificados, que foram guardados a $-80^{\circ}C$.

Para a determinação da quantidade da proteína usou-se o método de BCA (BCA™ *protein assay kit*, Pierce) e para a determinação da SOD utilizou-se o kit referido de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram apresentados como a razão entre a atividade da SOD e a concentração de proteína total.

Glutatião reduzido

De forma a avaliar a expressão intracelular de glutatião reduzido (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, foi utilizada a citometria de fluxo, com recurso a um composto fluorescente, o alaranjado de mercúrio. Este composto reage rapidamente com o GSH, dando origem a um produto de reação que emite uma intensa fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon no comprimento de onda de 488 nm (Hedley & Chow, 1994).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC nas concentrações de 5 nM, de 50 nM, de 200 nM e de 500 nM. A análise foi realizada 2 e 24 horas após o tratamento.

Para este procedimento, as células foram centrifugadas a 200 G durante 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. Suspendeu-se o *pellet* em 1 ml de PBS e foram adicionados 4 μ l de alaranjado de mercúrio na concentração de 10 mM (Sigma M7750). Homogeneizou-se a suspensão e incubou-se durante 15 minutos, no escuro, a $37^{\circ}C$, após o que suspensão foi lavada com PBS e centrifugada a 200 G durante 5 minutos, e suspensa em tampão. A deteção foi feita no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences) e utilizado o comprimento de onda de

excitação de 620 nm. Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados na forma de razão em relação a culturas celulares controlo às quais se atribuiu o valor 1.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® versão 20. A avaliação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk.

Os parâmetros que definem as curvas de dose-resposta referentes aos resultados da atividade metabólica foram comparados utilizando o teste *t-student* para amostras independentes.

A comparação do conteúdo proteico das culturas celulares submetidas a tratamento com o das culturas celulares controlo foi realizada com o teste de *t-student* para uma amostra, tendo sido comparado o valor amostral de cada grupo com o valor de normalização 100%.

Para a comparação das captações de BBr2HPC entre os tempos analisados foi utilizado o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*) de um fator quando se verificou normalidade da distribuição para todos os tempos e homogeneidade das suas variâncias, e o teste de Kruskal-Wallis nos restantes casos. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

No que respeita às vias de morte celular, potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular, a comparação entre condições foi realizada com o teste ANOVA de um fator nos casos em que se verificou distribuição normal e homogeneidade das variâncias e o teste de Kruskal-Wallis no caso contrário. Seguidamente foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

Os valores das condições experimentais obtidos nos estudos de western blot, análise da concentração intracelular de anião superóxido e de radical hidroxilo e na análise da superóxido dismutase e do glutatião reduzido as comparações foram realizadas com o teste *t-student* para uma média e utilizado o valor de normalização 1.

No ensaio de cometas a comparação entre condições foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis uma vez que a distribuição dos valores é assimétrica com cauda à direita. Foram realizadas comparações múltiplas entre os pares de grupos experimentais.

No que diz respeito à avaliação da influência do oxigénio singlete e do radical superóxido, foram inicialmente determinados a atividade metabólica e respetivo erro padrão para as concentrações de fotossensibilizador em causa a partir das curvas de dose-resposta obtidas anteriormente. A comparação dos valores experimentais obtidos em combinação com os valores calculados a partir das curvas foi realizada pelo teste *t-student*.

Todas as comparações múltiplas foram corrigidas segundo o método de Bonferroni e foi considerado um valor de significância de 5 % para todas as comparações.

Resultados

Citotoxicidade

Após a síntese e a análise química do fotossensibilizador realizaram-se estudos de citotoxicidade por forma a avaliar o seu potencial fotodinâmico em linhas celulares tumorais. Foi possível estudar a influência da PDT, baseada no fotossensibilizador BBr2HPC, a nível da atividade metabólica e da viabilidade em três linhas celulares humanas de cancro, a linha WiDr de carcinoma colorretal, a linha OE19 de carcinoma do esófago e a linha A375 de melanoma melanocítico.

Os resultados experimentais, obtidos pelo ensaio do MTT, foram ajustados ao modelo sigmóide de dose-resposta tal como representado na Figura 17. Neste caso, a avaliação da atividade metabólica foi realizada 24 horas após o tratamento. A partir da equação de cada curva calculou-se o ponto médio, correspondente ao valor de IC_{50} .

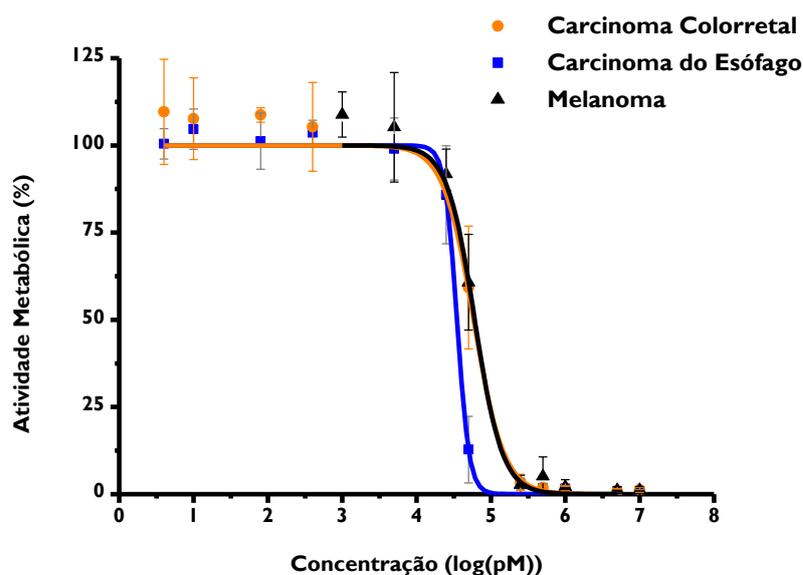


Figura 17: Curvas de dose-resposta para as linhas celulares humanas de carcinoma colorretal (WiDr), de carcinoma do esófago (OE19) e de melanoma (A375) 24 horas após o tratamento fotodinâmico. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos seis ensaios.

A linha celular de carcinoma colorretal apresentou um IC_{50} de 58,5 nM, a linha celular de carcinoma de esófago apresentou um IC_{50} de 34,95 nM e a linha celular de melanoma apresentou um IC_{50} de 50,5 nM. Apesar do valor de IC_{50} da linha celular de carcinoma do esófago ser mais baixo, não existem diferenças com significado estatístico entre os IC_{50} das três linhas celulares. Os valores de IC_{50} e respetivos intervalos de confiança a 95 % estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: IC₅₀ e respectivos intervalos de confiança a 95% do fotossensibilizador BBr2HPC nas linhas celulares humanas de carcinoma colorretal, carcinoma do esôfago e melanoma, 24 horas após o tratamento fotodinâmico.

	IC ₅₀ (nM) 24h	Intervalo de confiança (95%)
Carcinoma Colorretal (WiDr)	58,5	[42,2; 81,0]
Carcinoma do Esôfago (OE19)	35,0	[28,8; 42,4]
Melanoma (A375)	60,6	[40,6; 90,4]

A terapia fotodinâmica, pela sua dependência da formação de ROS de natureza transitória, é habitualmente caracterizada como um fenômeno com consequências apreciáveis a curto prazo (Agostinis *et al*, 2011; Anand *et al*, 2012). Por esse motivo avaliou-se também a atividade metabólica 2 horas após o tratamento fotodinâmico. As curvas de dose-resposta obtidas estão representadas na Figura 18. De modo semelhante ao que se fez para os estudos mais tardios, calculou-se o IC₅₀ e respectivos intervalos de confiança, que se encontram apresentados na Tabela 3.

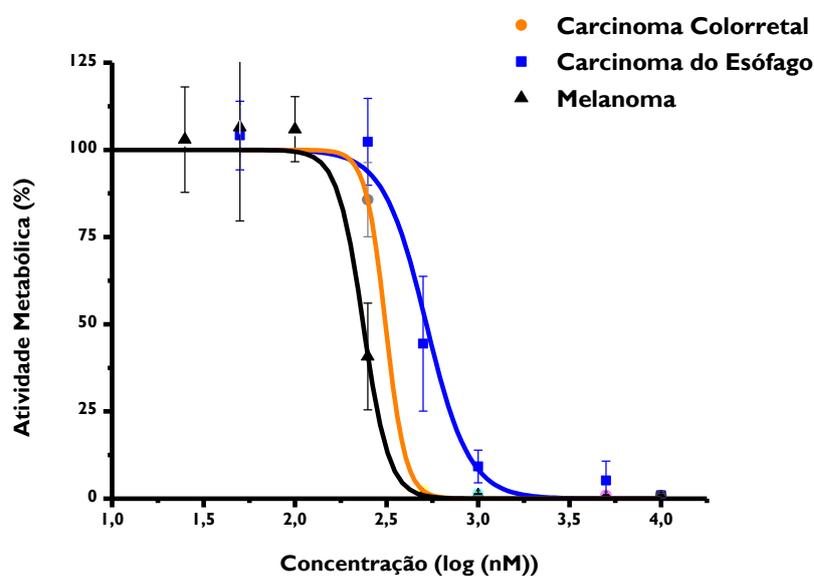


Figura 18: Curvas de dose-resposta para as linhas celulares humanas de carcinoma colorretal (WiDr), de carcinoma do esôfago (OE19) e de melanoma (A375) 2 horas após o tratamento fotodinâmico. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos seis ensaios.

Como se pode apreciar na Tabela 2 e na Tabela 3, não se verificam diferenças significativas nos resultados obtidos entre as três linhas celulares, para cada tempo considerado. Tendo em conta os resultados na sua

globalidade verifica-se que embora às duas horas o melanoma tenha uma aparente maior sensibilidade, a longo prazo a linha celular de carcinoma do esófago é a mais sensível.

Tabela 3: IC₅₀ e respetivos intervalos de confiança a 95% do fotossensibilizador BBr2HPC nas linhas celulares humanas de carcinoma colorretal, carcinoma do esófago e melanoma, 2 horas após o tratamento fotodinâmico.

	IC ₅₀ (nM) 2h	Intervalo de confiança (95%)
Carcinoma Colorretal (WiDr)	521,8	[312,7; 870,6]
Carcinoma do Esófago (OE19)	312,1	[204,6; 476,2]
Melanoma (A375)	235,6	[176,1; 315,2]

Se considerarmos uma potencial utilização, em contexto clínico, do fotossensibilizador BBr2HPC, este seria administrado por via sistémica. Por esse motivo, avaliou-se a citotoxicidade deste composto para células da linha celular humana não tumoral HFF1. A curva de dose-resposta obtida está representada na Figura 19 e a partir desta foi possível calcular o IC₅₀ de 5,55 µM, com um intervalo de confiança a 95 % de [4,93;6,23] µM.

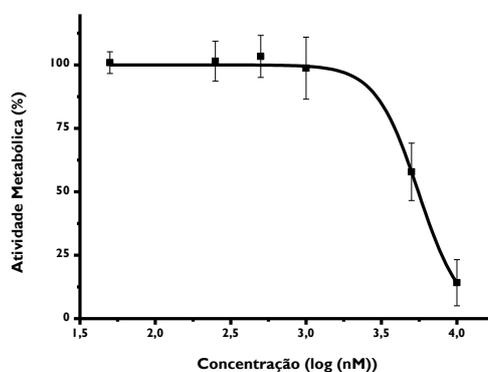


Figura 19: Curva de dose-resposta da linha celular humana não tumoral HFF1 ao sensibilizador BBr2HPC, obtida 24 horas após a administração. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos seis ensaios. As curvas de dose-resposta foram desenhadas no *software Origin 8.0*, que através do processamento dos resultados obtidos estabeleceu a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e forneceu a equação das mesmas.

De forma complementar à avaliação da atividade metabólica, estudou-se a viabilidade celular das três linhas celulares tumorais humanas 2 e 24 horas após o tratamento fotodinâmico. A viabilidade das culturas celulares foi significativamente reduzida após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC nas concentrações iguais ou superiores a 50 nM. Nas células de carcinoma colorretal, WiDr, apenas 2 horas após o tratamento,

verificou-se uma redução significativa da viabilidade para as concentrações de 200 nM ($44,6 \pm 5,3\%$, $p=0,008$) e de 500 nM ($30,7 \pm 2,9\%$, $p<0,001$). Para o mesmo tempo de avaliação (2 horas), nas células de carcinoma do esôfago, OE19, verificou-se uma redução da viabilidade significativa para as mesmas concentrações ($p<0,001$), ou seja, para a concentração de 200 nM a viabilidade foi de $41,2 \pm 6,3\%$ ($p<0,001$) e para a concentração de 500 nM foi de $23,2 \pm 1,7\%$ ($p<0,001$). Para a concentração de 50 nM a viabilidade foi de $70,5 \pm 5,3\%$, verificando-se também uma diminuição significativa ($p=0,004$). Nas células de melanoma, A375, também se verificou uma diminuição significativa da viabilidade, nos tratamentos com uma concentração de 200 nM ($54,4 \pm 14,9\%$, $p=0,048$) e de 500 nM ($30,9 \pm 8,0\%$, $p<0,001$).

Deverá referir-se que a diminuição da viabilidade celular foi mais acentuada 24 horas após o tratamento, para todas as linhas celulares, como se pode observar na Figura 20. Na linha celular de carcinoma colorretal (WiDr) a viabilidade foi significativamente reduzida para $37 \pm 5,2\%$ com a concentração de 50 nM ($p<0,001$), para $19,0 \pm 3,2\%$ com a concentração de 200 nM ($p<0,001$) e para $14,0 \pm 1,0\%$ com a concentração de 500 nM ($p<0,001$). Na linha celular de carcinoma do esôfago (OE19), a viabilidade foi reduzida significativamente para $50,0 \pm 5,9\%$ ($p<0,001$) com a concentração de 50 nM, para $14,0 \pm 3,8\%$ com a concentração de 200 nM ($p<0,001$) e para $7,0 \pm 1,7\%$ com a concentração de 500 nM ($p<0,001$). Nas células de melanoma, verificou-se igualmente uma redução significativa da viabilidade cuja percentagem foi de $40,0 \pm 8,0\%$ para a concentração de 50 nM ($p=0,016$), de $6,0 \pm 1,0\%$ para a concentração de 200 nM ($p<0,001$) e de $6,0 \pm 1,0\%$ para a concentração de 500 nM ($p<0,001$).

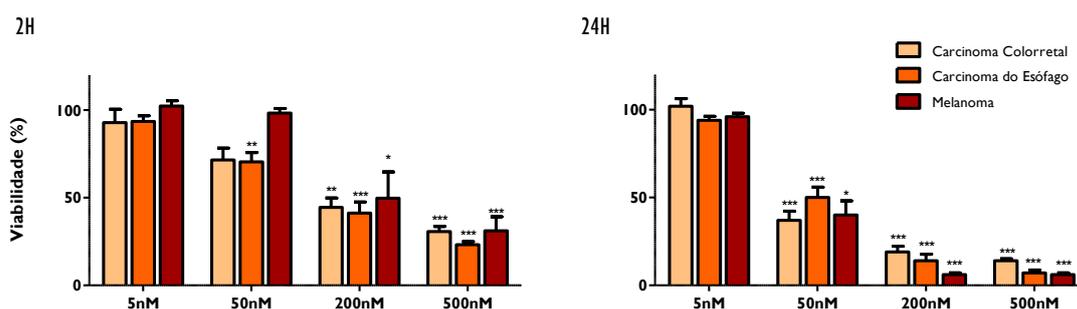


Figura 20: Viabilidade das células de carcinoma colorretal, de carcinoma do esôfago e de melanoma 2 horas (esquerda) e 24 horas (direita) após o tratamento fotodinâmico. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$, ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$.

Captação e localização subcelular

Comprovou-se que o fotossensibilizador BBr2HPC tem efeito citotóxico em várias linhas celulares tumorais humanas. De modo a conhecer o perfil de captação deste fotossensibilizador pelas células realizaram-se estudos de captação e, posteriormente, de localização subcelular, pelo que as propriedades fotoquímicas do composto, que foram anteriormente caracterizadas e descritas, foram tidas em conta. Para estes estudos, consideraram-se, os efeitos do fotossensibilizador apenas nas linhas celulares de carcinoma colorretal e de carcinoma do esófago.

Como podemos apreciar na Figura 21, a captação do fotossensibilizador BBr2HPC eleva-se com o aumento do tempo de incubação, tanto na linha celular de carcinoma colorretal como na linha celular de carcinoma do esófago, não se verificando diferenças significativas entre as duas linhas celulares para cada tempo. Os valores das captações do fotossensibilizador BBr2HPC após 24 horas de incubação foram de $0,288 \pm 0,037 \mu\text{M}$ nas células de carcinoma colorretal e de $0,338 \pm 0,124 \mu\text{M}$ nas células de carcinoma do esófago, o que corresponde a cerca de 30 % da concentração com que foram incubadas.

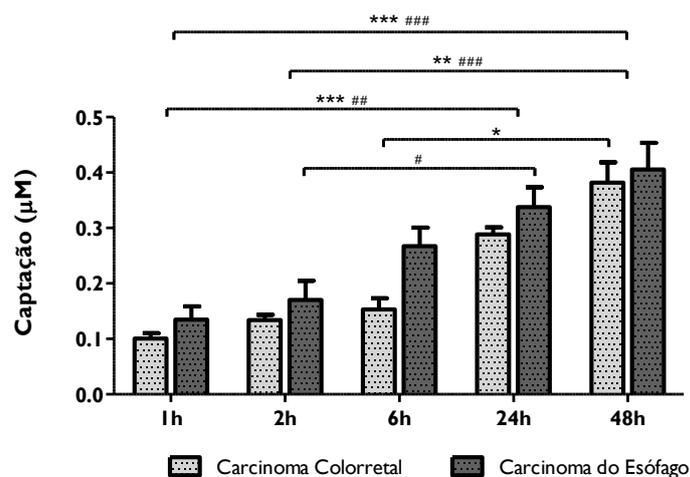


Figura 21: Captação do fotossensibilizador BBr2HPC, ao longo do tempo, pelas células de carcinoma colorretal e de carcinoma do esófago. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios. Não se verificaram diferenças significativas na captação do fotossensibilizador entre as duas linhas celulares para cada tempo. As diferenças significativas entre tempos estão representadas com * para a linha celular de carcinoma colorretal e com # para a linha celular de carcinoma do esófago, em que */# representa $p < 0,05$, **/## representam $p < 0,01$ e ***/### representam $p < 0,001$.

A localização subcelular dos fotossensibilizadores constitui o local de dano primário da terapia fotodinâmica e é determinante nas vias de atuação ativadas pela reação fotodinâmica (Agostinis *et al*, 2011). Confirmada a captação do fotossensibilizador BBr2HPC obtiveram-se imagens de microscopia confocal por forma a conhecer a sua localização subcelular. Como se verificou que a captação celular do fotossensibilizador BBr2HPC foi

significativamente superior às 24 e às 48 horas, sem diferenças entre estes dois tempos, tanto para as células de carcinoma colorretal como para as células de carcinoma do esôfago, optou-se pelas 24 horas de incubação.

Os estudos de localização subcelular realizados com recurso a microscopia confocal confirmaram a internalização celular do sensibilizador. As imagens foram analisadas com o *software Image J* para a existência de colocalização com os organelos marcados, tendo em conta a correlação de Pearson, e quando comprovada a existência de correlação positiva, esta foi quantificada.

Como se pode observar nas imagens da Figura 22 não ocorre internalização nuclear deste fotossensibilizador e não se verificou existência de correlação positiva, sendo o valor do coeficiente de Pearson igual a 0 para todas as imagens analisadas.

No que respeita aos restantes organelos marcados verificou-se a existência de correlação de Pearson positiva, que foi igual a 1 para todas as imagens analisadas com exceção de uma em que se verificou uma correlação de 0,825, e foi possível quantificar a percentagem de colocalização.

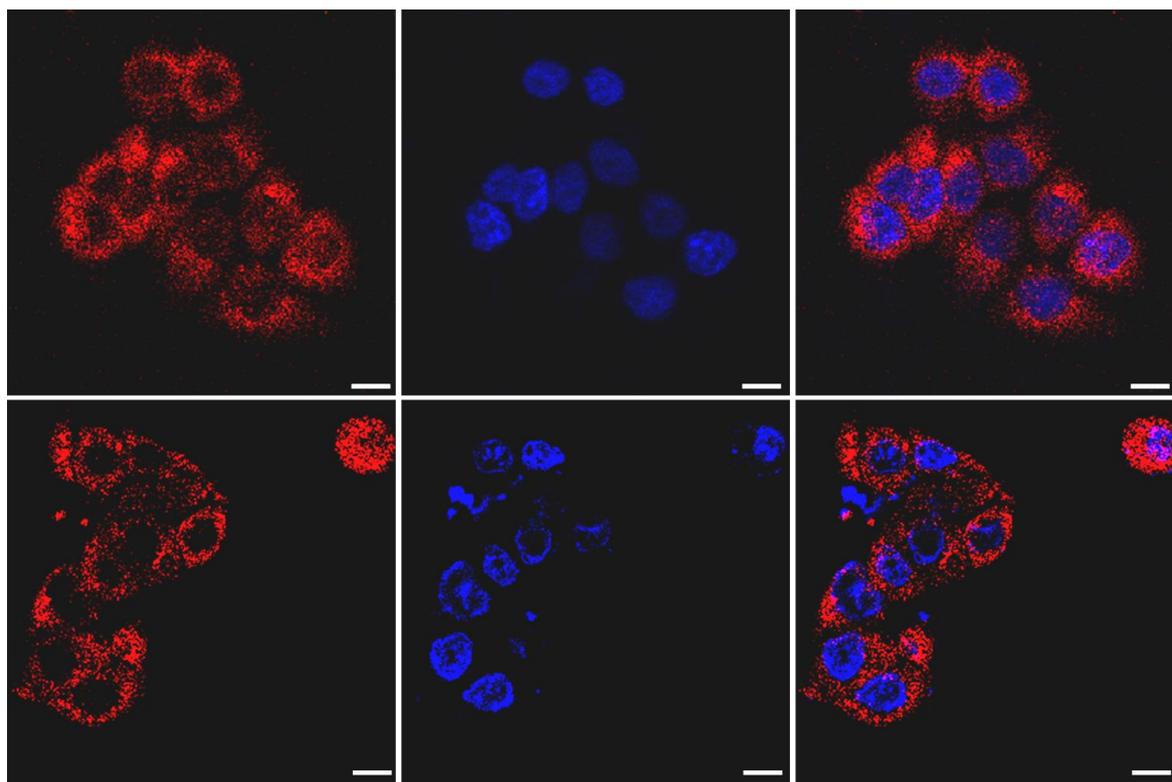


Figura 22: Imagens de microscopia confocal representativas da localização subcelular do fotossensibilizador BBr2HPC. A coluna da esquerda mostra a distribuição do fotossensibilizador a vermelho, a coluna central mostra a localização dos núcleos a azul e a coluna da direita representam a sobreposição de cada par de imagens. As células de carcinoma colorretal WiDr estão representadas em cima e as células de carcinoma do esôfago OE19 estão representadas em baixo. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x e a barra no canto inferior direito corresponde a 10 μm .

Verificou-se que o fotossensibilizador BBr2HPC é capaz de se localizar em vários organelos membranares. No que respeita à mitocôndria, cujas imagens representativas são apresentadas na Figura 23, obteve-se um índice de colocalização de $0,27 \pm 0,10$ para as células de carcinoma colorretal e de $0,27 \pm 0,11$ para as células de carcinoma do esôfago.

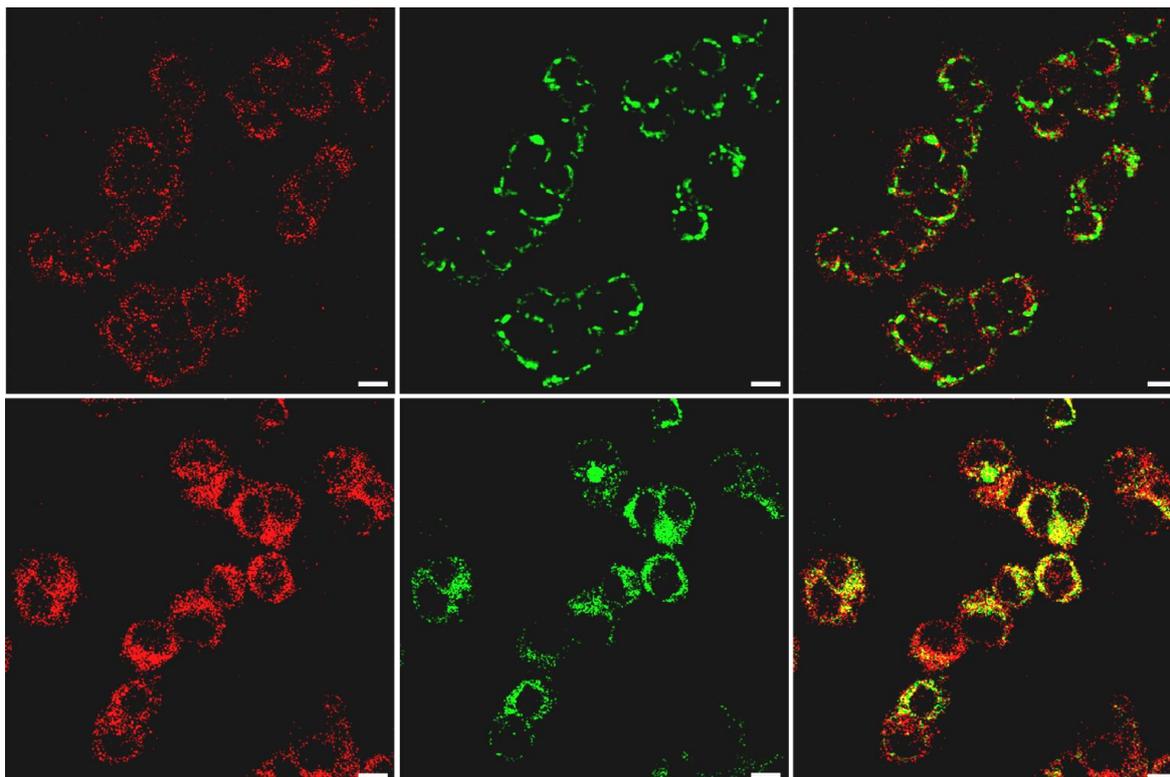


Figura 23: Imagens de microscopia confocal representativas da localização subcelular do fotossensibilizador BBr2HPC. A coluna da esquerda mostra a distribuição do fotossensibilizador a vermelho, a coluna central mostra a localização das mitocôndrias a verde e a coluna da direita representa a sobreposição de cada par de imagens. As células de carcinoma colorretal WiDr estão representadas em cima e as células de carcinoma do esôfago OE19 estão representadas em baixo. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x e a barra no canto inferior direito corresponde a 10 μm .

Nos lisossomas obteve-se um índice de colocalização de $0,34 \pm 0,06$ para as células de carcinoma colorretal e de $0,59 \pm 0,16$ para as células de carcinoma do esôfago. A Figura 24 mostra algumas imagens representativas da localização subcelular do fotossensibilizador BBr2HPC em comparação com a marcação dos lisossomas.

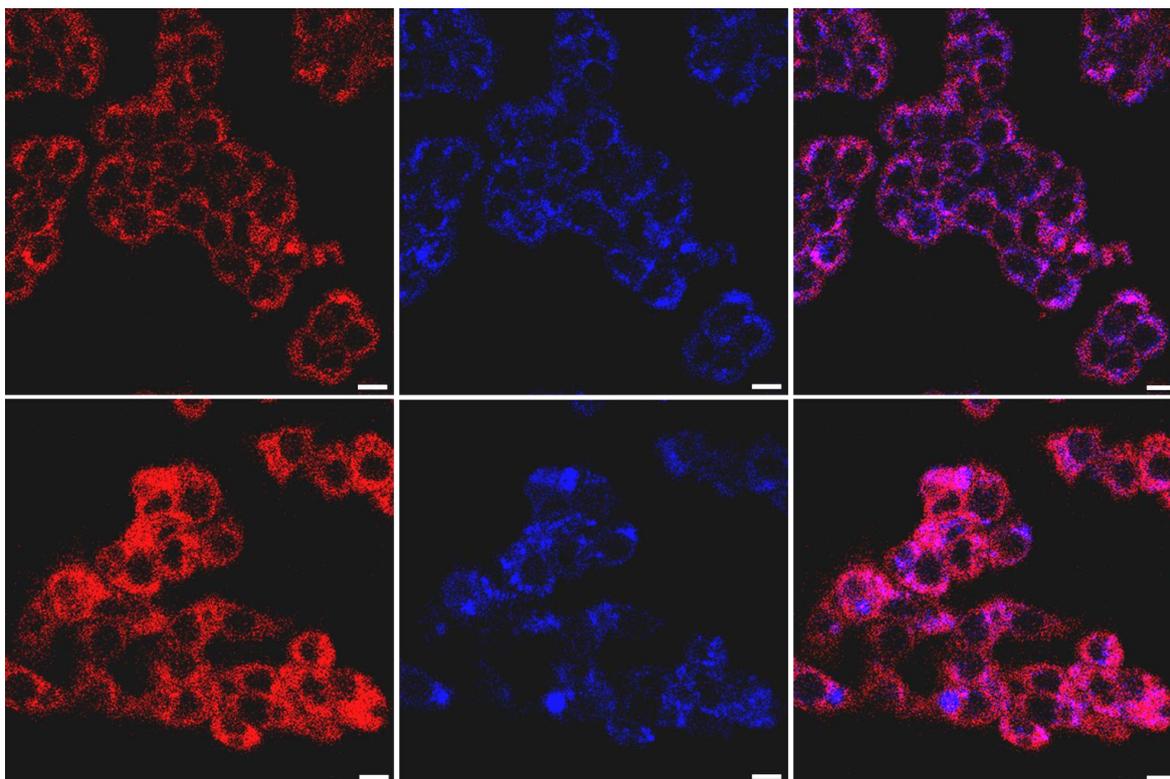


Figura 24: Imagens de microscopia confocal representativas da localização subcelular do fotossensibilizador BBr2HPC. A coluna da esquerda mostra a distribuição do fotossensibilizador a vermelho, a coluna central mostra a localização dos lisossomas a azul e a coluna da direita representa a sobreposição de cada par de imagens. As células de carcinoma colorretal WiDr estão representadas em cima e as células de carcinoma do esôfago OE19 estão representadas em baixo. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x e a barra no canto inferior direito corresponde a 10 μ m.

No caso do retículo endoplasmático, cujas imagens estão representadas na Figura 25, também se obteve uma correlação de Pearson positiva que se traduziu em índices de colocalização de $0,35 \pm 0,13$ para as células de carcinoma colorretal e de $0,32 \pm 0,15$ para as células de carcinoma do esôfago.

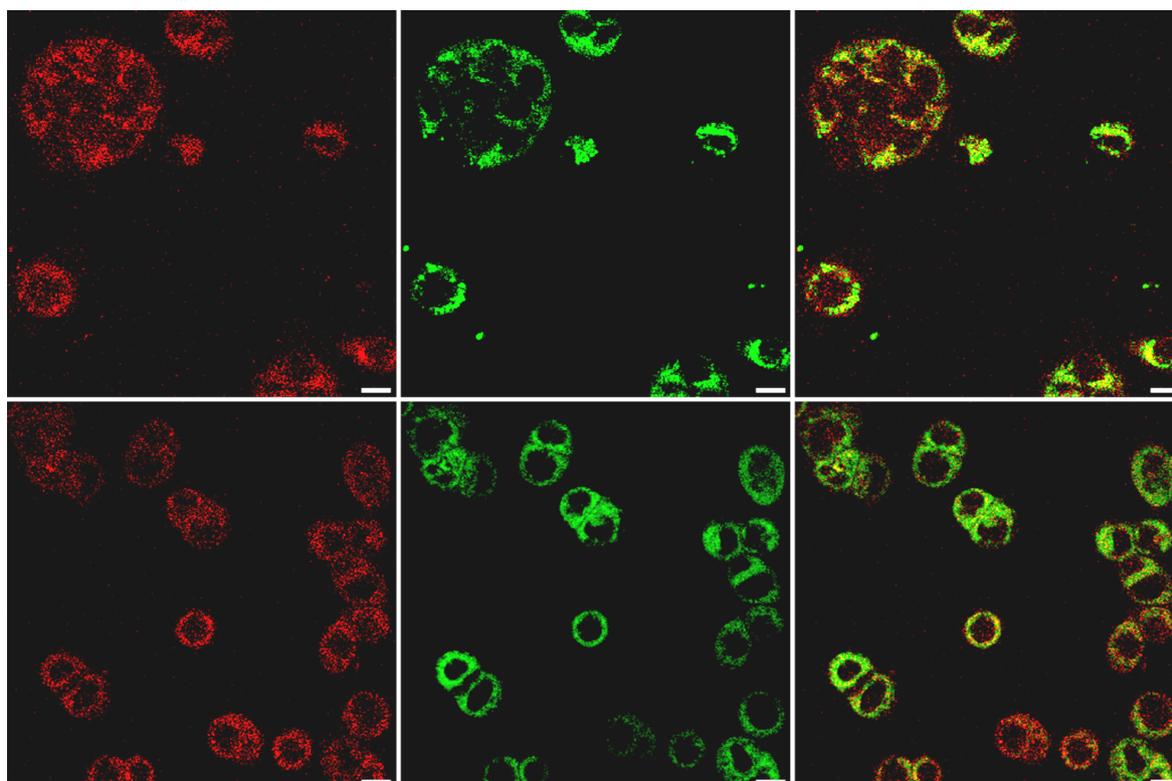


Figura 25: Imagens de microscopia confocal representativas da localização subcelular do fotossensibilizador BBr2HPC. A coluna da esquerda mostra a distribuição do fotossensibilizador a vermelho, a coluna central mostra a localização do retículo endoplasmático a verde e a coluna da direita representa a sobreposição de cada par de imagens. As células de carcinoma colorretal WiDr estão representadas em cima e as células de carcinoma do esôfago OE19 estão representadas em baixo. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x e a barra no canto inferior direito corresponde a 10 μ m.

Os intervalos de confiança a 95% da distribuição do índice de colocalização do fotossensibilizador BBr2HPC com os organelos em que se obteve correlação positiva são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Média e desvio padrão dos índices de colocalização do fotossensibilizador BBr2HPC com a mitocôndria, lisossomas e retículo endoplasmático e respetivos intervalos de confiança a 95%.

	Carcinoma Colorretal		Carcinoma do Esôfago	
	Média \pm DP	IC ₉₅	Média \pm DP	IC ₉₅
Lisossomas	0,34 \pm 0,06	[0,30; 0,37]	0,59 \pm 0,16	[0,49; 0,68]
Mitocôndria	0,27 \pm 0,10	[0,18; 0,36]	0,27 \pm 0,11	[0,20; 0,34]
Reticulo Endoplasmático	0,35 \pm 0,13	[0,23; 0,48]	0,32 \pm 0,15	[0,23; 0,40]

Vias de Morte Celular

Por forma a caracterizar as vias de morte celular induzidas pela PDT com base no fotossensibilizador BBr2HPC realizaram-se vários estudos, nomeadamente, para avaliar a exposição membranar de fosfatidilserina, a integridade da membrana citoplasmática, o potencial de membrana mitocondrial e a expressão de proteínas relevantes como a P53 e as caspases.

A viabilidade e o número de células em morte por apoptose, por apoptose tardia e por necrose são influenciados pelo tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC de modo significativo e dependente da concentração do fármaco, como se pode observar na Figura 26, para as células de carcinoma colorretal, e na Figura 27, para as células de carcinoma do esófago.

Nas células de carcinoma colorretal, WiDr (Figura 26), apenas 2 horas após o tratamento fotodinâmico, verificou-se uma redução da população de células vivas para os tratamentos com as concentrações de 5 nM para $75,9 \pm 2,5\%$ ($p < 0,001$), de 50 nM para $75,7 \pm 4,7\%$ ($p = 0,001$) e de 200 nM para $70,4 \pm 5,3\%$ ($p < 0,001$). No caso do tratamento com a concentração de 500 nM verificou-se uma redução da população de células vivas para apenas $25,4 \pm 9,1\%$ ($p < 0,001$).

De modo concomitante, 2 horas após o tratamento fotodinâmico, verificou-se um aumento das populações de células em apoptose para os tratamentos com a concentração de 50 nM para $10,7 \pm 3,5\%$ ($p = 0,004$) e de 200 nM para $9,4 \pm 2,8\%$ ($p = 0,017$), em necrose com a concentração de 200 nM para $13,9 \pm 2,5\%$ ($p = 0,028$) e de 500 nM para $57,2 \pm 13,1\%$ ($p < 0,001$) e em apoptose tardia ou necrose com a concentração de 5nM para $5,9 \pm 2,2\%$ ($p = 0,018$) e de 500nM para $8,8 \pm 7,5\%$ ($p = 0,011$).

Em relação às consequências 24 horas após o tratamento fotodinâmico (Figura 26), ocorre uma diminuição mais acentuada das populações de células vivas do que após 2 horas, nomeadamente nos tratamentos com a concentração de 5 nM para $78,5 \pm 5,1\%$ ($p = 0,003$), de 50 nM para $68,7 \pm 10,1\%$ ($p = 0,002$), de 200 nM para $28,8 \pm 11,7\%$ ($p < 0,001$) e de 500 nM para $12,8 \pm 3,4\%$ ($p < 0,001$).

No que concerne às populações em morte, para este tempo de avaliação (24 horas após o tratamento fotodinâmico) verificou-se um aumento significativo das células em apoptose para $11,4 \pm 4,9\%$ ($p = 0,001$) e em necrose para $14,1 \pm 4,6$ ($p = 0,016$) no tratamento com a concentração de 50 nM. Verificou-se aumento das células em morte por apoptose para $15,2 \pm 6,6\%$ ($p < 0,001$), em apoptose tardia ou necrose para $31,0 \pm 8,6\%$ ($p = 0,008$) e em necrose para $25,0 \pm 15,9\%$ ($p = 0,002$) no tratamento com 200 nM. Finalmente, no tratamento com a concentração de 500 nM verificou-se aumento das populações de células em morte por apoptose tardia ou necrose para $12,8 \pm 4,0$ ($p < 0,001$) e em necrose para $63,8 \pm 12,0$ ($p < 0,001$).

Nas células de carcinoma do esófago, OE19 (Figura 27), 2 horas após o tratamento fotodinâmico, verificou-se redução das populações de células vivas para os tratamentos com a concentração de 50 nM para $78,5 \pm 6,0\%$ ($p = 0,003$), de 200 nM para $78,6 \pm 3,3\%$ ($p = 0,003$) e de 500 nM para $28,2 \pm 4,7\%$ ($p < 0,001$). Para o mesmo período de avaliação verificou-se o aumento da população em apoptose para $10,9 \pm 2,0\%$ ($p = 0,018$) para o tratamento com a concentração de 200 nM. No caso do tratamento com a concentração de 500 nM verificou-se aumento das populações de células em apoptose para $17,5 \pm 4,7\%$ ($p < 0,001$), em apoptose ou necrose para $8,8 \pm 5,0\%$ ($p = 0,03$) e em necrose para $45,5 \pm 8,7\%$ ($p < 0,001$).

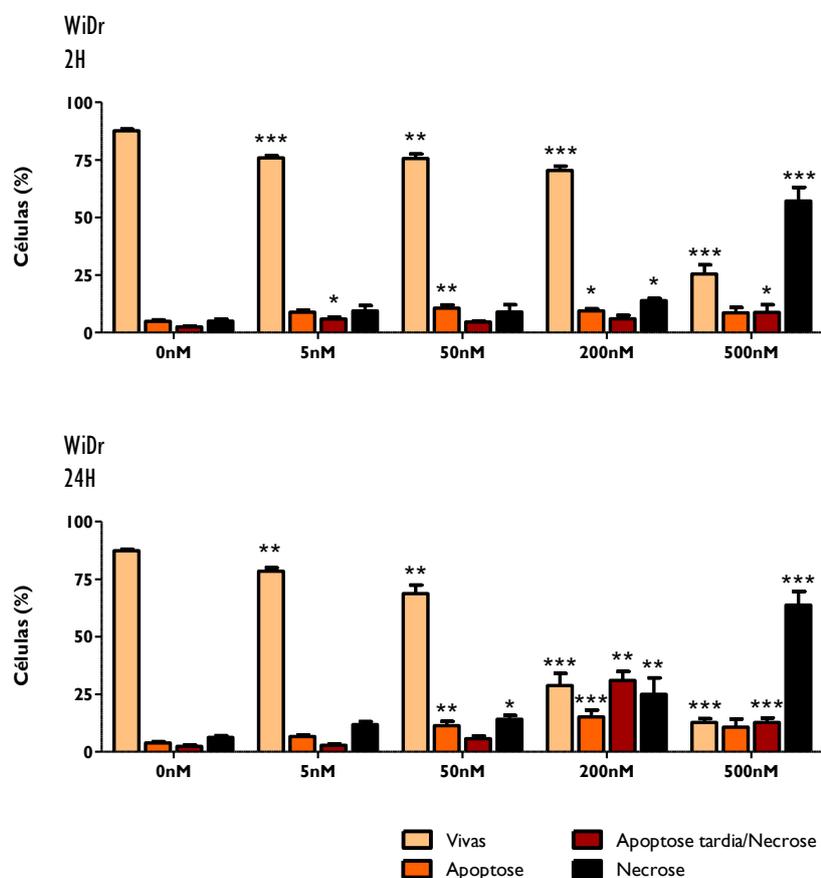


Figura 26: Viabilidade celular e tipos de morte celular nas células de carcinoma colorretal WiDr 2 horas (em cima) 24 horas (em baixo) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBP2HPC. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia ou necrose e em necrose. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Nestas células, 24 horas após o tratamento (Figura 27), ocorreu diminuição das células vivas para todas as concentrações de fotossensibilizador, nomeadamente, com a concentração de 5 nM para $78,0 \pm 3,8\%$ ($p = 0,042$), de 50 nM para $71,9 \pm 5,9\%$ ($p = 0,004$), de 200 nM para $9,2 \pm 5,6\%$ ($p < 0,001$) e de 500 nM para $20,6 \pm 4,4\%$ ($p < 0,001$). Para este tempo de avaliação verificou-se que a morte por apoptose está aumentada em todos os tratamentos, nomeadamente com a concentração de 5 nM para $11,8 \pm 4,5$ ($p = 0,002$), de 50 nM para $13,0 \pm 2,9\%$ ($p < 0,001$), de 200 nM para $19,0 \pm 11,2\%$ ($p < 0,001$) e de 500 nM para $13,7 \pm 9,5\%$ ($p = 0,012$). No caso das concentrações mais elevadas verifica-se também implicação de apoptose tardia ou necrose, com aumento para $65,3 \pm 14,3\%$ ($p < 0,001$) na concentração de 200 nM e para $17,3 \pm 8,8\%$ ($p = 0,002$) na concentração de 500 nM, e da necrose, com aumento para a concentração de 500 nM para $48,8 \pm 11,8\%$ ($p < 0,001$).

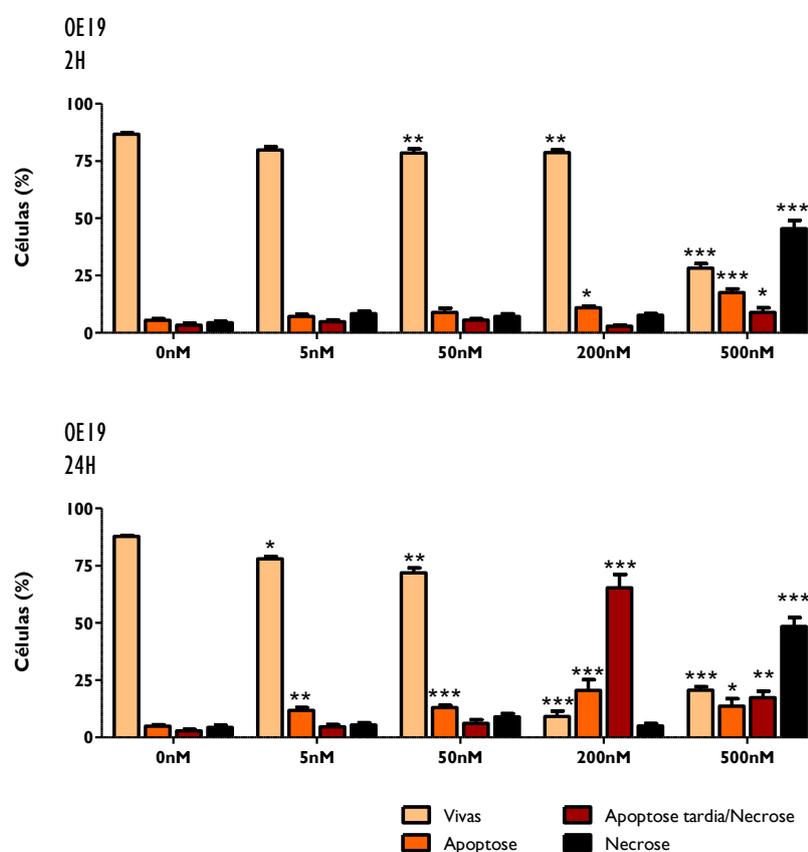


Figura 27: Viabilidade celular e tipos de morte celular nas células de carcinoma do esôfago OE19 2 horas (em cima) 24 horas (em baixo) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia ou necrose e em necrose. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

De um modo geral as células de carcinoma colorretal parecem ser mais suscetíveis à terapêutica, pelo menos para o tempo de avaliação mais curto. Tanto a apoptose como a necrose constituem resposta ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC, no entanto, a apoptose está associada principalmente às concentrações mais baixas e a necrose às concentrações mais elevadas de fotossensibilizador.

A mitocôndria constitui um organelo central na morte celular principalmente na apoptose. A disrupção do potencial de membrana mitocondrial constitui uma característica distintiva da apoptose, que resulta no desacoplamento da cadeia respiratória e na libertação de citocromo C. Neste trabalho utilizou-se o indicador do potencial de membrana mitocondrial JC-1 e análise por citometria de fluxo para avaliar as células submetidas ao tratamento. O potencial da membrana mitocondrial é perturbado como consequência do tratamento fotodinâmico como se pode observar na Figura 28 e na Figura 29.

Na linha celular de carcinoma colorretal verifica-se, na Figura 28, que o potencial de membrana mitocondrial é perturbado logo às duas horas após o tratamento fotodinâmico com as concentrações mais elevadas de fotossensibilizador, nomeadamente com a concentração de 200 nM ($p = 0,002$) e com a concentração de 500 nM

($p=0,002$). A alteração do potencial de membrana mitocondrial agrava-se 24 horas após o tratamento fotodinâmico, com o aumento significativo da razão monómeros/agregados para todos os tratamentos, ou seja, com as concentrações de 5 nM ($p=0,044$), de 50 nM ($p=0,036$), de 200 nM ($p<0,001$) e de 500 nM ($p<0,001$).

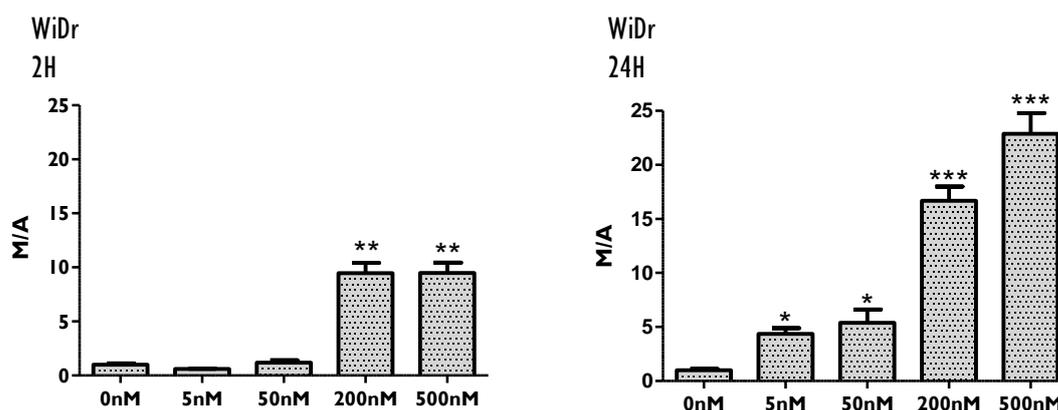


Figura 28: Potencial de membrana mitocondrial nas células de carcinoma colorretal WiDr 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BB2HPC. Os resultados representam a razão de monómeros/ agregados (M/A) para cada condição. A sonda JC-1 coexiste na forma monomérica ou agregada de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, um aumento na razão M/A indica uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$, ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$.

Nas células de carcinoma do esófago, também se verifica alteração do potencial de membrana mitocondrial, duas horas após o tratamento fotodinâmico com as concentrações de 200 nM ($p=0,012$) e de 500 nM ($p<0,001$), como representado na Figura 29. Esta diminuição do potencial de membrana mitocondrial mantém-se 24 horas depois do tratamento fotodinâmico com as mesmas concentrações de fotossensibilizador, nomeadamente, com 200 nM ($p=0,008$) e com 500 nM ($p<0,001$). Globalmente verifica-se que ocorre disrupção do potencial de membrana mitocondrial de modo dependente da concentração e do tempo.

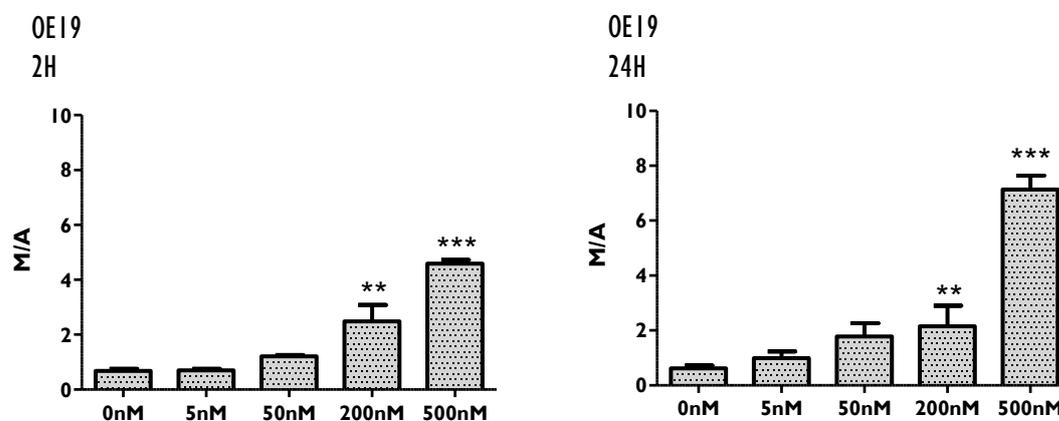


Figura 29: Potencial de membrana mitocondrial nas células de carcinoma do esôfago, OE19, 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados representam a razão de monômeros/agregados (M/A) para cada condição. A sonda JC-1 coexiste na forma monomérica ou agregada de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, um aumento na razão M/A indica uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

As vias de sinalização da P53 podem ser ativadas em resposta a vários tipos de stress, de modo a coordenar programas de transcrição que podem contribuir para a supressão tumoral (Muller & Vousden, 2013). Esta proteína é importante na resposta à quimioterapia e à radioterapia, no entanto, a sua importância na resposta à PDT não está completamente caracterizada (Tong *et al*, 2000).

A expressão da proteína P53 é influenciada pelo tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC, como se pode observar na Figura 30. Nas células de carcinoma colorretal verifica-se que o tratamento leva a diminuição significativa da expressão da proteína de forma dependente da concentração. Assim, a expressão da P53 é reduzida para $0,80 \pm 0,14$ ($p=0,024$) para o tratamento com a concentração de 5 nM, reduzida para $0,69 \pm 0,18$ ($p=0,012$) para o tratamento com a concentração de 50 nM e para $0,63 \pm 0,15$ ($p=0,018$) para o tratamento com a concentração de 200 nM. Nas células de carcinoma do esôfago também se verificou uma diminuição significativa da expressão de P53 para o tratamento com a concentração de 200 nM para $0,67 \pm 0,12$ ($p=0,009$).

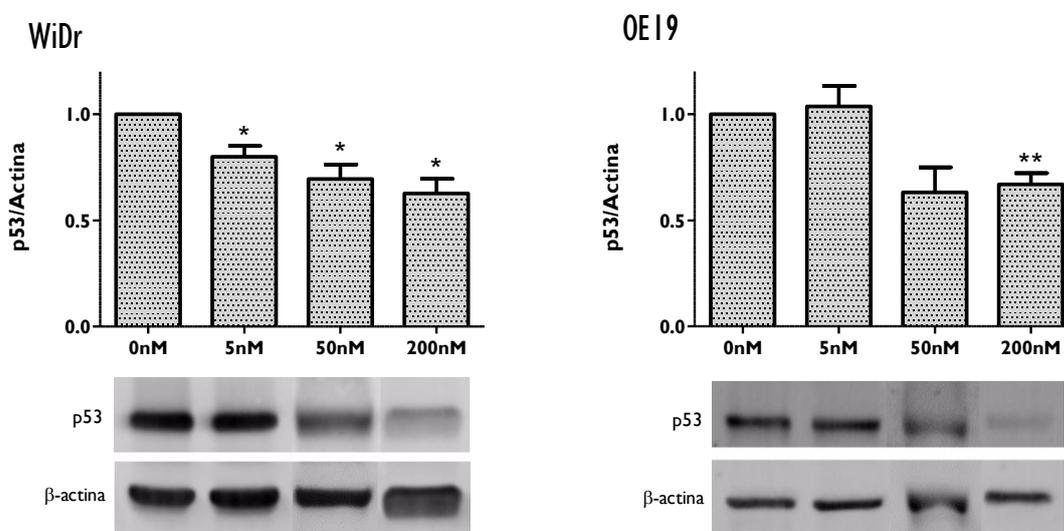


Figura 30: Expressão da proteína P53, nas células de carcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de carcinoma do esôfago (à direita), 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da P53 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controle (razão P53/actina do controle igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro ensaios. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da actina para cada uma das condições experimentais.

As caspases são proteases baseadas em cisteína, capazes de clivar outras proteínas numa região com ácido aspártico. Estas proteínas são de grande importância no desenrolar da apoptose. A caspase 8 está associada à via extrínseca enquanto a caspase 9 está associada à via intrínseca (Budihardjo *et al*, 1999; Almeida *et al*, 2004; Fan *et al*, 2005). A expressão das proteínas caspase 8, caspase 3 e caspase 9 é influenciada pelo tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC, como se pode observar na Figura 31, na Figura 32 e na Figura 33, respetivamente.

A expressão da proteína caspase 3 é alterada pelo tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC de forma dependente da concentração (Figura 31). De um modo geral verificou-se uma diminuição da proteína caspase 3 identificada a 32 kDa, com o aumento da concentração de fotossensibilizador. Porém, essa diminuição é acompanhada do aumento de um produto de clivagem da proteína caspase 3, com peso molecular de 17 kDa. As células de carcinoma colorretal quando submetidas ao tratamento fotodinâmico com a concentração de 200 nM de fotossensibilizador apresentaram uma diminuição para $0,53 \pm 0,14$ ($p < 0,001$) da proteína de maior peso molecular, acompanhada de aumento da proteína clivada, com 17 kDa, para $1,39 \pm 0,27$ ($p = 0,006$).

Para as células de carcinoma do esôfago verificou-se uma resposta semelhante para a mesma concentração (200 nM), com redução do valor médio da caspase 3 de 32 kDa para $0,67 \pm 0,06$ ($p < 0,001$) e aumento da proteína de menor peso para $3,16 \pm 1,55$ ($p = 0,018$). No tratamento com a concentração de 50 nM verificou-se uma resposta semelhante tanto para a caspase 3 de 32 kDa como para a proteína clivada de 17 kDa, no entanto,

apenas a redução da primeira teve significado estatístico, tanto para a linha celular de carcinoma colorretal ($0,71 \pm 0,15$ com $p=0,039$) como para a linha celular de carcinoma do esófago ($0,73 \pm 0,12$ com $p<0,001$).

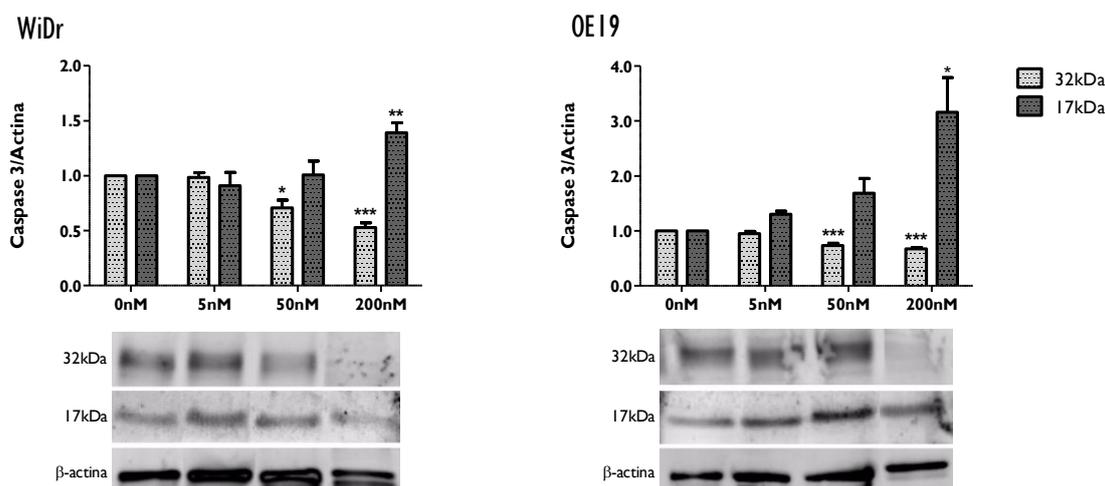


Figura 31: Expressão da proteína caspase 3, nas células de carcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de carcinoma do esófago (à direita), 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Foi possível quantificar a expressão da caspase 3, proteína com 32 kDa, e de um produto de clivagem da mesma com peso molecular de 17 kDa. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da proteína de interesse e da actina. Os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controlo (razão Caspase 3/actina do controlo igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$, ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína Caspase 3 e da actina para cada uma das condições experimentais.

Em relação à expressão da caspase 8, representada na Figura 32, nas células de carcinoma colorretal verifica-se que o tratamento leva à sua diminuição significativa de forma dependente da concentração. Assim, a expressão da proteína é reduzida para $0,72 \pm 0,20$ ($p=0,024$) com o tratamento com a concentração de 50 nM, para $0,58 \pm 0,22$ ($p=0,006$) para o tratamento com a concentração de 200 nM.

Quanto às células de carcinoma do esófago também se verifica uma alteração da expressão de caspase 8 mas, neste caso, com redução significativa apenas para o tratamento com a concentração de 200 nM para o valor médio de $0,68 \pm 0,17$ ($p=0,018$).

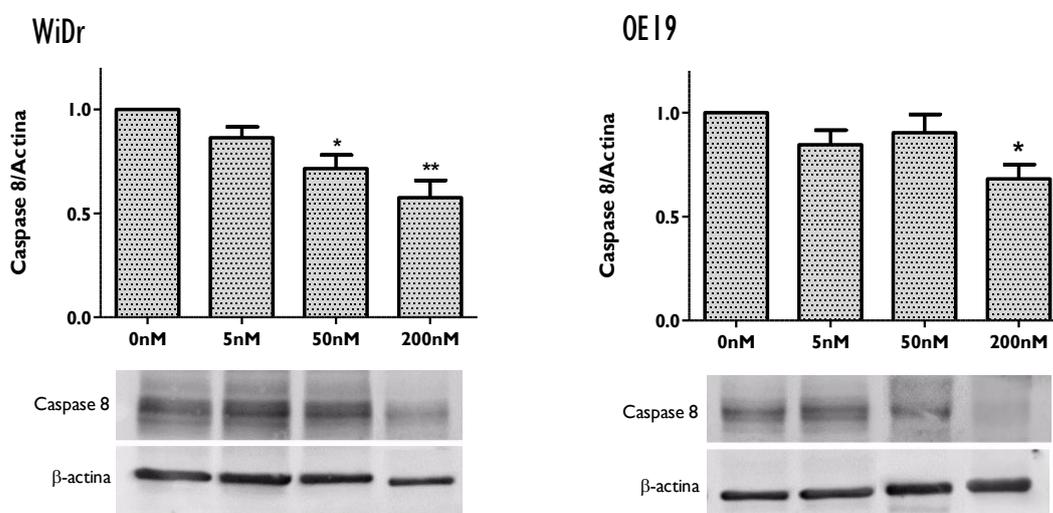


Figura 32: Expressão da proteína Caspase 8, nas células de carcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de carcinoma do esôfago (à direita), 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência de Caspase 8 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controlo (razão Caspase 8/actina do controlo igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos seis experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína Caspase 8 e da actina para cada uma das condições experimentais.

No que concerne à caspase 9 (Figura 33), nas células de carcinoma colorretal verificou-se uma diminuição significativa da proteína de maior peso molecular, com 46 kDa, para $0,75 \pm 0,14$ ($p = 0,012$) quando o tratamento fotodinâmico foi realizado com a concentração de 50 nM e para $0,58 \pm 0,25$ ($p = 0,003$) quando o tratamento foi realizado com a concentração de 200 nM. Apesar de com as mesmas concentrações se verificar uma tendência para o aumento da expressão da caspase 9 clivada, com 35 kDa, não se verificou significância estatística.

Nas células de carcinoma do esôfago verifica-se que a diminuição da expressão da caspase 9 de 46 kDa é acompanhada de aumento significativo da proteína de menor peso molecular. Assim, para o tratamento com BBr2HPC na concentração de 50 nM verifica-se uma diminuição da caspase 9 de 46 kDa para $0,65 \pm 0,19$ ($p = 0,003$) e um aumento da proteína de 35kDa para $1,48 \pm 0,38$ ($p = 0,027$). Com a concentração de 200 nM a resposta é semelhante, havendo uma diminuição da caspase 9 de 46 kDa para $0,76 \pm 0,17$ ($p = 0,015$) e um aumento da proteína de 35 kDa para $2,13 \pm 0,39$ ($p < 0,001$).

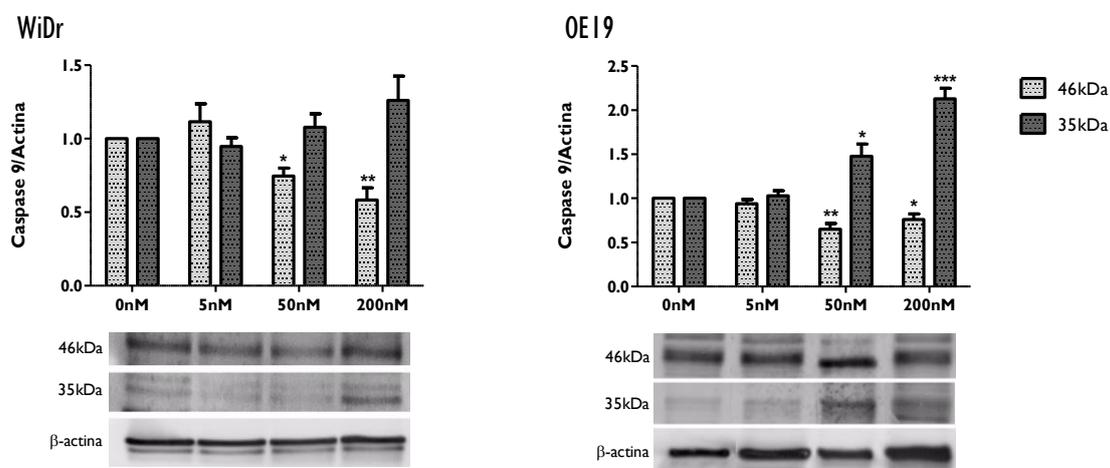


Figura 33: Expressão da proteína caspase 9, nas células de carcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de carcinoma do esôfago (à direita), 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Foi possível quantificar a expressão da caspase 9, proteína com 46 kDa, e de um produto de clivagem da mesma com peso molecular de 35 kDa. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da proteína de interesse e da actina. Os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controlo (razão Caspase 9/actina do controlo igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$. Um símbolo representa $p < 0,05$, dois símbolos representam $p < 0,01$ e três símbolos representam $p < 0,001$. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína Caspase 9, do produto de clivagem e da actina para cada uma das condições experimentais.

Globalmente, as proteínas caspases são influenciadas significativamente como consequência da PDT, com base no fotossensibilizador BBr2HPC, de modo dependente da concentração, verificando-se uma diminuição da expressão das caspases e aumento da expressão da forma clivada que foi possível detetar.

Alterações no núcleo celular

Nos estudos de localização subcelular verificou-se que o fotossensibilizador BBr2HPC não se localiza no núcleo celular. No entanto, como organelo fundamental que num processo de morte celular é submetido a alterações programadas é expectável que, como consequência do stress induzido pela PDT, se verifiquem alterações mensuráveis. Assim, neste trabalho, estudou-se o conteúdo de DNA das células, possíveis alterações pelo ensaio cometa e a influência na proteína estrutural lâmina B1.

A avaliação do conteúdo de DNA numa célula individual, pela progressiva alteração de $2n$ cromossomas para n , constitui forma de avaliar em que fase do ciclo celular se encontra, nomeadamente, em G1, em fase S e em G2 ou em divisão. De um modo geral o ciclo celular é pouco influenciado pela terapia fotodinâmica com base no sensibilizador BBr2HPC, como representado na Figura 34 e na Figura 35.

O acontecimento mais relevante é o surgimento de um pico pré-G0 tanto nas células de carcinoma colorretal (24 h: $p = 0,011$) como nas células de carcinoma do esôfago (2 e 24 horas: $p < 0,001$) para o tratamento com a

concentração de 500 nM. Este pico corresponde à presença de células mortas e, portanto, com núcleo fragmentado ou com menor conteúdo de DNA.

Na linha celular de carcinoma colorretal (Figura 34), 24 horas após o tratamento com a concentração de 500 nM verifica-se também uma diminuição da população celular em G0/G1 de $64,0 \pm 5,2$ para $49,0 \pm 12,3$ ($p < 0,001$), aumento da população celular em fase S, de $22,9 \pm 5,1$ para $50,7 \pm 12,1$ ($p = 0,015$) e diminuição da população celular em fase G2/M de $13,5 \pm 3,1$ para $0,3 \pm 0,6$ ($p = 0,002$).

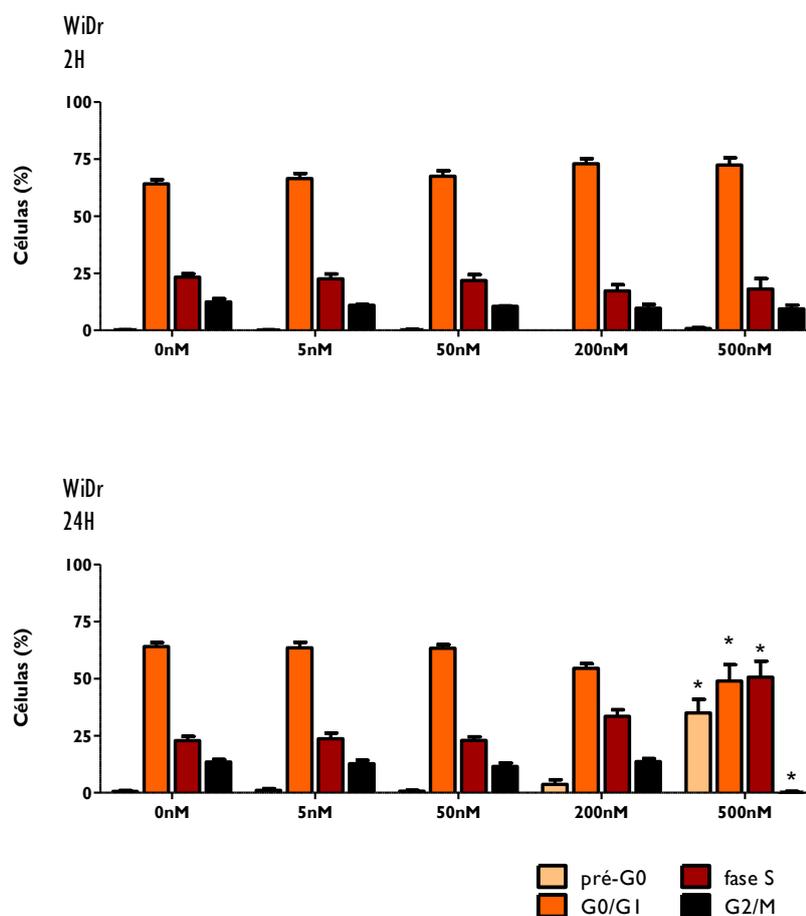


Figura 34: Ciclo celular das células de carcinoma colorretal WiDr 2 horas (em cima) e 24 horas (em baixo) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células nas fases pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Na linha celular de carcinoma do esófago (Figura 35) verifica-se também uma diminuição da fase G2/M de $16,0 \pm 5,7$ para $6,1 \pm 5,9$ ($p = 0,016$) e de $18,7 \pm 2,7$ para $7,3 \pm 5,5$ ($p = 0,002$) 2 horas e 24 horas, respetivamente,

após o tratamento fotodinâmico, com a concentração de 500 nM, que é acompanhada de um incremento não significativo da população celular em fase S.

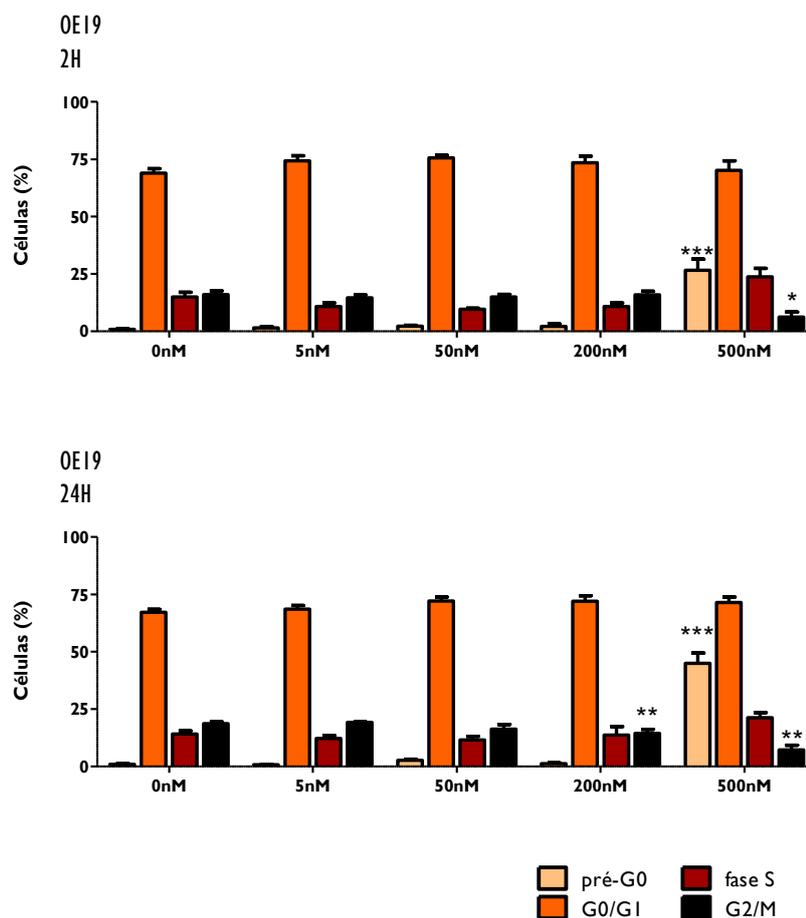


Figura 35: Ciclo celular das células de carcinoma do esôfago OE19 2 horas (em cima) e 24 horas (em baixo) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células nas fases pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

A eletroforese de células individuais em microgel fornece informações acerca do estado do DNA. No que diz respeito à distribuição de momento da cauda para as condições controlo e para os tratamentos com concentrações até 50 nM verifica-se uma distribuição assimétrica com cauda à direita enquanto para o tratamento com a concentração de 200 nM podemos observar uma distribuição bimodal.

Nas células de carcinoma colorretal verificaram-se diferenças significativas no momento da cauda para as células tratadas com a concentração de 50 nM e de 200 nM ($p < 0,001$). Nas células de carcinoma do esôfago verificaram-

se diferenças significativas apenas para o tratamento com a concentração de 200 nM ($p < 0,001$). As medianas e percentil 90 (P90) das distribuições obtidas estão representados na Tabela 5. A Figura 36 mostra os gráficos das distribuições obtidas e algumas imagens ilustrativas das condições estudadas.

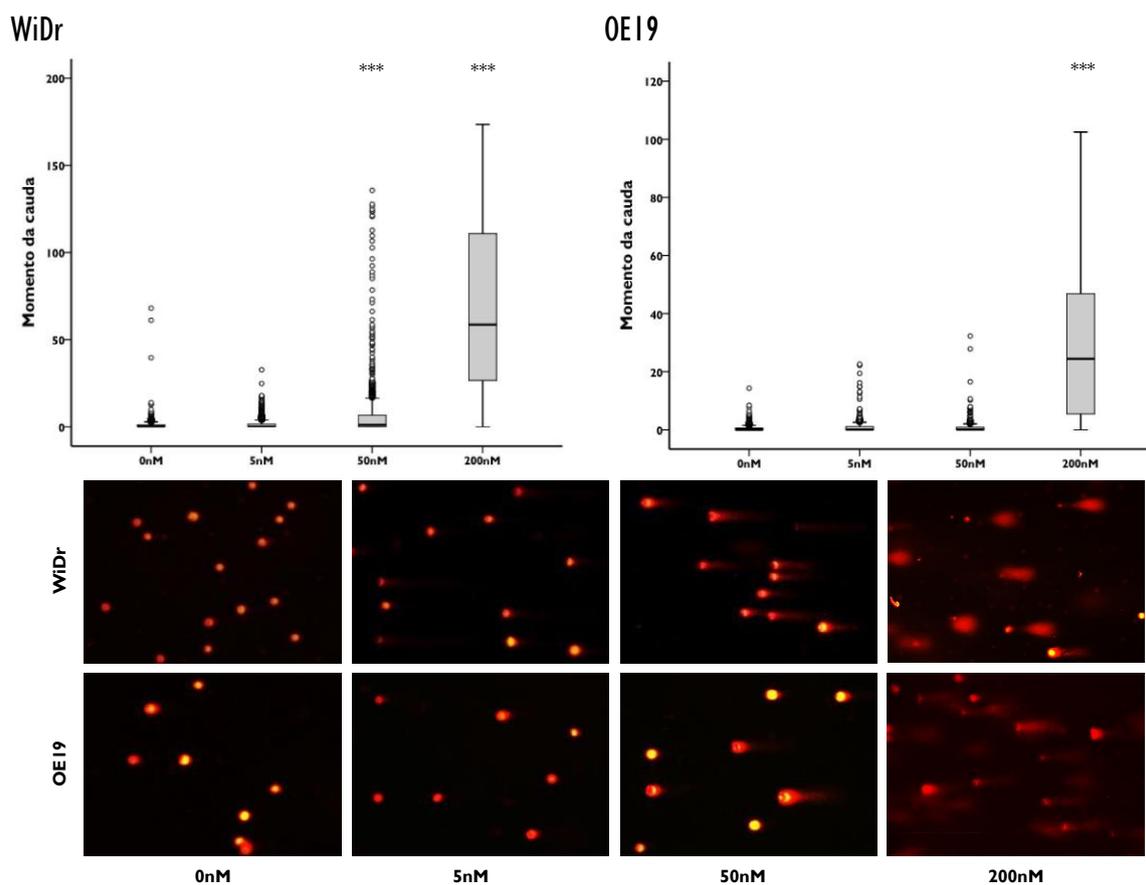


Figura 36: Momento da cauda dos cometas obtidos das células de carcinoma colorretal (à esquerda) e de carcinoma do esófago (à direita). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$. Em baixo estão representadas imagens ilustrativas dos cometas obtidos em cada uma das condições experimentais. As células de carcinoma colorretal estão representadas na linha de cima e as células de carcinoma do esófago estão representadas na linha de baixo. As experiências foram realizadas 24 horas após o tratamento fotodinâmico. As imagens representadas foram obtidas com uma ampliação de 400x.

Tabela 5: Mediana e P90 do momento da cauda dos cometas obtidos das células de carcinoma colorretal e de carcinoma do esófago após tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC.

	0nM		5nM		50nM		200nM	
	Mediana	P90	Mediana	P90	Mediana	P90	Mediana	P90
Carcinoma Colorretal	0,20	3,16	0,27	5,37	1,14	18,04	58,59	137,53
Carcinoma do Esófago	0,03	1,85	0,08	3,85	0,07	3,85	24,43	61,84

A lâmina BI é uma das proteínas da lâmina nuclear, camada proteica do envelope nuclear, responsável por manter a integridade desta estrutura e que também é capaz de interagir e ancorar a cromatina. Tal como representado na Figura 37, como consequência da terapia fotodinâmica baseada no fotossensibilizador BBr2HPC verifica-se uma redução da expressão desta proteína, tanto na linha celular de carcinoma colorretal para as concentrações de 50 nM ($p=0,009$) e de 200 nM ($p=0,027$), como nas células de carcinoma do esófago para a concentração de 200 nM ($p=0,003$).

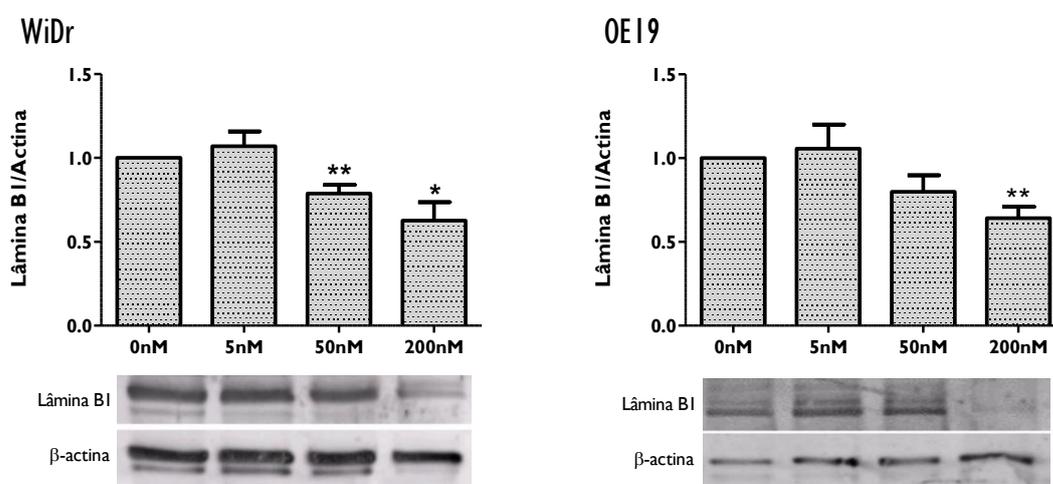


Figura 37: Expressão da proteína Lâmina BI, nas células de carcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de carcinoma do esófago (à direita), 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência de Lâmina BI e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controlo (razão Lâmina BI/actina do controlo igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos seis experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$, ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$. As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína Lâmina BI e da actina para cada uma das condições experimentais.

Stresse oxidativo

A formação de ROS é o evento responsável pela indução de morte na PDT. Várias ROS podem estar envolvidas neste processo e habitualmente o oxigénio singleto é considerado de importância *major*. Na impossibilidade de avaliar a concentração intracelular desta ROS de modo direto, realizaram-se estudos na presença de azida de sódio, um *quencher* desta espécie. Os resultados, representados na Figura 38, mostram que a inibição da atividade metabólica é reduzida na presença de azida de sódio. Na linha celular de carcinoma colorretal, a inibição da atividade metabólica provocada pelo tratamento com as concentrações de 50 nM e de 200 nM é reduzida. Esta redução da inibição da atividade metabólica é significativa no caso do tratamento com 200 nM em que a atividade metabólica passa de $6,7 \pm 0,6$ para $37,3 \pm 11,4\%$ ($p<0,001$). Na linha celular de carcinoma do esófago a implicação do oxigénio singleto é ainda mais evidente uma vez que no tratamento com a concentração de 50 nM a atividade

metabólica passa de $12,8 \pm 0,5$ para $82,5 \pm 14,9$ ($p < 0,001$) e no tratamento com a concentração de 200 nM a atividade metabólica sobe para $19,8 \pm 12,64$ ($p = 0,007$).

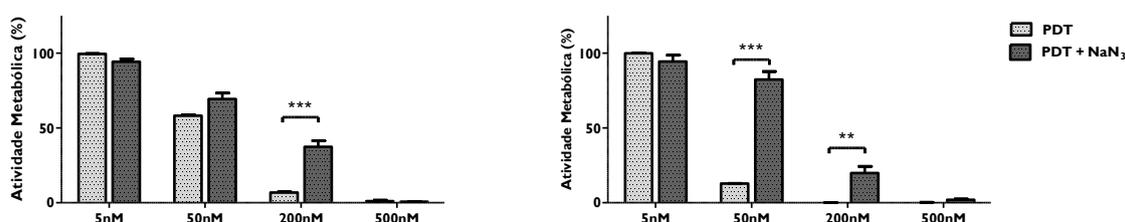


Figura 38: Atividade metabólica das células de carcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de carcinoma do esôfago (à direita) 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC na presença de um *quencher* de oxigênio singlete (1O_2). Para calcular a atividade metabólica utilizou-se como termo de comparação as culturas celulares controlo submetidas ao veículo de administração do fotossensibilizador. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

O d-manitol constitui um *scavenger* de radical superóxido. Os estudos na presença deste composto estão representados na Figura 39. Nas células de carcinoma colorretal, verifica-se que a atividade metabólica na presença de d-manitol é significativamente superior no tratamento com a concentração de 200 nM ($p < 0,001$). No caso das células de carcinoma do esôfago o d-manitol influencia o resultado do tratamento de modo significativo para as concentrações de 50 nM ($p < 0,001$) e de 200 nM ($p = 0,045$).

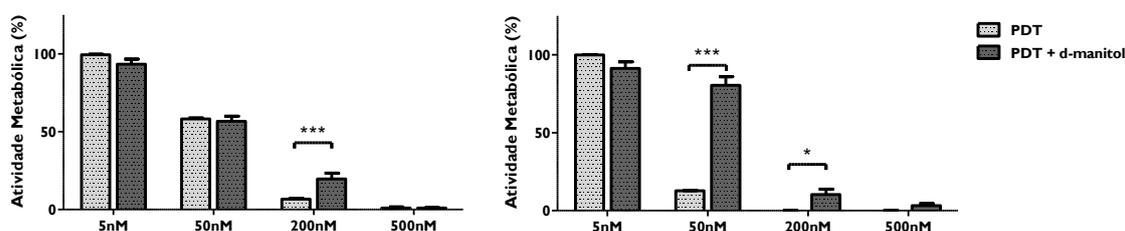


Figura 39: Atividade metabólica das células de carcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de carcinoma do esôfago (à direita), 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC, na presença de d-manitol, um *scavenger* de radical superóxido (HO^{\bullet}). Para calcular a atividade metabólica utilizou-se como termo de comparação as culturas celulares controlo submetidas ao veículo de administração do fotossensibilizador. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos seis ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

A produção intracelular de anião superóxido, representada na Figura 40 e na Figura 41, foi avaliada 2 e 24 horas após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. De um modo geral, verifica-se aumento significativo desta ROS com o tratamento com as concentrações mais elevadas de fotossensibilizador.

Enquanto para as concentrações mais baixas, de 5 nM e de 50 nM, não se registam variações em relação às culturas celulares controlo tanto após 2 como após 24 horas do tratamento fotodinâmico, nas concentrações mais elevadas, de 200 nM e de 500 nM verificam-se aumentos significativos da concentração intracelular de anião superóxido. Assim, nas células de carcinoma colorretal (Figura 40) verificou-se um aumento desta ROS 2 horas após o tratamento com a concentração de 200 nM para $1,34 \pm 0,30$ ($p=0,036$) e com a concentração de 500 nM para $4,01 \pm 0,75$ ($p=0,016$) e também 24 horas após o tratamento com as mesmas concentrações de 200 nM para $1,83 \pm 0,71$ ($p=0,032$) e de 500 nM para $3,40 \pm 0,77$ ($p=0,008$).

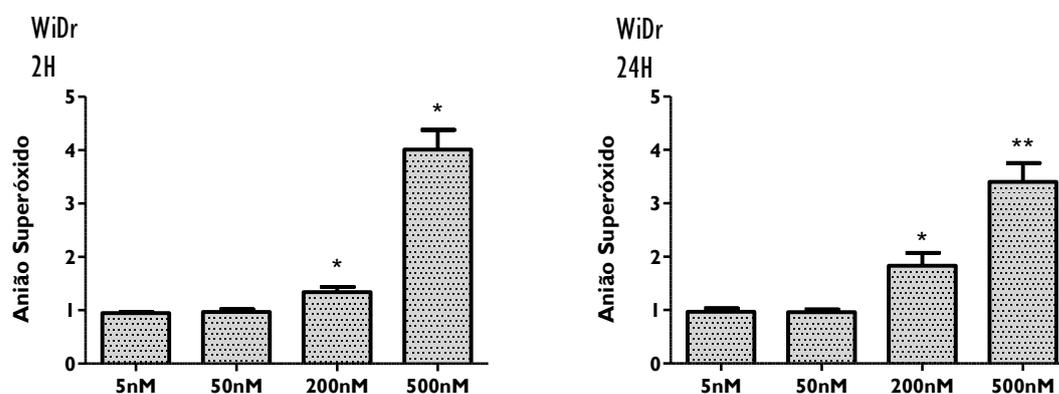


Figura 40: Produção intracelular de anião superóxido nas células de carcinoma colorretal 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controlo. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Nas células de carcinoma do esófago, representadas na Figura 41, verificou-se um aumento de anião superóxido 2 horas após o tratamento com a concentração de 200 nM para $1,27 \pm 0,23$ ($p=0,012$) e com a concentração de 500 nM para $1,46 \pm 0,36$ ($p=0,018$) e também 24 após o tratamento com as mesmas concentrações de 200 nM para $1,42 \pm 0,18$ ($p < 0,001$) e de 500 nM para $1,73 \pm 0,79$ ($p=0,048$).

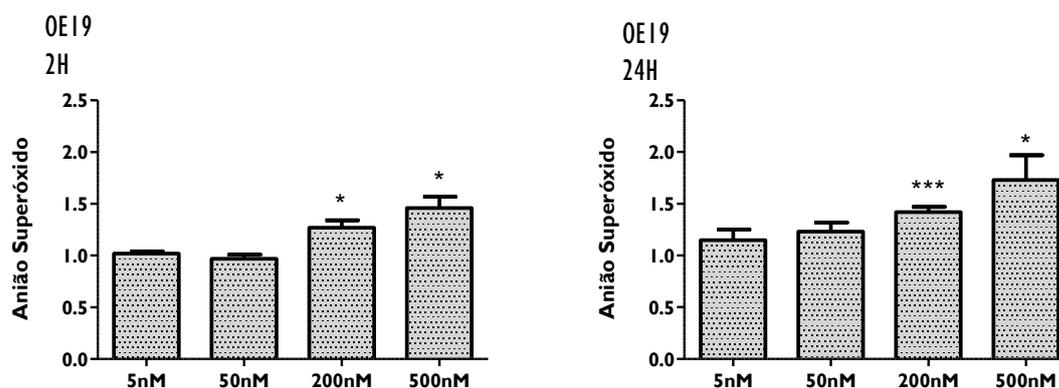


Figura 41: Produção intracelular de anião superóxido nas células de carcinoma do esôfago 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BB2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controle. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos sete ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

No que concerne à produção intracelular de peróxidos verificou-se um desequilíbrio na produção destas ROS nas duas linhas celulares estudadas, como se pode apreciar na Figura 42 e na Figura 43.

Na linha celular de carcinoma colorretal (Figura 42), 2 horas após o tratamento, verificou-se um aumento de peróxidos nos tratamentos com as concentrações mais baixas de fotossensibilizado, nomeadamente para a concentração de 5 nM para $1,58 \pm 0,22$ ($p = 0,004$) e de 50 nM para $1,56 \pm 0,42$ ($p = 0,048$) acompanhado de diminuição muito acentuada para a concentração mais elevada, de 500 nM, para $0,19 \pm 0,13$ ($p < 0,001$). Após 24 horas do tratamento, verifica-se que deixa de haver diferenças em relação ao controlo para as duas concentrações mais baixas de fotossensibilizador (5 nM e 50 nM), no entanto, para as concentrações mais elevadas mantém-se a diminuição desta ROS, no caso da concentração de 200 nM para $0,41 \pm 0,08$ ($p < 0,001$) e no caso da concentração de 500 nM para $0,11 \pm 0,09$ ($p < 0,001$).

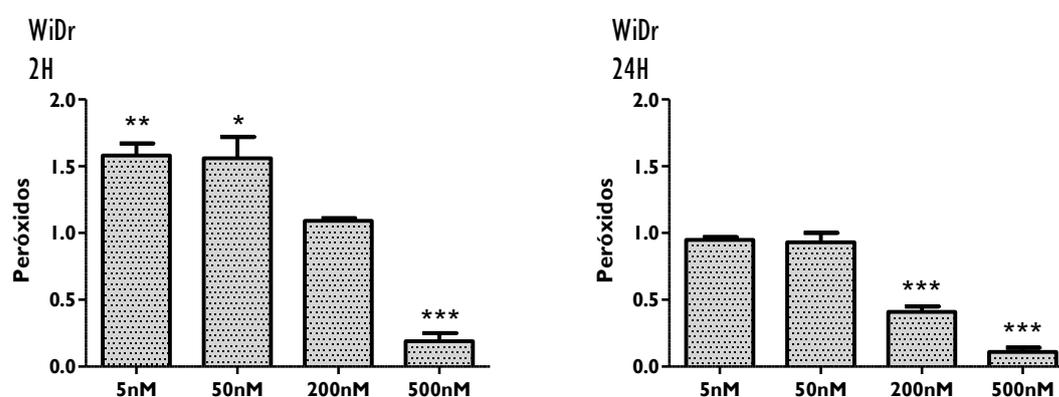


Figura 42: Produção intracelular de peróxidos nas células de carcinoma colorretal 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BB2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controle. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Na linha celular de carcinoma do esôfago, a produção intracelular de peróxidos consequente da PDT segue uma tendência similar (Figura 43). Assim, 2 horas após o tratamento com as concentrações mais baixas verifica-se um aumento significativo da produção desta ROS, nomeadamente com a concentração de 5 nM para $1,28 \pm 0,21$ ($p=0,028$) e de 50 nM para $1,38 \pm 0,27$ ($p=0,008$) enquanto para as concentrações mais elevadas, de 200 nM e de 500 nM se verifica diminuição para $0,58 \pm 0,35$ ($p=0,028$) e para $0,14 \pm 0,09$ ($p<0,001$), respetivamente.

Na avaliação mais tardia, 24 horas após o tratamento, verifica-se que para as concentrações mais baixas ocorre restabelecimento desta espécie para valores iguais a células não tratadas e, que para as concentrações mais elevadas se mantem a diminuição significativa, tanto para a concentração de 200 nM com valor médio de $0,05 \pm 0,02$ ($p<0,001$), como para a concentração de 500 nM com um valor médio de $0,06 \pm 0,05$ ($p<0,001$).

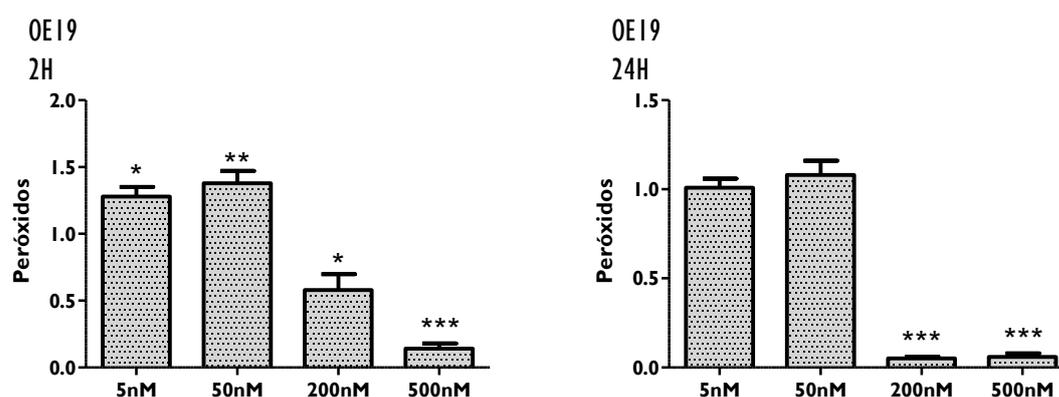


Figura 43: Produção intracelular de peróxidos, nas células de carcinoma do esôfago 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controlo. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$, ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$.

Além das ROS, também as defesas antioxidantes da célula podem influenciar o resultado terapêutico pelo seu efeito citoprotetor. A superóxido dismutase (SOD) foi avaliada nas duas linhas celulares 2 e 24 horas após o tratamento fotodinâmico. Em ambas as linhas celulares não se verificaram diferenças significativas em relação às culturas celulares controlo, 2 horas após o tratamento (Figura 44 e Figura 45). No entanto, após 24 horas verifica-se um aumento com significado tanto para as células de carcinoma colorretal como para as células de carcinoma do esôfago. Assim, nas células de carcinoma colorretal (Figura 44) submetidas ao tratamento dinâmico com a concentração de 5 nM verificou-se um aumento para $1,26 \pm 0,15$ ($p=0,012$), para $1,31 \pm 0,21$ com a concentração de 50 nM ($p=0,024$) e para $1,50 \pm 0,20$ com a concentração de 200 nM ($p=0,015$).

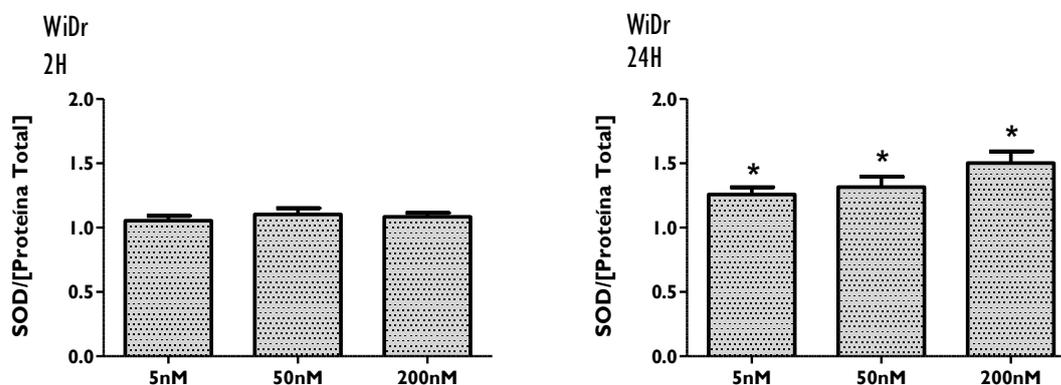


Figura 44: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas células de carcinoma colorretal 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a absorvância obtida e a concentração de proteína total e os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controle (razão SOD/proteína total do controle igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

No caso das células de carcinoma do esôfago (Figura 45), o tratamento com a concentração de 5 nM levou a um aumento para $1,19 \pm 0,06$ ($p = 0,006$), para $1,33 \pm 0,11$ ($p = 0,006$) com a concentração de 50 nM e para $1,48 \pm 0,22$ ($p = 0,024$) com a concentração de 200 nM.

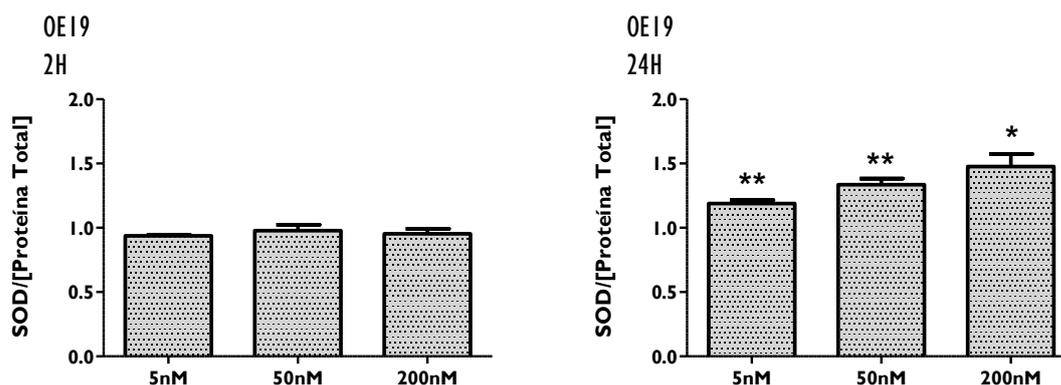


Figura 45: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas células de carcinoma do esôfago 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a absorvância obtida e a concentração de proteína total e os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controle (razão SOD/proteína total do controle igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

A glutatona reduzida é uma enzima antioxidante responsável pela metabolização de vários peróxidos e espécies radicais. Em resposta ao tratamento fotodinâmico com base no fotossensibilizador BBr2HPC verifica-se uma diminuição desta defesa antioxidante 2 horas após o tratamento. Nas células de carcinoma colorretal, cujos resultados estão representados na Figura 46, esta redução é significativa no tratamento fotodinâmico com as concentrações de 50 nM, para $0,90 \pm 0,07$ ($p=0,016$), de 200 nM, para $0,53 \pm 0,17$ ($p<0,001$), e de 500 nM, para $0,45 \pm 0,24$ ($p=0,028$).

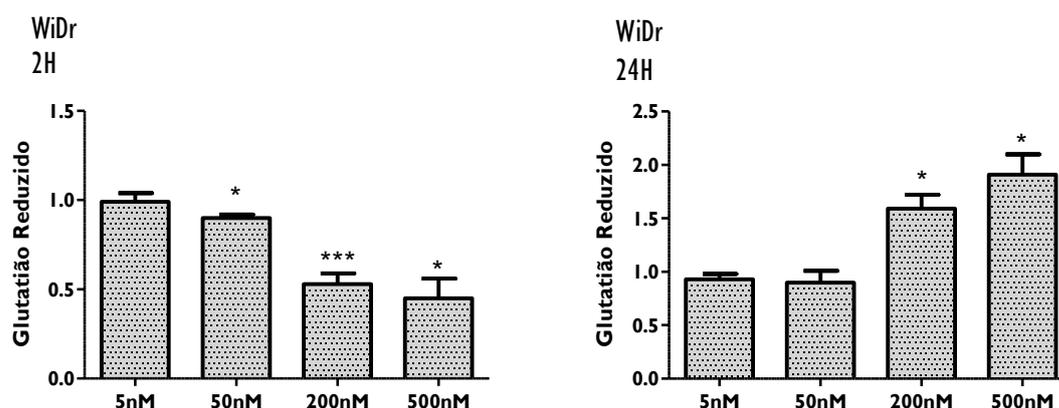


Figura 46: Atividade da enzima glutatião reduzido nas células de carcinoma colorretal 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controlo. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$, ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$.

Nas células de carcinoma do esófago, também para o tempo de avaliação 2 horas (Figura 47), a redução é significativa no caso das concentrações 50 nM, para $0,80 \pm 0,09$ ($p<0,001$), de 200 nM, para $0,76 \pm 0,18$ ($p=0,028$), e de 500 nM, para $0,48 \pm 0,18$ ($p=0,004$).

Nas células de carcinoma do esófago (Figura 47), verifica-se que 24 horas após o tratamento os níveis basais de GSH são restabelecidos, não se verificando alterações significativas em relação ao controlo. Na linha celular de carcinoma colorretal (Figura 46) esta alteração também se verifica para o tratamento com 50 nM de BBr2HPC, no entanto para as concentrações mais elevadas verifica-se um aumento significativo, nomeadamente com a concentração de 200 nM para $1,59 \pm 0,36$ ($p=0,02$) e de 500 nM para $1,92 \pm 0,50$ ($p=0,012$).

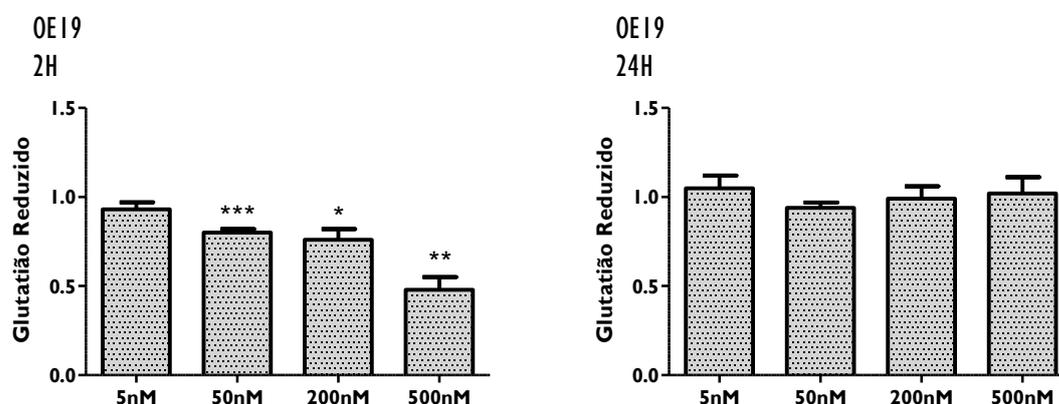


Figura 47: Atividade da enzima glutatião reduzido nas células de carcinoma do esôfago 2 horas (à esquerda) e 24 horas (à direita) após o tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controle. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos cinco ensaios. As diferenças significativas em relação ao controle estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Discussão

O fotossensibilizador BBr2HPC foi sintetizado e caracterizado tendo-se concluído que as suas propriedades fotoquímicas são apropriadas para utilização em PDT e que são superiores às da porfirina correspondente e precursora da sua síntese.

Os estudos de citotoxicidade comprovaram que o fotossensibilizador BBr2HPC tem efeito fotodinâmico *in vitro*. No que respeita à atividade metabólica, nas células humanas de carcinoma colorretal, de carcinoma do esôfago e de melanoma estudadas verifica-se que a inibição é proporcional ao aumento da concentração do fotossensibilizador. Os resultados do ensaio do MTT permitiram ainda calcular a concentração correspondente ao IC_{50} , valor comumente utilizado para quantificar e comparar o efeito terapêutico de fármacos com efeito anticâncer.

Não se obtiveram diferenças significativas entre os valores de IC_{50} obtidos para as três linhas celulares estudadas, carcinoma colorretal, carcinoma do esôfago e melanoma apesar de, tendencialmente, a linha celular mais sensível ser a do esôfago, com um IC_{50} de apenas 35 nM. A comparação dos valores de IC_{50} obtidos 2 e 24 horas após o tratamento mostra uma diminuição dessa concentração que permite concluir que os danos provocados pelo tratamento são irreversíveis ou, pelo menos, que as células das três linhas celulares estudadas não são capazes de recuperar durante o período de tempo em causa.

Os valores de IC_{50} obtidos com o fotossensibilizador BBr2HPC são bastantes promissores, variando entre 35 e 61nM nas linhas celulares de carcinoma colorretal, de carcinoma do esófago e de melanoma. Estes valores, na ordem do nanomolar, devem ser considerados em comparação com valores de IC_{50} de outros fotossensibilizadores que, naturalmente, tenham sido avaliados através da mesma metodologia. Em estudos anteriores com a porfirina correspondente e que foi precursora da síntese deste fotossensibilizador comprovou-se que o IC_{50} nas células WiDr é de 180nM e nas células A375 é de 100nM (Laranjo *et al*, 2013).

Zhang e colaboradores desenvolveram no presente ano um fotossensibilizador tetraaril, também de base clorina substituído por grupos metoxifenil que descreveram como eficaz e de elevado potencial. As concentrações correspondentes ao IC_{50} deste composto, em células humanas carcinoma do esófago e de carcinoma da nasofaringe, submetidas ao tratamento com 12 J/cm², foram de 1,73 e 2,87 μ M, respetivamente (Zhang *et al*, 2014). Nas células OE21, de carcinoma do esófago, o Foscan[®] tem um IC_{50} superior a 0,5 μ M (Paszko *et al*, 2013).

Num estudo realizado em células de carcinoma colorretal (HT29) e de retinoblastoma (Y79), foram estudadas várias hidroxifenilporfirinas e clorinas, assim como dos seus derivados glicoconjugados, incluindo o Foscan[®]. Neste estudo, em que as células foram irradiadas com 1,8 J/cm² e a avaliação realizada 72 horas após a irradiação, obtiveram-se concentrações inibitórias médias na ordem do micromolar, sendo para o Foscan[®] e para as células HT29 de 8 μ M, enquanto para as células Y79 foi de 6 μ M (Maillard *et al*, 2007). Num outro estudo com várias linhas celulares de carcinoma do cólon em que foi realizada PDT com base no fotossensibilizador hipericina e irradiação com 3,15 J/cm², obtiveram-se IC_{50} promissores entre 40 e 60nM (Mikešová *et al*, 2013).

Num estudo comparativo de vários fotossensibilizadores, irradiados com 1,5 J/cm², em células de carcinoma epidermoide A431, o IC_{50} do Foscan[®] foi o mais baixo, 30nM, contra 1,94 μ M do Photofrin[®] e 393 μ M do 5-ALA. Li e colaboradores prepararam uma nova clorina, substituída com polietilenoglicol (PEG) e com folato com características interessantes de solubilidade e seletividade para células tumorais positivas para a expressão do recetor do folato, como é o caso das HeLa e das Hep-2. Estas células, quando submetidas ao tratamento fotodinâmico com 18 J/cm², sofreram uma diminuição de viabilidade para 35 % e 27 %, respetivamente, no entanto, com uma concentração de fotossensibilizador de 17,5 μ M.

Neste trabalho, o fotossensibilizador BBr2HPC foi estudado também em fibroblastos humanos. Estes estudos foram realizados com o propósito de esclarecer a citotoxicidade intrínseca do composto, definindo assim a importância da irradiação para ativar a citotoxicidade, e também, avaliar a citotoxicidade em células distantes da lesão, tendo em conta que, no contexto clínico, este composto seria administrado por via sistémica. Obteve-se um valor de IC_{50} 5,55 μ M, uma concentração mais de 100 vezes superior aos valores obtidos para o tratamento fotodinâmico nas células tumorais, o que está de acordo com outros estudos em linhas celulares humanas de fibroblastos para avaliar a citotoxicidade de fotossensibilizadores (Perry *et al*, 1990; Pittet *et al*, 2007; Bergmann *et al*, 2008). Com isto provou-se que a ativação pela luz é um requisito fundamental para a atividade citotóxica do fotossensibilizador desenvolvido e que a toxicidade deste composto nas células normais, caso não ocorra ativação pela luz, é muito baixa, e só se verifica para concentrações muito superiores às concentrações terapêuticas.

A avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT é muito útil para obter um *screening* rápido de vários compostos pois, e tendo em conta o princípio da técnica, fornece uma indicação do estado metabólico, com contribuição principal de enzimas mitocondriais (Mosmann, 1983; Wang *et al*, 2010b). A redução do MTT é influenciada não só pela viabilidade, mas também por vários fatores intrínsecos ao próprio metabolismo que não dependem apenas da mitocôndria (Vistica *et al*, 1991). O ensaio SBR, por sua vez, constitui uma indicação da alteração no conteúdo proteico total e, portanto, correlaciona-se com a biomassa celular (Freshney, 2010). Os resultados de viabilidade corroboram os resultados obtidos pelo ensaio do MTT e confirmam que a diminuição da viabilidade celular ocorre como consequência de morte celular. Assim, para os estudos realizados 24 horas após o tratamento verifica-se uma diminuição significativa da viabilidade celular para concentrações iguais ou superiores a 50nM. Considerando os estudos realizados 2 horas após o tratamento, no caso das células de melanoma, a concentração que diminuiu a atividade metabólica das culturas celulares foi de 235,6 nM. De igual modo, observou-se uma diminuição significativa da população de células vivas para os tratamentos com 200 e com 500 nM, para $54,4 \pm 14,9$ e para $30,9 \pm 8,0\%$, respetivamente. Em relação aos resultados com as células de carcinoma colorretal e de carcinoma do esófago, embora na mesma ordem de grandeza, parece ocorrer uma diminuição de viabilidade superior à esperada tendo em conta os IC₅₀. A aparente atividade metabólica aumentada, tendo em conta a percentagem de células que perdem viabilidade como consequência do tratamento, pode ser explicada, hipoteticamente, pela ativação de mecanismos celulares de citoproteção (Buytaert *et al*, 2007; Agostinis *et al*, 2011), numa resposta a curto-prazo aos danos causados e à produção de ROS, que contribuam para a redução do sal de tetrazólio.

Os estudos de citotoxicidade permitiram concluir que o fotossensibilizador BBr2HPC tem efeito fotodinâmico em várias linhas celulares tumorais humanas. Verificou-se que o resultado deste fotossensibilizador de base clorina é superior ao da correspondente porfirina, estudada em trabalhos anteriores. Concluiu-se também que os valores de IC₅₀ obtidos são consequentes de diminuição da viabilidade celular e que o fotossensibilizador BBr2HPC é promissor, tendo em conta estudos de outros grupos de investigação recentemente publicados, e portanto merece ser alvo de estudos mais aprofundados.

Os artigos de revisão mais recentes indicam que a PDT tem sido usada principalmente em dermatologia, no tratamento de lesões neoplásicas e preneoplásicas, e tem sido igualmente considerada no esófago de Barrett e no colangiocarcinoma (Agostinis *et al*, 2011). Na Tabela I verifica-se que entre as aprovações clínicas da terapia fotodinâmica, os tumores do trato digestivo estão considerados, mas limitados a lesões do esófago. Como sabemos, atualmente há outros tumores do trato gastrointestinal extremamente acessíveis por técnicas endoscópicas, seja por endoscopia digestiva alta ou por colonoscopia. Nestes casos, a PDT poderia proporcionar uma terapêutica localizada, adequada para tumores de pequenas dimensões ou classificados como N0, nos quais se poderia optar por terapêutica conservadora de órgão, nomeadamente a PDT e vigilância apertada ou a PDT mais terapêutica endoscópica cirúrgica em vez de recesso. Tendo em consideração estas características prosseguiram-se os estudos no carcinoma colorretal e no carcinoma do esófago.

De modo a conhecer o perfil de captação do fotossensibilizador BBr2HPC pelas células tumorais, realizaram-se estudos de captação e de localização subcelular. Para a realização dos estudos de captação celular consideraram-se as propriedades fotoquímicas desta clorina, caracterizadas e descritas no capítulo V, entre as quais a linearidade entre a concentração e a emissão de fluorescência, que permitiu estabelecer as curvas de calibração representadas na Figura 16. Verificou-se que após 24 horas de incubação, as células de carcinoma colorretal internalizaram $0,288 \pm 0,037 \mu\text{M}$ e as células de carcinoma do esôfago internalizaram $0,338 \pm 0,124 \mu\text{M}$. Em estudos anteriores com a correspondente porfirina do fotossensibilizador BBr2HPC verificou-se que a captação foi de $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}$ nas células de carcinoma colorretal (Laranjo, 2010; Serra *et al.*, 2010). Apesar de não existir referência a diferenças significativas na internalização de fotossensibilizadores do tipo clorina e suas correspondentes porfirinas (Banfi *et al.*, 2006), também neste aspeto a clorina BBr2HPC parece ter características superiores para utilização como fotossensibilizador. Além disso, está documentado que a presença de bromo na estrutura de fotossensibilizadores, como acontece com o BBr2HPC, favorece a sua internalização (Serra *et al.*, 2008b; Picard *et al.*, 2009).

No que respeita à localização subcelular do fotossensibilizador BBr2HPC, considerando os resultados da captação avaliou-se, após 24 horas de incubação, a existência de colocalização com os organelos núcleo, mitocôndria, lisossomas e retículo endoplasmático, através de microscopia confocal. Está documentado que a distribuição intracelular do fotossensibilizador define o local onde ocorrem os primeiros danos como consequência da reação fotodinâmica (Uzdensky *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2002; Marchal *et al.*, 2004) e constitui uma informação que pode ser correlacionada até mesmo com as vias de morte ativadas pelas células (Huang *et al.*, 2008; Agostinis *et al.*, 2011). Relativamente à colocalização com o núcleo, nas imagens obtidas e analisadas, não se detetou correlação positiva entre a distribuição do fotossensibilizador BBr2HPC e este organelo. Em estudos anteriores verificou-se que a correspondente porfirina do fotossensibilizador BBr2HPP, também não era capaz de atingir o núcleo celular (Laranjo *et al.*, 2013). Semelhante resultado ocorre com os fotossensibilizadores que estão atualmente aprovados para uso clínico os quais também não acumulam no núcleo celular. Desta forma, danos diretos no DNA que poderiam de algum modo originar carcinogénese ou contribuir para o desenvolvimento de resistência ao tratamento, são inexistentes (Agostinis *et al.*, 2011). Assim estes resultados, à luz da bibliografia existente, corroboram o reduzido ou inexistente potencial mutagénico da PDT.

Os fotossensibilizadores do grupo das porfirinas e os derivados macrociclos são na sua maioria moléculas lipofílicas que têm tendência para acumular em organelos membranares (Kolarova *et al.*, 2007). A localização subcelular do Foscan[®], por exemplo, foi abordada em vários estudos, que mostraram que este fotossensibilizador pode acumular nos lisossomas, no retículo endoplasmático ou na mitocôndria, parecendo o padrão de localização dependente do tipo de tumor e da linha celular. No entanto, não foram ainda postuladas hipóteses para explicar esta distribuição distinta (Leung *et al.*, 2002).

No caso do fotossensibilizador BBr2HPC verificou-se que este apresenta colocalização com os lisossomas, com a mitocôndria e com o retículo endoplasmático. No caso das células de carcinoma colorretal humano e de carcinoma do esôfago humano, curiosamente verifica-se que a distribuição é semelhante a nível da mitocôndria e do retículo

endoplasmático, uma vez que há sobreposição dos intervalos de confiança obtidos para a colocalização. Em relação à acumulação nos lisossomas, verificou-se que a acumulação do fotossensibilizador é maior nas células de carcinoma do esófago ($0,59 \pm 0,16$) do que nas células de carcinoma colorretal ($0,34 \pm 0,06$).

A acumulação de fotossensibilizadores em múltiplos alvos subcelulares também já foi descrita (Begum *et al*, 2009). Entre os compostos tetrapirrólicos vários estudos evidenciaram que os mais eficazes tendem a acumular na mitocôndria e nos lisossomas (Gryshuk *et al*, 2006). O facto de vários fotossensibilizadores, como é o caso do BBr2HPC, acumularem na mitocôndria contribui para explicar a apoptose que é rapidamente desencadeada em resposta à terapia fotodinâmica (Almeida *et al*, 2004). No entanto, os mecanismos de fotossensibilização relacionados com a localização nos lisossomas também podem corroborar a apoptose. A localização de clorinas neste organelo já foi anteriormente observada e há evidências de que a fotossensibilização pode promover a libertação de enzimas lisossomais para o citoplasma ou a re-localização do sensibilizador em outros alvos não lisossomais (Rancan *et al*, 2005; Ali-Seyed *et al*, 2011). Em relação à libertação de enzimas lisossomais, a libertação de catepsina D pode induzir a apoptose por clivagem da proteína pró-apoptótica BID, que promove perda do potencial de membrana mitocondrial e libertação de citocromo-C (Ali-Seyed *et al*, 2011).

A fotossensibilização do retículo endoplasmático, consequente da PDT, não foi muito abordada na literatura. O retículo endoplasmático desempenha funções chave na biossíntese, segregação e transporte de proteínas e lípidos e também na homeostasia de Ca^{2+} . É um organelo que se localiza principalmente na região perinuclear e está em interação constante com o complexo de Golgi (Di Stasio *et al*, 2005). Alguns estudos demonstraram a importância da fotossensibilização do retículo endoplasmático *in vitro* (Morlière *et al*, 1998; Teiten *et al*, 2003) e verificaram a consequente desregulação da homeostasia de Ca^{2+} (Ritz *et al*, 2008; Begum *et al*, 2009).

O efeito fotocitotóxico do fotossensibilizador BBr2HPC foi determinado pela avaliação dos mecanismos de morte por apoptose e por necrose. A necrose foi avaliada pela observação da perda da integridade da membrana citoplasmática através da capacidade de excluir o iodeto de propídeo. A apoptose foi estimada pela externalização de fosfatidilserina. Verificou-se que 2 horas após o tratamento com concentrações entre 5 nM e 500 nM ocorre uma diminuição significativa (exceto nas células de carcinoma do esófago em que a diminuição de viabilidade no tratamento com 5 nM não tem significado estatístico) da população de células vivas que é proporcional ao aumento da concentração de fotossensibilizador. Esta diminuição da população de células vivas é superior 24 horas após o tratamento. De modo concomitante a esta alteração verifica-se também aumento das populações de células em morte. Tanto a apoptose como a necrose constituem resposta ao tratamento fotodinâmico, no entanto, a apoptose está associada às concentrações mais baixas de fotossensibilizador enquanto a necrose está associada às concentrações mais elevadas. Nas células de carcinoma colorretal verifica-se aumento da população de células em apoptose nos tratamentos com 50 nM e com 200 nM, um aumento de células em apoptose tardia/necrose para os tratamentos com 200 nM (apenas 24 horas após o tratamento) e com 500 nM e um aumento das células em necrose nos tratamentos com 200 nM e com 500 nM. Nas células de carcinoma do esófago também se observa o *shift* do tipo de morte entre a apoptose e a necrose nas concentrações baixas e elevadas, no entanto, estas células

parecem ser menos suscetíveis à fotossensibilização, pelo menos para o tempo de avaliação mais curto. Assim, 24 horas após o tratamento verifica-se aumento da população de células em apoptose para todas as concentrações estudadas e, no tratamento com 500 nM verifica-se também aumento significativo das populações de células em apoptose tardia/necrose e em necrose. Vários trabalhos mostram que o balanço entre a morte celular por apoptose ou por necrose depende da intensidade da reação fotodinâmica (Piette *et al*, 2003; Buytaert *et al*, 2007; Mikes *et al*, 2007; Allison & Sibata, 2010; Mroz *et al*, 2011; Acedo *et al*, 2014). Por exemplo, no caso do fotossensibilizador hipericina, um estudo mostrou que o aumento da concentração do fotossensibilizador de 1,25 para 2,5 μ M alterou a resposta celular da apoptose para a necrose. No mesmo trabalho os autores verificaram que a mesma concentração associada a uma maior fluência também produzia o mesmo efeito (Kamuhabwa *et al*, 2001). A apoptose foi observada como modalidade predominante de morte celular quando células P388 foram tratadas com cloroaluminofalocianina (fotossensibilizador comumente designado ALPC) utilizando doses baixas de luz, enquanto a necrose foi observada para doses de luz mais elevadas (Kessel *et al*, 2006).

A alteração de uma via de morte para outra com o aumento da intensidade dos danos também já foi referida para outro tipo de estímulos apoptóticos (Almeida *et al*, 2004) e no caso da PDT foi atribuída a produção de ROS muito elevada, aumento da concentração de cálcio ou depleção grave de ATP (Yoo & Ha, 2012). É aceite que a PDT é um eficaz indutor de apoptose, no entanto, em concentrações mais elevadas pode causar necrose, o que indica que o fator que determina a via de morte é a extensão dos danos (Oleinick *et al*, 2007). Vários autores referem também que outro mecanismo que pode afetar a ativação das vias de morte celular é a localização subcelular do fotossensibilizador (Oleinick *et al*, 2007). No caso do fotossensibilizador BBr2HPC verificou-se que este se localiza pelo menos em três organelos, os lisossomas, a mitocôndria e o retículo endoplasmático. Possivelmente, a fotossensibilização de múltiplos alvos celulares, em simultâneo, tem como resultado a ativação das vias de morte através de vários mecanismos moleculares.

O potencial de membrana mitocondrial reflete a atividade da cadeia transportadora de eletrões e a própria função mitocondrial (Shao *et al*, 2012). A disrupção do potencial de membrana mitocondrial, juntamente com a libertação de citocromo C, Smac ou AIF, constituem os típicos *hallmarks* da apoptose (Mikešová *et al*, 2013). A disrupção do potencial de membrana mitocondrial já foi observada após fotossensibilização da mitocôndria (Fabris *et al*, 2001; Sasnauskienė *et al*, 2009; Shao *et al*, 2012), dos lisossomas (Noodt *et al*, 1999; Shao *et al*, 2012) e do retículo endoplasmático (Marchal *et al*, 2005).

No caso do fotossensibilizador BBr2HPC verificou-se diminuição do potencial de membrana mitocondrial de modo dependente da concentração e do tempo. Duas horas após o tratamento verificou-se uma diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial para as concentrações de 200 nM e de 500 nM para ambas as linhas celulares. Na avaliação após 24 horas, verificou-se um aumento significativo do potencial de membrana mitocondrial para todos os tratamentos nas células de carcinoma colorretal e para os tratamentos com as concentrações mais elevadas (200 nM e 500 nM) nas células de carcinoma do esófago, corroborando a hipótese de que a última linha celular é menos sensível à fotossensibilização. De um modo geral, verifica-se que a diminuição

do potencial de membrana mitocondrial está associada aos tratamentos em que também se verificou a exposição da fosfatidilserina, corroborando os resultados obtidos. No entanto, nos tratamentos com as concentrações mais elevadas (200 nM e 500 nM) também se verificou um aumento das populações em necrose e, no caso das células de carcinoma colorretal tratadas com 500 nM de BBr2HPP não foi detetada apoptose.

A mitocôndria constitui um organelo central na execução da morte por apoptose. A formação de ROS após reação fotodinâmica mediada por fotossensibilizadores que se localizam neste organelo resulta maioritariamente em apoptose. Quando os fotossensibilizadores se localizam noutros organelos, os danos mitocondriais também podem ser efetores no processo de morte celular uma vez que estes podem ser propagados até à mitocôndria (Sasnauskiene *et al*, 2009). As células em que os danos fotooxidativos são suficientes para a disrupção do potencial de membrana mitocondrial ficam comprometidas com uma via de morte, mas não necessariamente a apoptose (Kessel & Luo, 1999).

O Foscan[®] é um fotossensibilizador que se localiza principalmente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Após o tratamento de células de carcinoma colorretal com este fotossensibilizador verificou-se que tanto a morte por apoptose como a morte por necrose estão implicadas e, como também se verifica perda de potencial de membrana mitocondrial, este organelo está também igualmente implicado na resposta. Sophie Marchal e colaboradores propuseram que a fotossensibilização do retículo endoplasmático pode desencadear sinais que convergem na mitocôndria, desencadeando o processo de morte de forma distinta dos fotossensibilizadores que se acumulam neste organelo (Marchal *et al*, 2005).

A disrupção do potencial de membrana indica que a mitocôndria está implicada na resposta à fotossensibilização com BBr2HPC e que, podem ser ativadas tanto a via de morte por apoptose como a via de morte por necrose. O fotossensibilizador BBr2HPC pode ser encontrado não só na mitocôndria mas também nos lisossomas e no retículo endoplasmático. Tal como referido anteriormente, a PDT mediada por fotossensibilizadores que se localizam na mitocôndria resulta em disrupção do potencial de membrana mitocondrial, enquanto os fotossensibilizadores que se acumulam nos lisossomas levam a libertação de enzimas proteolíticas lisossomais e os que se acumulam no retículo endoplasmático levam à perda da homeostasia do cálcio (Nawalany *et al*, 2012). Assim, no caso do fotossensibilizador BBr2HPC pode ser postulada a hipótese de que a fotossensibilização resulta na ativação de uma rede de vias celulares alternativas mas interligadas entre si, em que mitocôndria pode ser fotossensibilizada de modo direto mas também atuar em resposta a processos *upstream* a este organelo.

A proteína P53 está presente em baixa concentração em células normais e, em resposta a vários tipos de stresse a sua concentração aumenta. Este aumento de expressão da proteína P53 retarda a entrada na fase S do ciclo celular até que eventuais danos no DNA sejam reparados. A P53 está também envolvida no desencadear da apoptose em circunstâncias em que os danos são demasiado severos para serem reparados (Almeida *et al*, 2004). A perda de função ou a perturbação das vias de regulação, através de mutações no gene da proteína P53 é uma característica da maioria dos cancros humanos. Mais de 75 % das mutações do gene *TP53* resultam na expressão de uma proteína que perdeu a função nativa (habitualmente designada como *wild-type*), que adquire funções

oncogénicas e que é capaz de exercer uma função dominante sobre a proteína normal que, eventualmente, seja expressa (Muller & Vousden, 2013).

Alguns estudos indicam que a P53 pode estar envolvida na resposta à PDT, no entanto a sua função exata neste processo é controversa (Lee *et al*, 2010). Após revisão de uma série de estudos em que a proteína P53 foi avaliada em resposta à PDT foi possível concluir que as células que expressam P53 mutada são menos sensíveis à fotossensibilização do que células em que a P53 é normal. No entanto, a principal conclusão foi que a morte induzida pela PDT não é dependente da função da proteína P53 (Fisher *et al*, 1999; Oleinick *et al*, 2002).

As células de carcinoma colorretal WiDr expressam uma P53 mutada em que uma arginina está substituída por uma histidina no codão 273 do gene *TP53* (Garcia-Barreno *et al*, 1992) e as células de carcinoma do esófago OE19 expressam uma P53 mutada associada à síndrome de Li-Fraumeni (Bulusu *et al*, 2014). Em resposta à PDT baseada em BBr2HPC, nestas duas linhas celulares, verifica-se uma redução da expressão da P53, dependente da concentração de fotossensibilizador. Na realidade a maior parte dos estudos em que a P53 foi avaliada após fotossensibilização mostram um aumento na expressão desta proteína (Tong *et al*, 2000; Hajri *et al*, 2002; Wei *et al*, 2013). A ausência de alterações também já foi reportada num estudo em que as células de carcinoma colorretal HT29 foram submetidas ao tratamento com hipericina (Kleban *et al*, 2008). Por outro lado, quando as células HeLa foram tratadas com hipericina observou-se redução da expressão da P53 (Mikes *et al*, 2007). Após o tratamento de células de melanoma com 5-ALA verificou-se um aumento da expressão da proteína P53 para o tratamento com 10 mM e uma redução desta expressão após tratamento com 20 mM, no entanto, os autores não apresentam nenhuma hipótese explicativa para este resultado (Sparsa *et al*, 2013).

Para além destes efeitos, a PDT pode ser indutora de hipoxia se, como consequência da formação de ROS, ocorrer depleção de oxigénio nos tecidos (Dougherty *et al*, 1998; Bezdetsnaya *et al*, 2002; Henderson *et al*, 2004; Mitra *et al*, 2006; Verma *et al*, 2007; Kushibiki *et al*, 2008). Esta condição, de baixa pressão parcial de oxigénio, frequente nos tumores sólidos, foi associada a uma diminuição da expressão da proteína P53 (Schmaltz *et al*, 1998; Chen *et al*, 2010). Adicionalmente, em trabalhos anteriores verificou-se que a hipoxia determina, em várias linhas celulares de cancro colorretal, incluindo as WiDr, a diminuição da expressão da proteína P53 (Abrantes, 2013). Assim, podemos postular a hipótese que a PDT, baseada no fotossensibilizador BBr2HPC, leva à subexpressão da P53 de modo indireto pela geração de hipoxia.

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais. Uma via é mediada pelos recetores de morte e outra pela mitocôndria. Na primeira, os recetores de superfície da família TNF são estimulados a ativar a caspase iniciadora 8 através de proteínas adaptadoras e de *scaffold* (Almeida *et al*, 2004). A caspase 8, também designada por FLICE, é uma proteína com várias isoformas que podem apresentar entre 55 e 53 kDa, na forma de proenzima, e entre 41 e 43 kDa quando clivadas. Neste trabalho foi possível detetar uma proteína com cerca de 55 kDa, portanto correspondente a forma não ativada (Scaffidi *et al*, 1997; Granville *et al*, 1998).

No segundo processo, a ruptura da mitocôndria leva à libertação de citocromo C para o citosol. Esta proteína liga a Apaf-1, induz a oligomerização e a formação do apoptossoma que ativa a caspase iniciadora 9 (Almeida *et*

et al, 2004). Esta proteína, quando não processada, a pró-caspase 9, tem 46 kDa e a subunidade maior da caspase 9 madura tem 35 kDa (Costantini & Bruey, 2002).

Em ambas as vias a ativação das caspases iniciadoras leva a ativação da caspase efetora 3 (Almeida *et al*, 2004). A caspase 3 é a caspase efetora da apoptose mais estudada. A caspase 3 é produzida como uma proenzima inativa de 32 kDa que é clivada num resíduo de aspartato, de modo a obter uma subunidade de 12 e outra de 17 kDa que se combinam de modo a formar a enzima ativa (O'Donovan *et al*, 2003; Qian *et al*, 2006; Nakajima *et al*, 2014).

Neste trabalho, em resposta ao tratamento fotodinâmico baseado no fotossensibilizador BBr2HPC, nas concentrações de 50 nM e de 200 nM, foi possível verificar a implicação das três caspases estudadas no processo de morte, tanto nas células de carcinoma colorretal como nas células de carcinoma do esôfago. No caso da efetora caspase 3 verificou-se uma diminuição significativa da pro-caspase 3 e um aumento da subunidade clivada (apesar de não significativo para o tratamento com 50nM). De modo a verificar qual a via *upstream* responsável por esta ativação, estudaram-se também a caspase 9 e a caspase 8.

A implicação da via mitocondrial era conjecturável, dado os resultados, nomeadamente, a localização do fotossensibilizador neste organelo e as evidências da fotossensibilização do mesmo pela disrupção do potencial de membrana mitocondrial, tanto nas células de carcinoma colorretal, como nas células de carcinoma do esôfago. Vários trabalhos, com vários fotossensibilizadores e em vários tumores, comprovaram a ativação da via mitocondrial da apoptose após PDT (Reiners *et al*, 2002; Wild *et al*, 2005; Tian *et al*, 2006; Wu & Xing, 2006). Neste trabalho também se verificou essa ativação acompanhada de diminuição significativa da pro-caspase 9 e de um aumento da subunidade catalítica (apesar de não significativo para as células de carcinoma colorretal).

No que concerne à via de recetores verificou-se a diminuição significativa da expressão da pró-caspase 8, tanto nas células de carcinoma colorretal como nas células de carcinoma do esôfago (com significado estatístico apenas para a concentração de 200nM) o que indicia a ativação da via extrínseca. O envolvimento da caspase 8 como evento iniciador da apoptose, na via de recetores de morte mediada pelo recetor FAS e TNF, está bem documentada (Granville *et al*, 1998; Ali *et al*, 2002; Almeida *et al*, 2004). A ativação da via intrínseca em simultâneo com a via extrínseca também foi reportada como consequência da PDT (Takahashi *et al*, 2003). No entanto, num outro trabalho em que a pro-caspase 8 foi clivada de modo concomitante a outras caspases, e em que um inibidor específico da caspase 3 bloqueou a sua ativação, os autores sugeriram que esta proteína não deverá ter um papel iniciador neste processo mas antes, ser implicada *downstream* à caspase 3 de modo a alimentar um mecanismo de *feedback* positivo (Granville *et al*, 1998; Piette *et al*, 2003).

O tratamento fotodinâmico com base no fotossensibilizador BBr2HPC levou à ativação da apoptose pela via intrínseca com contribuição também de proteínas da via de recetores. Como foi discutido anteriormente a morte por necrose também está envolvida na resposta a este processo. A morte por necrose pode ocorrer em sequência da apoptose, quando os danos são muito elevados, ou poderá ser uma via ativada em paralelo. Constitui perspetiva futura deste trabalho avaliar os principais *hallmarks* envolvidos na necrose.

Apesar de se ter comprovado que o fotossensibilizador BBr2HPC não se localiza no núcleo celular este é um organelo fundamental que no decurso do processo de morte é submetido a várias alterações. Além disto, foi proposto que a fotossensibilização do núcleo celular pode ocorrer de forma indireta, por transferência para a membrana nuclear de danos fotooxidativos que ocorrem primariamente no retículo endoplasmático, no caso de fotossensibilizadores que se localizam neste organelo (Morlière *et al*, 1998), como é o caso do fotossensibilizador BBr2HPC.

O tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC não influenciou grandemente a progressão do ciclo celular, observando-se alterações na distribuição das populações celulares com o tratamento com a concentração mais elevada. Em alguns trabalhos com outros fotossensibilizadores e com outros tipos de células tumorais, foi estudado o efeito da terapia fotodinâmica na progressão do ciclo celular (Moor, 2000; Piette *et al*, 2003; Mikes *et al*, 2007; Kleban *et al*, 2008; Gariboldi *et al*, 2009). As células de carcinoma colorretal HT29 ficaram retidas na fase G0/G1 após fotossensibilização, com aumento da expressão de uma série de proteínas típicas do ciclo celular, nomeadamente a ciclina A, a ciclina E, a cdk-2 e a pRB (Kleban *et al*, 2008). Porém, noutro trabalho com a mesma linha celular verificou-se bloqueio na fase G2/M (Mikes *et al*, 2007). No caso da PDT com hipericina, Kleban e colaboradores, verificaram, após revisão bibliográfica, que pode ocorrer inibição ou bloqueio da progressão em vários pontos de controlo, de acordo com o tipo celular e com as condições do tratamento, nomeadamente, a concentração do fotossensibilizador e a fluência da luz (Kleban *et al*, 2008). Nas células de carcinoma colorretal HT-29, estes investigadores verificaram bloqueio do ciclo celular em G2/M, enquanto em células de leucemia verificaram bloqueio na fase S de forma dependente da concentração e do tempo (Kleban *et al*, 2008). Por outro lado, num estudo com 5,15-diarilporfirinas, os autores verificaram que o tratamento fotodinâmico não introduziu modificações significativas no ciclo celular (Gariboldi *et al*, 2009).

A PDT pode levar a danos no DNA nomeadamente quebras nas duas cadeias da dupla hélice de DNA, quebras numa única cadeia da dupla-hélice de DNA, oxidação das bases do DNA e *cross-links*. O Photofrin[®], por exemplo, causou danos no DNA de modo dependente da concentração e da fluência da luz em células de glioma (Lee *et al*, 2010). Binder e colaboradores estudaram o efeito fotodinâmico de dois fotossensibilizadores de segunda geração nas células HeLa e verificaram elevada fragmentação do DNA para concentrações superiores a 5 µM, o que os levou a concluir que estas moléculas apresentam fototoxicidade elevada e poderiam ser utilizadas com sucesso em PDT (Binder *et al*, 2011).

O ensaio cometa, também designado eletroforese em gel de células individuais, foi desenvolvido por Ostling e Johanson em 1984, e é frequentemente usado para avaliar a genotoxicidade de diversas substâncias (Choucroun *et al*, 2001; Olive & Banáth, 2006). O tratamento das células de carcinoma colorretal e das células de carcinoma do esófago com BBr2HPC levou à obtenção de células com a forma de cometa e com a concentração de 200nM observou-se uma distribuição bimodal do momento de cauda.

Uma das consequências da apoptose são alterações no DNA, que são consideradas um evento relativamente tardio (Bednarz *et al*, 2007). Neste tipo de morte celular apesar de os organelos permanecerem intactos, o DNA é digerido nos locais internucleossomais em fragmentos de 180 a 200 pares de bases (Almeida *et al*, 2004).

O tratamento com Photofrin® em células de glioblastoma também levou à fragmentação do DNA devido à indução de morte celular por apoptose (Chakrabarti *et al*, 2013). Noutro estudo com o Photofrin®, os autores verificaram que os danos no DNA surgem mais rápido nas células da linha celular MCF7 do que nas células das linhas celulares A549 e HUVEC e podem ser considerados uma prova da indução de morte celular por apoptose (Saczko *et al*, 2008).

Farbain e colegas, compararam os danos no DNA de vários tipos de células em apoptose com células em necrose e concluíram que o momento da cauda pode ser utilizado para diferenciar populações em apoptose pois estas apresentam uma distribuição bimodal de danos no DNA (Fairbairn & O'Neill, 1995; Fairbairn *et al*, 1996).

Os resultados obtidos corroboram os de citometria de fluxo que demonstraram um aumento da morte por apoptose inicial e apoptose tardia/necrose nos tratamentos com a concentração de 200 nM, permitindo ainda concluir que a dupla marcação positiva com anexina V e iodeto de propídeo corresponderá a uma morte preferencial por apoptose.

A lâmina nuclear constitui uma camada proteica na superfície interna da membrana nuclear, que suporta o envelope nuclear e proporciona locais de ancoragem para vários componentes estruturais e enzimas, como é o caso dos complexos de poro nuclear, componentes do citoesqueleto e a própria cromatina (Chiarini *et al*, 2008). As lâminas B são proteínas expressas construtivamente no núcleo e são indispensáveis para assegurar a integridade estrutural deste organelo. A lâmina B1 é responsável por ancorar o núcleo ao citoesqueleto através da proteína nesprina, controlar a sua orientação na células, posicionar os cromossomas e várias enzimas, sendo fundamental em várias funções nucleares (Chiarini *et al*, 2008).

As lâminas B também já foram implicadas como consequência do processo de apoptose induzido pela PDT (Lavie *et al*, 1999; Chiarini *et al*, 2008; Kleban *et al*, 2008). As caspases efetoras da apoptose são capazes de clivar proteínas do citoesqueleto, incluindo as lâminas, os filamentos intermediários do citoplasma, entre outras, resultando na desagregação de estruturas que dependem do citoesqueleto. A clivagem da PARP ou das lâminas B constituem indicadores da ação da caspase 3 e da caspase 7 (Oleinick *et al*, 2002). Como consequência do tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC verificou-se diminuição da expressão da lâmina B1, constituindo mais uma confirmação da execução do processo apoptótico.

Na reação fotodinâmica, tal como representado na Figura 2 após absorção de luz, o fotossensibilizador passa ao estado excitado tripleto. O estado tripleto do fotossensibilizador pode reagir com um substrato celular que posteriormente leva à produção de ROS. Esta reação é habitualmente designada por reação do tipo I. Na reação do tipo II, o fotossensibilizador interage diretamente com o oxigénio, com transferência de energia, para formar o oxigénio singleto, considerado a ROS mais importante na PDT (Triesscheijn *et al*, 2006).

A azida de sódio constitui um reconhecido *quencher* de oxigénio singlete (Verna *et al*, 1998; Maisch *et al*, 2007) e já foi usada anteriormente em ensaios biológicos (Ding *et al*, 2004; Obata *et al*, 2009). Por sua vez, o manitol protege (*scavenger*) contra radicais hidroxilo (Shen *et al*, 1997; Obata *et al*, 2009). Ding e colaboradores testaram a fototoxicidade do éster-metil da hematoporfirina na presença destes inibidores, a azida de sódio e o d-manitol, e verificaram inibição da reação fotodinâmica, por ambas as espécies. Assim, estes autores concluíram que a reação fotodinâmica, promovida por este fotossensibilizador, levou a formação tanto de oxigénio singlete como de radical superóxido, estando envolvidas tanto a reação do tipo II como a reação do tipo I, respetivamente (Ding *et al*, 2004). À semelhança destes estudos verificou-se que o fotossensibilizador BBr2HPC tem o seu efeito diminuído a nível da atividade metabólica na presença quer de azida de sódio quer de d-manitol. Assim, comprovou-se a importância do oxigénio singlete e da reação fotodinâmica do tipo II no tratamento com o fotossensibilizador BBr2HPC, e que, também as ROS formadas pela reação fotodinâmica do tipo I estão envolvidas neste processo. Para ambos os inibidores não se verificaram diferenças no caso dos tratamentos com a concentração de 500 nM, possivelmente porque a concentração de azida de sódio e de d-manitol não é suficiente para suprimir as ROS que são produzidas.

A reação do tipo II determina a formação principalmente de oxigénio singlete que ocorre por transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigénio. Paralelamente, em alguns casos também pode ocorrer a transferência de um eletrão do fotossensibilizador para o oxigénio, o que determina a formação de anião superóxido. Uma vez que a formação desta espécie, tipicamente associada à reação do tipo I (Juaranz *et al*, 2008; Plaetzer *et al*, 2009; Agostinis *et al*, 2011), ocorre também por interação direta entre o fotossensibilizador e o oxigénio, alguns autores também a classificam como do tipo II (Foote, 1991). Neste trabalho, foi possível avaliar a produção intracelular de anião superóxido com recurso ao dihidroetideo.

O dihidroetideo é um composto permeabilizante da membrana celular, que pode sofrer uma oxidação de dois eletrões e formar um fluoróforo, que se intercala no DNA. A reação do dihidroetideo com o anião superóxido é relativamente específica, com um mínimo de oxidação induzida pelo peróxido de hidrogénio ou o ácido hipocloroso (Tarpey *et al*, 2004). A oxidação intracelular do dihidroetideo tem sido analisada frequentemente em suspensões celulares por citometria de fluxo (Carter, 1994).

Nas células de carcinoma colorretal e nas células de carcinoma do esófago submetidas a PDT com o fotossensibilizador BBr2HPC verificou-se um aumento da produção intracelular de anião superóxido de forma dependente da concentração de fotossensibilizador. O aumento intracelular desta espécie verifica-se logo 2 horas após o tratamento fotodinâmico e esta elevação mantém-se 24 horas depois. A produção de níveis elevados de anião superóxido é uma alteração espetável após PDT e já foi verificada, por exemplo, nas de células fotossensibilizadas pela hipericina (Lavie *et al*, 1999).

A dismutação ou redução do anião superóxido leva à formação de peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio, por sua vez, pode sofrer redução de um eletrão e formar o radical hidroxilo, uma espécie altamente oxidante (Agostinis *et al*, 2011). O diacetato de 2'7'diclorodihidrofluoresceína é uma das sondas mais frequentemente

usadas para avaliar o estado redox das células. É um composto permeabilizante da membrana celular que é clivado por esterases intracelulares, com formação de um intermediário menos permeabilizante, que ao ser oxidado, produz um composto fluorescente. A fluorescência obtida é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares (Carter, 1994; Wang & Joseph, 1999; Zhang *et al*, 2008). No caso do tratamento com o fotossensibilizador BBr2HPC, verificou-se um aumento da produção de peróxido de hidrogênio duas horas após o tratamento com as concentrações de 5 nM e de 50 nM. Paralelamente, duas horas após o tratamento com as concentrações mais elevadas, verificou-se uma diminuição da produção intracelular de peróxidos, que se acentuou passado 24 horas. Em estudos com a NPe6, verificou-se um aumento de ROS até 30 minutos após PDT, no entanto não foram investigadas estas espécies para períodos mais tardios (Liu *et al*, 2011). No caso do fotossensibilizador *pheophorbide-a* o aumento de peróxidos também não se verificou para a concentração mais elevada de fotossensibilizador (Hoi *et al*, 2012). Além destes estudos, Ali-Seyed e colaboradores avaliaram a produção de peróxidos após PDT com Photolon™ ao longo do tempo. Estes investigadores verificaram um aumento gradual da produção destas ROS a partir dos 30 minutos com máximo após uma hora, seguido de declínio até três horas após tratamento (Ali-Seyed *et al*, 2011). Um outro estudo que corrobora os resultados obtidos é o de Zhao e colaboradores, os quais verificaram que em células de adenocarcinoma do pulmão fotossensibilizadas com Photofrin® a concentração intracelular de ROS foi inversamente proporcional à concentração de fotossensibilizador. A concentração de ROS foi máxima para a concentração de 2,5 µg/ml e mínima quando a concentração de fotossensibilizador foi aumentada para 10 µg/ml (Zhao *et al*, 2011).

Vários autores têm referido os mecanismos citoprotetores das células tumorais para evitar os efeitos citotóxicos da PDT. Um dos mecanismos associados a esta resposta depende das moléculas antioxidantes presentes nas células, cuja concentração é muito variável entre os vários tipos de células tumorais, como é o caso de alguns aminoácidos, da glutatona (GSH), ou da vitamina E. Outro mecanismo está associado à expressão de enzimas capazes de eliminar ROS, como a superóxido dismutase (Agostinis *et al*, 2011).

No que concerne à atividade da SOD, as células de carcinoma colorretal e de carcinoma de esófago apresentam uma atividade semelhante, que se verificou aumentada 24 horas após o tratamento fotodinâmico. A eficácia da PDT baseada em Photofrin® na linha de adenocarcinoma do cólon C-26 foi avaliada num estudo em que se verificou igualmente um aumento dos níveis de SOD após PDT (Golab *et al*, 2003). Aliás, aumento da atividade da SOD tem sido observado em vários tipos de células após a PDT (Hadjur *et al*, 1996; Agostinis *et al*, 2011).

A presença de glutatão reduzido também foi avaliada após PDT com o fotossensibilizador BBr2HPC. Esta molécula antioxidante é capaz de eliminar radicais livres e reduzir peróxidos (Chiou *et al*, 2010). Nas células de carcinoma do esófago, verificou-se uma redução do glutatão reduzido, 2 horas após o tratamento fotodinâmico e reposição dos seus níveis basais, após 24 horas. Nas células de carcinoma colorretal verificou-se também uma redução do glutatão reduzido 2 horas após o tratamento fotodinâmico com reposição dos níveis basais, após 24 horas, para as concentrações mais baixas de fotossensibilizador e aumento significativo para com as concentrações de 200 nM e de 500 nM. Alterações na atividade do glutatão reduzido já foram referidas após PDT

com vários fotossensibilizadores e em vários tipos de células (Hadjur *et al*, 1996; Zhang *et al*, 2008; Joshi & Wang, 2010; Mikešová *et al*, 2013).

São vários os mecanismos celulares capazes de interagir com os oxidantes para formar produtos menos reativos. No entanto, em condições de elevado stresse oxidativo, tais como aqueles que ocorrem durante o PDT, esses mecanismos citoprotetores são insuficientes e ocorrem danos significativos nos constituintes celulares (Szokalska *et al*, 2009). Tendo em conta os resultados obtidos e apesar das alterações nas defesas antioxidantes das células, o seu efeito citoprotetor não parece ser suficiente para limitar de forma significativa o efeito da terapia fotodinâmica com base no fotossensibilizar BBr2HPC.

CAPÍTULO VII — ESTUDOS *IN VIVO*

Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, cumprindo todas as Orientações da Sociedade Portuguesa de Ciência em Animais de Laboratório (SPCAL), a Diretiva 2010/63/EU, sempre numa perspetiva dos 3R's (*Replacement, Reduction e Refinement*) em pesquisa com animais, sempre sob a orientação e executado por pessoal devidamente formado e creditado para o manuseamento de animais de laboratório.

Na continuidade dos estudos *in vitro*, e uma vez que estes estudos são realizados em ambiente controlado, os resultados podem não corresponder totalmente aos obtidos num organismo vivo. Por este motivo, e sabendo que um tumor não é somente um conjunto de células tumorais mas sim um conjunto de células tumorais, células de suporte e as vias de drenagem vasculares associadas, é de extrema importância a realização de estudos *in vivo* para averiguar o potencial do fotossensibilizador BBr2HPC como fármaco *in vivo*. Para tal, foram utilizados ratinhos *Balb/c nu/nu*. Esta estirpe foi escolhida tendo em conta que estes animais permitem o desenvolvimento de xenotransplantes uma vez que são animais atímicos e, portanto, deficientes em células T, pelo que aceitam com alguma facilidade células de outra espécie.

Desenvolvimento do modelo animal

Os ratinhos *Balb/c nu/nu* foram adquiridos aos Laboratórios Internacionais Charles River, Inc (Espanha) com 6 semanas de idade, mantidos em sala climatizada própria, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, acesso livre a ração padrão de laboratório para murinos *nude* e água devidamente filtrada. O bem-estar dos animais foi verificado diariamente no decorrer do estudo. Foram utilizados 49 animais.

Para a realização deste trabalho, realizaram-se xenotransplantes em ratinhos *Balb/c nu/nu*. Para tal, foram inoculadas 10^7 células tumorais humanas. A linha celular selecionada foi a linha celular WiDr, de carcinoma colorretal, também utilizada nos estudos *in vitro* anteriormente descritos. As células foram inoculadas subcutaneamente na região dorsal por ser uma boa área para expansão do xenotransplante, por apresentar boa

vascularização, por permitir o desenvolvimento rápido e por ser uma zona na qual a monitorização é bastante simples e acessível.

Após a administração das células os tumores foram monitorizados de modo a verificar o volume tumoral de acordo com a seguinte expressão:

$$V = \frac{L \times S^2}{2}$$

onde L corresponde ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor (Grosa *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004).

Tratamento fotodinâmico

Quando se atingiu o volume tumoral de cerca de 250mm³, o fotossensibilizador BBr2HPC foi administrado por via intraperitoneal. Após a administração do fotossensibilizador os animais foram irradiados utilizando um dispositivo de luz laser CeramOptec Ceralas PDT com uma potência de 0,13 watts durante 1500 segundos perfazendo um total de 180 joules.

Para a realização destes estudos os ratinhos foram divididos em 5 grupos experimentais que diferiram na concentração de fotossensibilizador administrada e no tempo em que foram irradiados. O grupo 1, constituído por 11 ratinhos, correspondeu ao grupo de controlo do estudo e, portanto, os animais não foram submetidos a qualquer tratamento. O grupo 2, constituído por 10 ratinhos, correspondeu a animais submetidos à administração de 0,5 mg/Kg de fotossensibilizador e a irradiação realizada após 24 horas. O grupo 3, constituído por 11 ratinhos, correspondeu a animais submetidos à administração de 2 mg/Kg e a irradiação após 24 horas. O grupo 4, constituído por 7 ratinhos, correspondeu a animais submetidos à administração de 0,5 mg/Kg de fotossensibilizador e a irradiação realizada após 72 horas. O grupo 5, constituído por 10 ratinhos, correspondeu a animais submetidos à administração de 2 mg/Kg e a irradiação realizada após 72 horas.

Para a irradiação os animais foram submetidos a anestesia. Para tal, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de 2 µl/g de uma solução que continha uma proporção de 3:1 de quetamina (50 mg/ml; Ketalar[®], Parke-Davis, Pfizer Laboratories Lda.) e clorpromazina (2,5 %, Largatil[®], Rhône-Poulenc Rorer, Laboratórios Vitória). A quetamina é um fármaco anestésico que também promove sedação e amnésia anterógrada por ação direta no córtex e no sistema límbico, causando interferência na percepção sensorial dos estímulos dolorosos. A clorpromazina é um fármaco do grupo dos fenotiazídicos, que são usados com propriedades antipsicóticas e antieméticas.

A monitorização dos tumores realizou-se a cada 48 horas durante 12 dias. Avaliaram-se as dimensões do tumor de forma a calcular a variação de volume relativamente às dimensões iniciais, aquando da irradiação, segundo a fórmula:

$$VTR = \frac{V_x}{V_0}$$

onde VTR representa o volume tumoral relativo, V_x representa o volume tumoral obtido em cada dia de avaliação $x \in \{2; 4; 6; 8; 10; 12\}$ e V_0 representa o volume tumoral obtido imediatamente antes da irradiação.

Na análise inferencial dos estudos *in vivo* foi utilizada a estimativa de Kaplan-Meier, para avaliar o tempo necessário para ser atingido o volume tumoral relativo de 1,5 (Heitjan *et al*, 1993). Foram traçadas curvas de sobrevivência e a comparação entre os grupos foi realizada segundo o teste *log-rank*, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Considerou-se uma significância de 5%.

Análise histopatológica

Após a realização dos estudos *in vivo* e atingidos os 12 dias de monitorização após a irradiação, os animais foram ocidados por deslocamento cervical e logo de seguida, procedeu-se à excisão dos tumores para análise histológica em pelo menos 2 ratinhos de cada um dos grupos. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%. Posteriormente as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e embutidas em parafina. Realizou-se microtomia aleatória e preparação de lâminas que foram coradas com base na técnica de hematoxilina e eosina (H&E). A observação microscópica foi realizada num microscópio Nikon ACT-I equipado com câmara digital Nikon DMXM120F e computador dedicado com o *software* Nikon eclipse 80i.

O processamento das amostras, o exame macroscópico dos espécimes e a observação microscópica das lâminas coradas foram realizados no Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Estudos de biodistribuição

Com o propósito de caracterizar a biodistribuição do fotossensibilizador BBr2HPC recorreu-se à quantificação da emissão de fluorescência do composto. Para a quantificação do composto utilizou-se a banda de absorção com um máximo em 405nm e a banda de emissão de fluorescência de 645nm, como representado na Figura 15.

Nos estudos de biodistribuição utilizaram-se ratos em vez de ratinhos, pelo seu maior tamanho, e selecionou-se a estirpe Rowett *nude* (RNU) que também são animais atímicos com a mesma deficiência em células T que os ratinhos *Balb/c nu/nu* e que, por isso, permitem o desenvolvimento de xenotransplantes.

Para realizar os estudos de biodistribuição utilizaram-se 36 ratos *nude* (ratos Rowett *nude*, RNU) adquiridos aos Laboratórios Internacionais Charles River, Inc (Espanha) com 6 semanas de idade, mantidos em sala climatizada própria, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, ração padrão de laboratório para murinos *nude* e água devidamente filtrada.

Foram inoculadas 10^8 células tumorais humanas da linha celular de carcinoma colorretal WiDr no dorso dos animais. Quando os xenotransplantes atingiram um volume de 500 mm^3 , administrou-se o fotossensibilizador BBr2HPC na concentração de 3 mg/kg por via intraperitoneal. Os animais foram divididos em três grupos que diferiram na hora de ocisão após administração do fotossensibilizador: 4 horas, 24 horas e 72 horas. Durante estes períodos de tempo os animais foram mantidos no escuro. Realizou-se a necropsia e foram colhidas amostras dos seguintes órgãos, tecidos e fluidos: baço, bexiga, cérebro, coração, esôfago, estômago, fígado, gónadas, intestino delgado, intestino grosso, músculo, pâncreas, pele, pulmão, rim, tiróide, tumor, sangue, conteúdo do estômago, conteúdo do intestino delgado, conteúdo do intestino grosso e urina.

Todas as amostras foram pesadas e mantidas em recipiente apropriado sobre gelo. Cada amostra foi fracionada mecanicamente e solubilizadas em metanol num homogeneizador de Potter-Elvehjem. O metanol, a 4°C, foi adicionado a cada amostra numa proporção de 1,5 ml por 200mg de tecido. Todas as amostras foram homogeneizadas durante 10 minutos, se necessário em gelo para evitar aquecimento, transferidas para tubos de centrífuga e mantidas em gelo. A centrifugação foi realizada a 4°C durante 15 minutos com uma força de 1000G. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos que foram mantidos a -20C até ao momento da quantificação da emissão de fluorescência. A emissão de fluorescência foi analisada no espetrómetro PerkinElmer LS45, estando as amostras à temperatura ambiente.

A concentração do fármaco em cada órgão foi obtida por quantificação através da curva de calibração que se mostra na Figura 16. A quantificação pode ser feita através da área sob a curva e da altura do pico da curva. A área debaixo da curva de fluorescência correlaciona-se com o número de fotões emitidos, o qual é diretamente proporcional ao número de moléculas fluorescentes presentes na amostra. Entre os valores experimentais, área e altura, utilizou-se preferencialmente a área, como no caso de espetros similares ao representado na Figura 48.

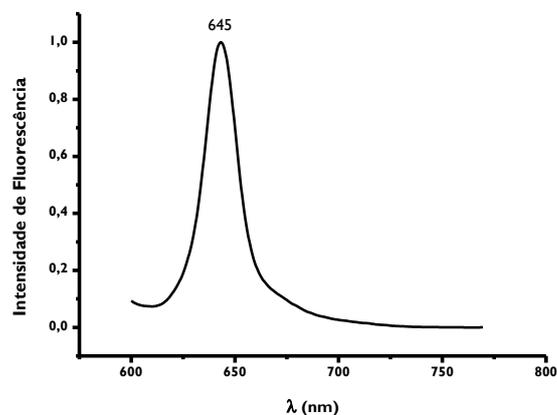


Figura 48: Espectro exemplificativo do pico a 645nm correspondente à clorina BBr2HPC, identificada no homogeneizado de um pâncreas.

As alturas foram usadas em órgãos tais como a pele, e o coração, em que se observa a banda a 645nm contaminada com um metabolito do tipo porfirínico, como exemplificado na Figura 49.

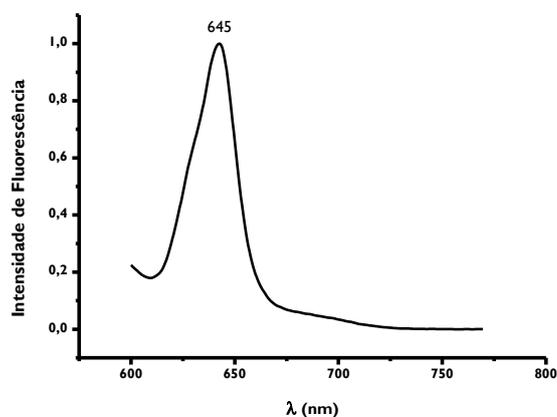


Figura 49: Espectro exemplificativo de um caso em que se recorreu à quantificação de fotossensibilizador pela altura do pico, uma vez que a banda a 645nm está contaminada com um metabolito. O espectro apresentado corresponde ao homogeneizado de uma pele.

No caso do conteúdo do estômago, do intestino delgado, do intestino grosso e dos respetivos conteúdos, a excitação em 405 nm permite observar uma banda com máximo a 630 nm e por vezes uma banda com máximo a 667 nm, exemplificados na Figura 50, que não correspondem ao composto em análise

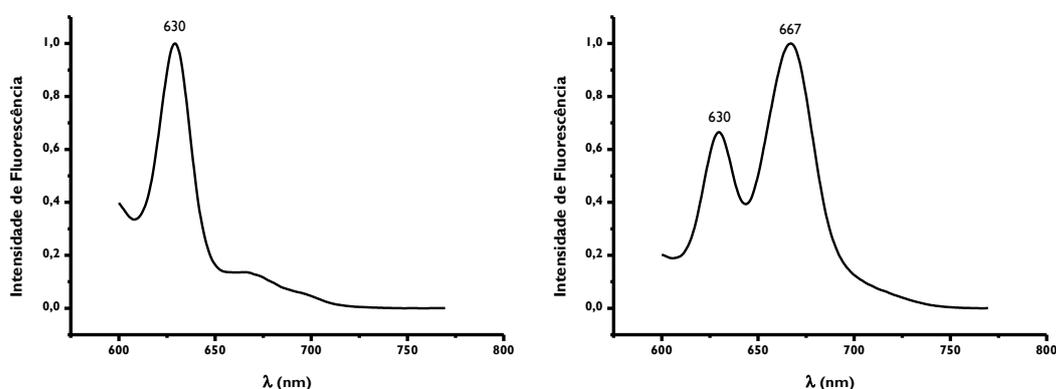


Figura 50: Espectros exemplificativos de um conteúdo do estômago (à esquerda) e de um conteúdo do intestino delgado (à direita) em que a quantificação de fotossensibilizador foi realizada através do pico a 630nm, referente à porfirina correspondente da clorina BBr2HPC.

A estrutura do metabolito emissor em 630 como foi confirmada como sendo a respetiva porfirina, cujo espectro de emissão e de excitação está representado na Figura 74 (anexos IV), realizou-se a sua quantificação tal como descrito para a correspondente clorina. A emissão de fluorescência em 667nm não se corresponde com um único composto de estrutura conhecida, como se pode constatar na Figura 75 (anexo V), pelo que não foi utilizado para a quantificação.

Resultados

Terapia Fotodinâmica *in vivo*

Após os estudos *in vitro* com os quais se comprovou que o fotossensibilizador BBr2HPC é captado pelas células, produz efeito fotodinâmico e induz morte celular, iniciaram-se os estudos *in vivo*. Foi possível obter um modelo animal de xenotransplante de carcinoma colorretal de células humanas da linha celular WiDr, anteriormente utilizada nos estudos *in vitro*, em ratinhos atímicos Balb/c *nu/nu*.

A população do estudo foi constituída por 49 ratinhos com xenotransplante. Destes, 11 constituíram o grupo de controlo, de animais não tratados, e os restantes foram divididos em quatro grupos que foram submetidos a

duas concentrações de fotossensibilizador, 0,5 e 2 mg/kg, e que foram irradiados 24 ou 72 horas após a administração.

Os resultados obtidos, representados na Figura 51-A, mostram a média e o desvio padrão do volume relativo dos xenotransplantes de cada grupo. Com os valores experimentais foi ainda possível estabelecer curvas pela estimativa de Kaplan-Meier, representadas na Figura 51-B, em que se definiu como ponto de corte o volume tumoral relativo superior a 1,5. Desta forma, encontraram-se 35 eventos (77,4%), num universo de 49 ratinhos.

No período experimental de 12 dias, verificou-se que todos os ratinhos do grupo controlo atingiram o ponto de corte definido, com um tempo médio até ao evento de 5,3 dias com um intervalo de confiança a 95% (IC95%) de [4,3; 6,3]. No grupo submetido a uma concentração de 0,5 mg/kg com irradiação após 24 horas, 20% dos animais não atingiram o volume tumoral relativo de 1,5 e, apresentaram um tempo médio até ao evento de 8,4 dias; IC95% [6,6; 10,2]. Para o grupo tratado com a mesma concentração mas com irradiação 72 após horas a administração do fotossensibilizador, 14,3% não atingiram o ponto de corte durante o período experimental, apresentando um tempo médio de 7,4 dias; IC95% [5,5; 9,3]. Considerando o tratamento em que a irradiação foi realizada 24 horas após a administração da concentração mais elevada, 81,8% dos ratinhos mantiveram o volume tumoral relativo inferior a 1,5, com um tempo médio até ao evento de 10,9 dias; IC95% [9,5; 12,3]. Por fim, o grupo tratado com 2 mg/kg e irradiação após 72 horas apresentou 20% dos ratinhos com um volume tumoral relativo inferior a 1,5 após os 12 dias, com um tempo médio até ao evento de 8,6 dias; IC95% [6,6; 10,6].

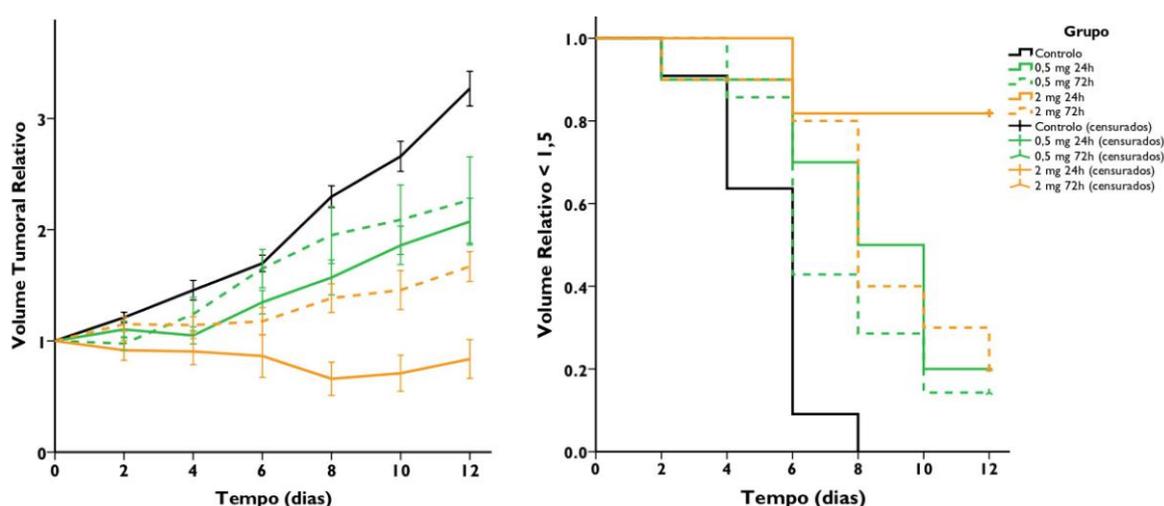


Figura 51: Crescimento tumoral relativo dos xenotransplantes nos ratinhos controlo não submetidos a tratamento e dos xenotransplantes nos quatro grupos de ratinhos submetidos a tratamento (A). Os resultados representam a média e o erro padrão dos valores experimentais obtidos. À direita (B) estão representadas as curvas de Kaplan-Meier que traduzem a probabilidade de o volume tumoral relativo atingir 1,5 vezes o volume inicial.

A comparação das curvas através do teste de *log-rank* mostrou a existência de diferenças significativas entre os cinco grupos ($p < 0,001$). Os tratamentos com a concentração mais elevada de fotossensibilizador (2 mg/kg) mostram uma progressão tumoral significativamente inferior, tanto na irradiação após 24 horas ($p < 0,001$) como na irradiação após 72 horas ($p = 0,018$), do que no grupo controlo. No caso do tratamento com 0,5 mg/kg só se verificaram diferenças significativas para a irradiação após 24h ($p = 0,031$).

Nas comparações múltiplas entre os grupos dos vários tratamentos não se verificaram diferenças com significado estatístico. Para discriminar diferenças estatísticas entre os tratamentos seria necessário aumentar o número de animais por grupo. No entanto, analisando as curvas de progressão do volume tumoral verifica-se que o tratamento mais eficaz é o tratamento com 2 mg/kg com irradiação após 24 horas. Verifica-se também que para cada concentração se obtêm melhores resultados com a irradiação 24 horas do que 72 horas após administração do fotossensibilizador. Apesar da menor eficácia dos tratamentos com intervalo de 72h, no tratamento com 2 mg/kg os resultados são ainda promissores.

A Figura 52 ilustra o crescimento tumoral de um ratinho do grupo de controlo e de um ratinho de um dos grupos experimentais. Nas imagens do ratinho do grupo de controlo, verifica-se o aumento tumoral progressivo. Nas imagens do ratinho submetido ao tratamento fotodinâmico verifica-se o aparecimento de uma ulceração do tumor nos primeiros dias após o tratamento, com redução do volume tumoral. De forma concomitante, verifica-se alguma cicatrização da zona afetada com redução gradual da área ulcerada.



Figura 52: Registo fotográfico ilustrativo do crescimento tumoral ao longo do período experimental de um tumor de um ratinho do grupo de controlo (em cima) e de um tumor de um ratinho do grupo tratado com 2 mg/kg e irradiação após 24 horas (em baixo). Os dias (D) decorridos do período experimental estão identificados nas respetivas imagens.

As imagens representativas da histologia dos tumores excisados após o *follow-up* e a ocisão dos ratinhos estão representadas na Figura 53, na Figura 54, na Figura 55 e na Figura 56. A Figura 53 representa os cortes histológicos dos ratinhos do grupo controle. Na Figura 53-A, com uma ampliação de 100x, é possível observar a arquitetura geral de um corte de um xenotransplante, em que a necrose central é envolvida por áreas de padrão sólido. Na Figura 53-B, ampliada 200x, observa-se uma região de padrão glandular e células mucinosas com morfologia compatível com a formação de glândulas do intestino e áreas de muco. Na Figura 53-C, com ampliação de 200x de uma região periférica do xenotransplante, é possível observar o padrão sólido com elevado índice mitóticos e formações histológicas trabeculares, estruturas tubulares e maciços.

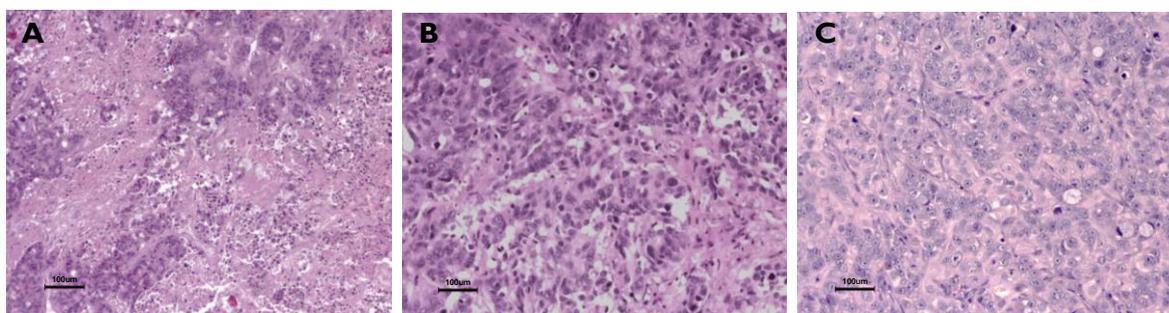


Figura 53: Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de xenotransplantes de ratinhos do grupo de controle. A imagem A foi obtida com ampliação de 100x e as imagens B e C foram obtidas com ampliação de 200x.

Os cortes histológicos dos xenotransplantes dos ratinhos submetidos aos vários regimes de tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador BBr2HPC, corados com hematoxilina e eosina, corresponderam a adenocarcinomas com necrose central envolvida por região periférica sólida. À periferia observaram-se secções com elevado índice mitótico e anisocariose, bem como formações de células poligonais e mucinosas de disposição glandular, presença de muco e também a presença de linfócitos no estroma.

Na Figura 54-A observa-se a arquitetura geral de um corte histológico do tumor de um ratinho do grupo ao qual foi administrado 0,5mg/kg com irradiação após 24 horas. Na Figura 54-B, em maior ampliação, é possível observar uma grande área de muco central, o elevado índice mitótico e presença de anisocariose à periferia.

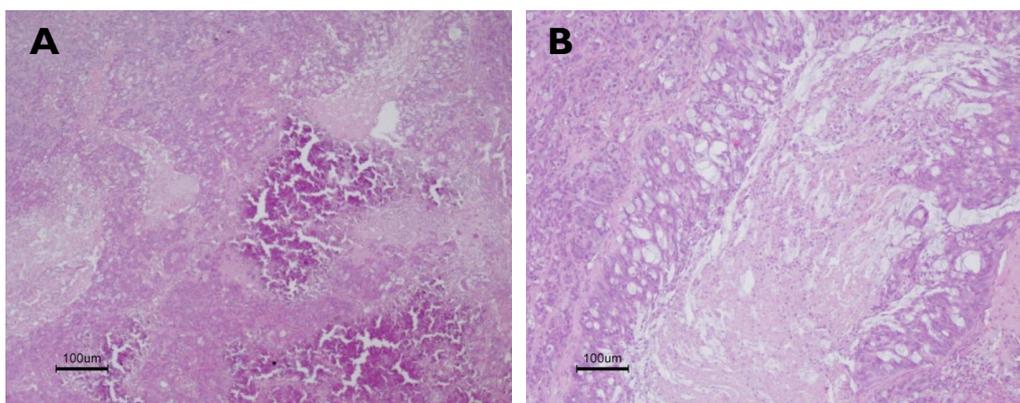


Figura 54: Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de xenotransplantes submetidos a terapia fotodinâmica com 0,5 mg/kg do fotossensibilizador BBr2HPC e irradiação após 24 horas. Ambas as imagens foram obtidas com ampliação de 40x.

As imagens da Figura 55 correspondem a cortes histológicos de tumores de ratinhos do grupo ao qual foi administrado 2 mg/kg com irradiação após 24 horas. Nestas imagens observa-se histologia compatível com adenocarcinoma com padrão organoide, presença de células mucinosas e células poligonais. A Figura 55-A evidencia necrose central e presença de paliçada de células nos maciços da periferia e na Figura 55-B é possível observar o padrão sólido periférico, com índice mitótico elevado e anisocariose.

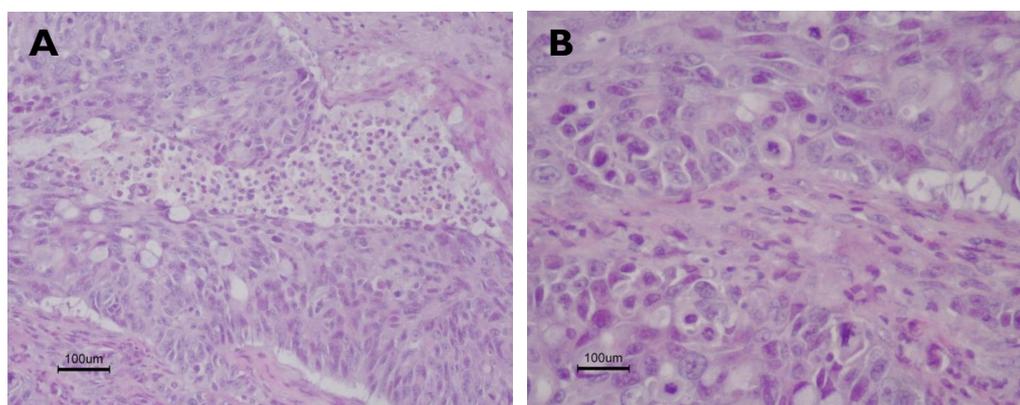


Figura 55: Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de xenotransplantes submetidos a terapia fotodinâmica com 2 mg/kg do fotossensibilizador BBr2HPC e irradiação após 24 horas. A imagem A foi obtida com ampliação de 200x e a imagem D foi obtida com ampliação de 400x.

Nas imagens da Figura 56 observam-se cortes histológicos de tumores de ratinhos do grupo ao qual foi administrado 0,5mg/kg com irradiação após 72h. Na Figura 56-A observa-se a arquitetura geral de corte de um adenocarcinoma com necrose central, e na Figura 56-B, observa-se um pormenor desta secção que evidencia a presença de linfócitos no estroma.

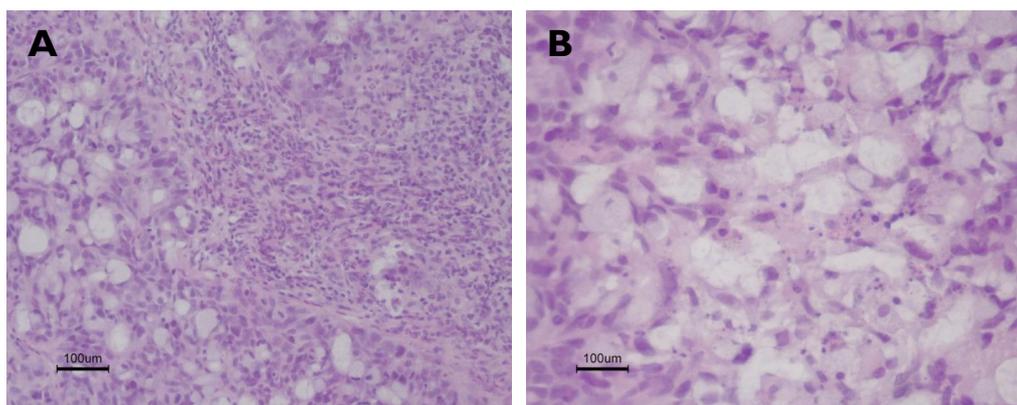


Figura 56: Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de xenotransplantes submetidos a terapia fotodinâmica com 0,5 mg/kg do fotossensibilizador BBr2HPC e irradiação após 72 horas. A imagem A foi obtida com ampliação de 200x e a imagem B foi obtida com ampliação de 400x.

No caso dos ratinhos tratados com 2 mg/kg e irradiação após 24h houve alguns casos de resposta patológica completa. A Figura 57 ilustra o caso de um ratinho em que não há evidência macroscópica nem microscópica de tumor. A observação macroscópica, patente na Figura 57-A, mostra que ocorreu regressão tumoral completa e ainda que a pele na região irradiada se encontra cicatrizada. A Figura 57-B mostra a arquitetura geral da secção em que se pode observar o tecido celular subcutâneo sem evidência de células tumorais, presença de tecido muscular estriado e um gânglio linfático. A Figura 57-C corresponde a uma ampliação da mesma secção histológica em que se pode observar com detalhe o gânglio linfático com folículos linfóides envolvido por tecido adiposo, no qual não há evidência de infiltração por células tumorais.

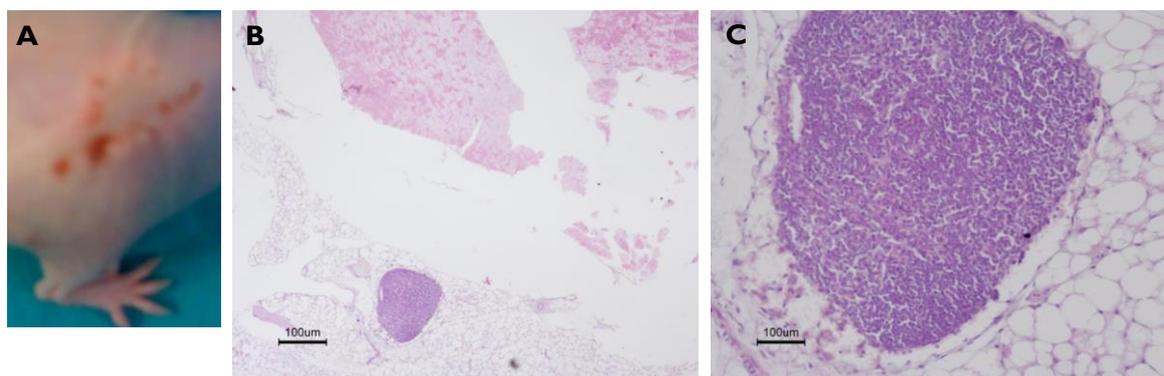


Figura 57: Observação macroscópica (A) e microscópica (B e C) de um ratinho em que se verificou resposta patológica completa. A imagem B foi obtida com uma ampliação de 40x e a imagem C, que corresponde a um pormenor da imagem B, foi obtida com uma ampliação de 400x.

Estudos de biodistribuição

Comprovado o efeito fotodinâmico *in vivo* do fotossensibilizador BBr2HPC avaliou-se a sua biodistribuição. A avaliação da concentração de fotossensibilizador presente em cada órgão foi realizada com base na emissão de fluorescência do fotossensibilizador. A Figura 48, a Figura 49 e a Figura 50 mostram espectros representativos da emissão de fluorescência obtidos a partir dos homogeneizados de vários órgãos. A Figura 58, a Figura 59 e a Figura 60 mostram a distribuição do fotossensibilizador BBr2HPC nos vários órgãos, tecidos e fluidos extraídos dos animais ocisados 4 horas, 24 horas e 72 horas após administração.

No caso do cérebro (Figura 58-A) detetou-se a presença de fotossensibilizador em quatro de seis casos após 4 horas, com concentração de $0,2 \pm 0,4$ ng por mg de cérebro, assim como após 24 horas a concentração foi de $0,6 \pm 0,9$ ng por mg de cérebro, não tendo sido detetado em nenhum caso após 72 horas. No coração (Figura 58-B) a presença de fotossensibilizador foi detetada em 50% dos casos nos três tempos de avaliação, com concentração de $0,2 \pm 0,3$ ng/mg de coração, de $0,1 \pm 0,1$ ng/mg de coração e de $0,2 \pm 0,2$ ng/mg de coração, respetivamente 4, 24 e 72 horas após a administração. O cérebro e o coração estão entre os órgãos em que verifica menor concentração do fotossensibilizador BBr2HPC.

O pulmão (Figura 58-C) apresenta uma das mais elevadas concentrações iniciais de fotossensibilizador, com concentração de $3,3 \pm 1,2$ ng/mg de pulmão às 4 horas, que decresce para $1,3 \pm 0,5$ ng/mg de pulmão após 24 horas, e para $0,6 \pm 0,6$ ng/mg de pulmão com dois casos em que não foi detetado fotossensibilizador após 72 horas.

Relativamente aos órgãos do sistema urinário, nomeadamente na bexiga (Figura 58-D), verificou-se a distribuição do fotossensibilizador em quatro dos seis casos após 4 horas, obtendo-se um valor médio de $0,1 \pm 0,1$ ng/mg de bexiga, e em todos os casos após 24 horas, com concentração de $0,5 \pm 0,2$ ng/mg de bexiga. Neste órgão verificou-se evidência de eliminação após 72 horas, uma vez que não foi detetado composto em quatro dos seis casos, obtendo-se um valor médio de $0,7 \pm 1,1$ ng/mg de bexiga. O rim (Figura 58-E) é o órgão em que se verifica

maior concentração de fotossensibilizador após 4 horas, com concentração de $8,8 \pm 1,7$ ng/mg de rim, e após 24 horas, com concentração de $9,8 \pm 1,7$ ng/mg de rim, no entanto, após 72 horas há evidência de eliminação completa em quatro de seis casos, obtendo-se uma concentração média de $0,1 \pm 0,2$ ng/mg de rim.

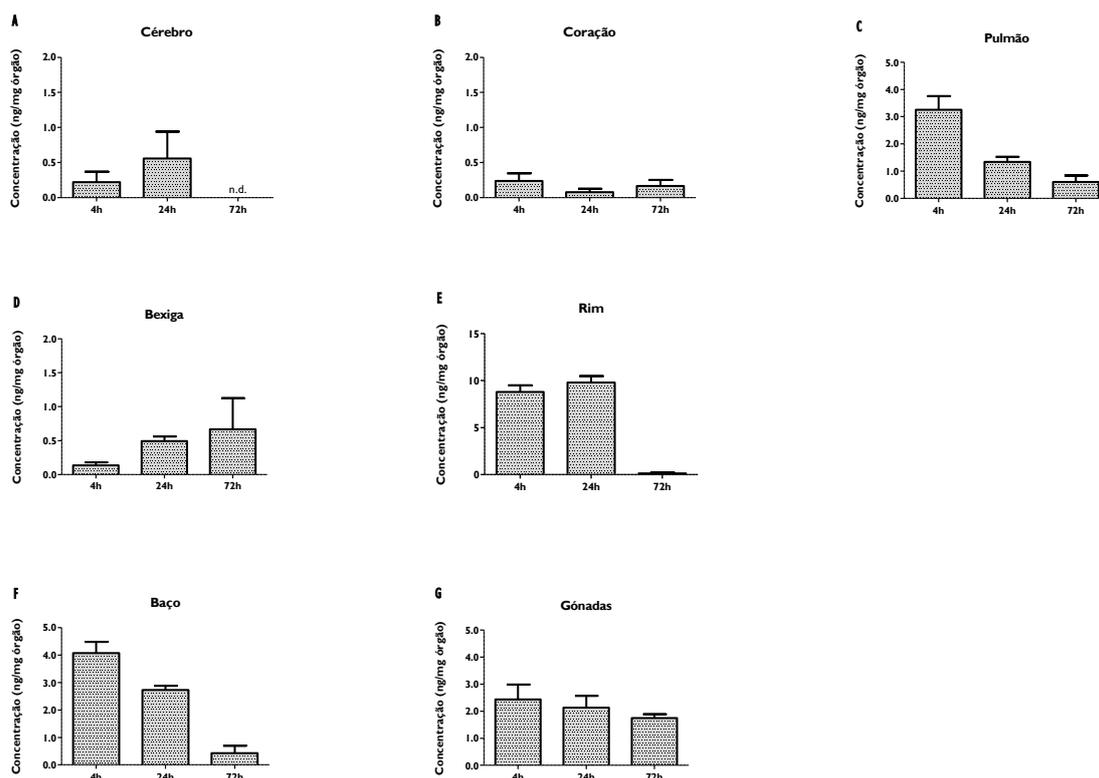


Figura 58: Biodistribuição do fotossensibilizador BBr2HPC nos órgãos cérebro, coração, pulmão, baço, gonadas, bexiga e rim 4, 24 e 72 horas após a administração. Os resultados correspondem à média e ao erro padrão das concentrações nos órgãos de seis animais em cada tempo de análise.

O baço (Figura 58-F) está também entre os órgãos em que se verifica maior concentração do fotossensibilizador BBr2HPC após 4 horas da administração, com concentração de $4,1 \pm 1,1$ ng/mg de baço, e após 24 horas, com concentração de $2,7 \pm 0,4$ ng/mg de baço. No que concerne às 72 horas há evidências de eliminação uma vez que não se detetou composto em quatro de seis casos, obtendo-se uma concentração média de $0,4 \pm 0,7$ ng/mg de baço.

Nas gónadas (Figura 58-G), apesar de se verificar uma progressão decrescente da concentração de fotossensibilizador, com valores médios de $2,4 \pm 1,3$ ng/mg de gónadas, de $2,1 \pm 1,1$ ng/mg de gónadas e de $1,8 \pm 0,3$ ng/mg de gónadas após 4, 24 e 72 horas da administração, respetivamente, constituem o segundo órgão de maior concentração no tempo de avaliação mais tardio.

Na Figura 59 está representada a biodistribuição do fotossensibilizador BBr2HPC nos órgãos do sistema gastrointestinal e respectivos conteúdos. No esôfago (Figura 59-A) observou-se uma progressão decrescente da concentração de fotossensibilizador com valores de $1,1 \pm 0,7$ ng/mg de esôfago, de $0,7 \pm 0,4$ ng/mg de esôfago e de $0,4 \pm 0,4$ ng/mg de esôfago para cada tempo de avaliação, respectivamente para as 4, as 24 e as 72 horas, estando entre os órgãos de menor concentração para todos os tempos.

O fígado (Figura 59-B) é um dos órgãos em que se verificam as concentrações mais elevadas de fotossensibilizador 4 horas após a administração, com valores de $4,3 \pm 0,7$ ng/mg de fígado, e 24 horas após a administração com valores de $3,8 \pm 1,1$ ng/mg de fígado. Após 72 horas verifica-se uma menor concentração média de composto neste órgão com valores de $1,1 \pm 1,7$ ng/mg de fígado, não tendo sido detetado fotossensibilizador em quatro de seis casos. O pâncreas (Figura 59-C) constitui um dos órgãos de maior captação de fotossensibilizador para todos os tempos estudados e verificou-se logo após 4 horas da administração, uma concentração de $7,1 \pm 2,1$ ng/mg de pâncreas, com retenção às 24 horas de $2,8 \pm 0,9$ ng/mg de pâncreas e às 72 horas de $2,8 \pm 0,7$ ng/mg de pâncreas.

No estômago (Figura 59-D) verificou-se uma progressão também decrescente da concentração de fotossensibilizador com valores médios de $2,3 \pm 0,6$ ng/mg de estômago, de $2,0 \pm 0,4$ ng/mg de estômago e de $1,5 \pm 1,2$ ng/mg de estômago, respectivamente para as 4, 24 e 72 horas, não tendo sido detetado composto às 72 horas em quatro de seis casos. Relativamente ao conteúdo do estômago (Figura 59-G) verificou-se uma concentração de $5,3 \pm 4,7$ ng/mg de conteúdo, de $5,0 \pm 4,7$ ng/mg de conteúdo e de $6,5 \pm 7,2$ ng/mg de conteúdo, respectivamente para as 4, 24 e 72 horas.

No intestino delgado (Figura 59-E) verificou-se uma concentração de $2,4 \pm 2,3$ ng/mg de intestino delgado após quatro horas, de $1,3 \pm 1,0$ ng/mg de intestino delgado após 24 horas e de $1,7 \pm 0,5$ ng/mg de intestino delgado após 72 horas. No intestino grosso (Figura 59-F) verificou-se uma concentração de $2,7 \pm 0,8$ ng/mg de intestino grosso após quatro horas, de $1,2 \pm 0,9$ ng/mg de intestino grosso após 24 horas e de $1,6 \pm 0,9$ ng/mg de intestino grosso após 72 horas. Os intestinos delgado e grosso estão entre os órgãos em que se verifica maior concentração para o tempo de avaliação mais tardio. Relativamente aos conteúdos destes órgãos, verificou-se no conteúdo do intestino delgado (Figura 59-H) uma concentração de $2,3 \pm 2,7$ ng/mg de fezes às 4 horas e posterior diminuição até às 72 horas com uma concentração de $0,7 \pm 0,6$ ng/mg de fezes. No caso do intestino grosso verifica-se um aumento na concentração de fotossensibilizador ao longo do tempo, com um valor médio de $20,0 \pm 2,3$ ng/mg de fezes às 72 horas.

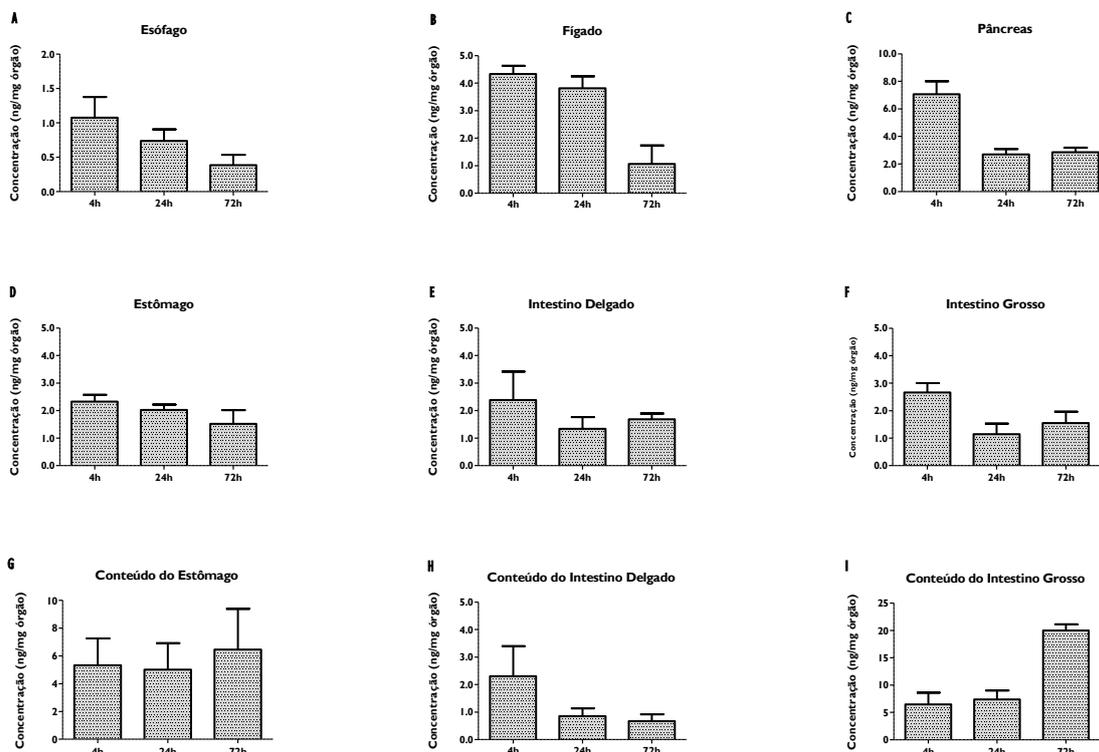


Figura 59: Biodistribuição do fotossensibilizador BBr2HPC nos órgãos do sistema gastrointestinal e respectivos conteúdos, 4, 24 e 72 horas após a administração. Os resultados correspondem à média e ao erro padrão dos órgãos de seis animais em cada tempo de análise.

A Figura 60 representa a distribuição de fotossensibilizador no tumor, no músculo, na pele e no sangue. No tumor (Figura 60-A) verificou-se uma concentração de $1,5 \pm 0,7$ ng/mg de tumor 4 horas após a administração, que se manteve após 24 horas com valores de $1,6 \pm 0,5$ ng/mg de tumor, e com uma ligeira diminuição após 72 horas para valores de $1,2 \pm 0,2$ ng/mg de tumor. No músculo (Figura 60-B) foi possível detetar a presença de fotossensibilizador após 4 horas na concentração de $1,0 \pm 0,9$ ng/mg de músculo, e evidências de eliminação às 24 horas onde os valores foram de $0,9 \pm 0,6$ ng/mg de músculo, e às 72 horas de $0,6 \pm 0,7$ ng/mg de músculo com dois casos em que não se detetou composto para os dois tempos mais longos. Na pele (Figura 60-C) verificou-se uma concentração de fotossensibilizador de $1,5 \pm 0,6$ ng/mg de pele 4 horas após a administração, de $0,8 \pm 0,2$ ng/mg de pele 24 horas após a administração e de $0,6 \pm 0,2$ ng/mg de pele 72 horas após a administração. No sangue (Figura 60-D) observou-se presença do fotossensibilizador após 4 horas na concentração de $0,7 \pm 0,4$ ng/mg de sangue, e após 24 horas a concentração de $0,9 \pm 0,3$ ng/mg de sangue e não se detetou em nenhum caso após 72 horas.

Com os resultados experimentais de cada animal foi possível calcular a média da razão tumor/músculo. Após 4 horas de administração do fotossensibilizador obteve-se uma razão de $1,93 \pm 0,62$, com um intervalo de confiança

de 95% de [1,16; 2,70]; após 24 horas uma razão de $1,50 \pm 0,38$, com um IC95% de [1,11; 1,90]; e, após 72 horas uma razão de $1,3 \pm 0,75$, com um IC95% de [0,54; 2,1]. Assim, verifica-se que a concentração no tumor é significativamente superior à do músculo às 4 horas e às 24 horas ($p < 0,05$).

A razão tumor/pele também foi calculada, sendo após 4 horas de administração do fotossensibilizador de $1,00 \pm 0,56$, com um IC95% de [0,40; 1,60]; após 24 horas de $1,78 \pm 0,73$, com um IC95% de [1,01; 2,55]; e $1,99 \pm 0,67$, com um IC95% de [1,30; 2,62] após 72 horas. Verifica-se que a concentração no tumor é significativamente superior à da pele às 24 e às 72 horas ($p < 0,05$).

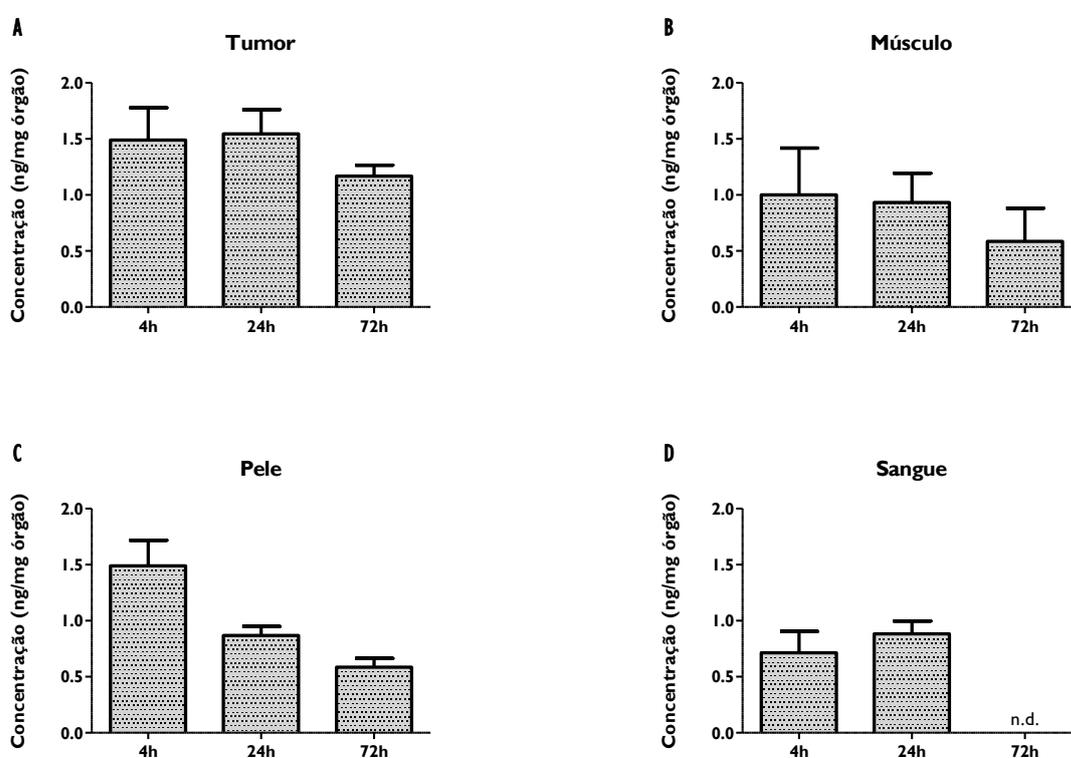


Figura 60: Biodistribuição do fotossensibilizador BBr2HPC no tumor, no músculo, na pele e no sangue 4, 24 e 72 horas após a administração. Os resultados correspondem à média e ao erro padrão dos órgãos de seis animais em cada tempo de análise.

Discussão

Os resultados experimentais *in vitro* demonstraram a eficácia do fotossensibilizador nas linhas celulares estudadas, comprovados por diversas técnicas e vários níveis moleculares. Os estudos *in vivo* permitem uma avaliação do comportamento biológico das células tumorais num organismo vivo, as interações com o microambiente e os

processos críticos no desenvolvimento tumoral. Um modelo animal que visa avaliar a resposta à terapêutica, será naturalmente um patamar prévio à aplicação em ensaio clínico.

A transplantação singênica, utilizada há mais de 25 anos, constituiu uma importante estratégia, disponível para estudos terapêuticos pré-clínicos, sendo ainda utilizada para ensaios com imunoterapia (Rygaard & Povlsen, 1969; Shimosato *et al*, 1976; Kerbel, 2003; Kelland, 2004). A implantação de células tumorais humanas no modelo animal, ou xenotransplantação, é um procedimento simples que permite a avaliação de vários tipos de interação celular em contexto vivo e de diversas terapêuticas. Este método constituiu, em diversos estudos, na prova do conceito para a posterior aplicação a ensaios clínicos de fase I e II (Kelland, 2004). Este modelo permite a demonstração da eficácia anti-tumoral em concentrações que deverão ser muito inferiores às de toxicidade grave. Nestes modelos ocorre um rápido crescimento tumoral, habitualmente subcutâneo, facilmente enucleado e normalmente sem metastização. Apesar de o estabelecimento e a monitorização destes modelos serem bastante simples, destacam-se também algumas limitações, como a resposta imune, que desempenha um papel fulcral no desenvolvimento tumoral e cuja influência fica prejudicada com a utilização de animais imunodeprimidos. Além disto, os componentes do estroma, a vascularização e todos os fatores do microambiente não correspondem ao ambiente nativo dos tumores e as células humanas não estão programadas para crescer em ambiente murino.

As potenciais aplicações dos xenotransplantes incluem a avaliação pré-clínica da resposta dos tumores humanos a vários regimes de quimioterapia, a avaliação de novos agentes terapêuticos, a análise da progressão tumoral a nível celular e molecular, a identificação de novos agentes de terapêutica dirigida, a determinação de qual o melhor esquema terapêutico e a combinação de vários fármacos conhecidos (Jin *et al*, 2010).

Os modelos ortotópicos podem otimizar o estudo de algumas das limitações dos modelos com xenotransplante, particularmente na metastização. A resposta tumoral é diferente quando o tumor tem uma implantação subcutânea ou se encontra no ambiente nativo, tendo sido já demonstrado em cancro colorretal (Pocard *et al*). Recentemente têm sido descritos modelos com aparecimento tumoral espontâneo, utilizando ratos geneticamente manipulados com mutações responsáveis pelo aparecimento de cancro humano (Van Dyke & Jacks, 2002; Céspedes *et al*, 2006). Estes modelos permitem o estabelecimento de relações causais de tumorigénese e a identificação de vias singénicas. No entanto, a aplicação destes modelos ao desenvolvimento de novas terapias tem sido limitada, possivelmente, devido à capacidade limitada destes modelos replicarem o padrão de metastização observado em humanos e à dificuldade em avaliar a eficácia do fármaco (Céspedes *et al*, 2006).

Existem vários estudos *in vitro* sobre a eficácia de sensibilizadores, no entanto, o mesmo não se verifica relativamente à sua eficácia no modelo-animal. Otimizou-se um modelo animal em ratinhos *Balb/c nu/nu* de forma a obter desenvolvimento reprodutível de xenotransplantes, tendo-se optado pela injeção de 10^7 células, administrados subcutaneamente na região dorsal. Realizou-se o tratamento fotodinâmico com o sensibilizador, avaliaram-se as concentrações de 0,5 e 2 mg/kg, irradiados às 24 ou à 72 horas após a administração.

Os resultados da PDT *in vivo* mostraram que ambas as formulações não são tóxicas para os ratinhos pois não ocorreram mortes como consequência da administração. A comparação entre os grupos mostrou que a concentração

mais elevada, de 2 mg/Kg, com irradiação às 24 ou às 72 horas tinha diferenças significativas em relação ao controlo, sendo a irradiação após 24 horas a estratégia mais eficaz. Vários sensibilizadores, incluindo o Photofrin® e várias ftalocianinas, têm sido tipicamente usados em concentrações iguais ou superiores a 5 mg/kg para realizar a PDT e obter efeitos em xenotransplantes de carcinoma colorrectal, e, em xenotransplantes com a linha celular HT29, o Photofrin® foi usado numa concentração de 30mg/kg (Lim *et al*, 2009), e também noutros tipos de cancro como o cancro da cabeça e pescoço (Reuther *et al*, 2001).

O intervalo de tempo entre a administração do fotossensibilizador e a irradiação tem elevado impacto no resultado da terapêutica *in vivo* (Reuther *et al*, 2001). Bourré *et al.*, testaram uma hidroxifenil-porfirina *in vivo*, e concluíram que o intervalo de 12 horas entre a injeção e a irradiação fornece melhores resultados que 24 horas. Este composto apresenta certamente uma distribuição e uma eliminação rápidas (Bourré *et al*, 2003). Num estudo em que a PDT foi mediada por Foscan® observou-se que um intervalo de três horas entre a administração e a irradiação, em tumores murinos da mama (células EMT6), obteve a melhor eficácia terapêutica (Garrier *et al*, 2010). Uma vez que no nosso trabalho com o fotossensibilizador BBr2HPC se obtiveram melhores resultados 24 horas após do que 72 horas após a injeção, poderá ser uma interessante perspectiva futura a realização de estudos com um intervalo de tempo ainda menor entre a injeção e a irradiação.

No caso do tratamento fotodinâmico mediado por Foscan®, observou-se um efeito significativo sobre o carcinoma pulmonar de Lewis *in vivo* com inibição do crescimento dos tumores, no entanto, após 9 dias observou-se recuperação do seu potencial de crescimento (Bourré *et al*, 2003). Nos tumores de carcinoma colorrectal submetidos ao tratamento com o fotossensibilizador BBr2HPC não se observou recuperação de crescimento até aos 12 dias de monitorização e, além disso, foi possível obter casos de regressão tumoral completa, como se pode apreciar na Figura 52.

Após os 12 dias de follow-up do tratamento fotodinâmico, os animais foram sacrificados tendo-se realizado a excisão dos xenotransplantes, o que permitiu a realização de alguns estudos *ex vivo*. Procedeu-se à análise histológica com recurso à coloração com H&E. A análise histológica confirmou a presença de áreas de necrose, como se pode observar na Figura 54, na Figura 55 e na Figura 56.

Tendo em conta a geometria aproximadamente esférica do tumor, é comum a existência de um núcleo central de células não viáveis. As células periféricas têm um suprimento sanguíneo mais adequado, e por isso no centro tumoral frequentemente ocorrem células em apoptose e/ou necrose e maioritariamente em situação de hipoxia (Abrantes, 2007). Nos tumores do grupo de controlo foi possível identificar este núcleo central de células não viáveis, que sofreram morte por necrose. A análise histológica dos xenotransplantes submetidos ao tratamento fotodinâmico demonstrou a presença de células mucinosas, glândulas e células poligonais assim como, elevado índice mitótico o que pode traduzir a presença de células tumorais viáveis após o tratamento, apesar das extensas áreas de necrose. Este facto possivelmente é indicador da necessidade de otimização da dosimetria do tratamento, particularmente no que concerne às características do feixe de luz para irradiação. Neste trabalho a irradiação foi realizada com recurso a um equipamento dedicado, que é provido de uma fibra ótica que dispersa a luz

frontalmente, sendo utilizado apenas um feixe de irradiação sobre o tumor. Poderia eventualmente ser vantajoso a utilização de um equipamento que permitisse a rotação da fibra ótica para várias posições, o que possibilitaria a conjugação de vários feixes de luz e, conseqüentemente, uma distribuição de luz mais homogênea em todo o tumor, maximizando o efeito fotodinâmico.

Noutros estudos com fotossensibilizadores que têm como base a estrutura da clorina, a análise histológica demonstrou morte por necrose (Hajri *et al*, 2002; Lim *et al*, 2009). Nos tumores tratados com o fotossensibilizador BBr2HPC destaca-se a presença de linfócitos no estroma o que indica o recrutamento, ao leito tumoral, de células do sistema imune, que, apesar de deficitário nos ratinhos *Balb/c nude*, apresenta um complemento normalidade de linfócitos B e pode apresentar uma baixa proporção de linfócitos T de maturação extra-tímica (Mond *et al*, 1982; Wortis *et al*, 1982). Um evento dominante na PDT é a indução de inflamação com rápida invasão de células inflamatórias ativadas, incluindo linfócitos T que podem reconhecer o epítipo tumoral (Dougherty *et al*, 1998; Castano *et al*, 2006). A PDT demonstrou ser efetiva em gerar células imunes sensibilizadas pelos tumores que podem ser recrutadas pelo sistema imune à distância, gerando memória imunitária, conforme provou uma administração de esplenócitos previamente sensibilizados (Korbelik & Dougherty, 1999). Assim, foi descrito que a irradiação e a rápida necrose podem provocar a liberação de proteínas e de citocinas pelas células tumorais que levam à regulação positiva do sistema imunitário, tendo até sido proposto que a PDT poderia atuar de modo semelhante a uma vacina, o que implica a existência de uma resposta à distância, além o efeito local (Allison, 2014).

Ainda relativamente à análise histológica, salientam-se os casos em que se verificou resposta patológica completa confirmada histologicamente, de que é exemplo o caso representado na Figura 57. Este resultado reforça a perspectiva da PDT como tratamento primário do cancro. A formulação utilizada não evidenciou efeitos secundários major nas concentrações utilizadas revelando efeito fotodinâmico em baixas doses, o que a torna aliciente para aplicação clínica.

Os estudos *in vitro* demonstraram a eficácia do fotossensibilizador testado e as vias moleculares envolvidas na sua atividade. No entanto, a sua eficácia *in vivo* é muito influenciada pela sua biodisponibilidade. O desenvolvimento de um fotossensibilizador ideal deve combinar seletividade para o tumor, farmacocinética favorável, aumento da absorção para coeficientes próximos do infra-vermelho mas com janela fototerapêutica, entre outras características (Detty *et al*, 2004). Neste sentido, é de grande relevância avaliar a retenção no tumor e a captação pelos diversos órgãos.

A avaliação da biodistribuição *in vivo* é uma forma de prever efeitos secundários e possíveis toxicidades numa fase prévia à implementação de ensaios clínicos. A biodistribuição e a farmacocinética são dependentes da estabilidade do fármaco em estudo. Os compostos menos estáveis são rapidamente eliminados, ao contrário dos mais estáveis, que permanecem mais tempo no organismo, tendo uma maior oportunidade de se acumular no tumor, onde é desejado o seu efeito (Dąbrowski *et al*, 2011a).

A determinação da concentração de fotossensibilizador nos tecidos foi realizada, naturalmente, após distribuição e metabolização pelo organismo. Tal como referido, quando o espectro de emissão de fluorescência apresentou o pico característico a 645 nm, que traduz a estrutura original do composto, este foi quantificado recorrendo à metodologia estabelecida no capítulo V. Quando por eventuais processos de metabolização o fotossensibilizador sofreu transformações que deram lugar a metabolitos identificáveis, de estrutura química conhecida também se realizou a quantificação. Foi o caso do pico em 630 nm que, através da análise do espectro de excitação de fluorescência, se comprovou corresponder à porfirina correspondente. Neste caso, e tendo em conta trabalhos anteriores (Serra *et al*, 2010), esta porfirina de estrutura química conhecida e de fácil acesso foi utilizada como padrão para a quantificação. Noutros casos, em que se observaram bandas correspondentes a metabolitos de estrutura desconhecida estas não foram consideradas. Esta situação verificou-se para alguns órgãos em que se detetou uma banda a 667 nm cuja tentativa de identificação foi realizada por espetrometria de massa conforme descrito nos anexos.

Os estudos de biodistribuição do fotossensibilizador BBr2HPC tiveram como propósito focar na avaliação de vários órgãos que de algum modo podem ser implicados em vias de eliminação ou órgãos implicados em toxicidade relevante como é o caso do cérebro, do pulmão e das gónadas.

Relativamente ao sistema urinário, uma via primordial de depuração de metabolitos, verificou-se maior concentração no rim 4 horas e 24 horas após a administração, concordante com o pico de deteção na bexiga, o órgão de armazenamento, 24 horas após a administração, com evidências de eliminação destes órgãos após 72 horas. Estes resultados evidenciam a rápida eliminação do fotossensibilizador BBr2HPC por via urinária.

Os órgãos reticuloendoteliais, nomeadamente o fígado e o baço, apresentam concentrações elevadas 4 e 24 horas após a administração. Estes órgãos possuem vasos fenestrados que permitem fácil passagem de moléculas mais complexas, e são importantes órgãos de depuração. A acumulação nestes órgãos também pode estar relacionada com o elevado número de recetores LDL (Dąbrowski *et al*, 2011b). A elevada concentração no fígado é consistente com a ação deste órgão como principal responsável pela metabolização do fotossensibilizador BBr2HPC e posterior eliminação por via hepatobiliar. A elevada concentração de fotossensibilizador nos conteúdos dos intestinos delgado e grosso, com concentração naturalmente superior no segmento intestinal mais distal para tempo de avaliação mais tardio (72 horas) corrobora a eliminação hepatobiliar. Foram descritos outros fotossensibilizadores com padrão de eliminação urinário e hepatobiliar, como é o caso do Foscan[®] (Dąbrowski *et al*, 2011b). Alguns compostos têm eliminação hepatobiliar preferencial, como é o caso do Photofrin[®] (Hajri *et al*, 2002).

As concentrações cerebrais e cardíacas são baixas comparativamente com as dos outros órgãos, apontando efeitos tóxicos incipientes a este nível. Nas gónadas as concentrações detetadas foram superiores, particularmente para a avaliação 72 horas após a administração, o que significa alguma tendência para a retenção neste órgão. A gónada masculina tem uma produção de gâmetas, a espermatogénese, constante e ininterrupta, apontando-se implicações pouco importantes a este nível. No que respeita à reserva ovárica, o período de eliminação do

fotossensibilizador poderá ter efeito apenas no ciclo menstrual em curso, e a eventual toxicidade ovárica poderá ser ultrapassada com a indicação de contraceção durante a administração do fotossensibilizador.

A razão tumor/pele, indicativa de eventual fotossensibilidade deste órgão, decresce de 1,93 ng/mg 4 horas após a administração para 1,3 ng/mg 72 horas após a administração, sendo que a concentração de fotossensibilizador no tumor é significativamente superior do que na pele 24 e 72 horas após a administração.

A concentração do fotossensibilizador no tumor manteve-se pouco alterada ao longo das 72 horas. Este resultado está de acordo com os dados bibliográficos que apontam para a acumulação e a retenção de fotossensibilizadores no tecido tumoral (Dąbrowski *et al*, 2011a). Com o objetivo de avaliar os efeitos em tecidos adjacentes ao tumor, foi avaliada a concentração do fotossensibilizador no músculo dos animais injetados com células de carcinoma colorretal. No músculo, a concentração foi inferior à do tumor, chegando a 0,6 ng/mg de músculo às 72 horas. Assim, a concentração no tumor é significativamente superior ao músculo às 4 e às 24 horas após a administração. Estes dados apontam para a otimização do resultado terapêutico se o tempo entre a administração e a irradiação for de 24 horas. Como anteriormente exposto, a avaliação do tratamento fotodinâmico *in vivo* em xenotransplantes com células de cancro colorretal mostrou que resultados significativamente superiores para este tempo do que com um intervalo entre a administração do fotossensibilizador e a irradiação de 72 horas.

Outros fotossensibilizadores descritos apresentam razões tumor/músculo superiores. É o caso do Photofrin® que atingiu uma razão de 5 em células de tumor humano do cólon 24 horas após a administração (Hajri *et al*, 2002) e uma razão elevada em fibrossarcoma após apenas 6 horas (Barinaga, 2000). O perfil descrito para o fotossensibilizador BBr2HPC será menos favorável, no entanto, as concentrações musculares são baixas comparando com as descritas para outros fotossensibilizadores. Neste sentido, destaca-se o caso de resposta patológica completa, em que se verificou também cicatrização completa no leito tumoral.

SECÇÃO B – IMAGEM

Os resultados apresentados ao longo desta secção foram publicados sob a forma de artigo em revista de especialidade com arbitragem científica:

Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2014, 57: 141-147. doi: 10.1002/jlcr.3180

Evaluation of a ^{99m}Tc -labelled *meso*-bisphenylporphyrin as a tumour image agent

Santos, P. M.* , Laranjo, M.* , Serra, A. C., Abrantes, A. M., Piñeiro, M., Casalta-Lopes, J., Trindade, D., Maia, J., Rocha-Gonçalves, A. and Botelho, M. F.

*Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho.

CAPÍTULO VIII — ESTUDOS DE QUÍMICA

Material e Métodos

Antes da sua utilização os solventes foram purificados recorrendo a procedimentos usuais. O diclorometano foi seco sobre hidreto de cálcio (CaH_2) e destilado. O clorofórmio foi neutralizado com alumina ativa neutra. O pirrol foi destilado antes de ser utilizado. Para a cromatografia em coluna foi utilizada sílica-gel 60 (0,035=0,070 mm) da Fluka. O 3-hidroxibenzaldeído (Sigma-Aldrich) foi recristalizado em água e o α -bromo acetato de metilo foram utilizados como obtidos da Aldrich. O 9,10-dimetilantraceno (DMA; Sigma-Aldrich) foi utilizado sem purificação adicional. Outros reagentes de uso comum foram utilizados tal como adquiridos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear protónica (RMN 1H) foram obtidos recorrendo a espectrómetro Bruker Advance II de 400 MHz. O padrão interno utilizado foi o tetrametilsilano (TMS). Os valores correspondem ao desvio químico em partes por milhão (δ , ppm), a primeira letra dentro do parêntesis representa a multiplicidade do sinal, a seguir apresenta-se a integração do sinal e, finalmente, a atribuição do sinal. Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro Thermo Finnigan LCQ Advantage com ionização por electrospray (ESI). Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram registados num espectrofotómetro Hitachi U-2001 e num Shimadzu UV-2100. Os espectros de fluorescência foram obtidos num espectrofotómetro Spex Fluorolog 3.

Síntese e caracterização do fotossensibilizador

A síntese da *meso-bis*[3,4-di(carboximetileneoxi)fenil]porfirina, que passará a ser designada por 2CPP, iniciou-se pela síntese do 3,4-di-(metoxicarbonilmetoxi)benzaldeído. Para tal, dissolveram-se 14,5 mM de 3,4-dihidroxibenzaldeído em acetona num balão de fundo redondo de 1 l. De seguida, adicionaram-se à solução 36,2 mM de carbonato de potássio anidro (K_2CO_3) e 32,9 mM de α -bromoacetato de metilo. A solução ficou em refluxo, durante a noite, e formou-se um precipitado que se filtrou e cujo filtrado se aproveitou. Após evaporação do solvente, obteve-se 1,90 g de uma massa sólida.

Para a formação do dipirrilmetano, num balão de fundo redondo adicionaram-se 288 mmol de pirrol, 20 ml de diclorometano, 20 ml de ácido acético e 18 mmol de ácido tricloroacético e deixou-se reagir durante 1 hora

e 30 minutos, com agitação constante, aquecimento e refluxo. Adicionou-se uma mistura de 144 mmol de pirrol, 23 mmol de paraformaldeído e 20 ml de diclorometano e deixou-se em refluxo durante duas horas. Após arrefecimento, a fase orgânica foi lavada com uma solução de hidróxido de sódio a 10%, de seguida com água e posteriormente seca com sulfato de sódio anidro. A solução foi concentrada em vácuo e o excesso de pirrol foi removido por destilação. O dipirrilmetano foi purificado por cromatografia em camada fina com diclorometano como eluente e obteve-se um sólido branco.

A análise por ressonância magnética nuclear em clorofórmio deuterado (CDCl_3) apresentou os seguintes sinais: 3,88 – 3,96 (s, 2H, ponte de metileno-H); 6,03 (m, 2H, 3,3, pirrol-H); 6,14 (m, 2H, 4,4, pirrol-H); 6,55 (m, 2H, 5,5, pirrol-H); 7,83 (bs, 2H, NH).

A condensação de 10,3 moles de dipirrilmetano com 10,3 mmoles do aldeído anteriormente obtido foi realizada em diclorometano e ácido trifluoroacético. A solução foi mantida em agitação constante e em refluxo, no escuro, durante a noite. Neutralizou-se com trietilamina e oxidou-se com 14,9 mM de dicianodiquinona (DDQ). Após 2 horas a solução foi evaporada até obter um sólido. Após dissolução purificou-se por cromatografia em coluna de sílica utilizando como eluente uma solução de diclorometano e de acetato de etilo ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 80/20) e, com isto, obteve-se o dimetilester da meso-bis[3,4-bis(carboximetileneoxi)fenil]porfirina com um rendimento de 27%.

A análise por ressonância magnética nuclear em clorofórmio deuterado (CDCl_3) apresentou os seguintes sinais: 3,14 (s, 2H, NH); 3,70-4,00 (m, 12H, OCH_3); 4,92-5,05 (m, 8H, OCH_2); 7,29 (m, 2H, Ph); 7,84 (m, 4H, Ph); 9,09 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 4H, $\beta\text{-H}$); 9,39 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 4H, $\beta\text{-H}$); 10,29 (s, 2H, meso-H). A espectrometria de massa com ionização de electrospray do composto apresentou um valor de $[\text{MH}]^+$ 837.

Para a hidrólise do diester de porfirina anteriormente preparado, solubilizaram-se 7,97 mmoles do composto em 15 ml tetrahydrofurano. A esta solução adicionaram-se 142,6 mmoles de uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH). A mistura foi deixada em agitação, em atmosfera de azoto, protegida da luz, durante a noite. Neutralizou-se com ácido acético, evaporou-se o solvente e o precipitado foi filtrado. Obteve-se um sólido vermelho que foi lavado com metanol e se deixou secar em estufa aquecida. Obteve-se a meso-bis[3,4-bis(carboximethleneoxi)fenil]porfirina com um rendimento de 88%.

A análise por ressonância magnética nuclear em água deuterada/dimetilsulfoxido ($\text{D}_2\text{O}/\text{DSMO}$) apresentou os seguintes sinais: 4,55 (m, 8H, OCH_2); 7,27 (d, 2H, $J=6\text{Hz}$, Ph); 7,71– 7,62 (m, 4H, Ph); 9,15 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 4H, $\beta\text{-H}$); 9,58 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 4H, $\beta\text{-H}$); 10,53 (s, 2H, meso-H). A espectrometria de massa com ionização de electrospray do composto apresentou um valor de $[\text{MH}]^+$ 758.

Todos os estudos foto-físicos foram realizados utilizando soluções do fotossensibilizador 2CPP em metanol. Os coeficientes de extinção foram calculados através da lei de Beer-Lambert, com soluções de concentração de 1×10^{-4} a 1×10^{-7} M.

Resultados

O dipirrimetano e o dimetil ester da *meso* bis[(carboximetilneoxi)fenil]benzaldeído, reagentes indispensáveis à síntese da porfirina 2CPP, foram obtidos através de métodos conhecidos da literatura e posteriormente condensados para obter a porfirina 2CPP, cuja estrutura química está representada na Figura 61, com um rendimento de 88%.

A espectrometria de massa do composto 2CPP ($C_{40}H_{26}N_4O_{12}$) apresentou um valor de $[MH]^+$ 758 para um valor teórico de $[M]^+$ 754,7. No espectro de ressonância magnética nuclear é de salientar o sinal em 10,53 (s, 2H, meso-H) que confirma a formação de uma porfirina 5,15-substituída, e o sinal em 4,55 (m, 8H, OCH₂) correspondente ao grupo metil do substituinte, que confirma a presença de quatro grupos carboxilato por núcleo porfirínico.

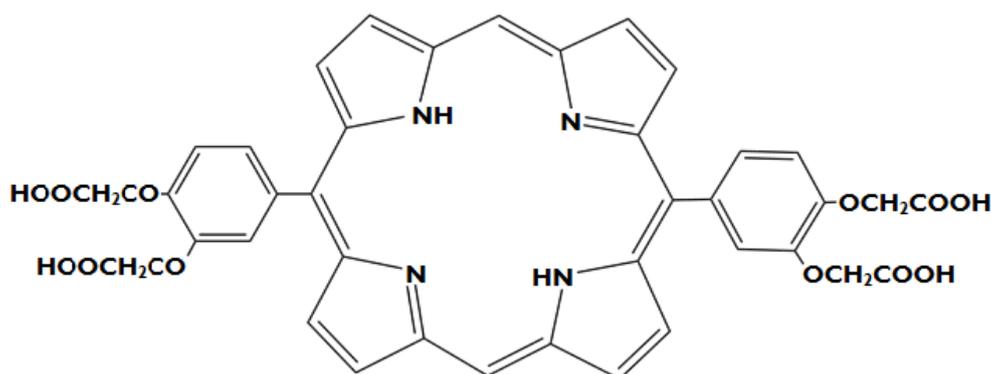


Figura 61: Estrutura química do fotossensibilizador 2CPP.

Os espectros de absorção, de emissão de fluorescência e de excitação de fluorescência estão representados na Figura 62.

O espectro de absorção do fotossensibilizador em metanol mostra dois tipos de transições diferentes entre os 400 e os 600 nm. Observa-se a banda Soret, típica deste tipo de compostos, correspondente a uma transição B(0,0) em 406 nm, e as bandas Q em 509, 545, e 626 nm.

O espectro de fluorescência apresenta uma banda única com um máximo em 655 nm correspondente a transição Q(0,0) com um desvio de Stokes de aproximadamente 20 nm. O espectro de excitação de fluorescência, obtido para a emissão em 655 nm, é apresentado com metade da intensidade do espectro de absorção, uma vez que é em tudo similar ao espectro de absorção corroborando a pureza do composto obtido.

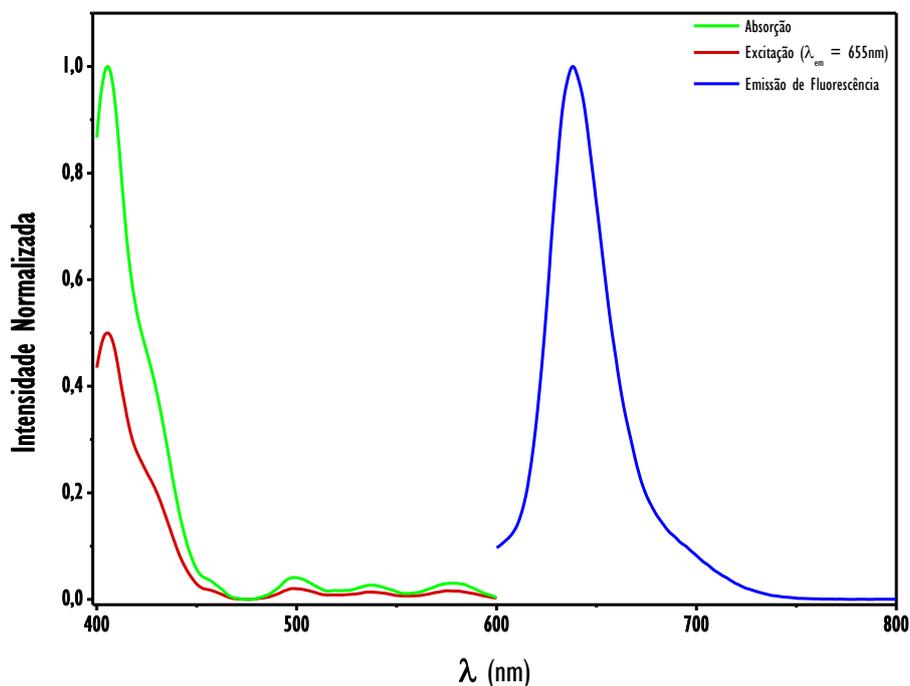


Figura 62 Espectros de absorção, de emissão de fluorescência e de excitação de fluorescência do 2CPP. Os valores máximos de absorção e de emissão de fluorescência foram normalizados a 1 e o valor máximo do espectro de excitação de fluorescência foi normalizado a metade desse valor utilizando o software *Origin 8*. Os resultados expressam a média de três experiências independentes.

Discussão

A preparação de uma porfirina com uma estrutura adequada à complexação com um metal com um raio atômico grande tal como o tecnécio-99 metastável (^{99m}Tc) requer a modificação da periferia da porfirina, de modo a integrar um local de coordenação na estrutura porfirínica. A estratégia passou pela síntese de um aldeído com dois grupos metilencarboxilato em posições orto.

Com o objetivo de manter alguma analogia estrutural com o fotossensibilizador desenvolvido para terapêutica (Parte II – Seção A), de minimizar o número de locais de fixação de metal e de manter a anfifilicidade, optou-se pela síntese de uma porfirina 5,15-substituída, recorrendo à metodologia já descrita na síntese do fotossensibilizador BBr2HPC. Após o isolamento e a purificação, através de cromatografia em coluna, obteve-se a

porfirina com um rendimento de 27%. Para assegurar uma boa complexação com o metal, os grupos éster da porfirina foram hidrolisados de modo a originar a estrutura complexante dos ácidos carboxílicos, obtendo-se a porfirina com 4 grupos carboxílicos, cuja estrutura química está representada na Figura 61, com um rendimento de 88% após recristalização.

O fotossensibilizador 2CPP foi obtido através de procedimentos desenvolvidos para a síntese de porfirinas 5,15-substituídas. A marcação de porfirinas com emissores de radiação gama, tal como o ^{99m}Tc , tem sido realizada em porfirinas simétricas tetrasubstituídas (Chatterjee *et al.*, 1997; Murugesan *et al.*, 2001a, 2002; Jia *et al.*, 2008). Esta marcação requer a introdução de grupos quelantes na molécula, isto é, substituintes dicarboxilato em posições adjacentes ou a introdução de derivados de agentes quelantes conhecidos como o DTPA (Murugesan *et al.*, 2001a, 2002; Jia *et al.*, 2008). Qualquer um destes resíduos que permite ligar a um metal é hidrofílico e, a sua introdução na estrutura, modifica muito a solubilidade em água da porfirina, pelo que se optou por seguir uma estratégia de síntese que permite a obtenção da porfirina com menos grupos ligantes e assegurar alguma anfifilicidade. A incorporação do grupo 3,4-(carboximetileneoxi)fenil foi realizada porque este grupo já tinha sido utilizado anteriormente para complexar isótopos como o ^{99m}Tc , no caso de porfirinas tetrasubstituídas (Murugesan *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2008). Deste modo foi possível obter uma estrutura química com uma geometria mais próxima do fotossensibilizador BBr2HPC, alvo dos estudos descritos na Parte II – Secção A, e também do fotossensibilizador BBr2HPP, anteriormente estudado (Serra *et al.*, 2010; Laranjo *et al.*, 2013).

Com o procedimento desenvolvido obteve-se a estrutura orgânica capaz de complexar com o metal radioativo para prosseguir com os estudos de marcação.

CAPÍTULO IX — ESTUDOS *IN VITRO*

Material e Métodos

Marcação do 2CPP com ^{99m}Tc

Após a síntese da porfirina, procedeu-se à otimização do procedimento de marcação com ^{99m}Tc . A otimização de um processo de marcação simples e reprodutível foi conseguida por tentativa e erro, através da variação de vários parâmetros. A massa do ligando utilizada variou entre 0,1 a 2 mg. O agente redutor selecionado foi o cloreto estanhoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma 208035), cujas massas testadas foram de 10, 15, 20, 30, 40 e 60 μg . Foram também testadas várias temperaturas, nomeadamente, a temperatura ambiente ($23 \pm 3^\circ\text{C}$), 40, 55, 80 e 100°C ; e vários valores de pH, entre 5,0 e 8,0. De modo a estimar o efeito de cada um destes parâmetros individualmente na eficiência de marcação, os restantes foram mantidos constantes.

Finalmente, o protocolo de marcação, que se estabeleceu consistiu na preparação de um kit com 200 μL de uma solução 2 mg/mL de ligando em água bidestilada esterilizada, pH ajustado para 7,0, que foi reservado em frasco selado com atmosfera saturada em argon. Imediatamente antes da marcação adicionaram-se 15 μL de uma solução 1 mg/mL de cloreto estanhoso em ácido clorídrico (HCl) 0,1 N. Adicionaram-se $162,9 \pm 2,8$ MBq de pertecnato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) num volume de 0,5 mL, misturou-se em vórtex durante alguns segundos e deixou-se repousar durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Controlo de qualidade

A microcromatografia ascendente em camada fina é um método comum para a determinação da pureza radioquímica de complexos tecneciados. Esta metodologia permite a separação dos componentes da amostra, através da migração do eluente, ou solvente, ao longo da componente adsorvente. De acordo com a afinidade e a solubilidade dos componentes da amostra, para com a fase estacionária e a fase móvel, respetivamente, a migração ocorre a diferentes velocidades (Abrantes, 2007). A pureza radioquímica do complexo ^{99m}Tc -2CPP foi avaliada com esta metodologia.

No caso das complexações com ^{99m}Tc , as principais impurezas radioquímicas são o pertecnetato livre e as formas coloidais resultantes da hidrólise do pertecnetato, que formam complexo de tecnécio reduzido-hidrolisado. No processo de separação cromatográfica, cada componente da amostra é considerado tendo em conta a razão entre a distância percorrida ao longo da fase estacionária e a distância percorrida pela frente do solvente. Esta razão é habitualmente designada por fator de retenção (R_f , do inglês, *retention factor*).

A pureza radioquímica da formulação obtida foi quantificada como a percentagem de radioatividade presente com a forma química desejada relativamente à radioatividade total. No caso do complexo desenvolvido optimizaram-se dois sistemas de microcromatografia ascendente independentes uma vez que, como referido, podem existir duas espécies contaminantes. Conforme descrito na Tabela 6, para quantificar a presença de tecnécio livre utilizaram-se tiras de papel de cromatografia Whatman N° 1 (Whatman Chromatography Products) com 10 cm de comprimento e 1 cm de largura como fase estacionária e acetona como fase móvel. Para separar o complexo ^{99m}Tc -2CPP utilizaram-se tiras de sílica gel (Instant Thin Layer Chromatography-Sílica Gel, ITLC-SG, Pall Corporation) com a mesma dimensão como fase estacionária e uma solução de acetona, água e hidróxido de amónia (1;20;0,8, v/v) como fase móvel. Na Tabela 6 estão também representados os fatores de retenção de cada componente da formulação desenvolvida

Tabela 6: Valores dos fatores de retenção (R_f , do inglês, *retention factor*) para o ^{99m}Tc -livre, ^{99m}Tc -R/H e ^{99m}Tc -2CPP determinados por microcromatografia de camada fina.

Fase Estacionária	Fase Móvel	R_f (^{99m}Tc livre)	R_f (R/H ^{99m}Tc)	R_f (^{99m}Tc -2CPP)
Whatman® N°1	Acetona	1,0	0,0	0,0
ITLC-SG	Acetona, Água, Hidróxido de Amónio (1;20;0,8, v/v)	1,0	0,0	1,0

Os controlos de qualidade foram realizados 20, 60, 120, 180, 240 e 360 minutos após a preparação da formulação. Para tal, colocou-se 1 ml de eluente em tina própria para cromatografia e 2 μl da formulação preparada na origem da fase estacionária. As tiras foram colocadas no interior das tinas e aguardou-se a migração da frente do solvente ao longo de toda a fase estacionária. Posteriormente, foram adquiridas imagens das tiras numa câmara-gama GE 400 AC, através da obtenção de uma imagem estática com uma matriz de 128x128 pixels, zoom 1, durante 30 segundos. As imagens foram processadas numa estação de processamento Xeleris, através do desenho de duas regiões de interesse (ROI, do inglês *regions of interest*), a primeira correspondente à distância percorrida pela frente do solvente e a segunda correspondente a metade dessa distância a partir da origem. A primeira ROI forneceu a informação acerca da radioatividade total e a segunda acerca da radioatividade presente na metade inferior da tira. A percentagem de cada um dos componentes presentes na formulação foi determinada através das seguintes equações, em que a primeira corresponde ao sistema de fase estacionária Whatman® N°1,

a segunda corresponde ao sistema de fase estaconária ITLC-SG, e última permite a determinação da pureza radioquímica com base nos cálculos das duas primeiras equações.

$${}^{99m}\text{TcO}_4^- = \left(1 - \frac{\text{Atividade}_{\text{Base}}}{\text{Atividade}_{\text{Total}}}\right) \times 100$$

$${}^{99m}\text{Tc.R/H} = \left(1 - \frac{\text{Atividade}_{\text{Base}}}{\text{Atividade}_{\text{Total}}}\right) \times 100$$

$${}^{99m}\text{Tc.2CPP} = 100 - ({}^{99m}\text{TcO}_4^- + {}^{99m}\text{Tc.R/H})$$

Estabilidade no soro sanguíneo humano

A estabilidade da marcação do complexo ${}^{99m}\text{Tc-2CPP}$ no soro sanguíneo humano foi determinada através da metodologia de microcromatografia ascendente em camada fina descrita anteriormente. Para tal, prepararam-se amostras de 0,5 ml de soro sanguíneo humano às quais se adicionaram 1,6 MBq da formulação e se incubou a 37°C. Após 30, 120 e 360 minutos retiraram-se amostras com um volume de 5 μl para avaliar a pureza radioquímica.

Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição é a razão de concentrações de um composto entre duas fases, uma aquosa e outra orgânica, e utiliza dois solventes imiscíveis em equilíbrio. O coeficiente de partição, constitui uma medida da diferença de solubilidade de um dado composto entre esses dois solventes e, portanto, dá-nos uma indicação do carácter hidrofóbico ou hidrofílico da substância. Para este trabalho utilizaram-se como solventes a água e o octanol, amplamente descritos na literatura. Para esta avaliação preparou-se uma mistura de 1 ml de 1-octanol (Sigma O4500) e de 1 ml de uma solução de NaCl a 0,9%, à qual se adicionaram 16 MBq de ${}^{99m}\text{Tc-2CPP}$, e agitou-se em vórtex e deixou-se repousar durante 5 minutos. Foram retiradas de cada fase amostras de igual volume que foram medidas num contador de poço DPC Gamma C12. O coeficiente de partição ($\log P$) foi calculado com base na função logarítmica seguinte.

$$\log P = \log \left(\frac{[\text{cpm}]_{\text{octanol}}}{[\text{cpm}]_{\text{água}}} \right)$$

em que *cpm* representa as contagens por minuto.

Estudos de captação

Os estudos de captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP foram realizados no LigandTracer[®]Yellow (RidgeviewInstruments AB, Sweden), um equipamento dedicado a este fim, através da avaliação das contagens por minuto entre uma área ativa e uma região de referência.

Os estudos de captação foram realizados em células de carcinoma colorretal, a linha WiDr, e em células de carcinoma do pulmão, designadas H1299. Estas células foram cultivadas no meio de cultura DMEM e mantidas a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO_2 e 95% de ar, de acordo com os procedimentos anteriormente descritos. Foram preparadas suspensões celulares com 2×10^6 células, que se deixaram aderir durante a noite, numa área específica de uma placa de Petri. No momento da realização dos estudos, a placa foi colocada no suporte dedicado do equipamento, que, pelo posicionamento, retém o meio de cultura na região inferior da placa, e foram adicionados 0,925 MBq/mL de ^{99m}Tc -2CPP. No decorrer do estudo a placa é feita rodar pelo equipamento e, a cada rotação, a área com células alterna entre a zona inferior com meio de cultura e zona superior onde está o detetor. Os estudos decorreram ao longo de 120 minutos.

Avaliação da fototoxicidade

Após a síntese e a caracterização do composto 2CPP pretendeu-se avaliar a sua eventual fotocitotoxicidade. Utilizaram-se as linhas celulares WiDr e H1299 que foram submetidas ao tratamento fotodinâmico de modo semelhante ao descrito para o fotossensibilizador BBr2HPC.

Para tal foram preparadas suspensões das linhas celulares referidas na concentração de 8×10^5 células/ml, que foram distribuídas por placas de 48 poços, contendo cada poço um volume final de 600 μL . Estas placas foram incubadas durante a noite de forma a permitir a adesão das células às mesmas.

O fotossensibilizador 2CPP foi adicionado em concentrações variáveis entre 1 μM e 200 μM . Em todos os ensaios foram realizados dois controlos: culturas celulares não tratadas e culturas celulares em que se adicionou o veículo de administração do sensibilizador, neste caso uma solução constituída por $\text{H}_2\text{O}/\text{PEG}_{400}/\text{EtOH}$ (50/30/20, v/v/v).

As culturas celulares foram incubadas durante 24 horas com a concentração do fotossensibilizador pretendida. Após este período de tempo, realizou-se uma lavagem com PBS, que garantiu que todo o fotossensibilizador não internalizado pelas células fosse removido, e colocou-se meio de cultura novo. As culturas foram irradiadas com um fluxo de 7,5 mW/cm^2 até atingir uma energia total de 10 J. A análise da atividade metabólica foi realizada 24, 48 e 72 horas após o tratamento fotodinâmico.

Para avaliar o efeito dos sensibilizadores na atividade metabólica foi realizado o ensaio do MTT. Para a avaliação da atividade metabólica o meio das culturas celulares foi aspirado e procedeu-se a uma lavagem com PBS a cada poço. Posteriormente, em cada poço, colocaram-se 100 μL de uma solução de MTT (0,5 mg/ml; Sigma M2128) em PBS, com pH de 7,4, e incubou-se, no escuro, à temperatura de 37 °C durante 4 horas. De forma a solubilizar

os cristais de formazano obtidos acrescentou-se a cada poço 100 μL de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação durante 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi posteriormente homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços, e a absorvância foi quantificada a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotômetro Biotek® Synergy HT.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® versão 20. A análise descritiva foi expressa utilizando média \pm desvio-padrão para as variáveis quantitativas.

Na análise inferencial, a avaliação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, com o objectivo de determinar a utilização de testes paramétricos ou não paramétricos nas comparações pretendidas.

As comparações entre as linhas celulares foram realizadas com recurso ao teste ANOVA de um fator (teste paramétrico), no caso de existir normalidade da distribuição e homogeneidade de variâncias, ou ao teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico) em caso contrário. As comparações múltiplas foram realizadas com a correção de Bonferroni.

A avaliação da estabilidade do complexo foi feita pela comparação da eficiência de marcação em diferentes tempos, tendo sido utilizado o teste de Friedman.

Nos estudos de captação, os dados experimentais para cada linha celular obtidos foram ajustados a uma função exponencial de dois parâmetros, utilizando o software OriginPro versão 8.0 (OriginLab).

Foi considerado um valor de significância de 5 % para todas as comparações.

Resultados

Foi possível otimizar um procedimento de marcação estável e reprodutível, através da variação de diversos parâmetros. O procedimento de marcação consistiu na preparação de um kit com 200 μL de uma solução 2 mg/mL de ligando em água bidestilada esterilizada, pH ajustado para 7,0, em frasco selado com atmosfera saturada em argon, ao qual foram adicionados 15 μL de uma solução 1 mg/mL de cloreto estanhoso em ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N e $162,9 \pm 2,8$ MBq de pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4\text{Na}$) num volume de 0,5 mL, à temperatura ambiente.

Paralelamente à otimização do procedimento de marcação do fotossensibilizador foi possível desenvolver um sistema de controlo de qualidade com quantificação da pureza radioquímica do ^{99m}Tc -2CPP com base em microcromatografia ascendente em camada fina, descrito na Tabela 6.

A Figura 63 representa o efeito do pH, da massa de cloreto estanhoso e da temperatura na pureza radioquímica do complexo marcado. No que diz respeito ao pH verificou-se a maior pureza radioquímica com o valor de 7, havendo um aumento da percentagem da forma livre de tecnécio e da forma de ^{99m}Tc reduzida/hidrolisada com pH mais elevado. Relativamente à massa de agente redutor verificou-se que a adição de 15 μg de cloreto estanhoso ao kit constituiu a melhor opção para a marcação do fotossensibilizador. Quanto ao efeito da temperatura verificou-se que o aquecimento aumenta a formação da espécie de ^{99m}Tc reduzida/hidrolisada, sendo a temperatura ambiente a melhor opção.

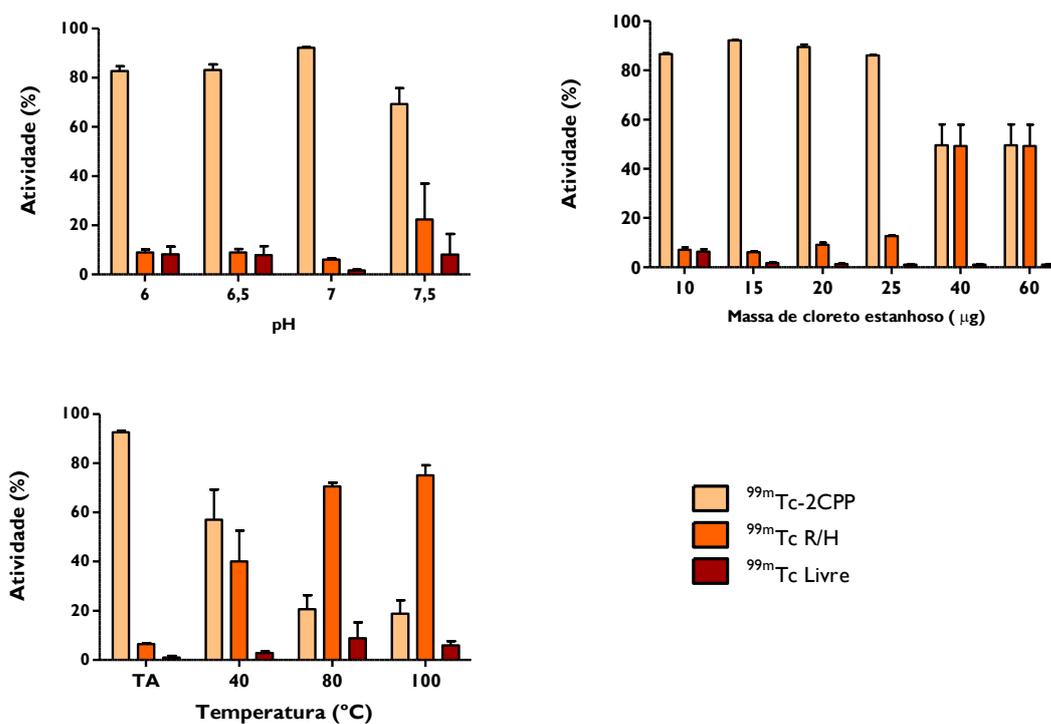


Figura 63: Efeito do pH, da massa de agente redutor e da temperatura na pureza radioquímica do complexo ^{99m}Tc -2CPP. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experiências independentes.

Com a utilização dos parâmetros descritos obtiveram-se as eficiências de marcação representadas nos gráficos da Figura 64 de $92,5 \pm 0,48\%$, para o tempo de 20 minutos após a marcação. O complexo mantém-se estável ao longo de 4 horas e, posteriormente, verifica-se uma pequena diminuição da pureza radioquímica. De facto verificam-

se diferenças estatisticamente significativas entre os 20 e os 300 minutos e também entre os 20 e os 360 minutos ($p=0,022$).

A estabilidade do complexo em soro sanguíneo humano, à temperatura de 37°C, está representada no gráfico da Figura 64. Após 30 minutos de marcação obteve-se uma pureza radioquímica de $86,5 \pm 2,8\%$ que se manteve constante.

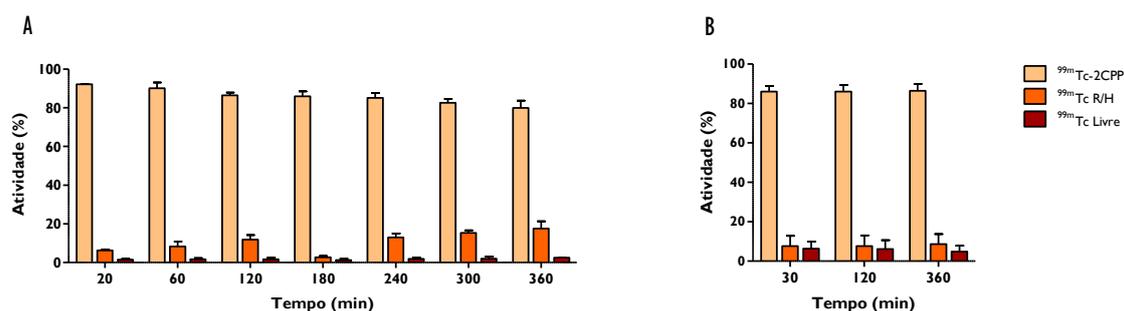


Figura 64: Pureza radioquímica do complexo ^{99m}Tc -2CPP *in vitro* (à esquerda, A) e no soro sanguíneo humano (à direita, B). Os resultados representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios.

O complexo ^{99m}Tc -2CPP revelou ser um composto hidrofílico, uma vez que o valor do coeficiente de partição determinado a $\text{pH}=7$ foi igual a 1.

A captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP, representada nos gráficos da Figura 65, aumentou ao longo do tempo nas células de carcinoma colorretal (WiDr) e nas células de carcinoma do pulmão (HI299), em que as captações máximas foram de $2,44 \pm 0,60\%$ para as primeiras e de $2,63 \pm 0,99\%$ para as segundas.

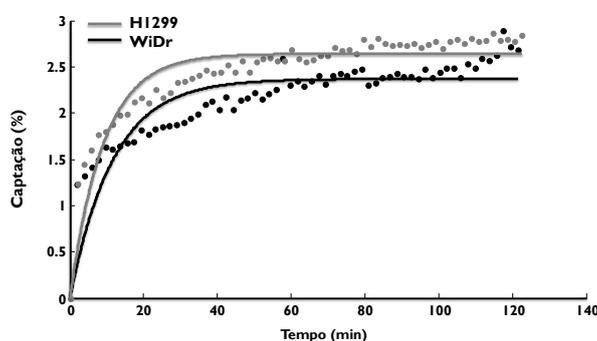


Figura 65: Perfil de captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP pelas células de carcinoma colorretal WiDr e pelas células de carcinoma do pulmão HI299. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cinco ensaios.

A fototoxicidade do fotossensibilizador foi avaliada nas mesmas linhas celulares e, embora se tenha verificado redução da atividade metabólica, como se pode observar nos gráficos da Figura 66, não foi possível calcular o valor de IC₅₀ que é superior à concentração máxima testada.

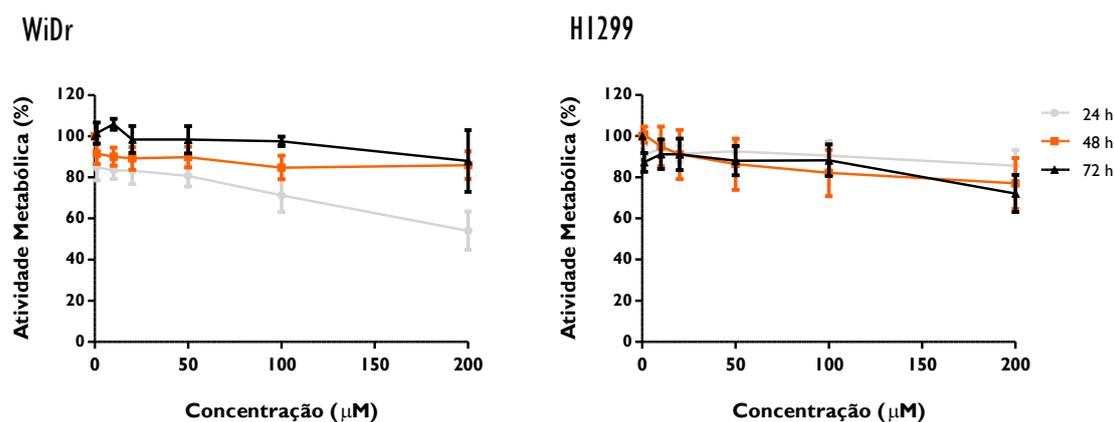


Figura 66: Perfis de dose-resposta das células de carcinoma colorretal (à esquerda) e das células de carcinoma do pulmão (à direita) 24, 48 e 72 horas após o tratamento fotodinâmico. Os resultados representam a média e o desvio padrão de seis ensaios.

Discussão

Pretendeu-se desenvolver e otimizar um protocolo de marcação radioativa do fotossensibilizador 2CPP com tecnécio-99 metastável. Este radionuclídeo, emissor de fóton simples, é o radioisótopo mais utilizado na prática clínica em medicina nuclear pelas suas características favoráveis, nomeadamente disponibilidade e baixo custo, tempo de semi-vida de aproximadamente 6 horas e energia de 140 KeV, ideais para a aquisição de imagem numa câmara-gama (Abrantes, 2007). O tecnécio-99 metastável é um metal de transição e pode formar complexos com metais com carência de eletrões e com átomos suscetíveis de partilhar eletrões, como é o caso do oxigénio, do enxofre, do azoto, ou do fósforo. Para além disso, este radionuclídeo pode apresentar estados de oxidação variáveis entre -1 e +7, o que permite a sua complexação com vários quelantes (Zolle, 2007). Este radioisótopo é obtido a partir de um gerador de molibdénio/tecnécio com o estado de oxidação +7. Assim, para possibilitar a

complexação, é necessária a adição de um agente redutor para que o estado de oxidação baixe (Hung *et al*, 1996; Mattos *et al*, 2012). O cloreto estanhoso dihidratado é um dos agentes redutores mais usados, porém é necessário otimizar a sua massa de modo a maximizar a redução do tecnécio-99 metastável e evitar o excesso que leva à formação de impurezas radioquímicas (Hung *et al*, 1996). Nesta formulação verificou-se que 15 µg de cloreto estanhoso dihidratado possibilitava a maior eficiência de marcação e que o seu aumento leva à formação de ^{99m}Tc reduzido/hidrolisado. Pela sua fácil oxidação, a utilização deste agente redutor obriga a purgar todas as amostras e soluções com um gás inerte como o argon. Houve também necessidade de avaliar e de otimizar o efeito do pH na pureza radioquímica, como está referenciado na Figura 63. O estanho (Sn²⁺) torna-se insolúvel em soluções alcalinas a neutras (Mattos *et al*, 2012), no entanto, o pH alcalino contribui para a desprotonação dos grupos carboxílicos e, no caso do fotossensibilizador 2CPP pode facilitar a complexação com o radioisótopo. Deste modo, nesta formulação atingiu-se um compromisso entre estes fatores com pH igual a 7. A temperatura também influencia a marcação radioquímica, sendo o aquecimento um requisito para a preparação de muitos radiofármacos, no entanto, a temperatura excessiva pode levar à formação de impurezas radioquímicas (Vallabhajosula *et al*, 2010). Neste processo de marcação verificou-se que o aquecimento está associado a diminuição da pureza radioquímica da formulação, pela formação da espécie reduzida/hidrolisada. Foi possível obter uma formulação estável no tempo, à temperatura ambiente, com eficiência máxima da reação aos 20 minutos, sendo por isso uma reação rápida. Obteve-se uma formulação farmacêutica estabilizada, assim como um procedimento de marcação simples e reprodutível, estável no tempo *in vitro* e no soro humano.

A possibilidade de associar a terapia fotodinâmica à medicina nuclear, através da marcação radioativa de fotossensibilizadores, foi considerada uma abordagem promissora (Pandey *et al*, 2006). O tecnécio-99 metastável foi utilizado para a marcação de alguns fotossensibilizadores (Wong *et al*, 1983; Schuitmaker *et al*, 1993; Murugesan *et al*, 2001b). Murugesan e colaboradores radiomarcaram alguns fotossensibilizadores tetrasubstituídos (Chatterjee *et al*, 1997; Murugesan *et al*, 2001c, 2002). O procedimento de controlo de qualidade, com base em microcromatografia ascendente em camada fina, adotado para o complexo ^{99m}Tc-2CPP, foi adaptado e otimizado a partir do anteriormente referenciado por estes autores (Murugesan *et al*, 2001c), uma vez que o fotossensibilizador 2CPP tem algumas características em comum com o fotossensibilizador referido pelos mesmos autores, nomeadamente, a presença de grupos carboxílicos que conferem hidrofiliabilidade à molécula.

O coeficiente de partição (log P) é uma medida da distribuição de um composto de entre um sistema de duas fases, o n-octanol e a água. Os compostos que apresentam valores de P inferiores a 10 são solúveis em água, enquanto os valores de P superiores a 10⁴ são considerados muito hidrofóbicos (Wang *et al*, 2010a). No caso proposto, o valor de log-P determinado (com o pH igual a 7) foi de 1, pelo que o complexo ^{99m}Tc-2CPP é um composto hidrofílico. Esta elevada hidrofiliabilidade será devida sobretudo à existência de quatro grupos de ácidos carboxílicos na estrutura porfirínica.

Após a otimização do procedimento de marcação radioativa, a qual apresentou uma elevada pureza radioquímica, procedeu-se à realização de estudos *in vitro*. Verificou-se que as células de carcinoma colorretal e de carcinoma

do pulmão captaram o complexo ^{99m}Tc -2CPP. A captação aumenta ao longo do tempo em ambas as linhas celulares, sendo a captação superior pelas células de carcinoma do pulmão. Avaliou-se também nestas linhas celulares o efeito fotodinâmico do fotossensibilizador, em que as curvas de dose-resposta estão representadas na Figura 66, mas, como referido, não foi possível calcular o valor de IC_{50} que foi superior à concentração máxima testada de 200 μM . Este resultado indica que este fotossensibilizador é pouco letal para as células e que o seu efeito terapêutico é significativamente inferior ao fotossensibilizador BBr2HPC e à sua porfirina correspondente.

Apesar da importância dos grupos carboxílicos para permitir a complexação com o tecnécio, estes grupos estão associados a um efeito fotodinâmico modesto (You *et al*, 2003; Pereira *et al*, 2010). Em trabalhos anteriores, verificou-se que uma série de fotossensibilizadores do tipo porfirínico substituídos, com grupos carboxilo tiveram efeito fotodinâmico inferior ao de outras hidroxifenilporfirinas (Pereira *et al*, 2010). You e colaboradores também verificaram que apesar de a presença de grupos carboxílicos influenciar pouco as propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores, a captação celular e a fototoxicidade diminuem com o aumento de grupos carboxílicos na estrutura, pelo que não seria espetável uma grande eficácia terapêutica por parte deste fotossensibilizador, o 2CPP.

CAPÍTULO X — ESTUDOS *IN VIVO*

Material e Métodos

Desenvolvimento do modelo animal

Os ratinhos *Balb/c nu/nu* foram adquiridos aos Laboratórios Internacionais Charles River, Inc (Espanha) com 6 semanas de idade, mantidos em sala climatizada própria, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, acesso livre a ração padrão de laboratório para murinos *nude* e água devidamente filtrada. O bem-estar dos animais foi verificado diariamente no decorrer do estudo.

Para a realização deste trabalho, realizaram-se xenotransplantes em ratinhos *Balb/c nu/nu*. Para tal, depois de anestesiados com uma solução de ketamina a 77% (KetalarR, Porke-Davis) e clorpromazina a 23% (LargactilR) administrada por via subcutânea foram inoculadas 10^7 células tumorais humanas da linha celular WiDr, de carcinoma colorretal, ou da linha celular H1299 de carcinoma do pulmão, também utilizadas nos estudos *in vitro* anteriormente descritos, na região do cavado axilar. O xenotransplante foi realizado nesta localização porque corresponde a uma área de boa vascularização, que permite a expansão tumoral e que está afastada de órgãos como o coração ou órgãos associados a vias de eliminação, cuja sobreposição impediria a análise de regiões de interesse da imagem.

Estudos de biodistribuição

Para os estudos de biodistribuição os animais foram sujeitos a um protocolo anestésico semelhante ao descrito anteriormente. De seguida, cada animal foi posicionado sobre o colimador da câmara-gama e procedeu-se à injeção de $3,7 \pm 0,7$ MBq de ^{99m}Tc -2CPP na veia dorsal da cauda. Adquiriram-se imagens estáticas com matriz de 256 x 256 pixels e com duração de 2 minutos após a administração do complexo ^{99m}Tc -2CPP e a cada 30 minutos após injeção.

Os animais foram ocidados a diferentes tempos, 30, 120, 240 e 360 minutos após a administração do complexo, e foram recolhidas amostras de diferentes fluidos, órgãos e tecidos, nomeadamente, sangue, baço, cérebro, coração,

figado, estômago, intestino delgado, intestino grosso, pulmão, tiróide, rins, músculo, osso e tumor. Cada amostra foi pesada e a radioatividade foi medida num contador de poço (DPC Gamma C12). Com estes dados, calculou-se a percentagem da atividade administrada por grama de amostra (%/g).

Resultados

Os resultados dos estudos de biodistribuição estão sumariados na Tabela 7. Foi possível detetar a presença do complexo ^{99m}Tc -2CPP no cérebro, no entanto, em níveis muito baixos, inferiores a 1%/g. Neste órgão, juntamente com a tiróide, verificam-se os valores mais baixos de percentagem de atividade injetada por grama, ao longo de todos os tempos estudados. Pelo contrário, o fígado é o órgão onde se verifica a maior captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP, entre 19 e 15%/g. No que concerne aos restantes órgãos do sistema gastrointestinal, nomeadamente o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso verifica-se que a percentagem de radioatividade, em cada órgão diminui desde os 30 até aos 360 minutos. Os pulmões, os rins e o baço estão entre os órgãos em que se encontra maior percentagem de radioatividade, mantendo-se a tendência para o decréscimo ao longo do tempo do estudo. No sangue, assim como no coração, verifica-se uma redução da atividade para cerca de metade dos 30 para os 120 minutos e progressiva diminuição.

Tabela 7: Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -2CPP. Os valores representam a percentagem de atividade administrada por grama de fluido, órgão ou tecido. Cada valor representa a média e o desvio padrão de cinco ratinhos.

Órgãos	Tempo			
	30 min	120 min	240 min	360 min
Baço	7,91 ± 1,29	7,30 ± 2,04	6,62 ± 1,16	3,01 ± 1,31
Cérebro	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Coração	1,22 ± 0,31	0,64 ± 0,13	0,46 ± 0,16	0,30 ± 0,04
Estômago	1,13 ± 0,33	0,71 ± 0,11	0,73 ± 0,22	0,42 ± 0,04
Fígado	18,88 ± 3,83	17,73 ± 3,38	17,08 ± 1,58	14,84 ± 4,92
Intestino Delgado	2,80 ± 0,94	1,40 ± 0,25	1,40 ± 0,27	0,69 ± 0,20
Intestino Grosso	1,18 ± 0,23	0,90 ± 0,22	0,47 ± 0,16	0,34 ± 0,12
Osso	1,47 ± 0,32	1,21 ± 0,33	0,79 ± 0,11	0,44 ± 0,15
Pulmão	9,53 ± 2,75	6,33 ± 1,76	3,79 ± 0,95	1,25 ± 0,18
Rins	9,11 ± 0,58	6,33 ± 0,72	5,44 ± 1,72	4,40 ± 1,38
Sangue	5,75 ± 1,61	2,76 ± 0,64	1,54 ± 0,32	1,02 ± 0,44
Tiróide	0,48 ± 0,04	0,43 ± 0,04	0,35 ± 0,08	0,28 ± 0,07

A razão tumor/músculo está representada na Figura 67. Verificou-se que, tanto para as células de carcinoma colorretal (WiDr) como para as células de carcinoma do pulmão (H1299), ocorre um aumento ao longo do tempo. Aos 360 minutos após a administração obteve-se uma razão tumor/músculo de $3,33 \pm 1,22$ para os xenotransplantes de carcinoma colorretal e de $3,55 \pm 1,29$ para os xenotransplantes de carcinoma do pulmão.

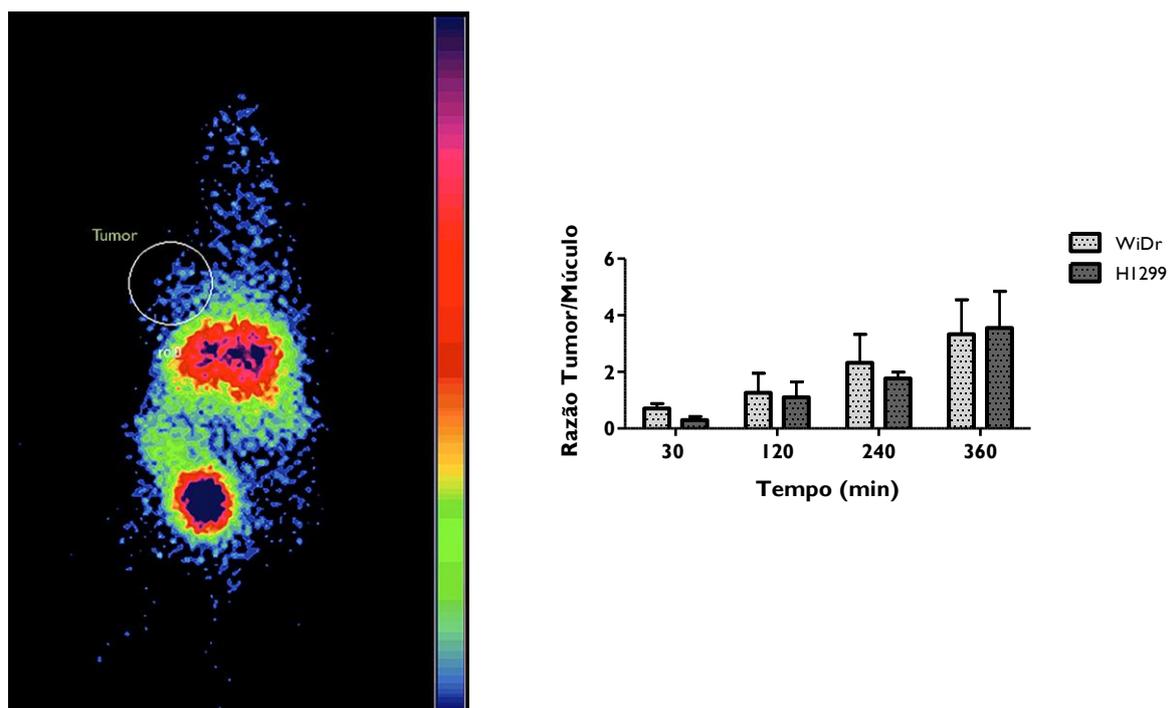


Figura 67: Imagem estática do complexo ^{99m}Tc -2CPP obtida 270 minutos após a administração do radiofármaco (à esquerda) e razão tumor/músculo do complexo ^{99m}Tc -2CPP (à direita). Os resultados representam a média e o desvio padrão de cinco animais.

Discussão

As características dos fotossensibilizadores do tipo porfirínico e estruturas derivadas têm vindo a demonstrar resultados promissores no tratamento de cancro (Agostinis *et al*, 2011). A capacidade destes compostos serem retidos seletivamente pelo tecido tumoral, associada às características de fluorescência que permitem a sua deteção, foi considerada uma vantagem que poderia ser utilizada para a obtenção de imagem, de modo minimamente

invasivo (Ethirajan *et al*, 2011). A possibilidade de, associadamente à terapêutica, realizar diagnóstico, constitui uma mais-valia com implicações óbvias, nomeadamente, no que concerne à possibilidade de otimizar o tratamento (Babbar *et al*, 2000; Murugesan *et al*, 2001b). A marcação de fotossensibilizadores com radionuclídeos pode iniciar o percurso na prática de medicina personalizada em terapia fotodinâmica. Nesta perspetiva, pode equacionar-se a possibilidade de se conseguir informação acerca do melhor tempo para a irradiação, já que a imagem possibilitará a identificação da melhor relação sinal-ruído, ou seja, o tempo em que a captação por parte do tumor é máxima e mínima nos outros órgãos ou sistemas. Deste modo seria possível a maximização do efeito terapêutico e a minimização de efeitos secundários para os doentes.

Poder-se-ia pensar, numa primeira aproximação, que seria possível obter informação imagiológica tendo em conta a fluorescência. Porém, como o organismo humano é rico em compostos de cor vermelha, a fluorescência destes compostos perder-se-ia. Assim, a utilização de fotossensibilizadores como as porfirinas marcados com emissores gama, pode constituir uma alternativa. Adicionalmente, esta abordagem pode também ser utilizada para perceber a biodistribuição dos compostos, saber qual ou quais os órgãos-alvo e quais as vias de excreção dos compostos (Pandey *et al*, 2006).

Neste trabalho, os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -2CPP, realizados aos 30, 120, 240 e 360 minutos, permitiram concluir que no tempo mais tardio a radioatividade detetada é consideravelmente mais baixa do que aos 30 minutos. Esta constatação permite concluir que a eliminação do complexo ^{99m}Tc -2CPP deverá ser rápida, o que deverá estar relacionado com a sua hidrofiliabilidade anteriormente comprovada pela avaliação do coeficiente de partição. Confirmando estes dados, a excreção é predominantemente renal com grande acumulação na bexiga (Figura 67).

No que concerne à biodistribuição é indicativa de que o complexo ^{99m}Tc -2CPP é metabolizado pelo fígado. O fígado é um órgão reticuloendotelial, com vasos sanguíneos fenestrados, muito permeáveis, responsável pela metabolização de vários compostos, nomeadamente moléculas orgânicas como os fotossensibilizadores. Posteriormente, a eliminação é feita por via hepatobiliar atingindo o intestino e sendo excretado através das fezes. Estes dados estão de acordo com o descrito por Castano e colaboradores (Castano *et al*, 2005). As imagens de cintigrafia obtidas, das quais é exemplo a imagem da Figura 67, mostram elevada acumulação de radioatividade no fígado e na bexiga, possivelmente com elevada contribuição da urina, o que constitui outra indicação da eliminação parcialmente hepatobiliar e parcialmente urinária. No rim também se verificou elevada acumulação do complexo ^{99m}Tc -2CPP. A elevada localização nos rins e no fígado está de acordo com outros resultados obtidos para algumas metaloporfirinas e para fotossensibilizadores como o Photofrin[®] e o Photosan[®] (Fawwaz *et al*, 1990; Castano *et al*, 2005; Das *et al*, 2010; Fakhar-e-Alam *et al*, 2010b). Apesar de a principal via descrita para a eliminação de fotossensibilizadores ser a via hepatobiliar é frequente ocorrer em simultâneo elevada acumulação em órgãos como o rim, indicativa de que simultaneamente ocorre excreção urinária (Woodburn *et al*, 1998; Castano *et al*, 2005; Fakhar-e-Alam *et al*, 2010b). Do ponto de vista clínico, a potencial utilização desta formulação

para visualização de massas tumorais nestes órgãos pode ser dificultada pela desfavorável relação sinal/ruído dadas as vias de metabolização e de eliminação.

Os órgãos gastrointestinais, como o estômago, os intestinos delgado e grosso costumam acumular valores intermédios de fotossensibilizador (entre o fígado e músculo, por exemplo) (Castano *et al*, 2005; Fakhar-e-Alam *et al*, 2010b), tal como se verificou para o complexo ^{99m}Tc -2CPP. Por outro lado, as concentrações mais baixas são encontradas em órgãos e tecidos como o coração, o músculo estriado, o osso e o cérebro, órgãos que apresentam uma vascularização menos permeável, sendo exemplo clássico a barreira hemato-encefálica (Castano *et al*, 2005).

Verificou-se que o pulmão é um dos órgãos que acumula uma elevada percentagem de atividade por grama de tecido, particularmente até aos 120 minutos. De acordo com a bibliografia, pouco tempo após a administração é comum encontrar elevada concentração de fotossensibilizador neste órgão (Castano *et al*, 2005). O baço também apresentou acumulação significativa conforme característica de órgão reticuloendotelial, como já apontado para o fígado. Para além disso, a acumulação de fotossensibilizadores no baço está na dependência da sua estrutura química, na medida em que esta influencia a carga e a hidrofiliicidade, mas pode também ser influenciada pelo veículo em que o composto é administrado (Castano *et al*, 2005; Das *et al*, 2010; Wang *et al*, 2010a).

Anteriormente, verificou-se que o complexo ^{99m}Tc -2CPP se mantém estável no tempo quer *in vitro*, quer em presença de soro humano. A baixa acumulação de radioatividade em órgãos como a tiróide e o estômago indicia que a estabilidade do complexo *in vivo* também será elevada, uma vez que estes órgãos são os principais locais de acumulação de contaminantes radioquímicos como o tecnécio livre (Murugesan *et al*, 2002). Por outro lado, os complexos de tecnécio reduzido hidrolisado têm tendência a acumular preferencialmente no fígado e na medula óssea (Zolle, 2007). Tal como referido, o complexo ^{99m}Tc -2CPP acumula-se preferencialmente no fígado, uma vez que este será um órgão de metabolização do mesmo, não sendo por isso possível tirar conclusões, no entanto, não existe acumulação óssea significativa, corroborando também a estabilidade radioquímica (Vallabhajusula *et al*, 2010).

A seletividade do complexo para as células tumorais foi avaliada tendo em conta a razão tumor/músculo. Apesar da elevada acumulação do fotossensibilizador observada em vários órgãos para os tempos mais curto, nomeadamente aos 30 minutos, verifica-se que esta acumulação diminui ao longo do tempo. Pelo contrário, o aumento do tempo contribui também para o aumento da razão tumor/músculo, que atinge valores superiores a 3, razão alvo/fundo mínima de um traçador (Murugesan *et al*, 2001c; Jia *et al*, 2008). Na perspetiva da medicina personalizada, a possibilidade de este fotossensibilizador ser aplicado como metodologia de diagnóstico, poderia associar um método imagiológico como a TAC que otimizará indubitavelmente a orientação na prática clínica.

PARTE III — CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Ao longo desta tese foram apresentados e discutidos os resultados obtidos no trabalho experimental. No entanto, há conclusões de maior importância que importa destacar, assim como, perspetivar o trabalho que se pretende realizar no futuro.

O fotossensibilizador BBr2HPC, sintetizado e caracterizado, demonstrou elevado rendimento de formação de oxigénio singleto e propriedades fotoquímicas adequadas à utilização como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica.

O efeito fotodinâmico *in vitro* deste fotossensibilizador revelou ser promissor para aplicação em terapêutica, pela constatação dos valores de IC₅₀ na ordem de nanomolar, em linhas celulares de vários tipos de cancro, nomeadamente, carcinoma colorretal, carcinoma do esófago e melanoma melanocítico.

O fotossensibilizador BBr2HPC tem uma elevada captação pelas células tumorais de carcinoma colorretal e de carcinoma do esófago, acumulando-se em organelos membranares como as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e os lisossomas, mas não penetra no núcleo, parecendo não ter capacidade de ultrapassar o envelope nuclear.

O tipo de morte celular ativado, apoptose e necrose, é influenciado pela concentração do fotossensibilizador BBr2HPC e pelo tipo de célula tumoral. A ativação da morte por apoptose está relacionada com a via mitocondrial, embora não exclusivamente, pois estão também implicados na resposta marcadores da via extrínseca.

Concluiu-se que não só oxigénio singleto, formado a partir da reação fotodinâmica do tipo II, mas também as ROS formadas através da reação do tipo I estão envolvidas na lesão após PDT baseada no fotossensibilizador BBr2HPC. Os mecanismos citoprotectores ativados não são suficientes para inibir os danos celulares consequentes ao efeito fotodinâmico.

Os estudos *in vivo* corroboraram o efeito fotodinâmico significativo verificado nos estudos *in vitro*, inclusivamente com a ocorrência de resposta patológica completa em alguns casos. Para este fotossensibilizador o intervalo entre a administração e a irradiação mais favorável foi de 24 horas.

Os estudos de biodistribuição permitiram concluir que as vias de eliminação do fotossensibilizador BBr2HPC são a hepatobiliar e a urinária. O tempo de eliminação permite apontar um perfil de segurança favorável numa fase pré-clínica. A captação do fotossensibilizador pelo tumor, em relação aos restantes tecidos, associada ao resultado obtido nos estudos de PDT *in vivo*, não evidencia efeitos lesivos em estruturas adjacentes.

O fotossensibilizador BBr2HPC apresenta-se como uma nova molécula promissora com potencial para utilização em terapia fotodinâmica contra o cancro.

Na perspetiva do desenvolvimento de um fotossensibilizador com propriedades adequadas à aplicação diagnóstica, o fotossensibilizador 2CPP, que apresenta alguma analogia estrutural com o fotossensibilizador BBr2HPC, foi sintetizado e caracterizado.

O fotossensibilizador 2CPP foi complexado com o radioisótopo tecnécio-99 metastável. O complexo ^{99m}Tc-2CPP, à semelhança do que se descreveu para o fotossensibilizador BBr2HPC, apresenta um padrão de eliminação por via hepatobiliar e urinária. Este complexo comprovou potencial para estudos de imagem, conforme se concluiu pela retenção tumoral e rápida eliminação, o que se reflete em efeitos secundários limitados.

A utilização de fotossensibilizadores complexados com radioisótopos principia uma abordagem de medicina personalizada em terapia fotodinâmica, através da medicina nuclear, com possibilidade teranóstica e de seguimento.

O desenvolvimento deste trabalho experimental permitiu adquirir conhecimento e otimização de procedimentos, que numa fase posterior se ambiciona alargar a outras vertente de estudo. Concretizou-se o objetivo de desenvolver um fotossensibilizador com intuito terapêutico e, paralelamente, uma molécula com analogia estrutural passível de ser marcada com um radioisótopo, possibilitando aquisição de imagem molecular pela aplicação de técnicas de medicina nuclear. De modo a conjugar estas duas premissas num único fotossensibilizador, perspectiva-se continuar a desenvolver síntese química associada à complexação radioativa de modo a que, no futuro, numa única administração se associe a possibilidade de diagnóstico e tratamento personalizado.

Os estudos de biodistribuição tanto do fotossensibilizador BBr2HPC como do fotossensibilizador 2CPP mostraram que o pulmão constitui um dos órgãos alvo, por esse motivo perspectiva-se o esclarecimento deste facto, quer através de estudos moleculares, quer pela interação com o microambiente pulmonar.

Além disto, verificou-se alguma seletividade tumoral em relação a órgãos como o músculo e a pele, no entanto, constitui perspectiva futura, desenvolver uma estratégia de transporte direcionada às células tumorais. A entrega do fotossensibilizador através de lipossomas apropriados para administração pulmonar, acoplados a moléculas direcionadas para recetores sobreexpressos no cancro do pulmão, como o EGFR, constitui uma visão, com trabalho experimental já em curso, que foi aprovada e financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/BIM-ONC/0979/2012) e pela Bolsa Liga Portuguesa contra o Cancro/Pfizer 2013, no âmbito do projeto NanoDirect-PDT.

PARTE IV — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abràmoff M (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11: 36–43.
- Abrantes AM (2007) Avaliação da hipóxia tumoral em adenocarcinoma colo-rectal. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Abrantes AMA (2013) Hipoxia tumoral - metabonómica e imagem. Universidade de Coimbra.
- Acedo P, Stockert JC, Cañete M, Villanueva A (2014) Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell Death Dis* 5: e1122 doi:10.1038/cddis.2014.77.
- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 74: 656–669.
- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbek M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 61: 250–281 doi:10.3322/caac.20114.
- Ahn J-C, Biswas R, Mondal A, Lee Y-K, Chung P-S (2014) Cisplatin enhances the efficacy of 5-Aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy in human head and neck squamous cell carcinoma. *Gen Physiol Biophys* 33: 53–62 doi:10.4149/gpb_2013046.
- Ali H, Lier JE Van (2010) Handbook of Porphyrin Science - Chapter 16: Porphyrins and Phthalocyanines as Photosensitizers and Radiosensitizers (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.).
- Ali S, Chee S, Yuen G, Olivo M (2002) Hypericin induced death receptor-mediated apoptosis in photoactivated tumor cells. *Int J Mol Med* 9: 601–616 doi:10.3892/ijmm.9.6.601.
- Ali-Seyed M, Bhuvanewari R, Soo KC, Olivo M (2011) Photolon™ - photosensitization induces apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes. *Int J Oncol* 39: 821–831 doi:10.3892/ijo.2011.1109.
- Allison BA, Pritchard PH, Levy JG (1994) Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br J Cancer* 69: 833–839.
- Allison R, Cuenca R, Downie G (2005) Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers—a review of applications and outcomes. 2: 205–222 doi:10.1016/S1572-1000(05)00092-X.
- Allison RR (2014) Photodynamic therapy: oncologic horizons. *Future Oncol* 10: 123–124 doi:10.2217/fon.13.176.
- Allison RR, Sibata CH (2010) Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 7: 61–75 doi:10.1016/j.pdpdt.2010.02.001.

- Allison RR, Sibata CH, Downie GH, Cuenca RE (2006) A clinical review of PDT for cutaneous malignancies. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **3**: 214–226 doi:10.1016/j.pdpdt.2006.05.002.
- Allum WH, Blazeby JM, Griffin SM, Cunningham D, Jankowski J a, Wong R (2011) Guidelines for the management of oesophageal and gastric cancer. *Gut* **60**: 1449–1472 doi:10.1136/gut.2010.228254.
- Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* **1704**: 59–86 doi:10.1016/j.bbcan.2004.05.003.
- Al-Waili NS, Butler GJ (2006) Phototherapy and malignancy: possible enhancement by iron administration and hyperbaric oxygen. *Med Hypotheses* **67**: 1148–1158 doi:10.1016/j.mehy.2005.12.052.
- Anand S, Honari G, Hasan T, Elson P, Maytin E V (2009) Low-dose methotrexate enhances aminolevulinate-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **15**: 3333–3343 doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3054.
- Anand S, Ortel BJ, Pereira SP, Hasan T, Maytin E V (2012) Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. *Cancer Lett* **326**: 8–16 doi:10.1016/j.canlet.2012.07.026.
- Anand S, Wilson C, Hasan T, Maytin E V (2011) Vitamin D3 enhances the apoptotic response of epithelial tumors to aminolevulinate-based photodynamic therapy. *Cancer Res* **71**: 6040–6050 doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0805.
- Anisimov VN (1983) Carcinogenesis and aging. *Adv Cancer Res* **40**: 365–424.
- Anisimov VN (2003) The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal. *Crit Rev Oncol Hematol* **45**: 277–304 doi:10.1016/S1040-8428(02)00121-X.
- Anisimov VN (2007) Biology of aging and cancer. *Cancer Control* **14**: 23–31.
- Azzouzi A-R, Barret E, Moore CM, Villers A, Allen C, Scherz A, Muir G, de Wildt M, Barber NJ, Lebdaï S, Emberton M (2013) TOOKAD(®) Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer. *BJU Int* **112**: 766–774 doi:10.1111/bju.12265.
- Babbar AK, Singh AK, Goel HC, Chauhan UP, Sharma RK (2000) Evaluation of (99m)Tc-labeled photosan-3, a hematoporphyrin derivative, as a potential radiopharmaceutical for tumor scintigraphy. *Nucl Med Biol* **27**: 587–592.
- Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Murano R, Monti E, Gariboldi M, Papa E, Gramatica P (2006) Comparison between 5,10,15,20-tetraaryl- and 5,15-diarylporphyrins as photosensitizers: synthesis, photodynamic activity, and quantitative structure-activity relationship modeling. *J Med Chem* **49**: 3293–3304 doi:10.1021/jm050997m.

- Barinaga M (2000) Angiogenesis research. Cancer drugs found to work in new way. *Science (80-)* **288**: 245a–245 doi:10.1126/science.288.5464.245a.
- Bechet D, Mordon SR, Guillemin F, Barberi-Heyob MA (2014) Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a complementary approach to conventional therapies. *Cancer Treat Rev* **40**: 229–241 doi:10.1016/j.ctrv.2012.07.004.
- Bednarz N, Zawacka-Pankau J, Kowalska A (2007) Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photodynamic treatment. *Pharmacol Rep* **59**: 474–479.
- Begum G, Dube A, Joshi PG, Gupta PK, Joshi NB (2009) Chlorin p6 preferentially localizes in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and inhibits Ca(2+) release from intracellular store. *J Photochem Photobiol B* **95**: 177–184 doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.03.003.
- Beja A, Paixão J, Silva M, de Veiga L, Rocha Gonsalves AMD, Serra A (2000) 3-Hydroxybenzaldehyde. *Acta Crystallogr C* **56**: 354–355.
- Berger AP, Steiner H, Stenzl A, Akkad T, Bartsch G, Holtl L (2003) Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study. *Urology* **61**: 338–341 doi:10.1016/S0090-4295(02)02123-4.
- Bergmann F, Stepp H, Metzger R, Rolle U, Johansson A, Till H (2008) In vitro and in vivo evaluation of photodynamic techniques for the experimental treatment of human hepatoblastoma and neuroblastoma: preliminary results. *Pediatr Surg Int* **24**: 1331–1333 doi:10.1007/s00383-008-2275-9.
- Bezdetnaya LN, Foster TH, Parache R, Coutier S, Guillemin F (2002) Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) -sensitized HT29 xenografts in nude mice I. *Radiat Res* **158**: 339–345.
- Bhuvaneswari R, Gan YY, Soo KC, Olivo M (2009) The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2275–2283 doi:10.1007/s00018-009-0016-4.
- Binder S, Kolarova H, Tomankova K, Bajgar R, Daskova a, Mosinger J (2011) Phototoxic effect of TPPS4 and MgTPPS4 on DNA fragmentation of HeLa cells. *Toxicol In Vitro* **25**: 1169–1172 doi:10.1016/j.tiv.2010.11.005.
- Blant SA, Glanzmann TM, Ballini J-P, Wagnières G, van den Bergh H, Monnier P (2002) Uptake and localisation of mTHPC (Foscan) and its 14C-labelled form in normal and tumour tissues of the hamster squamous cell carcinoma model: a comparative study. *Br J Cancer* **87**: 1470–1478 doi:10.1038/sj.bjc.6600651.
- Bourré L, Thibaut S, Fimiani M, Ferrand Y, Simonneaux G, Patrice T (2003) In vivo photosensitizing efficiency of a diphenylchlorin sensitizer: interest of a DMPC liposome formulation. *Pharmacol Res* **47**: 253–261.

Boyle RW, Dolphin D (1996) Structure and Biodistribution Relationships of Photodynamic Sensitizers. *Photochem Photobiol* **64**: 469–485 doi:10.1111/j.1751-1097.1996.tb03093.x.

Brackett CM, Gollnick SO (2011) Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochem Photobiol Sci* **10**: 649–652 doi:10.1039/c0pp00354a.

Brown SB, Brown EA, Walker I (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* **5**: 554–563 doi:10.1016/S1470-2045(04)01529-3.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev cell Dev Biol* **15**: 269–290.

Bulusu KC, Tym JE, Coker EA, Schierz AC, Al-Lazikani B (2014) canSAR: updated cancer research and drug discovery knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **42**: D1040–7 doi:10.1093/nar/gkt1182.

Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* **1776**: 86–107 doi:10.1016/j.bbcan.2007.07.001.

Byrne AT, O'Connor AE, Hall M, Murtagh J, O'Neill K, Curran KM, Mongrain K, Rousseau JA, Lecomte R, McGee S, Callanan JJ, O'Shea DF, Gallagher WM (2009) Vascular-targeted photodynamic therapy with BF2-chelated Tetraaryl-Azadipyromethene agents: a multi-modality molecular imaging approach to therapeutic assessment. *Br J Cancer* **101**: 1565–1573 doi:10.1038/sj.bjc.6605247.

Carter W (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* **55**: 253–258.

Castano A, Demidova T, Hamblin M (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one? photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **1**: 279–293 doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4.

Castano A, Demidova T, Hamblin M (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2**: 91–106 doi:10.1016/S1572-1000(05)00060-8.

Castano AP, Mroz P, Hamblin MR (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* **6**: 535–545 doi:10.1038/nrc1894.

Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, Pogue BW, Hasan T (2010) Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev* **110**: 2795–2838 doi:10.1021/cr900300p.

Céspedes M V, Casanova I, Parreño M, Mangués R (2006) Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol* **8**: 318–329.

- Chakrabarti M, Banik NL, Ray SK (2013) Photofrin based photodynamic therapy and miR-99a transfection inhibited FGFR3 and PI3K/Akt signaling mechanisms to control growth of human glioblastoma in vitro and in vivo. *PLoS One* **8**: e55652 doi:10.1371/journal.pone.0055652.
- Chatterjee SR, Murugesan S, Kamat JP, Shetty SJ, Srivastava TS, Noronha OP, Samuel AM, Devasagayam TP (1997) Photodynamic effects induced by meso-tetrakis[4-(carboxymethyleneoxy)phenyl]porphyrin using rat hepatic microsomes as model membranes. *Arch Biochem Biophys* **339**: 242–249 doi:10.1006/abbi.1996.9846.
- Chen B, Longtine MS, Sadovsky Y, Nelson DM (2010) Hypoxia downregulates p53 but induces apoptosis and enhances expression of BAD in cultures of human syncytiotrophoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**: C968–976 doi:10.1152/ajpcell.00154.2010.
- Chen M, Pennathur A, Luketich JD (2006) Role of photodynamic therapy in unresectable esophageal and lung cancer. *Lasers Surg Med* **38**: 396–402 doi:10.1002/lsm.20364.
- Cheung KK-Y, Chan JY-W, Fung K-P (2013) Antiproliferative effect of pheophorbide a-mediated photodynamic therapy and its synergistic effect with doxorubicin on multiple drug-resistant uterine sarcoma cell MES-SA/Dx5. *Drug Chem Toxicol* **36**: 474–483 doi:10.3109/01480545.2013.776584.
- Chiarini A, Whitfield JF, Pacchiana R, Armato U, Dal Pra I (2008) Photoexcited calphostin C selectively destroys nuclear lamin B1 in neoplastic human and rat cells - a novel mechanism of action of a photodynamic tumor therapy agent. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 1642–1653 doi:10.1016/j.bbamcr.2008.03.014.
- Chiaviello a, Paciello I, Postiglione I, Crescenzi E, Palumbo G (2010) Combination of photodynamic therapy with aspirin in human-derived lung adenocarcinoma cells affects proteasome activity and induces apoptosis. *Cell Prolif* **43**: 480–493 doi:10.1111/j.1365-2184.2010.00698.x.
- Chiou J-F, Wang Y-H, Jou M-J, Liu T-Z, Shiao C-Y (2010) Verteporfin-photoinduced apoptosis in HepG2 cells mediated by reactive oxygen and nitrogen species intermediates. *Free Radic Res* **44**: 155–170 doi:10.3109/10715760903380458.
- Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD (2001) Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res* **478**: 89–96.
- Compagnin C, Mognato M, Celotti L, Canti G, Palumbo G, Reddi E (2010) Cell proliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin in combination with photodynamic therapy. *Cell Prolif* **43**: 262–274 doi:10.1111/j.1365-2184.2010.00673.x.
- Costantini P, Bruey J (2002) Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ* **9**: 82–88 doi:10.1038/sj/cdd/4400932.

- Costes S V, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* **86**: 3993–4003 doi:10.1529/biophysj.103.038422.
- Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, Dalesio O, Baas P, Stewart F (2003) Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer* **88**: 283–290 doi:10.1038/sj.bjc.6600682.
- Dąbrowski JM, Krzykawska M, Arnaut LG, Pereira MM, Monteiro CJP, Simões S, Urbańska K, Stochel G (2011a) Tissue uptake study and photodynamic therapy of melanoma-bearing mice with a nontoxic, effective chlorin. *ChemMedChem* **6**: 1715–1726 doi:10.1002/cmdc.201100186.
- Dąbrowski JM, Urbanska K, Arnaut LG, Pereira MM, Abreu AR, Simões S, Stochel G (2011b) Biodistribution and photodynamic efficacy of a water-soluble, stable, halogenated bacteriochlorin against melanoma. *ChemMedChem* **6**: 465–475 doi:10.1002/cmdc.201000524.
- Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, Ribeiro MS, Mylonakis E, Hamblin MR, Tegos GP (2012) Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol* **3**: 120 doi:10.3389/fmicb.2012.00120.
- Das T, Chakraborty S, Sarma HD, Banerjee S, Venkatesh M (2010) A novel ¹⁷⁷Lu-labeled porphyrin for possible use in targeted tumor therapy. *Nucl Med Biol* **37**: 655–663 doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.02.007.
- Davila ML (2011) Photodynamic therapy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* **21**: 67–79 doi:10.1016/j.giec.2010.09.002.
- DePinho RA (2000) The age of cancer. *Nature* **408**: 248–254 doi:10.1038/35041694.
- Derycke A (2004) Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **56**: 17–30 doi:10.1016/j.addr.2003.07.014.
- Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ (2004) Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem* **47**: 3897–3915 doi:10.1021/jm040074b.
- Dewaele M, Maes H, Agostinis P (2010) ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy* **6**: 838–854 doi:10.4161/auto.6.7.12113.
- Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**: 717–727 doi:10.1161/01.HYP.0000258594.87211.6b.
- Ding X, Xu Q, Liu F, Zhou P, Gu Y, Zeng J, An J, Dai W, Li X (2004) Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Lett* **216**: 43–54 doi:10.1016/j.canlet.2004.07.005.

- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q (1998) Photodynamic Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* **90**: 889–905 doi:10.1093/jnci/90.12.889.
- Douglas RS, Tarshis AD, Pletcher CH, Nowell PC, Moore JS (1995) A simplified method for the coordinate examination of apoptosis and surface phenotype of murine lymphocytes. *J Immunol Methods* **188**: 219–228.
- Van Dyke T, Jacks T (2002) Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* **108**: 135–144.
- Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK (2011) The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* **40**: 340–362 doi:10.1039/b915149b.
- Eymerit-Morin C, Zidane M, Lebdaï S, Triau S, Azzouzi AR, Rousselet M-C (2013) Histopathology of prostate tissue after vascular-targeted photodynamic therapy for localized prostate cancer. *Virchows Arch* **463**: 547–552 doi:10.1007/s00428-013-1454-9.
- Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E (2001) Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* **61**: 7495–7500.
- Fairbairn DW, O'Neill KL (1995) Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **31**: 171–173 doi:10.1007/BF02639429.
- Fairbairn DW, Walburger DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL (1996) Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* **18**: 407–416.
- Fakhar-e-Alam M, Roohi S, Atif M, Firdous S, Amir N, Zahoor R (2010a) Labelling and optimization of PHOTOFRIN® with 99mTc. *Radiochim Acta* **98**: 813–818 doi:10.1524/ract.2010.1779.
- Fakhar-e-Alam M, Roohi S, Atif M, Firdous S, Amir N, Zahoor R (2010b) Labelling and optimization of PHOTOFRIN® with 99mTc. *Radiochim Acta* **98**: 813–818 doi:10.1524/ract.2010.1779.
- Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J (2005) Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**: 719–727 doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x.
- Fass L (2008) Imaging and cancer: a review. *Mol Oncol* **2**: 115–152 doi:10.1016/j.molonc.2008.04.001.
- Fawwaz R, Bohdiewicz P, Lavallee D, Wang T, Oluwole S, Newhouse J, Alderson P (1990) Use of metalloporphyrins in diagnostic imaging. *Int J Rad Appl Instrum B* **17**: 65–72.
- Fay FS, Taneja KL, Shenoy S, Lifshitz L, Singer RH (1997) Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). *Exp Cell Res* **231**: 27–37 doi:10.1006/excr.1996.3460.

Fazaeli Y, Jalilian AR, Amini MM, Rahiminejad-kisomi A, Rajabifar S, Bolourinovin F, Moradkhani S (2011) Preparation and preliminary evaluation of [67Ga]-tetra phenyl porphyrin complexes as possible imaging agents. *J Radioanal Nucl Chem* **288**: 17–24 doi:10.1007/s10967-010-0962-1.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D, Bray F (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].

Ferrario A, Fisher AM, Rucker N, Gomer CJ (2005) Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors. *Cancer Res* **65**: 9473–9478 doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1659.

Ferrario A, Gomer CJ (2010) Targeting the 90 kDa heat shock protein improves photodynamic therapy. *Cancer Lett* **289**: 188–194 doi:10.1016/j.canlet.2009.08.015.

Ferrario A, Luna M, Rucker N, Wong S, Gomer CJ (2011) Pro-apoptotic and anti-inflammatory properties of the green tea constituent epigallocatechin gallate increase photodynamic therapy responsiveness. *Lasers Surg Med* **43**: 644–650 doi:10.1002/lsm.21081.

Ferrario A, Rucker N, Wong S, Luna M, Gomer CJ (2007) Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res* **67**: 4989–4995 doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4785.

Ferrario A, Tiehl K Von, Rucker N (2000) Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* **60**: 4066–4069.

Ferrario A, Tiehl K Von, Wong S, Luna M, Gomer CJ, Von Tiehl K (2002) Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res* **62**: 3956–3961.

Firczuk M, Winiarska M, Szokalska A (2011) Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. *Front Biosci* **16**: 208–224.

Fisher AM, Ferrario A, Rucker N, Zhang S, Gomer CCJ (1999) Photodynamic therapy sensitivity is not altered in human tumor cells after abrogation of p53 function. *Cancer Res* **59**: 331–335.

Foote C (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* **54**: 659–659 doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x.

Freshney RI (2010) Culture of Animal Cells (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.).

Garcia-Barreno B, Delgado T, Akerlind-Stopner B, Norrby E, Melero JA (1992) Location of the epitope recognized by monoclonal antibody 63G on the primary structure of human respiratory syncytial virus G glycoprotein and the ability of synthetic peptides containing this epitope to induce neutralizing antibodies. *J Gen Virol* **73**: 2625–2630.

- Gariboldi MB, Ravizza R, Baranyai P, Caruso E, Banfi S, Meschini S, Monti E (2009) Photodynamic effects of novel 5,15-diaryl-tetrapyrrole derivatives on human colon carcinoma cells. *Bioorg Med Chem* **17**: 2009–2016 doi:10.1016/j.bmc.2009.01.035.
- Garrier J, Bressenot A, Gräfe S, Marchal S, Mitra S, Foster TH, Guillemin F, Bezdetrnaya L (2010) Compartmental targeting for mTHPC-based photodynamic treatment in vivo: Correlation of efficiency, pharmacokinetics, and regional distribution of apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **78**: 563–571 doi:10.1016/j.ijrobp.2010.04.009.
- Ge R, Ahn J-C, Shin J-I, Bahk CW, He P, Chung P-S (2011) An in vitro and in vivo study of combination therapy with Photogem®-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26). *Photomed Laser Surg* **29**: 155–160 doi:10.1089/pho.2009.2750.
- Gianni W, Cacciafesta M, Pietropaolo M, Perricone Somogyi R, Marigliano V (2001) Aging and cancer: the geriatrician's point of view. *Crit Rev Oncol Hematol* **39**: 307–311.
- Gollnick SO, Brackett CM (2010) Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunol Res* **46**: 216–226 doi:10.1007/s12026-009-8119-4.
- Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**: 37–43 doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001.
- Gomer CJ, Ferrario A, Luna M, Rucker N, Wong S (2006) Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. *Lasers Surg Med* **38**: 516–521 doi:10.1002/lsm.20339.
- Gomer CJ, Rucker N, Murphree AL (1988) Differential cell photosensitivity following porphyrin photodynamic therapy. *Cancer Res* **48**: 4539–4542.
- Grant WE, Speight PM, Hopper C, Bown SG (1997) Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity. *Int J Cancer* **71**: 937–942.
- Granville DJ, Carthy CM, Jiang H, Shore GC, McManus BM, Hunt DW (1998) Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. *FEBS Lett* **437**: 5–10.
- Greer A (2006) Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [1O_2 (Δg)] in photosensitized oxidation reactions. *Acc Chem Res* **39**: 797–804 doi:10.1021/ar050191g.
- Gryshuk AL, Chen Y, Potter W, Ohulchansky T, Oseroff A, Pandey RK (2006) In vivo stability and photodynamic efficacy of fluorinated bacteriopurpurinimides derived from bacteriochlorophyll-a. *J Med Chem* **49**: 1874–1881 doi:10.1021/jm050919z.

Gui T, Wang Y, Mao Y, Liu J, Sun S, Cao D, Yang J, Shen K (2013) Comparisons of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy and after-loading radiotherapy in vivo in cervical cancer. *Clin Transl Oncol* **15**: 434–442 doi:10.1007/s12094-012-0945-5.

Hadjur C, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, Favier a (1996) Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem Photobiol* **64**: 375–381.

Hajri A, Wack S, Meyer C, Smith MK, Leberquier C, Kedinger M, Aprahamian M (2002) In vitro and in vivo efficacy of photofrin and pheophorbide a, a bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colonic cancer cells. *Photochem Photobiol* **75**: 140–148.

Hamblin MR, Newman EL (1994a) On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **23**: 3–8.

Hamblin MR, Newman EL (1994b) Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. *J Photochem Photobiol B* **26**: 147–157.

Hatz S, Poulsen L, Ogilby PR (2008) Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: effects of oxygen diffusion and oxygen concentration. *Photochem Photobiol* **84**: 1284–1290 doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00359.x.

He J, Agarwal ML, Larkin HE, Friedman LR, Xue LY, Oleinick NL (1996) The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene BCL-2. *Photochem Photobiol* **64**: 845–852.

Hedley DW, Chow S (1994) Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* **15**: 349–358 doi:10.1002/cyto.990150411.

Heitjan DF, Manni A, Santen RJ (1993) Statistical analysis of in vivo tumor growth experiments. *Cancer Res* **53**: 6042–6050.

Henderson B, Gollnick S, Snyder J, Busch T (2004) Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res* **64**: 2120–2126.

Hoi SW-H, Wong HM, Chan JY-W, Yue GGL, Tse GM-K, Law BK-B, Fong WP, Fung KP (2012) Photodynamic therapy of Pheophorbide a inhibits the proliferation of human breast tumour via both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways in in vitro and in vivo models. *Phytother Res* **26**: 734–742 doi:10.1002/ptr.3607.

Hong WK, Hait W, Kufe DW (2010) *Holland-Frei Cancer Medicine* 8 (People's Medical Publishing House).

Hopper C (2000) Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol* **1**: 212–219.

- Hou W, Zhang Q, Yan Z, Chen R, Zeh lii HJ, Kang R, Lotze MT, Tang D (2013) Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death Dis* **4**: e966 doi:10.1038/cddis.2013.493.
- Huang Z, Chen Q, Shakil A, Chen H, Beckers J, Shapiro H, Hetzel FW (2003) Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **78**: 496–502.
- Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, Barqawi AB, Chen YK (2008) Photodynamic therapy for treatment of solid tumors-potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat* **7**: 309–320.
- Hung JC, Ponto JA, Hammes RJ (1996) Radiopharmaceutical-related pitfalls and artifacts. *Semin Nucl Med* **26**: 208–255.
- Jendzelovský R, Mikes J, Koval' J, Soucek K, Procházková J, Kello M, Sacková V, Hofmanová J, Kozubík A, Fedorocko P (2009) Drug efflux transporters, MRPI and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci* **8**: 1716–1723 doi:10.1039/b9pp00086k.
- Jia Z, Deng H, Pu M, Luo S (2008) Rhenium-188 labelled meso-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl] porphyrin for targeted radiotherapy: preliminary biological evaluation in mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**: 734–742 doi:10.1007/s00259-007-0682-0.
- Jiménez-Banzo A, Sagristà ML, Mora M, Nonell S (2008) Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **44**: 1926–1934 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.011.
- Jin CS, Zheng G (2011) Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. *Lasers Surg Med* **43**: 734–748 doi:10.1002/lsm.21101.
- Jin K, Teng L, Shen Y, He K, Xu Z, Li G (2010) Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin Transl Oncol* **12**: 473–480 doi:10.1007/s12094-010-0540-6.
- Jori G (1989) In vivo transport and pharmacokinetic behavior of tumour photosensitizers. *Ciba Found Symp* **146**: 78–94.
- Jori G, Reddi E (1993) The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int J Biochem* **25**: 1369–1375.
- Josefsen LB, Boyle RW (2008) Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs* **2008**: 276109 doi:10.1155/2008/276109.
- Joshi BP, Wang TD (2010) Exogenous Molecular Probes for Targeted Imaging in Cancer: Focus on Multi-modal Imaging.

Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* **10**: 148–154 doi:10.1007/s12094-008-0172-2.

Juzeniene A, Juzenas P, Ma L-W, Iani V, Moan J (2004) Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **19**: 139–149 doi:10.1007/s10103-004-0314-x.

Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey KD, Gollnick SO (2007) CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer* **96**: 1839–1848 doi:10.1038/sj.bjc.6603792.

Kadish KM, Smith KM, Roger G (2010) Handbook of Porphyrin Science: with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering Biology and Medicine.

Kalejta RF, Shenk T, Beavis AJ (1997) Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. *Cytometry* **29**: 286–291.

Kamuhabwa AR, Agostinis PM, D'Hallewin MA, Baert L, de Witte PA (2001) Cellular photodestruction induced by hypericin in AY-27 rat bladder carcinoma cells. *Photochem Photobiol* **74**: 126–132.

Kelkar SS, Reineke TM (2011) Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem* **22**: 1879–1903 doi:10.1021/bc200151q.

Kelland LR (2004) Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* **40**: 827–836 doi:10.1016/j.ejca.2003.11.028.

Kerbel RS (2003) Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived - but they can be improved. *Cancer Biol Ther* **2**: S134–S139.

Kessel D, Luo Y (1999) Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* **6**: 28–35 doi:10.1038/sj.cdd.4400446.

Kessel D, Morgan A, Garbo GM (1991) Sites and efficacy of photodamage by tin etiopurpurin in vitro using different delivery systems. *Photochem Photobiol* **54**: 193–196.

Kessel D, Reiners JJ (2007) Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol* **83**: 1024–1028 doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x.

Kessel D, Vicente MGH, Reiners JJ (2006) Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Autophagy* **2**: 289–290.

Kleban J, Mikes J, Horvath J, Sackova V, Hofmanova J, Kozubik A, Fedorocko P (2008) Mechanisms involved in the cell cycle and apoptosis of HT-29 cells pre-treated with MK-886 prior to photodynamic therapy with hypericin. *J Photochem Photobiol B* **93**: 108–118 doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.07.007.

Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* **118**: 7–18 doi:10.1242/jcs.01620.

Kolárová H, Bajgar R, Tománková K, Krestýn E, Dolezal L, Hálek J (2007) In vitro study of reactive oxygen species production during photodynamic therapy in ultrasound-pretreated cancer cells. *Physiol Res* **56**: S27–32.

Kolarova H, Bajgar R, Tomankova K, Nevrelova P, Mosinger J (2007) Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. *Toxicol In Vitro* **21**: 1287–1291 doi:10.1016/j.tiv.2007.04.017.

Korbelik M (1992) Low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of Photofrin: How much is it relevant for selective accumulation of the photosensitizer in tumors? *J Photochem Photobiol B Biol* **12**: 107–109 doi:10.1016/1011-1344(92)85022-M.

Korbelik M (2006) PDT-associated host response and its role in the therapy outcome. *Lasers Surg Med* **38**: 500–508 doi:10.1002/lsm.20337.

Korbelik M, Dougherty GJ (1999) Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res* **59**: 1941–1946.

Krammer B, Plaetzer K (2008) ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci* **7**: 283–289 doi:10.1039/b712847a.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight R a, Kumar S, Lipton S a, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**: 3–11 doi:10.1038/cdd.2008.150.

Kuimova M, Bhatti M, Deonarain M, Yahioglu G, Levitt J, Stamati I, Suhling K, Phillips D (2007) Fluorescence characterisation of multiply-loaded anti-HER2 single chain Fv-photosensitizer conjugates suitable for photodynamic therapy.

Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M (2013) Responses of cancer cells induced by photodynamic therapy. *J Healthc Eng* **4**: 87–108 doi:10.1260/2040-2295.4.1.87.

Kushibiki T, Sakai M, Awazu K (2008) Differential effects of photodynamic therapy on morphologically distinct tumor cells derived from a single precursor cell. *Cancer Lett* **268**: 244–251 doi:10.1016/j.canlet.2008.03.054.

Laranjo M (2010) Ação Intracelular da Terapia Fotodinâmica. Universidade de Coimbra.

Laranjo M, Serra AC, Abrantes M, Piñeiro M, Gonçalves AC, Casalta-Lopes J, Carvalho L, Sarmiento-Ribeiro AB, Rocha-Gonsalves A, Botelho F (2013) 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: Photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **10**: 51–61 doi:10.1016/j.pdpdt.2012.05.003.

Larroque C, Pelegrin a, Van Lier JE (1996) Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: photodynamic activities in solid tumour models. *Br J Cancer* **74**: 1886–1890.

Lavie G, Kaplinsky C, Toren a, Aizman I, Meruelo D, Mazur Y, Mandel M (1999) A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthone and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy. *Br J Cancer* **79**: 423–432 doi:10.1038/sj.bjc.6690066.

Lee SY, Luk SK, Chuang CP, Yip SP, To SST, Yung YMB (2010) TP53 regulates human AlkB homologue 2 expression in glioma resistance to Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Br J Cancer* **103**: 362–369 doi:10.1038/sj.bjc.6605797.

Leist M, Nicotera P (1997) The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 1–9 doi:10.1006/bbrc.1997.6890.

Leung WN, Sun X, Mak NK, Yow CM (2002) Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem Photobiol* **75**: 406–411.

Li Z, Agharkar P, Chen B (2013) Therapeutic enhancement of vascular-targeted photodynamic therapy by inhibiting proteasomal function. *Cancer Lett* **339**: 128–134 doi:10.1016/j.canlet.2013.07.012.

Lim Y-C, Yoo J-O, Park D, Kang G, Hwang B-M, Kim Y-M, Ha K-S (2009) Antitumor effect of photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer DH-II-24 in colorectal carcinoma. *Cancer Sci* **100**: 2431–2436 doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01326.x.

Liu L, Zhang Z, Xing D (2011) Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radic Biol Med* **51**: 53–68 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.042.

Liu W, Baer MR, Bowman MJ, Pera P, Zheng X, Morgan J, Pandey R, Oseroff AR (2007) The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate enhances the efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2. *Clin Cancer Res* **13**: 2463–2470 doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1599.

Lo VCK, Akens MK, Wise-Milestone L, Yee AJM, Wilson BC, Whyne CM (2013) The benefits of photodynamic therapy on vertebral bone are maintained and enhanced by combination treatment with bisphosphonates and radiation therapy. *J Orthop Res* **31**: 1398–1405 doi:10.1002/jor.22373.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P (2008) *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman).

- Luksiene Z (2004) Experimental evidence on possibility to radiosensitize aggressive tumors by porphyrins. *Medicina (Kaunas)* **40**: 868–874.
- Luksiene Z, Juzenas P, Moan J (2006a) Radiosensitization of tumours by porphyrins. *Cancer Lett* **235**: 40–47 doi:10.1016/j.canlet.2005.03.041.
- Luksiene Z, Kalvelyte A, Supino R (1999) On the combination of photodynamic therapy with ionizing radiation. *J Photochem Photobiol B* **52**: 35–42.
- Luksiene Z, Labeikyte D, Juodka B, Moan J (2006b) Mechanism of radiosensitization by porphyrins. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **25**: 293–306.
- Ma LW, Berg K, Danielsen HE, Kaalhus O, Iani V, Moan J (1996) Enhanced antitumour effect of photodynamic therapy by microtubule inhibitors. *Cancer Lett* **109**: 129–139.
- Maillard P, Looock B, Grierson DS, Laville I, Blais J, Doz F, Desjardins L, Carrez D, Guerquin-Kern J-L, Croisy A (2007) In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **4**: 261–268 doi:10.1016/j.pdpdt.2007.05.001.
- Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies R-M, Bäuml W (2007) The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7223–7228 doi:10.1073/pnas.0611328104.
- Manyak M, Ogan K (2003) Photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer: long-term clinical outcomes of single treatment using intravesical diffusion medium. *J Endourol* **17**: 633–639.
- Mao J, Zhang Y, Zhu J, Zhang C, Guo Z (2009) Molecular combo of photodynamic therapeutic agent silicon(iv) phthalocyanine and anticancer drug cisplatin. *Chem Commun (Camb)* 908–910 doi:10.1039/b817968a.
- Marchal S, Bezdetnaya L, Guillemin F (2004) Modality of cell death induced by Foscan-based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Biochem Biokhimiia* **69**: 45–49.
- Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin M-A, Guillemin F, Bezdetnaya L (2005) Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol* **69**: 1167–1176 doi:10.1016/j.bcp.2005.01.021.
- Marchal S, François A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetnaya L (2007) Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer* **96**: 944–951 doi:10.1038/sj.bjc.6603631.
- Marmur ES, Schmults CD, Goldberg DJ (2004) A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg* **30**: 264–271.

Marotta DE, Cao W, Wileyto EP, Li H, Corbin I, Rickter E, Glickson JD, Chance B, Zheng G, Busch TM (2011) Evaluation of bacteriochlorophyll-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles for photodynamic therapy efficacy in vivo. *Nanomedicine (Lond)* **6**: 475–487 doi:10.2217/nnm.11.8.

Mattos JCP De, Matos VC De, Rodrigues MP, Oliveira MBN De, Dantas FJS, Santos-Filho SD, Bernardo-Filho M, Caldeira-de-Araujo A (2012) Evaluation of deoxyribonucleic acid toxicity induced by the radiopharmaceutical ^{99m}Tc-methylene diphosphonic acid and by stannous chloride in Wistar rats. *Molecules* **17**: 12974–12983 doi:10.3390/molecules171112974.

Maziere JC, Santus R, Morliere P, Reyftmann JP, Candide C, Mora L, Salmon S, Maziere C, Gatt S, Dubertret L (1990) Cellular uptake and photosensitizing properties of anticancer porphyrins in cell membranes and low and high density lipoproteins. *J Photochem Photobiol B* **6**: 61–68.

Mikes J, Kleban J, Sacková V, Horváth V, Jamborová E, Vaculová A, Kozubik A, Hofmanová J, Fedoročko P (2007) Necrosis predominates in the cell death of human colon adenocarcinoma HT-29 cells treated under variable conditions of photodynamic therapy with hypericin. *Photochem Photobiol Sci* **6**: 758–766 doi:10.1039/b700350a.

Mikešová L, Mikeš J, Koval' J, Gyurászová K, Culka L, Vargová J, Valeková B, Fedoročko P (2013) Conjunction of glutathione level, NAD(P)H/FAD redox status and hypericin content as a potential factor affecting colon cancer cell resistance to photodynamic therapy with hypericin. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **10**: 470–483 doi:10.1016/j.pdpdt.2013.04.003.

Mitra S, Cassar SE, Niles DJ, Puskas J, Frelinger JG, Foster TH (2006) Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cancer Ther* **5**: 3268–3274 doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0421.

Mitton D, Ackroyd R (2008) A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **5**: 103–111 doi:10.1016/j.pdpdt.2008.04.004.

Moghissi K, Dixon K, Thorpe J, Stringer M, Moore PJ (2000) The role of photodynamic therapy (PDT) in inoperable oesophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* **17**: 95–100.

Mond JJ, Scher I, Cossman J, Kessler S, Mongini P, Hansen C, Finkelman F, Paul W (1982) Role of the thymus in directing the development of a subset of B lymphocytes. *J Exp Med* **155**: 924–936 doi:10.1084/jem.155.3.924.

Moor a C (2000) Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **57**: 1–13.

Morgan J, Jackson JD, Zheng X, Pandey SK, Pandey RK (2010) Substrate affinity of photosensitizers derived from chlorophyll-a: the ABCG2 transporter affects the phototoxic response of side population stem cell-like cancer cells to photodynamic therapy. *Mol Pharm* **7**: 1789–1804 doi:10.1021/mp100154j.

- Morlière P, Mazière J, Santus R (1998) Tolyporphin: a natural product from cyanobacteria with potent photosensitizing activity against tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **58**: 3571–3578.
- Morton C a, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H, Langmack K, McKenna K, Moseley H, Pearse a D, Stringer M, Taylor DK, Wong G, Rhodes LE (2002) Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol* **146**: 552–567.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55–63.
- Moss GP (1987) Nomenclature of tetrapyrroles (Recommendations 1986). *Pure Appl Chem* **59**: doi:10.1351/pac198759060779.
- Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR (2011) Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers (Basel)* **3**: 2516–2539 doi:10.3390/cancers3022516.
- Mukai H, Wada Y, Watanabe Y (2013) The synthesis of ⁶⁴Cu-chelated porphyrin photosensitizers and their tumor-targeting peptide conjugates for the evaluation of target cell uptake and PET image-based pharmacokinetics of targeted photodynamic therapy agents. *Ann Nucl Med* **27**: 625–639 doi:10.1007/s12149-013-0728-2.
- Müller J, Wunder A, Licha K (2013) Optical imaging. *Recent Results Cancer Res* **187**: 221–246 doi:10.1007/978-3-642-10853-2_7.
- Muller PAJ, Vousden KH (2013) P53 Mutations in Cancer. *Nat Cell Biol* **15**: 2–8 doi:10.1038/ncb2641.
- Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Statistics V (2012) Preliminary Data for 2010. *Natl Vital Stat Reports* **60**: 1–51.
- Murugesan S, Shetty S, Sristava T, Samuel A, Noronha O (2002) Preparation and biological evaluation of the new chlorin photosensitizer T3,4BCPC for detection and treatment of tumors. *J Photochem Photobiol B Biol* **68**: 33–38 doi:10.1016/S1011-1344(02)00329-9.
- Murugesan S, Shetty SJ, Srivastava TS, Noronha OP, Samuel AM (2001a) A technetium-99m-labelled cyclam acid porphyrin (CAP) for tumour imaging. *Appl Radiat Isot* **55**: 641–646.
- Murugesan S, Shetty SJ, Srivastava TS, Noronha OP, Samuel AM, Mukhtar H (2001b) Water-soluble ^{99m}Tc-labeled dendritic novel porphyrins tumor imaging and diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 32–36 doi:10.1006/bbrc.2001.4289.
- Murugesan, Shetty SJ, Srivastava TS, Noronha OP, Samuel a. M (2001c) Evaluation studies of technetium-99m-porphyrin (T3,4BCPP) for tumor imaging. *J Porphyr Phthalocyanines* **05**: 824–828 doi:10.1002/jpp.546.

Nahabedian MY, Cohen RA, Contino MF, Terem TM, Wright WH, Berns MW, Wile AG (1988) Combination cytotoxic chemotherapy with cisplatin or doxorubicin and photodynamic therapy in murine tumors. *J Natl Cancer Inst* **80**: 739–743.

Nakajima E, Hammond KB, Shearer TR, Azuma M (2014) Activation of the mitochondrial caspase pathway and subsequent calpain activation in monkey RPE cells cultured under zinc depletion. *Eye (Lond)* **28**: 85–92 doi:10.1038/eye.2013.239.

Nakamura T, Fukui H, Ishii Y, Ejiri K, Ejiri M (2003) Photodynamic therapy with polypectomy for rectal cancer. *Gastrointest Endosc* **57**: 266–269 doi:10.1067/mge.2003.57.

Nascimento BFO (2013) Synthetic Studies of Nitrogen-Containing Heterocycles under Microwave Irradiation. Universidade de Coimbra.

Nawalany K, Rusin A, Kepczynski M, Filipczak P, Kumorek M, Kozik B, Weitman H, Ehrenberg B, Krawczyk Z, Nowakowska M (2012) Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy: In vitro studies. *Int J Pharm* **430**: 129–140 doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.016.

Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM (1999) Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. *Br J Cancer* **79**: 72–81 doi:10.1038/sj.bjc.6690014.

Nowis D, Legat M, Grzela T, Niderla J, Wilczek E, Wilczynski GM, Głodkowska E, Mrówka P, Issat T, Dulak J, Józkwicz A, Waś H, Adamek M, Wrzosek A, Nazarewski S, Makowski M, Stokłosa T, Jakóbiśiak M, Gołab J (2006) Heme oxygenase-I protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* **25**: 3365–3374 doi:10.1038/sj.onc.1209378.

Nyst HJ, Tan IB, Stewart FA, Balm AJM (2009) Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis Photodyn Ther* **6**: 3–11 doi:10.1016/j.pdpdt.2009.03.002.

Nyst HJ, Wildeman MA, Indrasari SR, Karakullukcu B, van Veen RLP, Adham M, Stewart FA, Levendag PC, Sterenborg HJCM, Tan IB (2012) Temoporfin mediated photodynamic therapy in patients with local persistent and recurrent nasopharyngeal carcinoma after curative radiotherapy: a feasibility study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **9**: 274–281 doi:10.1016/j.pdpdt.2012.07.002.

O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT (2009) Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **85**: 1053–1074 doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x.

O'Donovan N, Crown J, Stunell H (2003) Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res* **9**: 738–742.

- Obata M, Hirohara S, Tanaka R, Kinoshita I, Ohkubo K, Fukuzumi S, Tanihara M, Yano S (2009) In vitro heavy-atom effect of palladium(II) and platinum(II) complexes of pyrrolidine-fused chlorin in photodynamic therapy. *J Med Chem* **52**: 2747–2753 doi:10.1021/jm8015427.
- Obwegeser A, Jakober R, Kostron H (1998) Uptake and kinetics of ¹⁴C-labelled meta-tetrahydroxyphenylchlorin and 5-aminolaevulinic acid in the C6 rat glioma model. *Br J Cancer* **78**: 733–738.
- Oleinick N, Morris R, Nieminen A (2007) Photodynamic therapy-induced apoptosis. In *Cancer Drug Discovery and Development Apoptosis, Senescence, and Cance*, pp. 557–578.
- Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* **1**: 1–21 doi:10.1039/b108586g.
- Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**: 23–29 doi:10.1038/nprot.2006.5.
- Ortel B, Shea CR, Calzavara-Pinton P (2009) Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front Biosci* **14**: 4157–4172.
- Ortner M (2001) Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **8**: 137–139 doi:10.1007/s0053410080137.
- Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**: 291–298 doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X.
- Pandey R, Sajjad M, Pandey S, Gryshuk A, Osero A (2006) PORPHYRIN-BASED COMPOUNDS FOR TUMOR IMAGING AND PHOTODYNAMIC THERAPY (United States).
- Pandey SK, Gryshuk AL, Sajjad M, Zheng X, Chen Y, Abouzeid MM, Morgan J, Charamisinau I, Nabi H a, Oseroff A, Pandey RK (2005) Multimodality agents for tumor imaging (PET, fluorescence) and photodynamic therapy. A possible “see and treat” approach. *J Med Chem* **48**: 6286–6295 doi:10.1021/jm050427m.
- Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J Immunol Methods* **208**: 151–158.
- Park S, Hong SP, Oh TY, Bang S, Chung JB, Song SY (2008) Paclitaxel augments cytotoxic effect of photodynamic therapy using verteporfin in gastric and bile duct cancer cells. *Photochem Photobiol Sci* **7**: 769–774 doi:10.1039/b719072g.
- Paszko E, Vaz GMF, Ehrhardt C, Senge MO (2013) Transferrin conjugation does not increase the efficiency of liposomal Foscan during in vitro photodynamic therapy of oesophageal cancer. *Eur J Pharm Sci* **48**: 202–210 doi:10.1016/j.ejps.2012.10.018.

Pereira N, Serra AC, Pineiro M, Gonsalves AM d'A. R, Abrantes M, Laranjo M, Botelho F (2010) Synthetic porphyrins bearing β -propionate chains as photosensitizers for photodynamic therapy. *J Porphyr Phthalocyanines* **14**: 438 doi:10.1142/S1088424610002227.

Perry RR, Matthews W, Mitchell JB, Russo a, Evans S, Pass HI (1990) Sensitivity of different human lung cancer histologies to photodynamic therapy. *Cancer Res* **50**: 4272–4276.

Picard N, Ali H, van Lier JE, Klarskov K, Paquette B (2009) Bromines on N-allyl position of cationic porphyrins affect both radio- and photosensitizing properties. *Photochem Photobiol Sci* **8**: 224–232 doi:10.1039/b812623b.

Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule J-Y, Habraken Y, Agostinis P (2003) Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol* **66**: 1651–1659 doi:10.1016/S0006-2952(03)00539-2.

Pineiro M, Carvalho A, Pereira M, Rocha Gonsalves AMD, Arnaut L, Formosinho S (1998) Photoacoustic measurements of porphyrin triplet-state quantum yields and singlet-oxygen efficiencies. *Chem Eur J* **4**: 2299–2307.

Pineiro M, Pereira MM, Rocha Gonsalves AM d', Arnaut LG, Formosinho SJ (2001) Singlet oxygen quantum yields from halogenated chlorins: potential new photodynamic therapy agents. *J Photochem Photobiol A Chem* **138**: 147–157 doi:10.1016/S1010-6030(00)00382-8.

Pittet O, Petermann D, Michod D, Krueger T, Cheng C, Ris H-B, Widmann C (2007) Effect of the TAT-RasGAP(317-326) peptide on apoptosis of human malignant mesothelioma cells and fibroblasts exposed to meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin and light. *J Photochem Photobiol B* **88**: 29–35 doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.04.009.

Pizova K, Tomankova K, Daskova A, Binder S, Bajgar R, Kolarova H (2012) Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **156**: 93–102 doi:10.5507/bp.2012.056.

Plaetzer K, Kiesslich T, Oberdanner CB, Krammer B (2005) Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. *Curr Pharm Des* **11**: 1151–1165.

Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T (2009) Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* **24**: 259–268 doi:10.1007/s10103-008-0539-1.

Pocard M, Tsukui H, Salmon RJ, Dutrillaux B, Poupon MF Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancers. *In Vivo* **10**: 463–469.

Polo L, Valduga G, Jori G, Reddi E (2002) Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 10–23.

- Postiglione I, Chiaviello A, Palumbo G (2011) Enhancing photodynamic therapy efficacy by combination therapy: dated, current and oncoming strategies. *Cancers (Basel)* **3**: 2597–2629 doi:10.3390/cancers3022597.
- Pottier R, Kennedy JC (1990) The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J Photochem Photobiol B* **8**: 1–16.
- De Proost I, Pintelon I, Brouns I, Kroese ABA, Riccardi D, Kemp PJ, Timmermans J-P, Adriaensen D (2008) Functional live cell imaging of the pulmonary neuroepithelial body microenvironment. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**: 180–189 doi:10.1165/rcmb.2008-00110C.
- Qian J, Bian Q, Cui L, Chen J, Song L, Wang X (2006) Octylphenol induces apoptosis in cultured rat Sertoli cells. *Toxicol Lett* **166**: 178–186 doi:10.1016/j.toxlet.2006.06.646.
- Qiang Y, Yow C, Huang Z (2008) Combination of photodynamic therapy and immunomodulation: current status and future trends. *Med Res Rev* **28**: 632–644 doi:10.1002/med.
- Qiang Y, Zhang X, Li J, Huang Z (2006) Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chin Med J (Engl)* **119**: 845–857.
- Qiu H, Mao Y, Gu Y, Zhu J, Wang Y, Zeng J, Huang N, Liu Q, Yang Y (2014) The potential of photodynamic therapy to treat esophageal candidiasis coexisting with esophageal cancer. *J Photochem Photobiol B* **130**: 305–309 doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.11.028.
- Rancan F, Wiehe A, Nöbel M, Senge MO, Omari S Al, Böhm F, John M, Röder B (2005) Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* **78**: 17–28 doi:10.1016/j.jphotobiol.2004.08.010.
- Ranyuk ER, Cauchon N, Ali H, Lecomte R, Guérin B, van Lier JE (2011) PET imaging using ⁶⁴Cu-labeled sulfophthalocyanines: synthesis and biodistribution. *Bioorg Med Chem Lett* **21**: 7470–7473 doi:10.1016/j.bmcl.2011.09.121.
- Reiners JJ, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin X-M, Kessel D (2002) Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* **9**: 934–944 doi:10.1038/sj.cdd.4401048.
- Reuther T, Kübler AC, Zillmann U, Flechtenmacher C, Sinn H (2001) Comparison of the in vivo efficiency of photofrin II-, mTHPC-, mTHPC-PEG- and mTHPCnPEG-mediated PDT in a human xenografted head and neck carcinoma. *Lasers Surg Med* **29**: 314–322.
- Ritz R, Roser F, Radomski N, Strauss WSL, Tatagiba M, Gharabaghi A (2008) Subcellular colocalization of hypericin with respect to endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in glioblastoma cells. *Anticancer Res* **28**: 2033–2038.

Roberts WG, Hasan T (1992) Role of neovasculature and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents. *Cancer Res* **52**: 924–930.

Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H (2009) Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* **96**: 1–8 doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001.

Robey RW, Steadman K, Polgar O, Bates SE (2005) ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. *Cancer Biol Ther* **4**: 187–194.

Rygaard J, Povlsen CO (1969) Heterotransplantation of a human malignant tumour to “Nude” mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* **77**: 758–760.

Saczko J, Chwilkowska A, Kulbacka J, Berdowska I, Zielinski B, Drag-Zalesinka M, Wysocka T, Lugowski M, Banas T (2008) Photooxidative action in cancer and normal cells induced by the use of Photofrin® in Photodynamic therapy. *Folia Biol (Praha)* **54**: 24–29.

Saha G (1998) Fundamentals of Nuclear Pharmacy. *Springer*.

Sarma HD, Das T, Banerjee S, Venkatesh M, Vidyasagar PB, Mishra KP (2010) Biologic evaluation of a novel 188Re-labeled porphyrin in mice tumor model. *Cancer Biother Radiopharm* **25**: 47–54 doi:10.1089/cbr.2009.0675.

Sasnauskiene A, Kadziauskas J, Vezelyte N, Jonusiene V, Kirvelienu V (2009) Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis* **14**: 276–286 doi:10.1007/s10495-008-0292-8.

Sato N, Moore BW, Keevey S, Drazba JA, Hasan T, Maytin E V (2007) Vitamin D enhances ALA-induced protoporphyrin IX production and photodynamic cell death in 3-D organotypic cultures of keratinocytes. *J Invest Dermatol* **127**: 925–934 doi:10.1038/sj.jid.5700595.

Sazgarnia A, Montazerabadi AR, Bahreyni-Toosi MH, Ahmadi A, Aledavood A (2013) In vitro survival of MCF-7 breast cancer cells following combined treatment with ionizing radiation and mitoxantrone-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **10**: 72–78 doi:10.1016/j.pdpdt.2012.06.001.

Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME (1997) FLICE Is Predominantly Expressed as Two Functionally Active Isoforms, Caspase-8/a and Caspase-8/b. *J Biol Chem* **272**: 26953–26958 doi:10.1074/jbc.272.43.26953.

Schmaltz C, Hardenbergh PH, Wells A, Fisher DE (1998) Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Mol Cell Biol* **18**: 2845–2854.

Schmidt-Erfurth U, Bauman W, Gragoudas E, Flotte TJ, Michaud NA, Birngruber R, Hasan T (1994) Photodynamic therapy of experimental choroidal melanoma using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. *Ophthalmology* **101**: 89–99.

- Schmidt-Erfurth U, Diddens H, Birngruber R, Hasan T (1997) Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. *Br J Cancer* **75**: 54–61.
- Schmidt-Erfurth U, Hasan T (2000) Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* **45**: 195–214.
- Schneider C a, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675 doi:10.1038/nmeth.2089.
- Schuitmaker JJ, Feitsma RIJ, Journée-De Korver JG, Dubbelman TMAR, Pauwels EKJ (1993) Tissue distribution of bacteriochlorin a labelled with ^{99m}Tc-pertechnetate in hamster greene melanoma. *Int J Radiat Biol* **64**: 451–458 doi:10.1080/09553009314551641.
- Selbo PK, Hasan T (2010) Handbook of Porphyrin Science (Volumes 1-5) (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.).
- Senge MO (2012) mTHPC--a drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagnosis Photodyn Ther* **9**: 170–179 doi:10.1016/j.pdpdt.2011.10.001.
- Serra A, Pineiro M, Pereira N, Rocha Gonsalves A, Laranjo M, Abrantes M, Botelho F (2008a) A look at clinical applications and developments of photodynamic therapy. *Oncol Rev* **2**: 235–249 doi:10.1007/s12156-008-0081-1.
- Serra A, Pineiro M, Santos CI, Gonsalves AM d'A R, Abrantes M, Laranjo M, Botelho MF (2010) In vitro photodynamic activity of 5,15-bis(3-hydroxyphenyl)porphyrin and its halogenated derivatives against cancer cells. *Photochem Photobiol* **86**: 206–212 doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00622.x.
- Serra AC, Pineiro M, Rocha Gonsalves AM d'A, Abrantes M, Laranjo M, Santos AC, Botelho MF (2008b) Halogen atom effect on photophysical and photodynamic characteristics of derivatives of 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyphenyl)porphyrin. *J Photochem Photobiol B* **92**: 59–65 doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.04.006.
- Shao J, Xue J, Dai Y, Liu H, Chen N, Jia L, Huang J (2012) Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitiser Photocyanine: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest. *Eur J Cancer* **48**: 2086–2096 doi:10.1016/j.ejca.2011.10.013.
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol* **115**: 527–532.
- Shetty S, Murugesan S, Chatterjee S, Banerjee S, Srivastava T, Noronha O, Samuel A (1995) A new ^{99m}Tc labeled porphyrin for specific imaging of Sarcoma 120: synthesis and biological study in a Swiss mouse model. *J Label Compd Radiopharm* **XXXVIII**: 411–418.
- Shi J, Liu TWB, Chen J, Green D, Jaffray D, Wilson BC, Wang F, Zheng G (2011) Transforming a targeted porphyrin theranostic agent into a PET imaging probe for cancer. *Theranostics* **1**: 363–370.

Shimosato Y, Kameya T, Nagai K, Hirohashi S, Koide T, Hayashi H, Nomura T (1976) Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **56**: 1251–1260.

Sibata C, Colussi V (2000) Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Brazilian J Med Biol Res* **33**: 869–880.

Da Silva EFF, Pedersen BW, Breitenbach T, Toftegaard R, Kuimova MK, Arnaut LG, Ogilby PR (2012) Irradiation- and sensitizer-dependent changes in the lifetime of intracellular singlet oxygen produced in a photosensitized process. *J Phys Chem B* **116**: 445–461 doi:10.1021/jp206739y.

Sinha AK, Anand S, Ortel BJ, Chang Y, Mai Z, Hasan T, Maytin E V (2006) Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *Br J Cancer* **95**: 485–495 doi:10.1038/sj.bjc.6603273.

Skyrme RJ, French AJ, Datta SN, Allman R, Mason MD, Matthews PN (2005) A phase-I study of sequential mitomycin C and 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma. *BJU Int* **95**: 1206–1210 doi:10.1111/j.1464-410X.2005.05506.x.

Soler A, Warloe T, Berner A, Giercksky K (2001) A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol* **145**: 467–471.

Sparsa A, Bellaton S, Naves T, Jauberteau M-O, Bonnetblanc J-M, Sol V, Verdier M, Ratinaud M-H (2013) Photodynamic treatment induces cell death by apoptosis or autophagy depending on the melanin content in two B16 melanoma cell lines. *Oncol Rep* **29**: 1196–1200 doi:10.3892/or.2012.2190.

Spinelli P, Calarco G, Mancini A, Ni X-G (2006) Operative colonoscopy in cancer patients. *Minim Invasive Ther Allied Technol* **15**: 339–347 doi:10.1080/13645700601038036.

St John JC, Amaral A, Bowles E, Oliveira JF, Lloyd R, Freitas M, Gray HL, Navara CS, Oliveira G, Schatten GP, Spikings E, Ramalho-Santos J (2006) The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* **331**: 347–374 doi:10.1385/1-59745-046-4:347.

Starkey JR, Pascucci EM, Drobizhev MA, Elliott A, Rebane AK (2013) Vascular targeting to the SST2 receptor improves the therapeutic response to near-IR two-photon activated PDT for deep-tissue cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* **1830**: 4594–4603 doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.043.

Di Stasio B, Frochot C, Dumas D, Even P, Zwier J, Müller A, Didelon J, Guillemin F, Viriot M-L, Barberi-Heyob M (2005) The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem* **40**: 1111–1122 doi:10.1016/j.ejmech.2005.04.007.

- Van Steensel B, van Binnendijk EP, Hornsby CD, van der Voort HT, Krozowski ZS, de Kloet ER, van Driel R (1996) Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J Cell Sci* **109** (Pt 4: 787–792.
- Stummer W, Beck T, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Etminan N, Stepp H, Tonn J-C, Baumgartner R, Herms J, Kreth FW (2008) Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. *J Neurooncol* **87**: 103–109 doi:10.1007/s11060-007-9497-x.
- Stylli SS, Kaye AH (2006) Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. *J Clin Neurosci* **13**: 709–717 doi:10.1016/j.jocn.2005.11.012.
- Szokalska A, Makowski M, Nowis D, Wilczynski GM, Kujawa M, Wójcik C, Mlynarczuk-Bialy I, Salwa P, Bil J, Janowska S, Agostinis P, Verfaillie T, Bugajski M, Gietka J, Issat T, Glodkowska E, Mrówka P, Stokłosa T, Hamblin MR, Mróz P, Jakóbiśiak M, Golab J (2009) Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Cancer Res* **69**: 4235–4243 doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3439.
- Szygula M, Pietrusa A, Adamek M, Wojciechowski B, Kawczyk-Krupka A, Cebula W, Duda W, Sieron A (2004) Combined treatment of urinary bladder cancer with the use of photodynamic therapy (PDT) and subsequent BCG-therapy: a pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **1**: 241–246 doi:10.1016/S1572-1000(04)00067-5.
- Takahashi H, Itoh Y, Miyauchi Y, Nakajima S, Sakata I, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H (2003) Activation of two caspase cascades, caspase 8/3/6 and caspase 9/3/6, during photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10(Na), in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **295**: 242–248 doi:10.1007/s00403-003-0424-5.
- Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**: R431–444 doi:10.1152/ajpregu.00361.2003.
- Teiten M-HH, Bezdetnaya L, Morliere P, Santus R, Guillemin F, Morlière P (2003) Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer* **88**: 146–152 doi:10.1038/sj.bjc.6600664.
- Tian Y, Leung W, Yue K, Mak N (2006) Cell death induced by MPPa-PDT in prostate carcinoma in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 413–420 doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.071.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki YF (2000) Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen* **35**: 206 –221.

- Tong Z, Singh G, Rainbow AJ (2000) The role of the p53 tumor suppressor in the response of human cells to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **71**: 201–210.
- Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA (2006) Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* **11**: 1034–1044 doi:10.1634/theoncologist.11-9-1034.
- Usuda J, Kato H, Okunaka T, Furukawa K, Tsutsui H, Yamada K, Suga Y, Honda H, Nagatsuka Y, Ohira T, Tsuboi M, Hirano T (2006) Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *J Thorac Oncol* **1**: 489–493.
- Uzdensky AB, Ma LW, Iani V, Hjortland GO, Steen HB, Moan J (2001) Intracellular localisation of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines. *Lasers Med Sci* **16**: 276–283.
- Vallabhajosula S, Killeen RP, Osborne JR (2010) Altered biodistribution of radiopharmaceuticals: role of radiochemical/pharmaceutical purity, physiological, and pharmacologic factors. *Semin Nucl Med* **40**: 220–241 doi:10.1053/j.semnuclmed.2010.02.004.
- Verma S, Watt GM, Mai Z, Hasan T (2007) Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. *Photochem Photobiol* **83**: 996–1005 doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00166.x.
- Verna LK, Chen D, Schluter G, Williams GM (1998) Inhibition by singlet oxygen quenchers of oxidative damage to DNA produced in cultured cells by exposure to a quinolone antibiotic and ultraviolet A irradiation. *Cell Biol Toxicol* **14**: 237–242.
- Verrico AK, Haylett AK, Moore J V (2001) In vivo expression of the collagen-related heat shock protein HSP47, following hyperthermia or photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **16**: 192–198.
- Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* **1**: 1112–1116 doi:10.1038/nprot.2006.179.
- Vistica D, Skehan P, Scudiero D, Monks A (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* **51**: 2515–2520.
- Vittar NBR, Lamberti MJ, Pansa MF, Vera RE, Rodriguez ME, Cogno IS, Sanabria LNM, Rivarola VA (2013) Ecological photodynamic therapy: new trend to disrupt the intricate networks within tumor ecosystem. *Biochim Biophys Acta* **1835**: 86–99 doi:10.1016/j.bbcan.2012.10.004.
- Voigt W (2005) Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* **110**: 39–48 doi:10.1385/1-59259-869-2:039.
- Volkert WA, Goeckeler WF, Ehrhardt GJ, Ketring AR (1991) Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *J Nucl Med* **32**: 174–185.

- Wang A-Y, Lin J-L, Lin W-C (2010a) Studies on the porphine labeled with ^{99m}Tc -pertechnetate. *J Radioanal Nucl Chem* **284**: 21–28 doi:10.1007/s10967-010-0466-z.
- Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **27**: 612–616.
- Wang P, Henning SM, Heber D (2010b) Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* **5**: e10202 doi:10.1371/journal.pone.0010202.
- Waterfield E, Renke M, Smits C, Gervais M, Bower R, Stonefield M, Levy J (2008) Wavelength-dependent effects of benzoporphyrin derivative monoacid ring A in vivo and in vitro. *Photochem Photobiol* **87**: 709–717.
- Wei X-Q, Ma H-Q, Liu A-H, Zhang Y-Z (2013) Synergistic anticancer activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in combination with low-dose cisplatin on Hela cells. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**: 3023–3028.
- West CM, West DC, Kumar S, Moore J V (1990) A comparison of the sensitivity to photodynamic treatment of endothelial and tumour cells in different proliferative states. *Int J Radiat Biol* **58**: 145–156.
- Whitlock HW, Hanauer R, Oester MY, Bower BK (1969) Diimide reduction of porphyrins. *J Am Chem Soc* **91**: 7485–7489 doi:10.1021/ja01054a044.
- Wiedmann MW, Caca K (2004) General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr Pharm Biotechnol* **5**: 397–408.
- Wild PJ, Krieg RC, Seidl J, Stoehr R, Reher K, Hofmann C, Louhelainen J, Knuechel R (2005) RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid — induced protoporphyrin IX in vitro RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid. *Mol Cancer Ther* **4**: 516–528.
- Wolfsen HC (2002) Photodynamic therapy for mucosal esophageal adenocarcinoma and dysplastic Barrett's esophagus. *Dig Dis* **20**: 5–17.
- Wong DW, Mandal A, Reese IC, Brown J, Siegler R (1983) In vivo assessment of ^{99m}Tc -labeled hematoporphyrin derivative in tumor-bearing animals. *Int J Nucl Med Biol* **10**: 211–218.
- Woodburn KW, Fan Q, Kessel D, Luo Y, Young SW (1998) Photodynamic therapy of B16F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin. *J Invest Dermatol* **110**: 746–751 doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00182.x.
- World.Health.Organization (2014) Cancer.
- Wortis H, Burkly L, Hughes D (1982) Lack of mature B cells in nude mice with X-linked immune deficiency. *J Exp Med* **155**: 903–913.

Wu D, Liu Z, Fu Y, Zhang Y, Tang N, Wang Q, Tao L (2013) Efficacy of 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a in photodynamic therapy of human esophageal squamous cancer cells. *Oncol Lett* **6**: 1111–1119 doi:10.3892/ol.2013.1493.

Wu Y, Xing D (2006) Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by Photofrin-PDT. *Cell Cycle* **5**: 729–734 doi:10.4161/cc.5.7.2630.

Xue LL, Chiu SS, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL (2008) Protection by Bcl-2 against apoptotic but not autophagic cell death after photodynamic therapy. *Autophagy* **4**: 125–127.

Yang JZ, Van Vugt DA, Kennedy JC, Reid RL (1993) Intrauterine 5-aminolevulinic acid induces selective fluorescence and photodynamic ablation of the rat endometrium. *Photochem Photobiol* **57**: 803–807.

Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S, Ikeda A, Kataoka H, Tanaka M, Joh T (2011) Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* **12**: 46–67 doi:10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001.

Yoo J-O, Ha K-S (2012) New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. (Elsevier Inc.).

You Y, Gibson SL, Hilf R, Davies SR, Oseroff AR, Roy I, Ohulchanskyy TY, Bergey EJ, Detty MR (2003) Water soluble, core-modified porphyrins. 3. Synthesis, photophysical properties, and in vitro studies of photosensitization, uptake, and localization with carboxylic acid-substituted derivatives. *J Med Chem* **46**: 3734–3747 doi:10.1021/jm030136i.

Yuan F, Michael L, Berk D, Jain R (1993) Microvascular Permeability of Albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma 1s174t usig dorsal chamber in scid mice. *Micrvascular Res* **45**: 269–289.

Zhang L-J, Bian J, Bao L-L, Chen H-F, Yan Y-J, Wang L, Chen Z-L (2014) Photosensitizing effectiveness of a novel chlorin-based photosensitizer for photodynamic therapy in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* doi:10.1007/s00432-014-1717-0.

Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK (2008) In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis* **13**: 1465–1478 doi:10.1007/s10495-008-0278-6.

Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5727–5732 doi:10.1073/pnas.0501719102.

Zhao H, Xing D, Chen Q (2011) New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy. *Eur J Cancer* **47**: 2750–2761 doi:10.1016/j.ejca.2011.06.031.

Zhong W, Celli JP, Rizvi I, Mai Z, Spring BQ, Yun SH, Hasan T (2009) In vivo high-resolution fluorescence microendoscopy for ovarian cancer detection and treatment monitoring. *Br J Cancer* **101**: 2015–2022 doi:10.1038/sj.bjc.6605436.

Zolle I (2007) Technetium-99m pharmaceuticals (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Zoller F, Riss PJ, Montforts F-P, Kelleher DK, Eppard E, Rösch F (2013) Radiolabelling and preliminary evaluation of ⁶⁸Ga-tetrapyrrole derivatives as potential tracers for PET. *Nucl Med Biol* **40**: 280–288 doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.11.006.

PARTE V — SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS

¹²⁴ I	Iodo-124
¹ O ₂	Oxigênio singlete
¹ PS	Fotossensibilizador no estado fundamental
¹ PS*	Fotossensibilizador no estado excitado singlete
2CPP	<i>meso-bis</i> [3,4-di(carboximetileneoxi)fenil]porfirina
³ PS*	Fotossensibilizador no estado excitado tripleto
5-ALA	<i>5-aminolevulinic acid</i>
⁶⁴ Cu	Cobre-64
⁶⁸ Ga	Gálio-68
⁸⁸ Re	Rênio-188
^{99m} Tc	Tecnécio-99 metastável
ABCG2	<i>ATP-binding cassette protein G2</i>
ADP	Adenosina difosfato
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
ALPC	Fotossensibilizador cloroaluminofalocianina
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AnV	Anexina V
API	<i>Activator protein 1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	Aloficocianina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer protein</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BB _{r2} HPC	5,15- <i>bis</i> (2-bromo-3-hidroxifenil)clorina
BB _{r2} HPP	5,15- <i>bis</i> (2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina
BCA	Ácido bicinconínico, do inglês, <i>bicinchochonic acid</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BCL-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma protein</i>
BCL-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large protein</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Carbono
Ca ₂ ⁺	Cálcio

CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CaH ₂	Hidróxido de Cálcio
CAPS	<i>N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid</i>
CD20	<i>B-lymphocyte antigen</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CDAMP	<i>Cell death associated molecular patterns</i>
CDCI ₃	Clorofórmio deuterado
CDK-2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
cpm	Contagens por minuto
Da	Dalton
DAMP	<i>Damage associated molecular patterns</i>
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH ₂ DA	diacetato de 2',7'-dichlorodihidrofluoresceína
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-dicianobenzoquinone
DHE	dihidroetideo
DISC	<i>Intracellular death-inducing signaling complex</i>
DMA	9,10-dimetilantraceno
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK/MAP	<i>Extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated protein</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
eV	Eletrão-volt
F	Fluor
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>

FAS	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
FAS/CD95	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLICE	<i>FADD-like like apoptotic protease 5 or Caspase 8</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GLUT 1	<i>Glucose transporter 1</i>
GRP	<i>Gastrin release peptide</i>
GSH	Glutatião reduzido
H&E	Coloração de hematoxilina eosina
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
Her2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1</i>
HO-1	Heme oxigenase 1
HpD	Derivados de hematoporfirina
HPPH	<i>3-(10-hexyloxyethyl)-3-devinylpyropheophorbide-a</i>
HSP	<i>Heat shock proteins</i>
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
HtrA2	<i>High temperature requirement protein A2</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
ICAM-1	<i>Inter-cellular adhesion molecule 1</i>
ICG	<i>Indocyanine green</i>
IFN- γ	<i>Interferon γ</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina-12
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IP	Iodeto de propídeo

ISC	<i>Intersystem crossing</i>
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Joules
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide</i>
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
M	Molar
M/A	Razão monómeros/agregados
MDR-1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHCI	<i>Major histocompatibility class I</i>
MIF	Média de intensidade de fluorescência
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
MPCs(n)	<i>Sulfonated metallo phthalocyanines</i>
MRP-1	<i>Multidrug resistance-related protein 1</i>
mTHPC	<i>Meta-tetrahydroxyphenylchlorin</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nd:YAG	<i>Neodymium-doped yttrium aluminium garnet</i>
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
NPe6	mono-l-aspartil clorina e6
O ₂ ^{-*}	Anião superóxido
°C	Graus Centígrados
OH ⁻	Radical hidroxilo
P38	
P53	Proteína 53
PARP	<i>Poly-ADP ribose polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>

PDT	<i>Photodynamic therapy</i>
PEG	Polietilenoglicol
PEG ₄₀₀	Polietilenoglicol 400
PET	<i>Positron emission tomography</i>
P-gp	<i>P-glicoprotein 1</i>
PpIX	Protoporfirina IX
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PS	<i>Photosensitizer</i>
PSI	<i>Proteasome inhibitor 1</i>
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RGD	Ácido arginilglicilaspártico
RIP1	<i>Receptor-interacting protein kinase 1</i>
RIP3	<i>Receptor-interacting protein kinase 3</i>
RIPA	Tampão de radioimunoprecipitação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SI	Estado singleto
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
<i>scid</i>	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point</i>
SOD	Superóxido dismutase
SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i>
SRB	Sulforrodamina B
SST2	<i>Somatostatin receptor 2</i>
TI	Estado tripleto
T34BCPC	<i>5,10,15,20-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl]chlorin</i>
T34CPP	<i>meso-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl]porphyrin</i>
TAC	Tomografia Axial Computadorizada
TBST	<i>Tris-buffered saline tween-20</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>

TP53	Gene da P53
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
TRAIL-R	<i>TNF related apoptosis inducing ligand receptor</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
TRL	<i>Toll-like receptors</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VIS	Visível
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
λ	Comprimento de onda

PARTE VI — ANEXOS

ANEXO I

NOMENCLATURA DE COMPOSTOS TETRAPIRRÓLICOS

Os compostos tetrapirrólicos são uma classe de compostos em que a molécula é constituída por quatro anéis de pirrol, habitualmente ligados entre si por pontes de um único átomo entre as posições α deste último. O arranjo mais comum destes quatro grupos pirrol é o macrociclo, como as porfirinas e estruturas relacionadas, e linear, como os pigmentos da bilis (Nascimento, 2013).

O primeiro sistema de nomenclatura do macrociclo tetrapirrolíco foi implementado por Fisher, no entanto, em 1980 foi estabelecida a nomenclatura IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) para este tipo de compostos de modo a facilitar a comunicação científica e limitar o uso de nomes comuns (Moss, 1987).

De acordo com este sistema de nomenclatura o núcleo macrocíclico é denominado porfirina, os átomos de carbono da estrutura são numerados de 1 a 20 e os átomos de azoto de 21 a 24, tal como representado na Figura 68. Além disso, as posições meso correspondem aos números 5, 10, 15 e 20 e os substituintes referem-se ao número do átomo de carbono ao qual estão ligados e ordenados alfabeticamente.

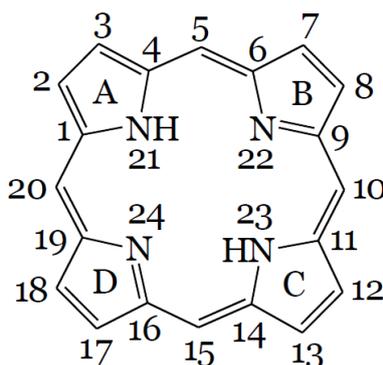


Figura 68: Estrutura química da porfirina e respetiva nomenclatura.

A porfirina é uma estrutura tautomérica em relação à localização dos dois átomos de hidrogénio que não participam no sistema conjugado periférico estando associados a dois dos quatro átomos de azoto. É importante

ter ainda em conta que para fins de nomenclatura, a palavra de porfirina implica que os átomos de azoto saturados estão localizados nas posições 21 e 23 (Moss, 1987).

Apesar da introdução da nomenclatura sistemática, algumas destas designações anteriores são ainda largamente utilizadas, devido à sua simplicidade e conveniência, das quais são exemplo as designações hematoporfirina, mesoporfirina e protoporfirina, cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 69.

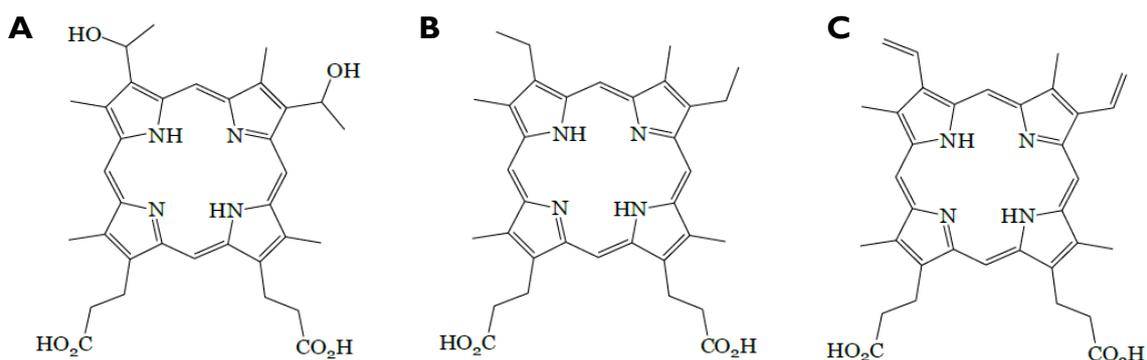


Figura 69: Estrutura química das porfirinas frequentemente designadas por hematoporfirina (A) mesoporfirina (B) e protoporfirina (C).

Relativamente aos diferentes estados de oxidação, a designação dos análogos substituídos e funcionalizados pode ser substituída pelos nomes comuns conforme descrito na Figura 70.

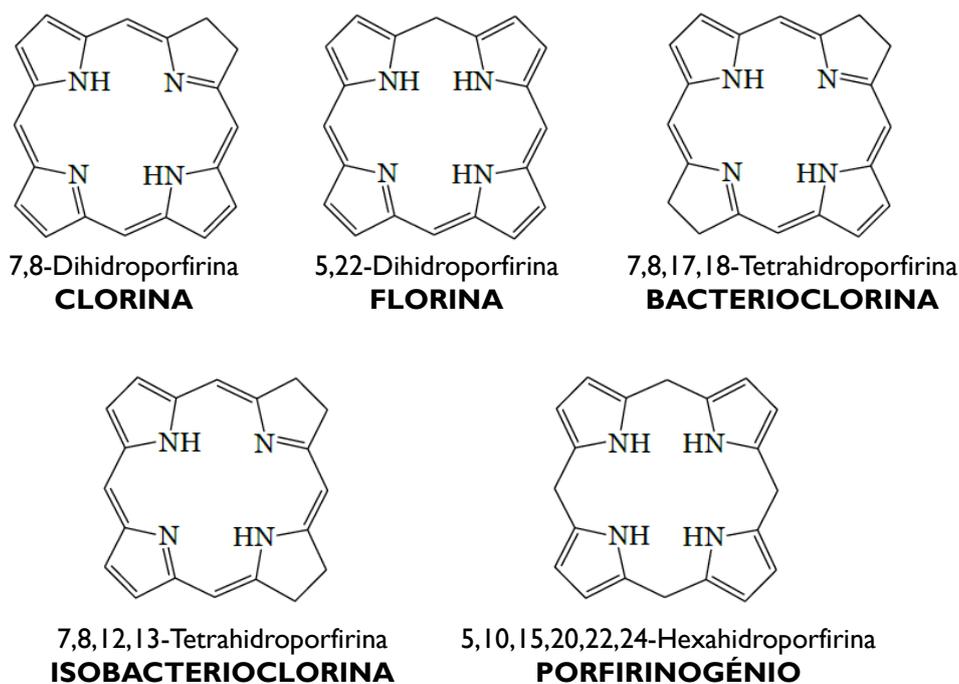


Figura 70: Nomenclatura de porfirinas de acordo com o seu estado de oxidação

ANEXO II

ESPETROS DE RMN E DE MASSA DO FOTOSSENSIBILIZADOR BBr2HPC

O espectro de RMN da Figura 71 e o espectro da Figura 72 apresentados de seguida são relativos ao fotossensibilizador BBr2HPC descrito no capítulo V.

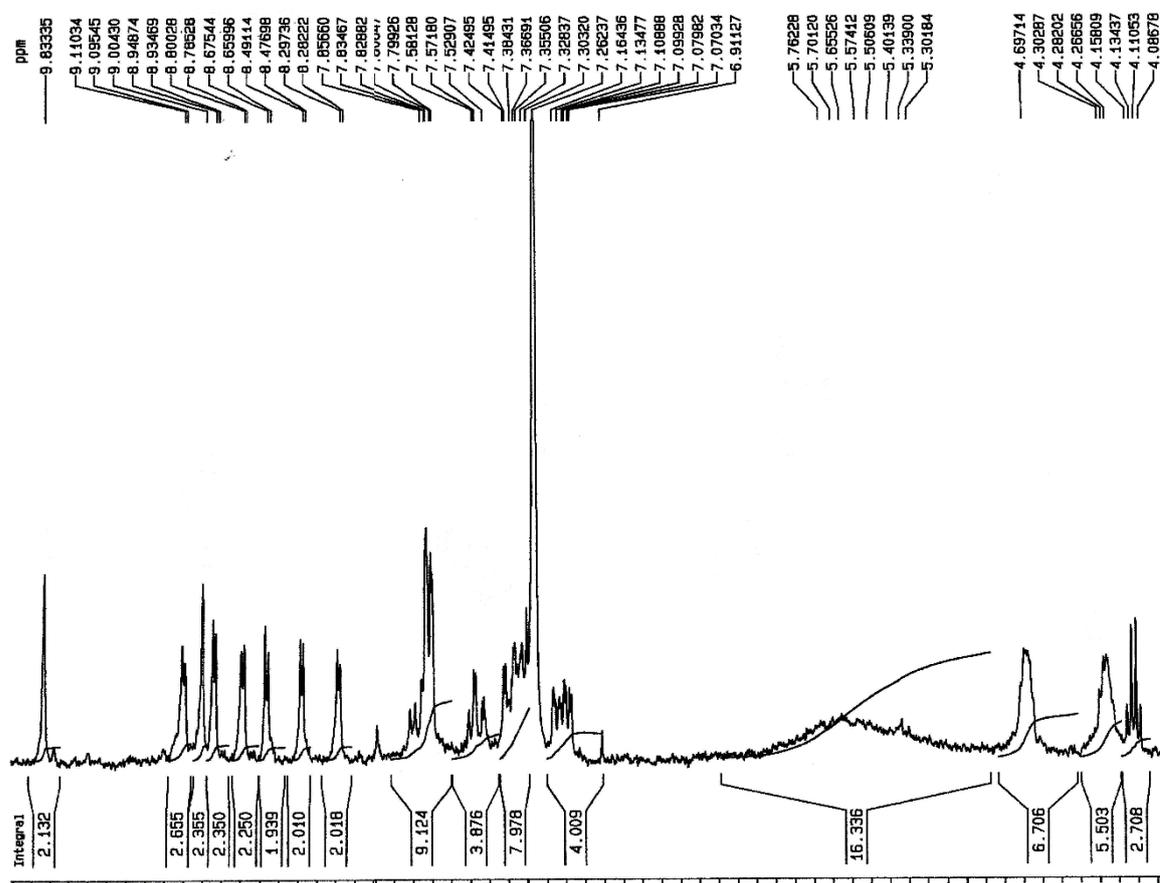


Figura 71: Espectro de ressonância magnética nuclear em clorofórmio deuterado do fotossensibilizador BBr2HPC.

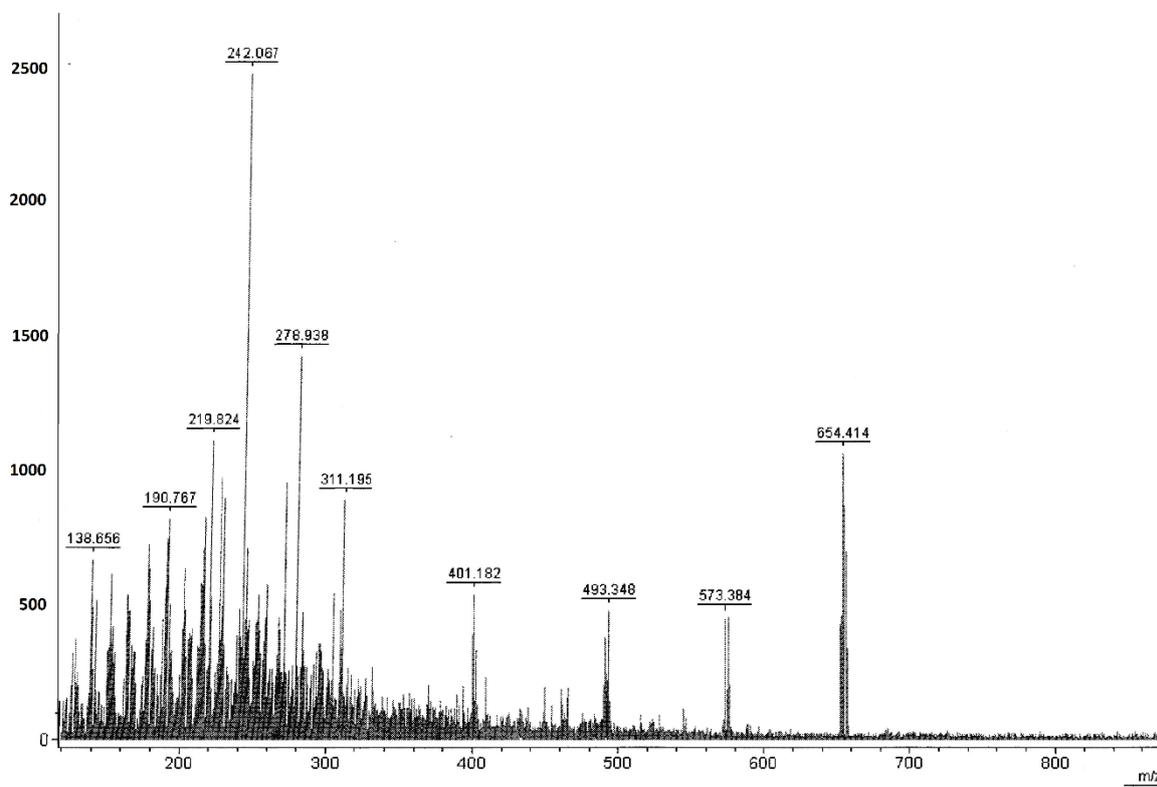


Figura 72: Espectro de massa de massa do composto BBr₂HPC, que apresentou um valor [MH]⁺ 654,41.

ANEXO III

ESPETROS DE RMN E DE MASSA DO FOTOSSENSIBILIZADOR 2CPP

O espectro de RMN da Figura 71 é relativo ao fotossensibilizador 2CPP descrito no capítulo VIII.

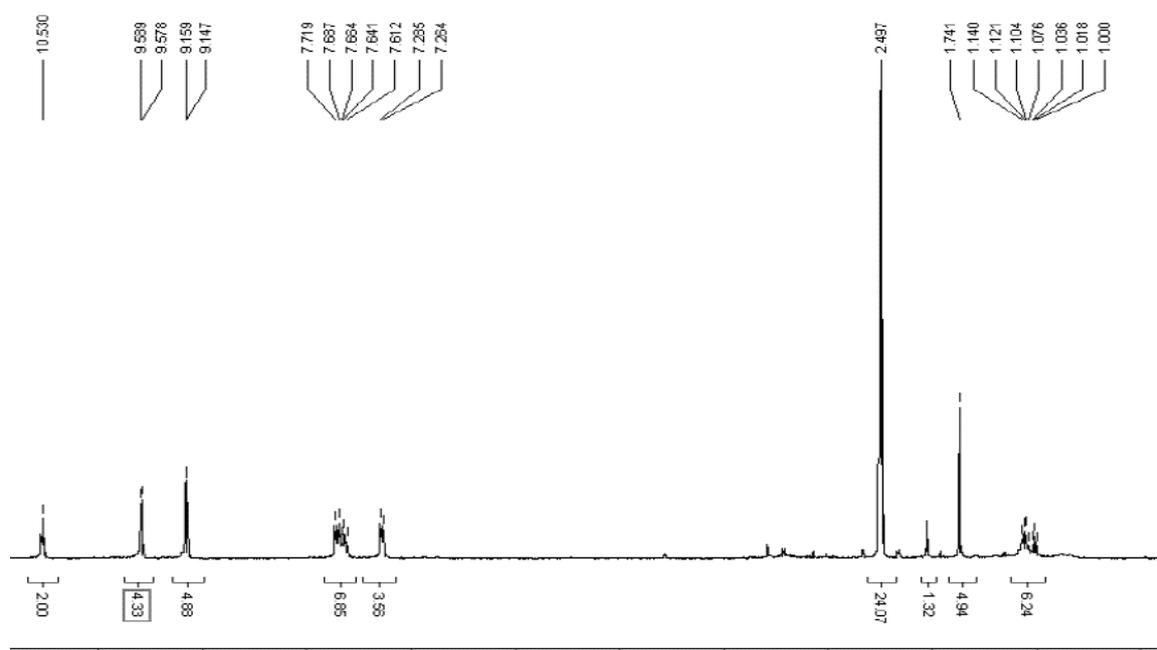


Figura 73: Espectro de ressonância magnética nuclear água deuterada/dimetilssulfoxido do fotossensibilizador 2CPP.

ANEXO IV

ESPETROS DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO COMPOSTO BBr2HPP

A Figura 74 representa as bandas Q do espectro de absorção e o espectro de emissão de fluorescência do composto 5,15-*bis*(2-bromo-3hidroxifenil)porfirina, BBr2HPP. O espectro de absorção do fotossensibilizador apresenta a típica banda Soret que corresponde a uma transição em 402 nm e as bandas Q em 499 nm, 529 nm, 572 nm e 627 nm. O coeficiente de absorção das bandas é de $3,12 \times 10^5$, $1,13 \times 10^3$, $3,57 \times 10^3$, $2,72 \times 10^2$, respetivamente. O espectro de emissão de fluorescência apresenta duas bandas em 630 nm e em 695 nm. O rendimento quântico de fluorescência deste fotossensibilizador foi de $0,002 \pm 0,00007$. O rendimento quântico de oxigénio singleto foi de $0,56 \pm 0,07$ (Laranjo, 2010; Serra *et al*, 2010).

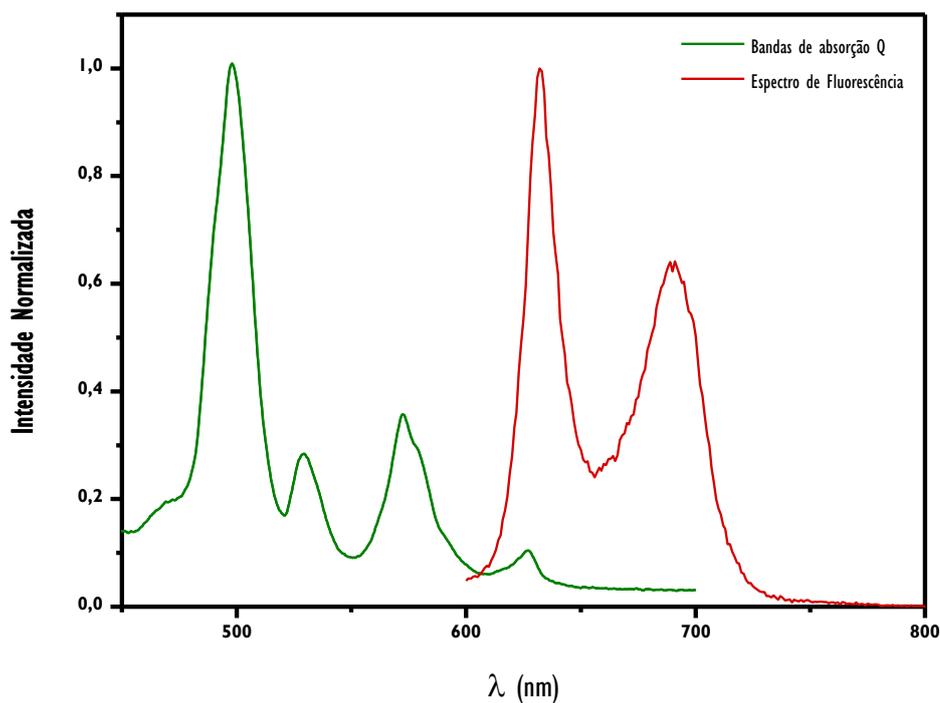


Figura 74: Bandas Q do espectro de absorção e espectro de emissão de fluorescência do fotossensibilizador BBr2HPP. Os valores máximos das bandas Q do espectro de absorção e do espectro de emissão de fluorescência foram normalizados a 1 utilizando o Software *Origin 8*.

ANEXO V

OUTROS ESPETROS DE MASSA

Relativamente aos estudos de biodistribuição realizados no capítulo VII, em que como descrito, em alguns órgãos, se observou uma banda com emissão a 667 nm tentou-se esclarecer a estrutura que originou esta banda de fluorescência, uma vez que poderia corresponder a algum macrociclo tetrapirrólico da mesma família do composto de interesse BBr2HPC.

Para tal realizou-se a extração de vários órgãos onde a mesma estava presente, por evaporação do solvente e obteve-se um sólido castanho que foi analisado por espectrometria de massa.

Na Figura 75 observa-se que o espectro de massa obtido apresenta vários picos, nomeadamente a 552 g/mol, a 1200 g/mol e 1860 g/mol. Pode-se colocar a hipótese de que o pico correspondente à massa de 552 g/mol poderia corresponder a um metabolito por perda de um átomo de bromo e de um grupo hidroxilo. Do mesmo modo os picos de massa em aproximadamente 1200 g/mol e 1860 g/mol que poderiam corresponder a estruturas diméricas e triméricas do fotossensibilizador. No entanto, não havendo correspondência com um único composto não seria possível utilizar um padrão que permita realizar a sua quantificação e, portanto, não se considerou a banda a 667 nm.

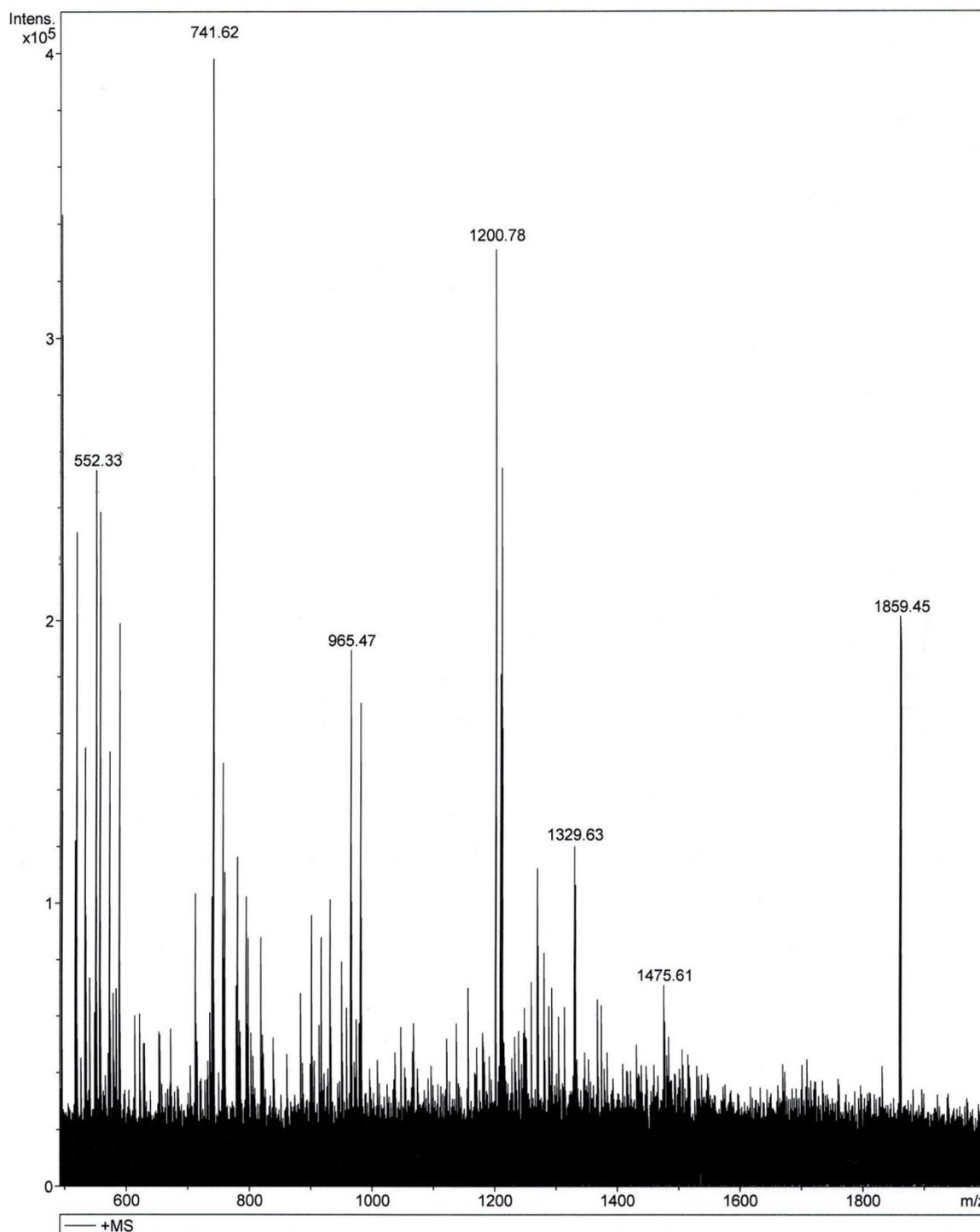


Figura 75: Espectro de massa do sólido obtido por extração de uma amostra dos estudos de biodistribuição em que detetou um pico a 667 nm.

