



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da Actividade Biológica *in vitro* de Moléculas Fotossensibilizadoras para Terapia Fotodinâmica

Daniela Filipa da Silva Lopes Rodrigues

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da Actividade Biológica *in vitro* de Moléculas Fotossensibilizadoras para Terapia Fotodinâmica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Dr. Luís Rocha (Bluepharma – Indústria Farmacêutica, SA) e da Professora Doutora Paula Veríssimo (Universidade de Coimbra)

Daniela Filipa da Silva Lopes Rodrigues

2014

Agradecimentos

Numa fase onde mais uma etapa da minha vida é concluída, é altura de agradecer a todos os que, de forma mais ou menos directa, me incentivaram e ajudaram a atingir este objectivo:

Em primeiro lugar, ao Dr. Luís Rocha pela orientação científica, paciência e disponibilidade, amizade, pela partilha de conhecimento e experiência científica, pelas críticas e conselhos, e por todo o apoio prestado durante a elaboração desta dissertação e a sua revisão. Quaisquer palavras são insuficientes para mostrar o meu agradecimento. Um grande e sincero obrigado.

Em segundo lugar, à Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA, em especial ao Professor Doutor Sérgio Simões, pela oportunidade concedida para a realização da minha tese de mestrado.

A todos os colegas da Bluepharma, especialmente à Tânia e aos colegas e amigos estagiários, que me acompanharam sempre ao longo da minha estadia na empresa, pela sua amizade, apoio e ajuda. Aos colegas do Laboratório de Investigação e Desenvolvimento e à Dona Estela por todo o apoio prestado. Às meninas do Laboratório de Microbiologia, Dona Rosa, Marta e Ana Paula, pelo carinho, ajuda e simpatia.

À Professora Doutora Paula Veríssimo, minha orientadora interna e professora, pela disponibilidade, esforço e dedicação, para que o meu estágio de mestrado decorresse em conformidade.

À Lígia Silva, do Departamento de Química da Universidade de Coimbra, pela sua simpatia, paciência, disponibilidade, ensinamento e apoio nos estudos dos mecanismos de morte celular.

Ao Hélder Soares e ao Fábio Schaberle, da Luzitin, SA, por toda ajuda prestada com a obtenção dos espectros e a utilização do espectrofotómetro, pela disponibilidade e simpatia.

Aos meus colegas de curso, principalmente às minhas meninas, que sempre me acompanharam ao longo destes 5 anos, em especial à Andreia, uma grande amiga e peça fundamental no meu percurso académico.

Aos meus amigos do secundário que, apesar de neste último ano me encontrar mais ausente, nunca deixaram de me apoiar. Obrigada pelo vosso apoio, carinho e amizade. Obrigada por estarem sempre presentes.

À Cátia, ao Alexandre, à Paula, à Carolina, ao Gonçalo, ao Didi, ao Zé e ao Diogo por todas as conversas, momentos de diversão e alegria que me proporcionaram ao longo deste ano e que tornaram o desenvolvimento deste projecto mais divertido.

À ADCRP, a minha segunda casa neste último ano, pelos ensinamentos e experiências vividas que têm sido fulcrais no meu crescimento pessoal. Obrigada à Cátia e ao Alexandre pela confiança depositada em mim para a ocupação deste cargo.

Por último, e mais importante, à minha família, principalmente aos meus pais, pelo amor, ajuda, apoio, esforço, dedicação e confiança. Sem o seu apoio, não me teria tornado a pessoa que hoje sou nem atingido os objectivos que me têm sido propostos ao longo destes anos. Muito obrigada por tudo.

A todos, muito obrigada ♥

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Símbolos, Abreviaturas e Fórmulas	iii
1. Introdução	1
1.1. A Problemática do Cancro	1
1.2. Terapia Fotodinâmica	6
1.2.1. Aspectos Históricos	7
1.2.2. Mecanismo da PDT	7
1.2.3. Vantagens e Limitações da PDT	10
1.2.4. Fotossensibilizadores	11
1.2.5. Fontes e Entrega de Luz	17
1.2.6. Modos de Acção	21
1.2.6.1.Mecanismos de Morte Celular Induzidos pela PDT	22
2. Enquadramento e Objectivos	27
3. Materiais e Métodos	29
3.1.Preparação de Meios e Soluções para Cultura Celular	29
3.2.Condições de Cultura Celular	30
3.3.Subcultura das Linhas Celulares HT-29 e CT26	30
3.4.Determinação da Densidade Celular	31
3.5.Cinética de Acumulação Celular do PS	32
3.5.1. Determinação da Quantidade Total de Proteína: Método do Ácido Bicínconínico (BCA)	33
3.6.Estudos de Toxicidade de PS em Cultura Celular	34
3.6.1. Toxicidade na Ausência de Luz	34
3.6.2. Fototoxicidade após PDT	35
3.6.3. Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio da Redução da Resazurina.....	36
3.7. Mecanismos de Morte Celular Induzidos pela PDT	38
4. Resultados e Discussão	40
4.1.Descrição dos Fotossensibilizadores em Estudo	40
4.2.Cinética de Acumulação Celular dos Fotossensibilizadores	41

4.3. Actividade Biológica <i>in vitro</i>	45
4.4. Mecanismo de Morte Celular Induzidos pela PDT	50
5. Conclusões	60
Bibliografia	62

Resumo

O cancro é uma doença que afecta milhões de pessoas todos os anos e continua a ser a principal causa de morte no mundo, apesar dos avanços no conhecimento da doença e da melhoria das estratégias terapêuticas. As terapias tradicionais de combate ao cancro como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia continuam a apresentar inúmeras desvantagens, nomeadamente o aparecimento de efeitos secundários graves e também uma eficácia limitada. Estas desvantagens conduzem à necessidade de desenvolver novas terapias mais eficazes e seguras. A Terapia Fotodinâmica (PDT) tem sido reconhecida ao longo dos anos como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de vários tipos de cancro. A PDT é uma estratégia terapêutica para o tratamento de vários tipos de tumores sólidos e de lesões não-malignas que utiliza a combinação de um fotossensibilizador (PS), luz visível e oxigénio molecular para a produção de espécies reactivas de oxigénio, originando uma reacção fotoquímica que leva à destruição do tecido alvo.

Uma das principais prioridades na área da PDT é a síntese e desenvolvimento de novos PS, com maior eficácia clínica e menos efeitos secundários, com o objectivo de ultrapassar algumas das actuais limitações inerentes à PDT. Este trabalho teve como objectivo a avaliação a actividade biológica *in vitro* de três porfirinas candidatas a PS, em duas linhas celulares, em termos de: i) citotoxicidade na ausência de luz, ii) fototoxicidade, iii) acumulação celular e iv) mecanismos de morte celular, de modo a permitir a selecção das que apresentem um maior potencial terapêutico para prosseguirem para as fases seguintes de desenvolvimento. Os resultados obtidos foram comparados com resultados obtidos para uma bacterioclorina, que já se encontra bem caracterizada pela empresa, e com actividade biológica conhecida. Os PS em estudo mostraram fototoxicidade considerável a baixas concentrações, sem toxicidade na ausência de luz, em ambas as linhas celulares. O mecanismo de morte celular induzida pelos quatro PS após PDT varia entre necrose e apoptose. Em alguns casos, verificou-se que maiores concentrações de PS predisõem as células a morrerem por necrose. Globalmente, das três porfirinas em estudo, a LUZ41P mostrou ter o melhor potencial terapêutico.

Palavras-chave: cancro, terapia fotodinâmica, fotossensibilizador, morte celular

Abstract

Cancer is a disease that affects millions of people every year and continues to be the major cause of death worldwide, despite the advances in the knowledge of the disease and the improvement of therapeutic strategies. The traditional therapies for cancer treatment, such as surgery, radiotherapy and chemotherapy, continue to show several disadvantages, namely the appearance of severe side effects and also limited efficacy. These disadvantages lead to the need to develop new therapies more effective and safe. The photodynamic therapy (PDT) has been recognized over the years as a promising therapeutic strategy for the treatment several cancers. PDT is a therapeutic strategy for the treatment of various solid tumors and non-malignant lesions that uses the combination of a photosensitizer (PS), visible light, and molecular oxygen to produce reactive oxygen species, yielding a photochemical reaction that leads to destruction of the target tissue.

One of the top priorities in the PDT field is the synthesis and development of new PS, with higher clinical efficacy and even fewer side effects, with the objective of overcoming some of the present limitations of PDT. The objective of this study was the evaluation of the *in vitro* biological activity of three porphyrin molecules candidate to PS in two cell lines, in respect to: i) cytotoxicity in the absence of light, ii) phototoxicity, iii) cellular accumulation and iv) mechanisms of cell death, in order to be able to select the one with the higher therapeutic potential to advance to the next phase of development. The results were compared with results obtained for a bacteriochlorin, which is already well characterized by the company, and with known biological activity. The PS under study showed considerable phototoxicity at low concentrations, without toxicity in absence of light, in both cell lines. The type of cell death induced by the four PS ranges between necrosis and apoptosis. In some cases, higher concentrations of PS favors cell death by necrosis. Globally, from the three porphyrins, LUZ41P showed the best therapeutic potential.

Keywords: cancer, photodynamic therapy, photosensitizer, cell death

Lista de Símbolos, Abreviaturas e Fórmulas

λ – Comprimento de onda

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AIF – Factor de Indução da Apoptose (Do inglês “Apoptosis-inducing factor”)

ALA - Ácido 5-aminolevulínico

ATCC - *American Type Culture Collection*

BCA – Método do Ácido Bicinconínico

BCC – Carcinoma baso celular

BPD-MA - Derivado Monoacídico de Benzoporfirina (Do inglês “benzoporphyrin derivative monoacid ring A”)

BSA – Albumina Sérica Bovina

Ca²⁺ - Ião Cálcio

CAD - Desoxirribonuclease Activada por Caspase

cm² – Centímetro quadrado

CaCl₂.2H₂O – Cloreto de Potássio di-hidratado

CO₂ – Dióxido de Carbono

Cu²⁺ - Ião cobre

DLI - Intervalo de tempo entre a administração do PS e a irradiação (Do inglês “Drug-to-light interval”)

DMEM - Dulbecco’s Modified Eagle Medium

DMRI - Degenerescência da Mácula Relacionada com a Idade

DMSO – Dimetilsulfóxido

EF – Eficiência Fotossensibilizadora

ER - Retículo Endoplasmático

FBS – Soro fetal bovino

Fe²⁺ - Ião Ferroso

Fe³⁺ - Ião Férrico

HEPES – Do inglês “ 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-ethanesulfonic acid”

HO⁻ – Ião Hidroxilo

HO[•] - Radical Hidroxilo

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HP - Hematoporfirina

HpD – Derivado de Hematoporfirina

IC50 - Concentração de fármaco que nas condições seleccionadas causa uma inibição de 50% na viabilidade celular

IP₃ – Inositol Trifosfato

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

KCl – Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ – Di-hidrogenofosfato de potássio

LED - Light Emitting Diode

log Pow – Coeficiente de partição octanol-água (Do inglês “Partition Coefficient Octanol-Water)

NaCl – Cloreto de Sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio

Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato di-sódico

MAL – Metilaminolevulinato

Mg²⁺ - Ião Magnésio

MgCl₂.6H₂O – Cloreto de magnésio hexa-hidratado

mTHPC - Meso-tetra(hidroxifenil)clorina ou temoporfina

nm - Nanómetro

NO⁻ - Óxido Nítrico

O₂ – Oxigénio Molecular

¹O₂ – Oxigénio no estado singuleto

³O₂ – Oxigénio no estado tripleto

$O_2^{\cdot-}$ - Radical Superóxido

OONO⁻ - Peroxinitrito

PBS – Tampão Fosfato Salino (Do inglês “Phosphate *Buffered* Saline”)

PC – Ftalocianinas (Do inglês “Phthalocyanines”)

PDT – Terapia Fotodinâmica (Do inglês “Photodynamic Therapy”)

PI - Iodeto de Propídeo

PpIX - Protoporfirina IX

PS – Fotossensibilizador (Do inglês “Photosensitizer”)

Resazurina – Do inglês “7-Hydroxy-3*H*-phenoxazin-3-one 10-oxide “

ROS – Espécies Reactivas de Oxigênio (Do inglês “Reactive Oxygen Species”)

S₀ – Estado singuleto fundamental

SOD – Dismutase do Superóxido

S₁ – Primeiro estado singuleto excitado

T₁ – Estado tripleto excitado

TOR - Alvo da Cinase da Rapamicina (Do inglês “Target of Rapamycin Kinase”)

UV – Ultravioleta

Vis. - Visível

W – Watt

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da aplicação clínica da Terapia Fotodinâmica ..	6
Figura 2 – Representação dos mecanismos fotofísicos e fotoquímicos ocorridos durante a PDT	8
Figura 3 – Macrocielo Tetrapirrólico das Porphirinas	11
Figura 4 – Estrutura do porfímero sódico (Photofrin®)	12
Figura 5 – Estrutura base das moléculas de Clorina e Bacterioclorina	13
Figura 6 – Estrutura do meso-tetra (hidroxifenil) clorina (Foscan®)	13
Figura 7 – Estrutura da Protoporfirina IX	14
Figura 8 – Estrutura do Ácido 5-aminolevulínico	15
Figura 9 – Estrutura do Metilaminolevulinato	16
Figura 10 – Janela Óptica do Tecido. Espectros de absorção de cromóforos teciduais (desoxi e oxi-hemoglobina e melanina) e da água	19
Figura 11 – Propagação da luz nos tecidos	20
Figura 12 - Mecanismos de acção sobre tumores através de Terapia Fotodinâmica ..	22
Figura 13 – Representação esquemática dos mecanismos de morte celular induzidos pela PDT	23
Figura 14 – Acumulação de LUZ11, LUZ37, LUZ41P e LUZ62P em células HT-29 ao longo de 24 horas.....	42
Figura 15 - Acumulação de LUZ11, LUZ37, LUZ41P e LUZ62P em células CT26 ao longo de 24 horas.....	42
Figura 16 - Toxicidade dos PS no escuro.....	46
Figura 17 - Fototoxicidade após irradiação.....	48
Figura 18 – Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ11 em células CT26.....	51
Figura 19 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ41P em células CT26.....	52
Figura 20 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ62P em células CT26.....	53
Figura 21 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ11 em células HT-29.....	55

Figura 22 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ41P em células HT-29..	56
Figura 23 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ62P em células HT-29	57

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resumo dos dados estatísticos mundiais obtidos em 2012 para casos de cancro.....	2
Tabela 2 – Lista dos fotossensibilizadores utilizados clinicamente para PDT (aprovados ou em ensaios clínicos) até 2011, incluindo a indicação da sua família, λ de absorção, região de aprovação e indicações terapêuticas	17
Tabela 3 – Principais características dos compostos em estudo.....	40
Tabela 4 - Resultados de toxicidade no escuro e fototoxicidade após irradiação para os PS em estudo na linha celular CT26 e respectivos valores de EF.....	49
Tabela 5 - Resultados de toxicidade no escuro e fototoxicidade após irradiação para os PS em estudo na linha celular HT-29 e respectivos valores de EF	49

1. Introdução

1.1 A problemática do Cancro

O cancro é uma doença que todos os anos afecta milhões de pessoas em todo o mundo. Em 2012, segundo a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, numa população mundial de 7 mil milhões de pessoas, estima-se que o cancro foi responsável por 8,2 milhões de mortes e 14,1 milhões de novos casos de cancro foram diagnosticados ³⁶. No ano de 2012, a taxa global de incidência de cancro em idade padronizada foi quase 25% maior em homens do que em mulheres, com taxas de 205 e 165 por 100 mil, respectivamente. O número de mortes em todo o mundo resultantes de cancro foi maior em homens do que em mulheres. No entanto, estima-se uma prevalência em 5 anos maior para mulheres do que para homens ³⁷. **A Erro! A origem da referência não foi encontrada.** mostra o resumo da estatística mundial de casos de cancro em 2012.

Tabela 1 - Resumo dos dados estatísticos mundiais obtidos em 2012 para casos de cancro ³⁶.

Mundo	Homens	Mulheres	Ambos os sexos
População (milhares)	3557717	3496728	7054446
Número de novos casos de cancro (milhares)	7427.1	6663.0	14090.1
Taxa padronizada pela idade (W)	205.4	165.3	182.3
Risco de contrair cancro antes dos 75 anos (%)	21.0	16.4	18.5
Número de mortes causadas por cancro (milhares)	4653.1	3547.9	8201.0
Taxa padronizada pela idade (W)	126.3	82.9	102.4
Risco de morrer de cancro antes dos 75 anos (%)	12.7	8.4	10.4
Casos de prevalência em 5 anos na população adulta (milhares)	15362.3	17182.3	32544.6
Proporção (per 100 000)	592	661.4	626.7
5 tipos de cancro mais frequentes (ranking definido pelo número total de casos)	Pulmão	Mama	Pulmão
	Próstata	Colo-rectal	Mama
	Colo-rectal	Pulmão	Colo-rectal
	Estômago	Colo do útero	Próstata
	Fígado	Estômago	Estômago

Cancro é o nome geral para o grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais ^{29,30,31}. As células cancerígenas podem disseminar-se para outras partes do corpo através da corrente sanguínea e do sistema linfático ²⁹.

Os tumores podem classificar-se como benignos ou malignos. Os tumores benignos não são cancerígenos e podem ser removidos, não reaparecendo na maioria dos casos. As células destes tumores não se espalham para outras partes do corpo nem invadem os tecidos em torno deles. O mais importante prende-se com o facto destes tumores raramente serem fatais. No entanto, podem crescer muito apresentando grandes tamanhos, o que pode tornar-se desconfortável e afectar funções orgânicas para quem é portador, e causar-lhes sintomas indesejáveis ^{29,31}. Os tumores malignos são

cancerígenos e as suas células podem invadir e destruir tecidos e órgãos adjacentes e até mesmo espalhar-se para outras partes do corpo. Esta propagação de células tumorais malignas, do tumor primário ou original para outras partes do corpo, que apresenta como meio de propagação a corrente sanguínea e sistema linfático, é chamada de metástase. Os tumores malignos muitas vezes podem ser removidos mas podem eventualmente voltar a crescer. Geralmente são mais graves que os tumores benignos e podem ser fatais, nomeadamente quando a propagação não se consegue controlar ²⁹.

Para que o cancro seja detectado a tempo de ser tratado e/ou completamente eliminado é necessário proceder a rastreios. Normalmente, o tratamento do cancro é mais eficaz quando a doença é detectada precocemente. Quando os testes de rastreio sugerem a existência de cancro ou os pacientes apresentam sintomas, devem ser realizados exames complementares que possam confirmar a sua existência e proporcionar um diagnóstico correcto ²⁹.

Quando o diagnóstico de cancro se confirma é preciso saber qual o estágio em que o cancro se encontra, de modo a que seja possível estimar o prognóstico do paciente e planear o tratamento adequado ao tipo de cancro e ao estágio em que se encontra ³². À medida que a complexidade do cancro aumenta, o mesmo ocorre com o tratamento necessário para combatê-lo.

O objectivo principal do tratamento é curar o paciente, ou seja, eliminar o cancro. No entanto, nem sempre isso é possível, e nesses casos os tratamentos são apenas paliativos, de forma a controlar a doença e/ou reduzir os sintomas durante o maior tempo possível ³³.

O cancro é tratado maioritariamente através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Alguns planos de tratamento de cancro incluem terapia hormonal, terapia biológica ou terapia direccionada ^{29,30,33}. Alguns tipos de cancro respondem melhor a um tipo de tratamento, enquanto outros podem responder melhor a uma combinação de tratamentos. Os tratamentos podem actuar numa área específica (terapia local) ou em todo o corpo (terapia sistémica) ³³.

A **cirurgia** é a forma de tratamento mais utilizada para a remoção do tumor sólido. Quando se dá a remoção do tumor, algum tecido circundante e alguns gânglios linfáticos próximos também são removidos para evitar que o tumor volte a crescer ³³.

Tal como qualquer tipo de tratamento, a cirurgia também pode apresentar efeitos colaterais. Os efeitos colaterais da cirurgia dependem de muitos factores, o tipo de cirurgia, saúde em geral do paciente e principalmente, do tamanho e localização do

tumor. Normalmente os pacientes sentem-se cansados ou fracos e com dor durante algum tempo após a cirurgia^{29,33}.

Em alguns tipos de cancro a cirurgia é suficiente para a completa remoção do tumor. No entanto, noutros casos, pode haver a necessidade de complementar o tratamento com outro tipo de terapia, como por exemplo, quimioterapia e/ou radioterapia para a completa eliminação do tumor²⁷.

Radioterapia utiliza radiação de alta energia (radiação ionizante) para a eliminação de células cancerígenas numa determinada região do corpo, sendo por isso considerada um tratamento local^{29,33,34}.

A radioterapia também apresenta algumas desvantagens e efeitos secundários. Para além de interferir na divisão de células cancerígenas, também afecta a divisão de células normais acabando também por as eliminar. Os efeitos secundários da radioterapia dependem, essencialmente, da dose e tipo de radiação que o paciente recebe, bem como da parte do corpo que é tratada, já que este é um tratamento local. Por norma, a aplicação de radioterapia pode causar náuseas, vómitos, diarreia e fadiga extrema^{33,34}. É comum que a pele da área tratada apresente vermelhidão, secura e fique sensível e irritada. Também é comum que pêlos existentes na área tratada caiam^{29,33,34}. A maioria dos efeitos secundários desaparece com o tempo³³.

Em alguns casos, constatou-se que depois de uma área ser submetida a um tratamento por radioterapia, essa área não pode ser novamente tratada com radiação devido aos danos causados em células normais na área de tratamento. Noutros casos, alguns pacientes podem ser submetidos a um segundo ciclo de radioterapia. Este tratamento é ineficaz no tratamento de cancro que metastizou porque a maioria das formas de radioterapia não chega a todas as partes do corpo³⁴. É um tratamento que também pode causar uma diminuição do número de células sanguíneas, nomeadamente dos glóbulos brancos, podendo assim aumentar o risco de infecção, e de plaquetas, aumentando o risco de hemorragia e problemas de cicatrização^{29,34}.

Existe ainda a possibilidade de desenvolvimento de um cancro secundário após a exposição à radiação utilizada durante o tratamento de radioterapia³⁴.

Em alguns tipos de cancros, muito sensíveis à radiação, esta pode ser usada por si só para que o cancro diminua ou desapareça completamente. Noutros, a radioterapia pode ser usada antes da cirurgia para diminuir o tamanho do tumor (terapia pré-operatória) ou após a cirurgia de modo a evitar que o cancro reapareça (terapia adjuvante). Noutros casos, a radioterapia por si só não é eficiente para a remoção ou

diminuição do tumor, e como tal, há necessidade de combinar a radioterapia com outro tipo de terapia, como por exemplo, a quimioterapia ³⁴.

A **quimioterapia** define-se pelo uso de fármacos para o tratamento de uma doença, neste caso o cancro ^{35,41}. Após a administração do fármaco por via oral ou intravenosa, ele entra na corrente sanguínea e circula por todo o organismo de modo a eliminar as células cancerígenas do tumor primário, e também as que metastizaram e se espalharam para outros locais ^{33,35,41}.

A quimioterapia também é utilizada para aliviar os sintomas causados pelo cancro em estádios mais avançados, quando já não há esperança de cura. O objectivo do uso paliativo da quimioterapia é apenas o de prolongar e, se possível, melhorar a qualidade de vida do paciente ^{35,41}.

A quimioterapia é das terapias anticancerígenas que apresenta mais efeitos secundários por ser uma terapia sistémica. Os fármacos utilizados nesta terapia não distinguem entre células cancerígenas e células normais. Assim, as células normais, principalmente as que se dividem rapidamente, são afectadas por estes fármacos, danificando-as e provocando efeitos colaterais para o paciente ^{29,35}.

Os efeitos secundários dependem, principalmente, do tipo de fármaco e da dose administrada ^{29,33,35}.

Este tratamento pode ser realizado usando apenas um fármaco ou uma combinação de fármacos ²⁹. A eficácia da quimioterapia é muitas vezes limitada pela toxicidade dos fármacos usados para os tecidos saudáveis do corpo, principalmente os que apresentam taxas de proliferação elevadas. Assim, as células hematopoiéticas são afectadas por este tratamento e como tal, o paciente fica mais propenso a infecções, a apresentar hematomas e a ter problemas de cicatrização. A quimioterapia pode causar, na maioria dos casos, queda de cabelo. Os fármacos antineoplásicos originam também náuseas, vômitos, diarreia, falta de apetite, cansaço extremo e feridas na boca e lábios ^{29,33}. Alguns fármacos podem afectar a fertilidade dos pacientes ³³.

Com o objectivo de superar as desvantagens associadas às terapias anticancerígenas tradicionais, de aumentar a eficácia dos tratamentos e diminuir o número de mortes causadas pelo cancro, cada vez mais se tem tentado desenvolver mais e melhores terapias anticancerígenas, como por exemplo a Imunoterapia, o direccionamento activo de fármacos ou a Terapia Fotodinâmica.

1.2 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma estratégia terapêutica minimamente invasiva, clinicamente aprovada para o tratamento de vários tipos de tumores sólidos e, também, de lesões não-malignas. A aplicação clínica da PDT requer a administração tópica ou sistêmica de um agente fotossensibilizador (PS), que se pode acumular no tumor, ou noutro tecido alvo. Após um determinado período de tempo (DLI), o PS é activado por irradiação selectiva do tecido alvo com luz visível, de comprimento de onda (λ) correspondente a uma das suas bandas de absorção, que, na presença de oxigénio molecular (O_2), origina uma reacção fotoquímica localizada que conduz à morte celular^{1,3}.

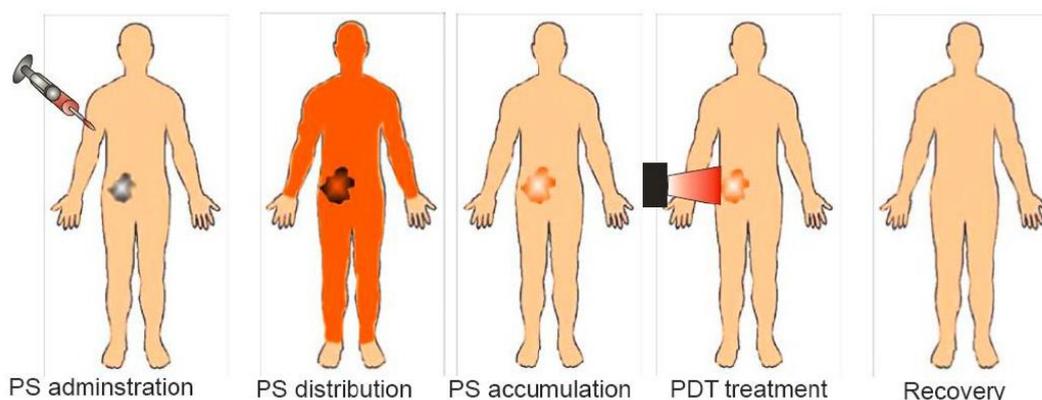


Figura 1 - Representação esquemática da aplicação clínica da Terapia Fotodinâmica³.

A interacção fotoquímica entre o PS e o O_2 , mediada pela irradiação leva à produção de oxigénio singuleto (1O_2) e outras espécies reactivas de oxigénio (ROS), tal como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (HO^\bullet) e/ou o anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). As ROS, produzidas localmente no tecido irradiado, são responsáveis por danos oxidativos em biomoléculas e estruturas celulares chave, podendo conduzir à morte celular do tecido alvo, por apoptose, necrose ou autofagia^{1,2,3}.

A PDT pode ser aplicada em várias áreas, sendo a principal a oncologia. Nesta área a PDT já se encontra aprovada ou está em fase de desenvolvimento para o tratamento de vários tipos de tumores, como por exemplo, o cancro da pele (não-melanoma), esófago e estômago, cabeça e pescoço, pulmão e brônquios, bexiga e mama¹. A PDT também pode ser aplicada na área da dermatologia, para tratamento de lesões não malignas ou pré-malignas e está a ser desenvolvida para o tratamento de acne e

psoríase ^{27,28}. Em oftalmologia a PDT já foi aprovada para o tratamento da Degenerescência da Mácula Relacionada com a Idade (DMRI) ²².

1.2.1 Aspectos Históricos

As primeiras noções de PDT remontam aos primórdios no século XX, mais especificamente a 1903, quando von Tappeiner e Jesionek aplicaram topicamente, o corante eosina para o tratamento de carcinoma basocelular (BCC), um dos tipos de cancro de pele mais frequente em caucasianos, em conjunto com a aplicação de luz solar ^{6,7}. Mais tarde, von Tappeiner e Jodlbauer definiram a PDT como a interacção entre luz, um agente PS e oxigénio, resultando na destruição do tecido. No entanto, o potencial da PDT para tratamento de cancro demorou aproximadamente 70 anos a ser reconhecida ⁷.

Em 1960, Lipson e Baídes descobriram, para aplicação em PDT, o derivado de hematoporfirina (HpD) ^{1,6,7}. O uso deste composto para aplicação em PDT foi alimentado por estudos pioneiros em ciência básica e aplicação clínica por Dougherty et al. em 1975, onde constataram que HpD em combinação com luz vermelha pode erradicar completamente o crescimento do tumor mamário de rato ^{6,7}. Posteriormente foram iniciados ensaios clínicos com HpD para o tratamento de pacientes com cancro de bexiga e tumores de pele ⁷. O sucesso deste e de outros ensaios conduziu em 1993, no Canadá, à aprovação regulamentar do primeiro PS para tratamento do cancro por PDT, o porfímero sódico (Photofrin®), uma versão purificada da HpD para o tratamento do cancro da bexiga ^{6,7}.

Desde então, todos os componentes necessários à PDT têm sido alvo de pesquisa e desenvolvimento até à actualidade, com o objectivo de contribuir para que a PDT seja cada vez mais reconhecida como uma alternativa terapêutica válida na dura batalha contra o cancro.

1.2.2 Mecanismo da PDT

A maioria das moléculas encontram-se no estado fundamental de energia, ou seja, num estado onde as partículas elementares têm o mínimo de energia possível num sistema físico ¹. Um PS no estado fundamental possui dois electrões com spins opostos, conhecido como estado singuleto fundamental (S_0), numa orbital molecular de baixa

energia ⁶. A partir da **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** pode-se observar os processos de absorção de luz e de transferência de energia que estão associados às reacções fotoquímicas, sobre as quais assenta o mecanismo da PDT.

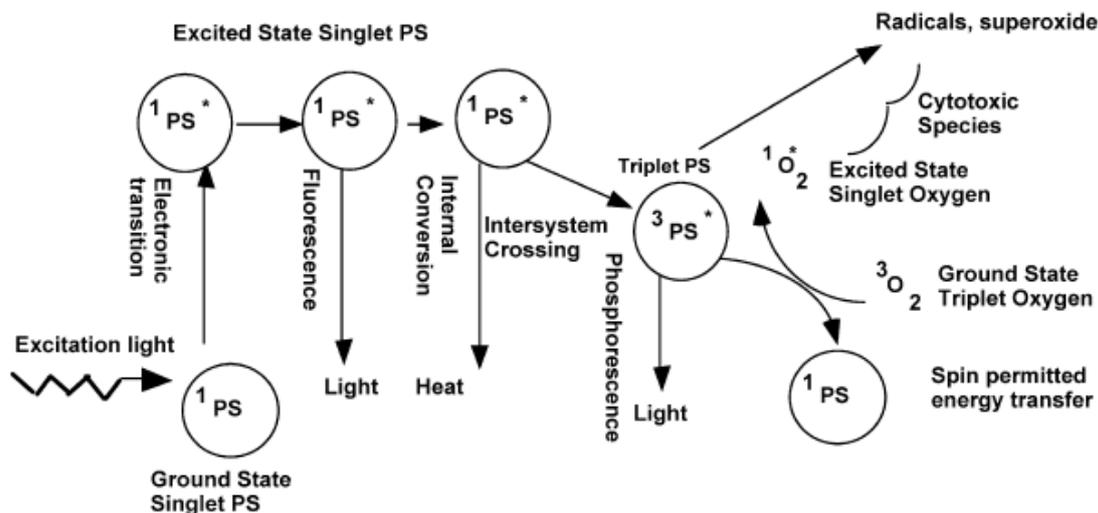


Figura 2 – Representação dos mecanismos fotofísicos e fotoquímicos ocorridos durante a PDT ⁶.

Quando o PS é irradiado com luz visível, este absorve luz e ocorre a transferência de um dos electrões do S_0 para uma orbital de maior energia mas o seu spin mantém-se (primeiro estado singuleto excitado, S_1). O PS excitado é muito instável apresentando um tempo de vida muito curto (nano segundos). Como tal, pode perder o excesso de energia através da emissão de luz por fluorescência e/ou calor por conversão interna. Alternativamente, o PS no S_1 também pode sofrer o processo de conversão intersistemas onde há a inversão do spin do electrão excitado para formar o estado tripleto excitado (T_1). Este estado, onde o spin dos electrões é paralelo, apresenta um tempo de vida de maior duração (microssegundos), devido ao facto do decaimento de T_1 para o S_0 , com perda de energia através de emissão de luz por fosforescência, ser um processo “spinforbidden” ^{1,6}.

O PS no T_1 pode sofrer dois tipos de reacções: Reacção de Tipo I e Reacção de Tipo II. Numa reacção de Tipo I o PS reage directamente com um substrato, como por exemplo, a membrana celular ou uma molécula orgânica, adquirindo prótons ou electrões e formando assim um radical catiónico ou aniónico, respectivamente. Estes radicais podem ainda reagir com o oxigénio e formar ROS como o HO^\bullet ou $O_2^{\bullet-}$. Nas reacções de Tipo II, o PS no T_1 pode decair para o estado fundamental ou transferir a

sua energia directamente para o O_2 para formar oxigénio no S_1 (1O_2), já que o oxigénio molecular no estado fundamental é um tripleto (3O_2)^{1,6}.

As reacções do Tipo I e II podem ocorrer simultaneamente e levam, conseqüentemente, à produção de várias ROS. A extensão de cada uma depende do tipo de PS usado, das concentrações de substrato e de oxigénio local⁶. A produção inicial do $O_2^{\bullet-}$ é efectuada, frequentemente, através de reacções do tipo I onde há transferência de electrões do PS para o 3O_2 (redução monovalente). $O_2^{\bullet-}$ por si só não causa muito dano oxidativo, mas ao reagir com ele próprio produz H_2O_2 e oxigénio, através da reacção chamada “dismutação” catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). A partir de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ há a possibilidade de obtenção de outro radical, o HO^{\bullet} . $O_2^{\bullet-}$ actua como agente redutor ao doar 1 electrão para reduzir iões metálicos existentes nas células, como por exemplo, o ião férrico (Fe^{3+}). Estes iões metálicos actuam como catalisadores que convertem H_2O_2 em HO^{\bullet} (Reacção de Fenton). O H_2O_2 e HO^{\bullet} são ROS muito importantes para a PDT porque para além de serem muito reactivas, podem passar facilmente membranas celulares e não podem ser excluídas das células conduzindo mais facilmente a danos oxidativos na célula e conseqüentemente à morte celular. A existência de iões metálicos nas células, em diferentes estados de oxidação, é muito importante para a produção de ROS, como já referido, relativamente à produção de HO^{\bullet} . Outro exemplo é o do ião ferroso (Fe^{2+}) que catalisa a quebra da ligação oxigénio-oxigénio do H_2O_2 produzindo HO^{\bullet} e um ião hidróxido (HO^-)^{1,6}.

Novas ROS podem ser produzidas através de reacções em cadeia. Quando há produção de $O_2^{\bullet-}$ e HO^{\bullet} estes radicais podem reagir entre si e formar 1O_2 . $O_2^{\bullet-}$ também pode reagir com óxido nítrico (NO^-), também ele um radical, e formar peroxinitrito ($OONO^-$), outra molécula oxidante altamente reactiva⁶.

Radicais também podem reagir com moléculas orgânicas, como por exemplo, ácidos gordos, e formar novos radicais, onde estes por sua vez podem reagir com outras moléculas numa reacção em cadeia causando dano oxidativo. Apesar de todas as células apresentarem alguma capacidade para reparar o dano oxidativo, o excesso de danos pode causar mutações ou morte celular⁶.

As reacções de tipo II são mecanisticamente muito mais simples do que as reacções de tipo I, por isso, acredita-se que a maioria dos PS actua via reacção de tipo II¹.

1.2.3 Vantagens e Limitações da PDT

A PDT apresenta várias vantagens em relação a outras opções terapêuticas, nomeadamente às terapias anticancerígenas tradicionais, já referidas anteriormente ^{1,7,39}. A mais importante é a ausência de efeitos secundários graves, que advém da dupla selectividade do tratamento por PDT. Esta dupla selectividade deriva da capacidade de alguns PS se localizarem preferencialmente em lesões neoplásicas, bem como da entrega de luz de forma precisa apenas no tecido alvo, minimizando assim os danos nos tecidos saudáveis circundantes. Consequentemente, a produção de ROS fica limitada ao tecido irradiado e, devido aos seus tempos de vida muitos curtos, a sua acção destrutiva fica confinada ao tecido alvo ^{1,6}. É um tratamento não invasivo, a repetição do tratamento pode ser realizada não resultando em toxicidade cumulativa, e tanto o PS como a irradiação não comprometem as outras modalidades terapêuticas. Assim, a PDT pode ser aplicada como coadjuvante de outros tipos de tratamentos anticancerígenos convencionais ^{1,21,39}. Um único procedimento pode resultar na destruição da lesão ³⁹ e o tratamento é altamente eficaz em pequenos tumores superficiais, não existindo efeitos colaterais a longo prazo se os protocolos apropriados forem seguidos correctamente ⁷. A PDT não interfere, não danifica, nem causa mudanças significativas nos tecidos, e a preservação do tecido conjuntivo permite a sua anatomia funcional e integridade mecânica dos órgãos ocos submetidos a PDT, já que praticamente não existe fibrose. Esta não alteração ou danificação dos tecidos, concretamente de elementos teciduais como o colagénio e elastina, permite a regeneração do tecido com pouca ou nenhuma formação de cicatriz ^{1,39}. Esta característica é muito importante em tratamentos dermatológicos, fazendo com que a PDT também apresente como vantagem um excelente efeito cosmético ^{1,39}. Outra vantagem importante da PDT é a ausência de mecanismos específicos de resistência ¹.

Em oncologia, uma das principais limitações da PDT é a sua aplicação apenas a lesões sólidas e não metastizadas. As metástases são a causa mais frequente de morte em pacientes com cancro, por isso muitos estudos têm-se focado em encontrar condições apropriadas para que a PDT possa induzir uma resposta imunitária anti-tumoral sistémica ^{1,39}. O principal efeito secundário descrito após um tratamento de PDT é a ocorrência de reacções de fotossensibilidade cutânea após a exposição dos pacientes à luz solar. Estas reacções, que se assemelham a queimaduras solares, podem ocorrer devido aos elevados tempos de permanência de alguns PS já aprovados no

organismo, como o Foscan® e Photofrin®, que tendem a acumular-se na pele após o tratamento ^{6,7}. A intensidade e duração da reacção de fotossensibilidade cutânea variam consoante a molécula fotossensibilizadora administrada.

Outra das limitações da PDT prende-se com a sua aplicação estar limitada a locais que possam ser acedidos para a entrega da luz. A tecnologia actual já permite a aplicação de luz em quase todos os locais do organismo ³⁹. Para além disso, a limitada penetração da luz nos tecidos, que está associada aos baixos λ aos quais os PS absorvem radiação, também constitui uma limitação por parte desta terapia ⁶.

1.2.4 Fotossensibilizadores

A maioria dos PS usados, tanto clinicamente como experimentalmente, baseiam-se na estrutura tetrapirrólica da porfirina (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**). Esta estrutura é encontrada em muitos pigmentos naturais, como a clorofila e a bacterioclorofila ^{1,6}. Também pode ser encontrado na hemoglobina e mioglobina, contendo, nestes casos, no seu centro um ião metálico ferro.

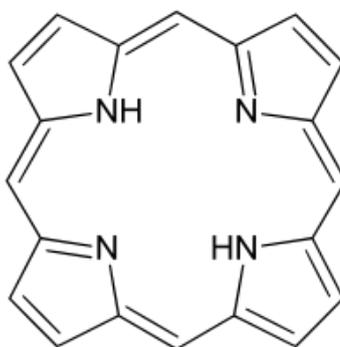


Figura 3 – Macrocielo Tetrapirrólico das Porfirinas ¹⁰.

Devido à sua estrutura, um sistema de ligações duplas conjugadas, os tetrapirróis apresentam normalmente uma banda de absorção relativamente grande na região dos 400 nm, conhecida como banda *Soret* e um conjunto de bandas de absorção mais fracas, bandas Q, com maiores λ (450 a 700 nm) ^{6,11}. Tendo em conta esta gama de absorção de luz das porfirinas e seus derivados, e considerando também a gama de λ onde se situa a janela óptica do tecido (ver secção “Fontes e entrega de luz”) as estruturas tetrapirrólicas tornam-se importantes nos PS para aplicação em PDT.

Os PS de primeira geração eram baseados em porfirinas de origem natural, como é o caso da hematoporfirina (HP) ⁷. A HP é uma porfirina endógena formada através da

porfirinas reduzidas, as benzoporfirinas, as ftalocianinas (PC) e em menor extensão as naftalocianinas, um análogo sintético do macrociclo ftalocianínico ^{6,14,15}.

As clorinas são tetrapirróis que normalmente resultam da redução da ligação dupla de um anel pirrol de uma porfirina (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**), levando a banda de absorção de λ mais longo, a última banda Q, a deslocar-se para a região do vermelho no espectro visível. Assim, as clorinas apresentam uma intensa banda de absorção entre os 650-690 nm, região do azul e do vermelho do espectro UV-visível ^{6,15}. As bacterioclorinas apresentam dois anéis de pirrol com ligação dupla reduzida (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**), o que faz com que haja um deslocamento da banda de absorção mais para a zona do vermelho e aumente a sua magnitude ⁶. Bacterioclorinas apresentam uma intensa banda de absorção aos 730 nm ¹⁵. Estas características fazem das bacterioclorinas PS mais eficazes, do ponto de vista fotodinâmico, do que as clorinas e porfirinas.

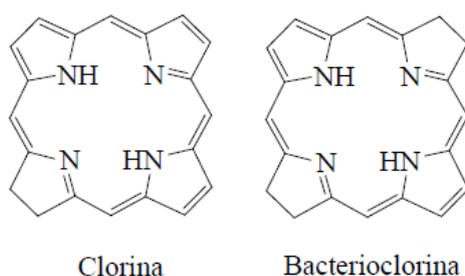


Figura 5 – Estrutura base das moléculas de Clorina e Bacterioclorina ¹⁷.

Dos PS de segunda geração destaca-se o derivado sintético meso-tetra (hidroxifenil) clorina (mTHPC), que tem o nome comercial Foscan® (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**) ^{14,15}.

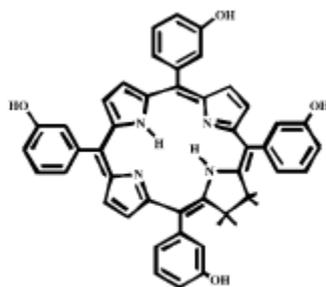


Figura 6 – Estrutura do meso-tetra (hidroxifenil) clorina (Foscan®) ⁶.

Este PS foi aprovado em 2001 na União Europeia para o tratamento paliativo de cancro da cabeça e pescoço ⁷. mTHPC requer doses de luz de apenas 10-20 J/cm² para controlo do tumor, provoca um menor período de fotossensibilidade (2 a 4 semanas) e possui um pico de absorção a 652 nm, o que aumenta ligeiramente a profundidade de penetração da luz no tecido, tornando-o assim um melhor PS, comparativamente à Photofrin ^{7,14}.

As PCs apresentam uma banda de absorção intensa a 680 nm ¹⁶. Através da adição de um segundo anel benzénico a cada extremidade das PCs obtém-se as naftalocianinas. Estas absorvem a um λ maior do que o das PCs (770 nm) permitindo uma maior profundidade terapêutica ¹⁸.

Um PS de segunda geração importante na área da PDT é a Verteporfirina, de nome comercial Visudyne®. Em 2000 a Verteporfirina foi aprovada como PS para aplicação em PDT para o tratamento da DMRI ²². Este PS é um derivado monoacídico de uma benzoporfirina (BPD-MA) e apresenta uma banda de absorção aos 690 nm ^{1,19,20,21}.

Ainda dentro dos PS de segunda geração existem os chamados PS endógenos, como a protoporfirina IX (PpIX) ¹⁴. A descoberta de que o ácido 5-aminolevulínico (ALA) era um precursor metabólico da PpIX, que pertence à via biossintética do grupo heme, levou a que ALA fosse usado como PS em PDT ^{1,7,14}. Moléculas como o ALA são considerados pró-fármacos porque necessitam de ser metabolizados pelo organismo para se tornarem activos ¹. A estrutura da protoporfirina IX está representada na Figura 7.

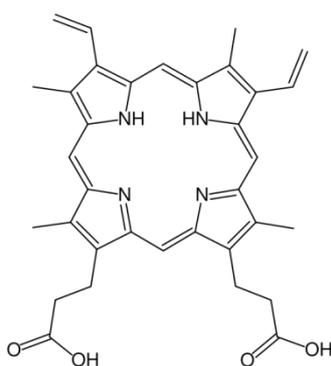


Figura 7 – Estrutura da Protoporfirina IX ²³.

O nome comercial de ALA é Levulan® e este composto foi aprovado em 1999 para o tratamento da queratose actínica na face e couro cabeludo ^{7,14}. A administração exógena de ALA induz uma maior produção de PpIX, que se acumula no interior da

célula devido à saturação da enzima ferroquelatase, responsável pela conversão da PpIX em grupo heme. Vários tipos de células tumorais apresentam uma menor actividade da ferroquelatase do que as células normais, o que leva a uma maior acumulação de PpIX neste tipo de células, podendo resultar num melhor efeito terapêutico ⁷.

PpIX apresenta um espectro de absorção semelhante ao porfímero sódico, sendo que ambos absorvem luz na gama dos 630 nm, dificultando o tratamento de lesões mais profundas ^{7,14}. No entanto, a utilização de ALA em PDT apresenta vantagens em relação à utilização de Photofrin. ALA é eliminado mais rapidamente do organismo do que Photofrin não apresentando, por isso, praticamente fotossensibilidade cutânea ^{7,14}. ALA apresenta também uma maior selectividade para tumores ⁷.

ALA apresenta a desvantagem de ser uma molécula altamente hidrofílica e carregada. Estas características tornam bastante difícil a penetração da molécula nas células, o que resulta numa menor conversão de ALA em PpIX ^{7,24}. Tem sido observado que quanto mais hidrofóbico for um PS, maior a sua incorporação pelas células tumorais e conseqüentemente, maior é o efeito da PDT ²⁴. Estudos demonstraram que ALA penetra na pele quando aplicado topicamente, no entanto, a sua penetração em profundidade e em tumores nodulares é bastante limitada ²⁷.

Na tentativa de solucionar o problema de hidrofílicidade de ALA e conseqüentemente, a sua difícil penetração nas células, foram desenvolvidos ésteres alquílicos de ALA. Estes apresentam maior lipofílicidade e, como tal, são capazes de penetrar na célula mais facilmente ^{7,27}.

As Figura 8 e Figura 9 representam as estruturas de ALA e de um derivado esterificado de ALA, respectivamente.

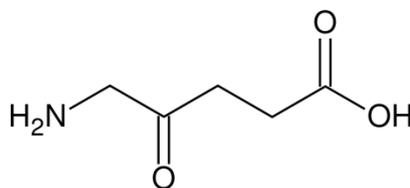


Figura 8 – Estrutura do Ácido 5-aminolevulínico ²⁶.

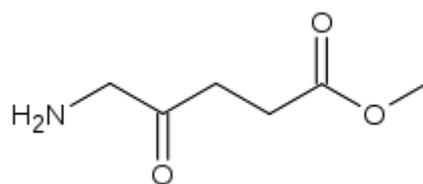


Figura 9 – Estrutura do Metilaminolevulinato ²⁵.

O derivado esterificado de ALA, o metilaminolevulinato (MAL), que apresenta como nome comercial Metvix®, foi aprovado na União Europeia em 2001 para o tratamento tópico de queratose actínica, BCC e doença de Bowen ^{7,24}. Depois de penetrar as células, MAL é desesterificado por enzimas intracelulares em ALA e conseqüentemente, pode ser convertido em PpIX. Estudos têm demonstrado que MAL é mais selectivo para lesões cutâneas anormais em comparação com ALA, e portanto há uma grande acumulação de PpIX nessas lesões. O carácter mais hidrofóbico do MAL facilita a sua penetração nos tecidos, podendo também atingir profundidades superiores, comparativamente ao ALA, o que se traduz na redução do intervalo DLI e no aumento da profundidade efectiva de tratamento ²⁷.

Com o objectivo de ultrapassar as desvantagens inerentes aos PS de segunda geração, tais como a fotossensibilidade cutânea, toxicidade, baixa absorção de luz a λ longo e alguma dificuldade em penetrar a membrana celular, tem sido constante a busca por novos PS, os de terceira geração, com as características mais próximas do ideal. O PS ideal deve apresentar as seguintes características:

- ser um composto puro, de síntese fácil e curta, composição constante, elevado rendimento e baixos custos de produção;
- não possuir toxicidade quando não é exposto à luz;
- apresentar uma maior selectividade para os tecidos neoplásicos em relação aos tecidos normais, promovendo assim uma maior concentração de PS no tecido neoplásico;
- ser rapidamente eliminado do organismo de modo a evitar a sua acumulação na pele e assim evitar reacções de fotossensibilidade cutânea;
- apresentar uma elevada absorção de luz na região do vermelho/infravermelho (600-800 nm), já que nesta gama a luz tem uma maior capacidade de penetração nos tecidos;
- ter um elevado rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$ e outras ROS, que é favorecido por um T_1 com tempo de vida e energia adequados;

- apresentar uma solubilidade adequada em formulações biocompatíveis que permitam a sua administração no organismo;
- causar poucos efeitos secundários, como hipotensão, reacções alérgicas e dor;
- deve ser mutagénico nem carcinogénico ^{1,6,7,15,24}.

Como já foi referido, até à data, vários PS já foram aprovados clinicamente para aplicação em PDT. No entanto, as suas limitações estão bem identificadas, o que tem motivado o esforço constante no desenvolvimento de uma nova geração de PS, com características mais próximas do ideal. Alguns ainda estão em fase de testes pré-clínicos, outros já se encontram em fases avançadas de desenvolvimento clínico.

Na Tabela 2 são apresentados os PS que, até 2011, estavam aprovados para aplicação em PDT e os que se encontravam em ensaios clínicos.

Tabela 2 – Lista dos PS utilizados clinicamente para PDT (aprovados ou em ensaios clínicos) até 2011, incluindo a indicação da sua família, λ de absorção, região de aprovação e indicações terapêuticas ¹.

PHOTOSENSITIZER	STRUCTURE	WAVELENGTH, nm	APPROVED	TRIALS	CANCER TYPES
Porfimer sodium (Photofrin) (HPD)	Porphyrin	630	Worldwide		Lung, esophagus, bile duct, bladder, brain, ovarian
ALA	Porphyrin precursor	635	Worldwide		Skin, bladder, brain, esophagus
ALA esters	Porphyrin precursor	635	Europe		Skin, bladder
Temoporfin (Foscan) (mTHPC)	Chlorine	652	Europe	United States	Head and neck, lung, brain, skin, bile duct
Verteporfin	Chlorine	690	Worldwide (AMD)	United Kingdom	Ophthalmic, pancreatic, skin
HPPH	Chlorin	665		United States	Head and neck, esophagus, lung
SnEt2 (Purlytin)	Chlorin	660		United States	Skin, breast
Talaporfin (LS11, MACE, NP6)	Chlorin	660		United States	Liver, colon, brain
Ce6-PVP (Fotolon), Ce6 derivatives (Radachlorin, Photodithazine)	Chlorin	660		Belarus, Russia	Nasopharyngeal, sarcoma, brain
Silicon phthalocyanine (Pc4)	Phthalocyanine	675		United States	Cutaneous T-cell lymphoma
Padoporfin (TOOKAD)	Bacteriochlorin	762		United States	Prostate
Motexafin lutetium (Lutex)	Texaphyrin	732		United States	Breast

1.2.5 Fontes e Entrega de Luz

Para além dos avanços na química, no que diz respeito ao desenvolvimento de novos PS, também a área das fontes de luz está a ter grandes progressos que facilitam a

entrega de luz no tecido alvo, contribuindo para uma melhoria na eficácia dos tratamentos por PDT.

A activação de PS pode ser realizada por diferentes tipos de fontes de luz, como por exemplo, lâmpadas incandescentes, lâmpadas de arco, LED's (light emitting diodes) ou lasers^{1,6,7,8}. O desenvolvimento de lasers que emitem luz de λ preciso, onde os feixes de luz podem ser facilmente focados nos locais onde se pretende realizar o tratamento, foi um importante avanço para a PDT⁷. Os primeiros lasers desenvolvidos para PDT eram equipamentos extremamente caros, grandes, imóveis e que necessitavam de elevado suporte técnico. Com os novos avanços na tecnologia produziram-se lasers de díodo de baixo custo, pequenos, compactos e portáteis, conseguindo manter uma potência adequada às aplicações em PDT. No entanto, os lasers de díodo apenas conseguem emitir num λ fixo, o que os torna específicos para um determinado PS^{1,7}. O desenvolvimento da tecnologia de fibra óptica também foi um marco importante para a PDT, já que o acoplamento de lasers a dispositivos flexíveis de fibra óptica permite a entrega de luz directamente no tecido alvo de forma precisa e homogénea^{1,7}.

Outras fontes de luz alternativas, os LED's, apresentam bandas espectrais relativamente estreitas e podem fornecer fluências elevadas, até 150 mW/cm^2 , a λ na gama de 350-1100 nm^{1,7}. São pequenos e mais baratos do que as outras fontes de luz mencionadas⁷ e têm a vantagem, comparativamente aos lasers, de poderem ser mais facilmente aplicados no tratamento de lesões de maior área.

A luz ao penetrar no tecido pode ser absorvida ou dispersa. O facto dos tecidos biológicos não serem homogéneos e apresentarem heterogeneidades microscópicas (macromoléculas, organelos celulares, estrutura celular organizada, camadas intersticiais, etc) faz com que a luz tenha pouca capacidade para se propagar no seu interior, devido principalmente à sua dispersão. A existência de cromóforos endógenos, como a hemoglobina, mioglobina e citocromos, são os responsáveis pela absorção de parte significativa da luz que incide no tecido. A extensão em que estes fenómenos ocorrem depende do tipo de tecido e do λ da luz. O conhecimento da óptica do tecido permite planejar o tratamento da lesão, tal como prevê a forma como a luz é distribuída dentro do tecido ou órgão alvo, de modo a otimizar o resultado clínico. O simples facto de se saber que diferentes tipos de tecidos, e até mesmo, o mesmo tipo de tecido ou órgão, apresentam diferentes propriedades ópticas ajuda a prever possíveis variações na forma como a luz é absorvida e dispersa⁶.

A combinação da absorção de luz pelos principais cromóforos endógenos (oxi e deoxi-hemoglobina e a melanina) a menores λ e a ocorrência de absorção de luz pela água a λ superiores a 1300 nm, conduziu à definição do conceito de Janela Óptica do Tecido, que se situa entre os 600 e os 1300 nm e que corresponde à região do espectro electromagnético onde os tecidos são mais transparentes à luz (Figura 10).

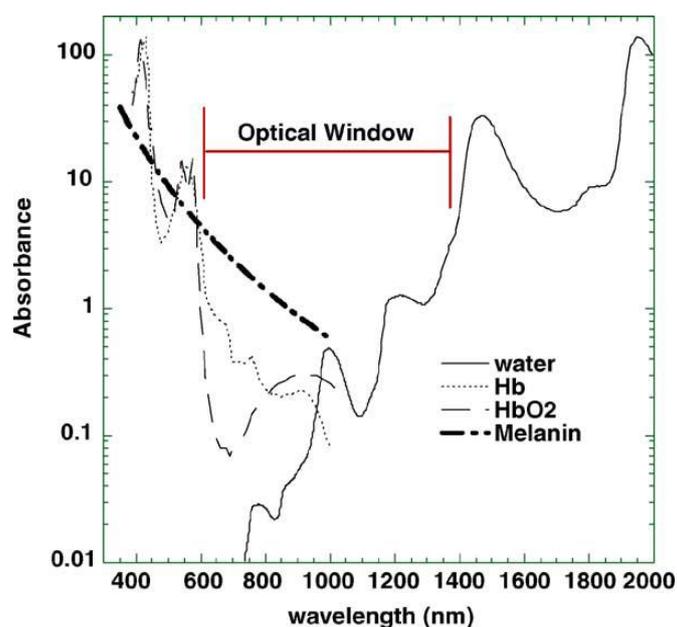


Figura 10 – Janela Óptica do Tecido. Espectros de absorção de cromóforos teciduais (desoxi e oxi-hemoglobina e melanina) e da água ⁶.

Apesar da janela óptica do tecido ir até aos 1300 nm, a λ maiores que 850 nm a energia dos fotões incidentes deixa de ser suficiente para excitar a molécula de PS e dar início à reacção fotoquímica, o que se reflecte na diminuição da eficácia do tratamento ¹. Assim, foi definida a Janela Fototerapêutica para a PDT entre os 600 e os 850 nm ⁹. Dentro desta gama, a excitação do PS é feita normalmente no λ mais longo correspondente a uma das suas bandas de absorção de luz, maximizando assim a profundidade efectiva de tratamento (Figura 11).

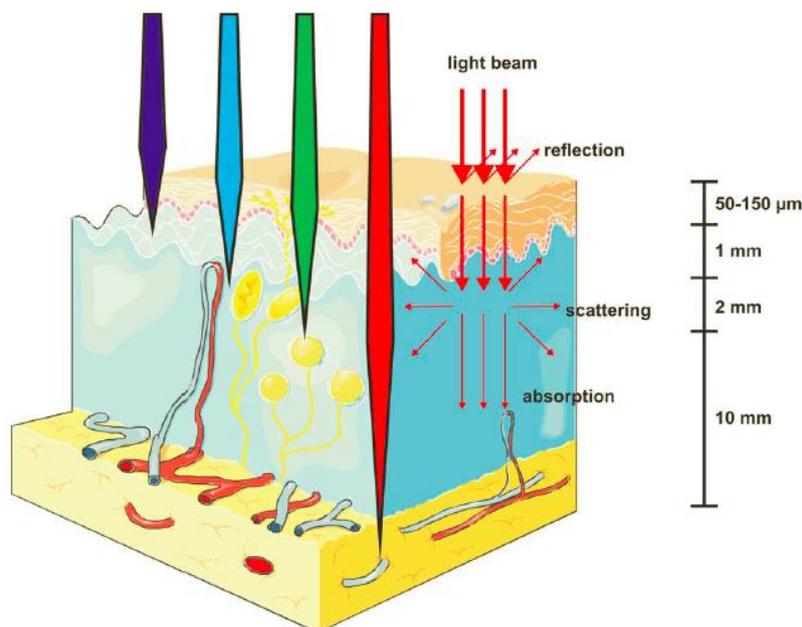


Figura 11 – Propagação da luz nos tecidos ¹.

A profundidade efectiva de tratamento aumenta com o aumento do λ da luz, sendo de 1-3 milímetros a 630 nm e de cerca de 10 milímetros entre os 700-850 nm ⁶.

A escolha da fonte de luz deve basear-se nas características do espectro de absorção pelo PS (λ das bandas e sua intensidade), no tipo de lesão (localização, tamanho, acessibilidade e características do tecido), e no custo e tamanho do dispositivo ¹.

A eficácia clínica da PDT vai depender também da dosimetria da luz: dose total, tempo de irradiação e modo de entrega (irradiação contínua ou fraccionada). A taxa de fluência (número de fótons que cruzam uma unidade de área por unidade de tempo) afecta também a resposta à PDT ^{1,9}.

A fluência (F) ou densidade de energia, expressa em J/cm^2 , é calculada da seguinte forma:

$$F = \frac{E}{A} \quad \text{(equação 1)}$$

onde E é a energia total absorvida pelo tecido, expressa em Joules (J) e A é a área da superfície irradiada, expressa em cm^2 ⁹.

A taxa de fluência (I), intensidade ou densidade de potência, expressa em W/cm^2 , é calculada através da equação 2:

$$I = \frac{P}{A} \quad \text{(equação 2)}$$

onde P é a potência de irradiação, expressa em Watts (W) e A é a área da superfície irradiada expressa em cm²⁹.

1.2.6 Modos de Acção

A eficácia da PDT depende de vários factores como o tipo e dose de PS usado, o tempo entre a administração do PS e a irradiação (DLI), a dose total de luz e a sua taxa de fluência e a concentração de oxigénio do tumor ¹. Todos estes factores levam à ocorrência de processos independentes que contribuem para a destruição do tecido alvo, ou seja, para o efeito final da PDT. Este efeito final pode resultar da conjugação de um ou mais modos de acção. Na aplicação da PDT para o tratamento do cancro, o efeito citotóxico directo das ROS conduz à morte das células tumorais, pela indução de necrose, apoptose ou autofagia, e pode também levar à destruição da vasculatura tumoral, privando o tumor de oxigénio e nutrientes e contribuindo para a sua eliminação. Para além disso, tem sido descrito por vários autores que a PDT normalmente origina uma reacção inflamatória aguda local, com mobilização de células do sistema imunitário tais como células dendríticas e neutrófilos, que promovem a remoção de células mortas e a restauração da homeostasia do tecido afectado. Esta reacção inflamatória não específica pode posteriormente levar ao desenvolvimento de uma resposta imunitária anti-tumoral específica e com acção sistémica, que pode ter um papel relevante no controlo de possíveis metástases noutros locais do organismo (Figura 12) ^{1,4}.

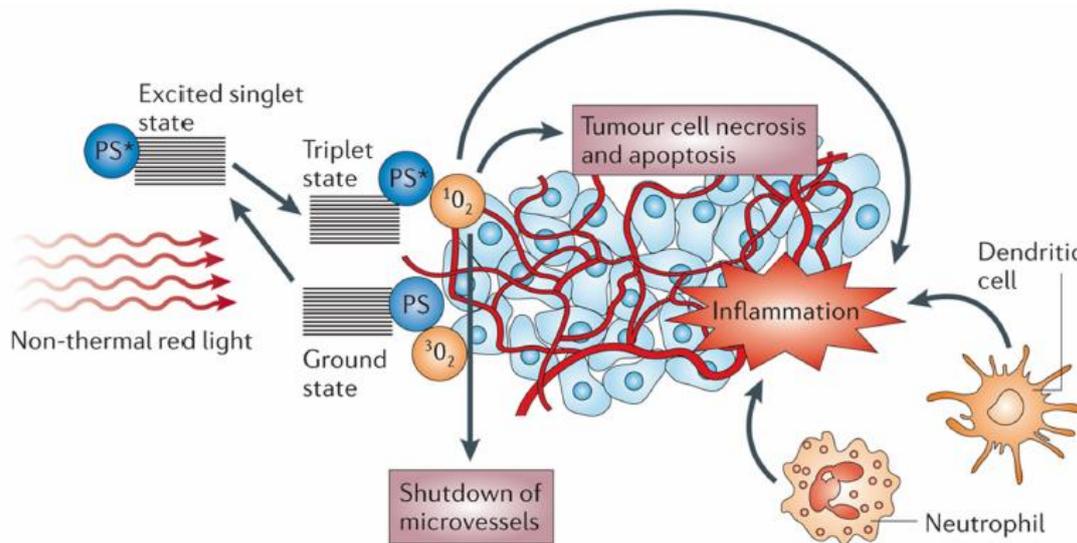


Figura 12 - Mecanismos de acção sobre tumores através de Terapia Fotodinâmica ⁴.

1.2.6.1 Mecanismos de Morte Celular Induzidos pela PDT

Segundo a literatura, não existe um único caminho que leve à morte celular após tratamento por PDT. A PDT pode evocar as três principais vias de morte celular: apoptose, necrose e autofagia associada à morte celular ^{1,3}.

O tipo de morte celular observada após PDT depende principalmente da localização intracelular do PS, mais concretamente dos danos causados no organelo em que o PS se acumula, e que por sua vez está directamente relacionada com o seu mecanismo de acção ³. Sabe-se que a maioria das porfirinas e os seus derivados se localizam preferencialmente em membranas celulares, incluindo a membrana citoplasmática, mitocondrial e lisossomal, no aparelho de Golgi e no retículo endoplasmático (ER). Os PS hidrofílicos e aniónicos, por serem muito polares, dificilmente atravessam a membrana plasmática e portanto, são internalizados especialmente através de endocitose, localizando-se principalmente nos lisossomas ⁵.

A Figura 13 apresenta as vias de morte celular induzidas pela PDT.

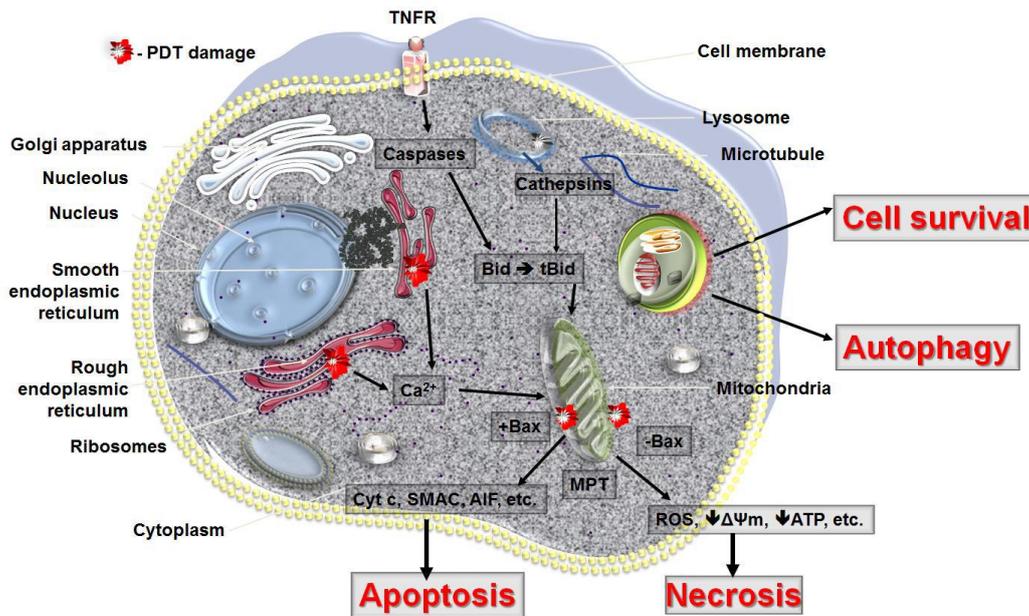


Figura 13 – Representação esquemática dos mecanismos de morte celular induzidos pela PDT ³.

Quando o PS se localiza na mitocôndria, após a aplicação de PDT, o *stress* oxidativo provocado pelas ROS geradas no local levará ao aumento da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, regulada por Bcl-2, e posterior libertação de ativadores de caspases, como citocromo c e Smac/DIABLO, uma proteína mitocondrial que potencia algumas formas de apoptose, ou outros mediadores pró-apoptóticos, incluindo factor de indução de apoptose (AIF). A activação de cascatas de caspase, mais concretamente das caspases efectoras, como a caspase-3, -6 e -7, conduz à clivagem de substratos celulares causando alterações morfológicas e bioquímicas características, observadas em células que se encontram em processo de morte por apoptose ³. A clivagem da lâmina nuclear é seguida pela condensação da cromatina e encurtamento do núcleo. É a lâmina nuclear que confere estabilidade ao envelope nuclear e ao interagir com a cromatina permite a organização tridimensional do núcleo. Durante a apoptose ocorre a fragmentação do ADN devido à clivagem do inibidor da Desoxirribonuclease Activada por Caspase (CAD), verifica-se uma retracção da célula e a sua fragmentação causada pela clivagem de proteínas do citoesqueleto e a formação de corpos apoptóticos sem colapso da membrana plasmática ^{1,3}. Quando há dano no ER ocorre a libertação de cálcio acumulado para o citosol levando à ocorrência do processo apoptótico ³. Geralmente, as células em apoptose libertam sinais para que as células fagocíticas do sistema imunitário procedam à sua eliminação e dos corpos remanescentes ¹.

A apoptose é descrita como a morte celular programada, sendo considerada um processo muito complexo e constituído por várias vias e etapas ³, sendo normalmente considerada como a principal via de morte celular em resposta à PDT ¹.

O mecanismo de morte celular depende da intensidade do protocolo de PDT, que está relacionada com as doses de PS e de luz utilizadas. Se a intensidade do tratamento for elevada, a morte celular tende a ocorrer devido a necrose, enquanto uma baixa intensidade do tratamento predispõe as células para a morte celular por apoptose ³.

Os mecanismos moleculares subjacentes à necrose ainda são elusivos. No entanto, sabe-se que o excesso de produção de ROS mitocondrial, danos lisossomais, a sobrecarga intracelular de Ca^{2+} e a inibição da acção das caspases estão recorrentemente envolvidos nesta via de morte celular ¹. A depleção de ATP para um nível incompatível com a sobrevivência da célula, e a perda da integridade da membrana plasmática, devido à localização de PS na membrana aquando do tratamento fotodinâmico, também levam à morte celular através de necrose ³. A necrose é morfológicamente caracterizada pelo aumento de volume do citoplasma, destruição de organelos e a desintegração progressiva da membrana plasmática, que leva à fragmentação celular e, conseqüentemente, à libertação do conteúdo celular e moléculas pró-inflamatórias para o meio extracelular ^{1,40}.

Os danos celulares causado pelo *stress* oxidativo provocado pela PDT também podem levar à morte celular por autofagia ¹. Autofagia é um mecanismo celular catabólico que conduz à degradação de componentes da própria célula, permitindo que a célula mantenha um equilíbrio entre a síntese, a degradação e a reciclagem dos seus constituintes. Todos os processos autofágicos envolvem a degradação lisossomal de organelos celulares e proteínas ³. No mecanismo de autofagia mais conhecido há a formação do autofagossoma, uma estrutura de dupla membrana que deriva do ER liso. O autofagossoma rodeia organelos envelhecidos ou danificados, ou outros componentes citoplasmáticos, produzindo uma vesícula que é transportada e fundida com o lisossoma, formando o autofagolisossoma onde o seu conteúdo é degradado por hidrólases lisossomais ^{1,3}.

Ainda não é completamente claro como o resultado da PDT conduz à autofagia. Sabe-se que as células de mamífero usam a autofagia como uma defesa contra danos causados por ROS, eliminando da célula os organelos danificados ³. Dependendo do tipo de ROS e grau de lesão oxidativa, a PDT pode estimular a autofagia de modo a preservar a viabilidade celular após a lesão fotodinâmica ou induzindo a morte celular

autofágica^{1,3}.

Aquando da aplicação de PDT, várias proteínas, algumas envolvidas no processo de autofagia, podem ser danificadas pelas ROS produzidas. Alguns PS que se localizam na mitocôndria e no ER causam danos em Bcl-2 e dá-se a ligação de Beclin1, uma proteína pro-autofágica, o que desencadeia o processo autofágico³. Outros PS afectam a proteína IP3, que regula o processo de autofagia associado ao ER, ou o alvo da rapamicina cinase (TOR), que controla o crescimento celular e síntese proteica, e participa na via de sinalização autofágica³.

A PDT também pode afectar a autofagia ao danificar os organelos que estão envolvidos neste processo. Alguns PS têm como alvo os organelos relacionados com a autofagia como lisossomas e endossomas. Neste caso, o direccionamento específico da PDT é para este organelo, e as enzimas lisossomais são inactivadas antes da ruptura da membrana lisossomal, não causando danos ao resto da célula. Assim, este tratamento pode ser utilizado para enriquecer selectivamente autofagossomas. No entanto, existem outros PS que se ligam à membrana lisossomal fazendo com que ela se rompa aquando da irradiação. Esta ruptura leva à libertação de proteases que podem induzir a apoptose por clivagem de Bid (proteína pró-apoptótica Bcl-2 contendo apenas o domínio BH3) mediada por catepsina³. Desta forma, verifica-se que a influência da PDT nos mecanismos de autofagia depende do tipo de PS utilizado.

A autofagia pode desempenhar um papel na apoptose induzida por PDT, mas os dois processos também são independentes um do outro. Um estudo realizado em células de leucemia linfoblástica de murganho (L1210) permitiu saber que autofagia pode ocorrer antes da apoptose. A situação é diferente para as células tumorais que não possuem a capacidade de sofrer apoptose devido à existência de uma deficiência em Bax e Bac, proteínas que regulam a via apoptótica. Nestas células, a autofagia induzida por PDT estimula a necrose. Estudos mostraram que a supressão da autofagia em células com deficiência em realizar apoptose resultou na inibição da morte celular durante a PDT. Necrose, bem como autofagia pode ser um modo de morte celular dominante após PDT quando a apoptose é disfuncional³.

No geral, a indução da autofagia em células tratadas com PDT ocorre independentemente de um resultado apoptótico. Em células que sofrem apoptose, a autofagia pode minimizar os efeitos destrutivos da PDT ao reciclar os organelos danificados. Isto permite que a PDT, aplicada a células cancerígenas, possa ser melhorada através da supressão de proteínas pró-autofágicas³.

É de salientar que vários PS podem localizar-se em mais do que um organelo e como tal, a activação das diferentes vias de morte celular pode ocorrer simultaneamente³.

2. Enquadramento e Objectivos

O desenvolvimento de novas terapias de combate ao cancro, capazes de superar as desvantagens associadas às terapias anticancerígenas tradicionais, é um dos grandes desafios científicos do nosso tempo. A PDT é vista actualmente como uma das terapias mais promissoras para o tratamento desta patologia, o que tem motivado uma grande aposta sobretudo ao nível da descoberta e desenvolvimento de PS mais eficazes e com menores efeitos secundários.

Nesse sentido, a Luzitin, SA (empresa do grupo Bluepharma) tem trabalhado no design, síntese e desenvolvimento de novos PS para PDT do cancro. Esse trabalho conduziu à descoberta de uma nova molécula, a LUZ11, que demonstrou excelente eficácia e segurança na fase de desenvolvimento não-clínico e que, recentemente, entrou em fase de ensaios clínicos em doentes com cancro avançado da cabeça e pescoço. Enquanto isso, novas moléculas com outras características continuam a ser produzidas e estudadas noutras indicações terapêuticas, no sentido de aumentar o portefólio de compostos em desenvolvimento.

Assim, procurando melhorar as características dos PS já existentes e que possam ser estudados em novos alvos terapêuticos, este trabalho tem como objectivo geral avaliar a actividade biológica *in vitro* de três novas moléculas, candidatos a PS, com vista à selecção das que apresentem as melhores características para avançarem para a fase seguinte de desenvolvimento não-clínico. Com este propósito, foram realizados vários estudos com os seguintes objectivos específicos:

1. Caracterizar a interacção dos compostos com as células em cultura, nomeadamente a sua cinética de acumulação celular;
2. Estudar a toxicidade das três moléculas candidatas a PS em duas linhas celulares tumorais em cultura, na ausência de luz e após irradiação;
3. Avaliar os mecanismos de morte celular induzidos pela aplicação do protocolo de PDT.

Nos estudos com as novas moléculas será incluído também a LUZ11, que assim poderá servir de referência, uma vez que as suas características e actividade biológica já são bem conhecidas a nível interno.

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparação de Meios e Soluções para Cultura Celular

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de células e respectivos meios de cultura, soluções tampão, reagentes ou materiais foram realizados em condições de assepsia no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical Steril Polaris 48 (Steril, Massa Martana, Itália). Todas as soluções para cultura celular preparadas foram esterilizadas por filtração sob vácuo através de um filtro Whatman ME 24 ST com 0,2 μm de tamanho de poro (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A esterilização dos materiais foi realizada por autoclavagem.

O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 24 mM bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10 mM de HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-ethanesulfonic acid) (VWR Chemicals, Leuven, Bélgica), 50 ml de soro fetal bovino (FBS) inativado (Biochrom, Berlim, Alemanha), e mistura de antibióticos penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$) (Lonza, Verviers, Bélgica).

A solução tampão de fosfato salino (PBS) pH 7.4 utilizada foi preparada no laboratório e tem a seguinte composição: 137 mM cloreto de sódio (NaCl) (Merck, Darmstadt, Alemanha), 2,7 mM Cloreto de potássio (KCl) (Merck, Darmstadt, Alemanha), 10 mM Hidrogenofosfato de di-sódico (Na_2HPO_4) (Panreac, Barcelona, Espanha), 1,8 mM Di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (Panreac, Barcelona, Espanha), 1 mM Cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,5 mM Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.2 Condições de Cultura Celular

A selecção das linhas celulares a estudar neste projecto foi feita a partir de um conjunto de linhas celulares tumorais disponíveis no laboratório. Foram seleccionadas uma linha de origem humana e outra de origem animal que já haviam sido bastantes utilizadas anteriormente em estudos de actividade biológica *in vitro* de compostos para PDT, nomeadamente estudos relacionados com o desenvolvimento do composto líder LUZ11 (Luzitin, SA, Coimbra, Portugal). As duas linhas celulares utilizadas neste estudo, HT-29 e CT26, foram adquiridas à ATCC-LGC Standards (Barcelona, Spain). As células HT-29 são células epiteliais de adenocarcinoma colorectal de humano e as CT26 células do fibroblasto de carcinoma do cólon de ratinho, sendo que ambas são células aderentes.

As células foram mantidas em atmosfera humidificada com 5% de CO₂, a 37°C numa incubadora Binder CB 150 (Binder, Tuttlingen, Alemanha).

As linhas celulares para o estudo, estavam crio-preservadas em azoto líquido (-196°C), foram descongeladas e colocadas em cultura. Cada tubo de crio-preservação (contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células) foi colocado imediatamente no banho de água a 37°C, até à descongelação completa do seu conteúdo (aprox. 30 seg). Seguidamente, o conteúdo do *vial* foi transferido para um frasco de cultura estéril de 75cm² (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) contendo 25mL de meio de cultura DMEM, previamente aquecido a 37°C. O frasco com as células em cultura foi colocado na incubadora de CO₂ durante a noite, para permitir a adesão das células à sua superfície, e no dia seguinte o meio de cultura foi substituído.

3.3 Subcultura das Linhas Celulares HT-29 e CT26

Quando as linhas celulares aderentes atingem o seu estado de confluência, isto é, ocupam toda a área disponível, devem ser subcultivadas para que possam prosseguir o seu crescimento exponencial e manter a viabilidade celular. Para isso, o meio de cultura antigo foi removido e a superfície de crescimento foi lavada com 2 mL de solução de Tripsina/EDTA (Lonza, Verviers, Bélgica). De seguida foram adicionados às células mais 4 mL de solução de Tripsina/EDTA e o frasco de cultura foi incubado a 37°C de modo a promover o destacamento das células do frasco de cultura (entre 5 a 10

minutos). A tripsina é uma enzima proteolítica que permite o destacamento e individualização de células aderentes, através da digestão das proteínas que promovem a ligação com células vizinhas e com a superfície de cultura.

Após a verificação visual do destacamento das células foram adicionados 6mL de meio de cultura DMEM e as células foram ressuspensas. Nesta fase as células em suspensão estão prontas para serem utilizadas nos ensaios *in vitro*, após determinação da densidade celular, ou podem ser apenas subcultivadas com o objectivo de as manter em cultura em condições adequadas ao seu crescimento. Neste caso, 0,5 a 1 mL de suspensão celular é transferido para um novo frasco com 25 mL de meio de cultura, que é depois colocado na incubadora de CO₂. O procedimento de subcultura não deve ser realizado mais do que uma vez a cada 48 horas porque o tratamento com tripsina é um procedimento que induz algum stresse celular. Para estas linhas celulares a periodicidade normal foi 2 vezes por semana.

3.4 Determinação da Densidade Celular

Nos estudos que envolvem o uso de células em cultura é necessário proceder-se à determinação da densidade celular na suspensão de modo a poder preparar uma suspensão com uma densidade celular adequada ao estudo em questão. Assim sendo, a contagem do número de células viáveis foi efectuada manualmente utilizando um hemocitómetro (Câmara de Neubauer) através do método de exclusão do corante azul de tripano.

Para proceder à contagem do número de células estas devem encontrar-se totalmente individualizadas. Assim, após o destacamento das células do frasco de cultura, por acção da tripsina, e ressuspensão em meio de cultura (secção 3.3), retirou-se uma amostra da suspensão celular para um micro-tubo, à qual se adicionou um determinado volume da solução de azul de tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 0,4% em PBS. Este corante permite a distinção entre células vivas e mortas, uma vez que não consegue atravessar as membranas íntegras das células vivas que apresentam cor branca. Já as células mortas, que apresentam a membrana danificada, adquirem o corante apresentando cor azul.

Seguidamente transferiu-se 10 μ L da suspensão corada para cada câmara do hemocitómetro Bright-Line (Hausser Scientific, Horsham, PA, EUA) e efectou-se a contagem das células viáveis, em cada quadrante, usando o microscópio óptico de

contraste de fase invertido Motic AE-31 (Motic Incorporation, Causeway Bay, Hong Kong) com uma ampliação de 100x. O número de células viáveis por mL de suspensão é obtido através da média do número de células viáveis por quadrante, multiplicado por 10^4 e pelo factor de diluição no azul de tripano.

3.5 Cinética de Acumulação Celular do PS

A interacção dos PS com células eucarióticas depende principalmente das suas propriedades físico-químicas. A sua actividade fototóxica está dependente da sua ligação e/ou entrada nas células alvo, uma vez que as ROS têm um raio de acção muito reduzido. Com o intuito de estudar a capacidade de ligação e/ou acumulação dos diferentes PS nas duas linhas celulares em estudo procedeu-se à avaliação da suas cinéticas de acumulação intracelular dos sensibilizadores. Desta forma pretendeu-se também definir o tempo óptimo de incubação dos PS com as células, de forma a maximizar a sua acumulação nas células e assim potenciar o seu efeito fototóxico aquando da aplicação do protocolo de PDT. Para estes ensaios, foram utilizadas placas de 48 poços Costar[®] (Corning, Nova Iorque, EUA) nas quais foram distribuídas as células num volume de 250 μL de meio de cultura por poço: 50000 células por poço para as células CT26 e 80000 células por poço para as células HT-29. Seguidamente, as placas foram incubadas durante a noite a 37°C, para permitir a aderência das células. No dia seguinte, adicionaram-se às células 250 μL de uma solução de 5 μM de cada PS em meio de cultura. As células foram incubadas a 37°C durante um determinado período de tempo até 24 horas, após o qual se procedeu à avaliação da quantidade de PS ligado/internalizado pelas células. Os tempos de análise definidos foram 2, 4, 6, 14, 17, 20 e 24 horas. Para cada tempo de incubação foram utilizados 8 poços com células, após o qual se efectuaram 3 lavagens com 200 μL de PBS. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em 200 μL de tampão de lise (0.5% Triton X-100 em PBS), que se deixou actuar durante 5 minutos. Nesta fase, juntou-se o conteúdo de 4 poços num tubo, tendo ficado 2 tubos por cada tempo de incubação. De cada tubo retiraram-se 30 μl do lisado celular para quantificação de proteína, que ficou refrigerado para posterior análise no mesmo dia (ver secção 3.5.1). Adicionaram-se 2 mL de Etanol:DMSO (3:1) (VWR Chemicals, Leuven Bélgica; Merck, Darmstadt, Alemanha) ao restante lisado em cada tubo, seguido de 30 segundos de agitação em vortéx e de centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos. Depois, recolheram-se 2 mL de sobrenadante que foi analisado

num espectrofotómetro Cary Series UV-Vis-NIR Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) para determinação do espectro na gama de comprimentos de onda entre os 300 e os 800 nm, que corresponde à gama espectral relevante para a análise de porfirinas e bacterioclorinas. Os espectros obtidos foram depois analisados para se obter a absorvância correspondente à banda de absorção de luz a 420 nm para as porfirinas e 745 nm para a bacterioclorinas. A absorvância determinada nestas condições para cada composto na amostra de lisado celular será proporcional à sua concentração. No mesmo dia da análise espectrofotométrica foi também determinada a quantidade total de proteína em cada tempo de análise através do método do ácido bicinconínico (BCA) descrito na secção 3.5.1. Como a quantidade de proteína na amostra é proporcional ao número de células presentes, será possível proceder à normalização da absorvância, determinada para cada composto, em função do número de células presentes.

3.5.1 Determinação da Quantidade Total de Proteína: Método do Ácido Bicinconínico (BCA)

A quantidade de proteína em cada amostra (2 amostras por tempo de incubação) foi determinada pelo método colorimétrico do BCA (BCA Assay Kit, Sigma, St. Louis, EUA), de forma a estabelecer a relação entre a absorvância medida para cada PS e o número de células presentes. Na presença de proteínas e sob condições alcalinas, forma-se um complexo Cu^{2+} -proteína seguido pela redução de Cu^{2+} a Cu^+ . O BCA forma com o ião Cu^+ um complexo azul púrpura que apresenta um máximo de absorvância a 562 nm e é proporcional à quantidade de proteína presente ⁴³.

Para a determinação da absorvância colocaram-se numa placa de 96 poços (BD-Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA), os 30 μL do lisado celular, retirados previamente tal como referido na secção 3.5, juntamente com soluções padrão de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), nas concentrações 0, 100, 150, 400, 600 e 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para construção da curva padrão. Foram adicionados 200 μL de Reagente BCA em cada poço e de seguida a placa foi agitada durante 30 segundos no fotómetro para microplacas Multiskan EX. O reagente BCA foi preparado imediatamente antes da sua utilização através da mistura do reagente A (ácido bicinconínico) e do reagente B (4% (m/v) de sulfato de cobre II penta-hidratado) numa proporção de 50:1 (Reagente A:Reagente B). Seguidamente tampou-se a placa e

incubou-se num banho de água a 37°C durante 30 minutos, protegida da luz com papel de alumínio. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente mediu-se a absorvância a 540 nm no fotómetro para microplacas Multiskan EX..

A quantidade de proteína para cada amostra foi determinada a partir da equação da recta padrão que relaciona a Ab_{540nm} com a concentração de proteína em $\mu\text{g/mL}$ das soluções padrão de BSA.

3.6 Estudos de Toxicidade de PS em Cultura Celular

Um tratamento de PDT requer sempre a combinação simultânea de um PS e de luz com um comprimento de onda específico, na presença de oxigénio molecular. Por si só, um bom candidato a PS deverá apresentar um efeito citotóxico nas células tão baixo quanto possível. Como tal, em primeiro lugar, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade dos PS em estudo na ausência de luz e, posteriormente foram realizados estudos de fototoxicidade após irradiação.

Os compostos candidatos a PS em estudo foram três porfirinas com a designação de LUZ37, LUZ41P e LUZ62P (Luzitin, SA, Coimbra, Portugal). Como referência, também foi estudado o PS com a designação de LUZ11 (Luzitin, SA, Coimbra, Portugal), uma bacterioclorina que já se encontra numa fase de desenvolvimento clínico na empresa. A actividade biológica da LUZ11 nas linhas celulares em estudo já se encontra bem caracterizada. Como tal, a comparação dos resultados dos estudos com os novos PS permitirá aferir a reprodutibilidade dos protocolos e das técnicas utilizadas e para seleccionar as moléculas candidatas com maior potencial terapêutico para prosseguirem para as fases seguintes do desenvolvimento.

3.6.1 Toxicidade na Ausência de Luz

Para o estudo da toxicidade na ausência de luz, células 80-90% confluentes foram destacadas, contadas e distribuídas em microplacas de 96 poços (BD-Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA), com uma densidade de 3000 células por poço para as células CT26 e 8500 células por poço para as células HT-29, em 100 μL de meio de cultura. Seguidamente as placas foram incubadas durante a noite a 37°C, para as células aderirem. No dia seguinte, foram adicionados às células os PS a testar em 100 μL de meio de cultura (volume final no poço 200 μL) de modo a obter as concentrações de

incubação pretendidas. Em cada placa foram incluídos poços como controlo negativo (células com meio de cultura sem PS), de modo a definir o 100% de viabilidade celular. Também se incluíram poços de controlo da percentagem de solvente, utilizado para dissolver os PS e permitir a sua subsequente diluição em meio de cultura. Para LUZ11 utilizou-se como solvente uma mistura de propilenoglicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e etanol absoluto (VWR Chemicals, Leuven, Bélgica) [PG/EtOH (60/40, v/v)] e para os restantes PS o solvente utilizado foi dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em todos os ensaios a % total de solvente em contacto com as células foi menor ou igual a 1,25%.

Após o período de incubação na ausência de luz, definido para cada PS (ver secção 4.2), as células CT26 foram lavadas com 200 μ L de meio DMEM e as HT-29 com 200 μ L de PBS (pH 7,4), enriquecido com iões de cálcio (Ca^{2+}) e de magnésio (Mg^{2+}), para remoção do fármaco não internalizado. As células CT26 foram lavadas com meio DMEM pois verificou-se que eram mais sensíveis à lavagem com PBS, sofrendo um destacamento considerável. Depois da lavagem adicionaram-se 200 μ L de meio novo DMEM em cada poço e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Após este período de incubação, foi determinada a viabilidade celular através do ensaio de redução da resazurina (nome comercial AlamarBlue®) (ver secção 3.6.3).

3.6.2 Fototoxicidade após PDT

O procedimento para avaliação da fototoxicidade dos quatro PS foi semelhante ao descrito na secção anterior. Neste caso, após a lavagem das células para remoção do PS não internalizado foram adicionados 100 μ L de meio DMEM a cada poço e de seguida as células foram irradiadas com luz de comprimento de onda específico. Nos ensaios com LUZ11 as células foram irradiadas com luz de 748 nm com uma intensidade de 8,0 mW/cm^2 emitida por um laser de diodo acoplado a uma fibra óptica (modelo LDM750.300.CWA.L.M, Omicron-Laserage, Dudenhofen, Alemanha). Nos ensaios com LUZ37, LUZ41P e LUZ62P as células foram irradiadas com luz de 412 nm com uma intensidade de 2,2 mW/cm^2 emitida por um dispositivo de LED protótipo (propriedade de Luzitin, SA). A dose de luz utilizada em todos os ensaios foi de 1 J/cm^2 . Para estes estudos as células foram distribuídas em placas de 96 poços pretas com fundo transparente (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA) para impedir a dispersão de luz para poços adjacentes.

Após a irradiação adicionou-se 100 μL de meio DMEM a cada poço (volume total 200 μL) e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Após este período a viabilidade celular foi determinada através do ensaio de redução da resazurina (ver secção 3.6.3).

Em cada ensaio foram incluídos três controlos: a) controlo negativo (células com meio de cultura sem PS e sem irradiação); b) controlo do efeito da luz (células em meio de cultura sem PS e com irradiação); c) controlo com PS no escuro (células, meio de cultura com as três concentrações mais elevadas do PS em estudo e sem irradiação). Este último controlo permite confirmar se nenhuma das três concentrações mais elevadas usadas neste estudo, na ausência de luz, provoca algum efeito na viabilidade celular.

As gamas de concentrações de PS a testar nos estudos de fototoxicidade corresponderam a concentrações sem toxicidade significativa na ausência de luz.

3.6.3 Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio de Redução da Resazurina

Existem vários testes que permitem avaliar a viabilidade celular após um estudo de toxicidade em células em cultura. Nestes estudos, o método utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o Ensaio da Redução da Resazurina, que é dos testes mais frequentemente utilizados para este tipo de avaliação. Este é um ensaio fotométrico que avalia a actividade metabólica celular. A resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) é um reagente azul não fluorescente que por acção da enzima desidrogenase, encontrada em células metabolicamente activas, é reduzida a resorufina que é altamente fluorescente e apresenta uma coloração rosa. Esta conversão ocorre apenas em células viáveis e como tal, a quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis na amostra. A resorufina assim formada pode ser quantificada por fluorimetria (λ de excitação entre 530-570 nm e um λ de emissão entre 590-620 nm) ou por colorimetria (absorvância a 540 nm e 630 nm). Neste ensaio é muito importante garantir a ausência de qualquer tipo de contaminação, uma vez que contaminações microbianas também reduzem a resazurina a resorufina, originando falsos positivos ^[42].

Este ensaio foi realizado 24 horas após o fim do protocolo de toxicidade na ausência de luz e do protocolo de fototoxicidade após PDT. Para isso, em cada poço

aspirou-se o meio de cultura existente e adicionaram-se 200 μL de solução de resazurina (10% em meio de cultura RPMI), incubando-se durante 2 a 4 horas a 37°C.

A solução de resazurina a adicionar a cada poço foi preparada a partir de uma solução *stock* de resazurina em PBS (0,1mg/mL) por diluição em meio de cultura RPMI sem soro e sem antibiótico. O meio de cultura RPMI é constituído por RPMI-1640 e NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A solução *stock* de resazurina é constituída por resazurina sal de Sódio (Sigma-Aldrich, Louis, MO, EUA) e PBS.

Após o tempo de incubação mediu-se a absorvância de cada poço a 540 e 630 nm num fotómetro U.V./Vis. para microplacas Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Para cada condição, a percentagem de viabilidade das células tratadas relativamente ao controlo negativo (100% de viabilidade celular) foi calculada com base na equação 3.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2 \times A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1 \times A\lambda_2}{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2 \times A^\circ\lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1 \times A^\circ\lambda_2} \quad \text{(equação 3)}$$

Onde,

(ϵ_{OX}) – Coeficiente de extinção molar da resazurina

λ_1 – 540 nm

λ_2 – 630 nm

$(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1$ – 47,619 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2$ – 34,798 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

A – Absorvância dos poços tratados

A° - Absorvância dos poços controlo (não tratados)

Os valores da percentagem de viabilidade celular irão ser utilizados para construir curvas de dose-resposta para cada PS em estudo e determinar o valor da concentração que, nas condições seleccionadas, causa uma inibição de 50% na viabilidade celular (IC50). Consequentemente será possível calcular a eficiência fotossensibilizadora (EF) de cada PS nas duas linhas celulares através da seguinte equação:

$$\text{Eficiência Fotossensibilizadora} = \frac{IC50_{\text{escuro}}}{IC50_{\text{PDT}}} \quad \text{(equação 4)}$$

onde $IC50_{\text{escuro}}$ e $IC50_{\text{PDT}}$ correspondem às concentrações de PS que causam uma diminuição da viabilidade celular em 50%, na ausência de luz e após irradiação, respectivamente.

3.7 Mecanismos de Morte Celular Induzidos pela PDT

Sabe-se que os mecanismos de morte celular induzidos pela PDT são principalmente a apoptose e necrose¹. A extensão em cada uma destas vias que ocorre após a PDT depende normalmente do sensibilizador, da intensidade do protocolo de PDT e das características da célula alvo^{44,45}. Deste modo, pretendeu-se avaliar, em células CT26 e HT-29, o tipo de mecanismos de morte celular induzidos por protocolos de PDT *in vitro* com os PS que ao longo deste trabalho demonstraram ter uma maior EF.

As células foram distribuídas em microplacas de 24 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) com uma densidade celular de 80000 células por poço para as células CT26 e 100000 células por poço para as células HT-29, em 500 μL de meio. Seguidamente as placas foram incubadas durante a noite a 37°C para as células poderem aderir. Posteriormente adicionaram-se diferentes volumes das soluções dos dois PS seleccionados, e também da LUZ11, de modo a obter três concentrações finais pretendidas. As três concentrações escolhidas causam uma diminuição da viabilidade celular maior ou igual a 50% após a aplicação do protocolo PDT.

Após o período de incubação, definido para cada PS no estudo de acumulação celular, as células CT26 foram lavadas com 500 μL de meio DMEM e as HT-29 com 500 μL de PBS. Seguidamente adicionaram-se 500 μL de meio novo DMEM em cada poço e as células foram irradiadas. A irradiação foi efectuada recorrendo a dois LEDs, um para LUZ11 com um λ de 748 nm, e outro para as duas porfirinas seleccionadas com um λ de 412 nm. A dose de luz utilizada em todas as irradiações foi de $1\text{J}/\text{cm}^2$, com uma intensidade de aproximadamente $1\text{mW}/\text{cm}^2$. Após a irradiação as microplacas foram incubadas a 37°C durante 3 horas.

Findo o período de incubação as células foram observadas ao microscópio óptico CKX41 (Olympus, Tóquio, Japão) para avaliação morfológica com o objectivo de

verificar qual o mecanismo de morte celular preferencial ocorrido após a aplicação do protocolo PDT.

Para complementar a avaliação morfológicas das culturas celulares foram também utilizados dois marcadores fluorescentes de ADN, o Hoechst e o Iodeto de Propídio (PI). A marcação das células foi realizada com a adição de 5 μ L do marcador Hoechst (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após 15 a 20 minutos as células foram observadas ao microscópio com um sistema de fluorescência U-RFLT50 incorporado no microscópio (Olympus, Tóquio, Japão). Este marcador de cor azul marca os núcleos, tanto de células mortas como de células viáveis. Ao marcar de forma mais intensa a cromatina condensada em células apoptóticas, permite distingui-las das células não apoptóticas ⁴⁶.

Seguidamente adicionaram-se, às células já marcadas com Hoechst, 10 μ L de iodeto de propídio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e observou-se novamente ao microscópio com o sistema de fluorescência incorporado. O PI é um marcador vermelho que apenas penetra em células cuja membrana já não se encontre íntegra, sendo possível assim, distinguir entre células viáveis e células mortas. Este marcador apenas permite a distinção entre células viáveis e não viáveis ⁴⁶.

4. Resultados e Discussão

4.1 Descrição dos Fotosensibilizadores em Estudo

Este trabalho consistiu no estudo da actividade biológica *in vitro* de novas moléculas candidatas a PS para aplicação em PDT. Os três novos compostos em avaliação, propriedade da empresa Luzitin, SA, foram estudados em conjunto com um outro PS, a LUZ11, que já se encontra numa fase mais avançada de desenvolvimento, tendo recentemente iniciado a primeira fase de ensaios clínico em doentes com cancro avançado da cabeça e pescoço ⁵⁰. A inclusão da LUZ11 neste estudo, um PS bem caracterizado e com actividade biológica conhecida, teve como objectivo, numa primeira fase, validar a aprendizagem e correcta aplicação da metodologia experimental, e depois, servir de comparador para os novos compostos.

Por razões de confidencialidade a informação sobre as novas moléculas que pode ser apresentada nesta fase ainda é limitada. Na Tabela seguinte (Tabela 3) encontram-se indicados os códigos internos dos compostos e as suas características físico-químicas mais relevantes para o presente trabalho facultadas por Luzitin, SA.

Tabela 3 – Principais características dos compostos em estudo.

PS	Família	Peso Molecular (g/mol)	log P _{ow} [#]	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) [*]	Φ_{Δ} [§]
LUZ11	bacterioclorina	1134,15	1,90	140000 (745nm)	0,43
LUZ41P	porfirina	720,72	2,19	~ 310000 (412nm)	0,76
LUZ37		784,08	3,05		ND
LUZ62P		828,66	2,51		0,64

[#] Logaritmo do coeficiente de partição n-octanol/água.

^{*} Coeficiente de absorvidade molar em etanol.

[§] Rendimento quântico de formação de oxigénio singleto.

ND Não determinado.

4.2 Cinética de Acumulação Celular dos Fotosensibilizadores

Devido ao reduzido tempo de meia-vida das ROS, produzidas pela reacção fotodinâmica durante a PDT, os danos oxidativos que podem provocar encontram-se muito limitados no espaço. Assim, para que as células alvo sejam destruídas pela PDT é necessário que os PS tenham capacidade para se ligar e/ou entrar nas células. Antes de iniciar os estudos de toxicidade e fototoxicidade dos compostos nas linhas celulares em cultura é necessário avaliar a sua capacidade de interacção com as células. Para isso, procedeu-se à avaliação da cinética de acumulação celular dos PS ao longo de 24h de incubação com células CT26 e HT-29. Este estudo permitiu determinar o tempo de incubação, de cada PS com ambas as linhas celulares, de modo a maximizar a sua acumulação nas células. Estes tempos de incubação foram depois os aplicados nos protocolos de toxicidade e fototoxicidade dos PS *in vitro*.

Os gráficos representados nas Figura 14 e Figura 15 apresentam os resultados relativos à cinética de acumulação dos PS em células HT-29 e CT26, respectivamente.

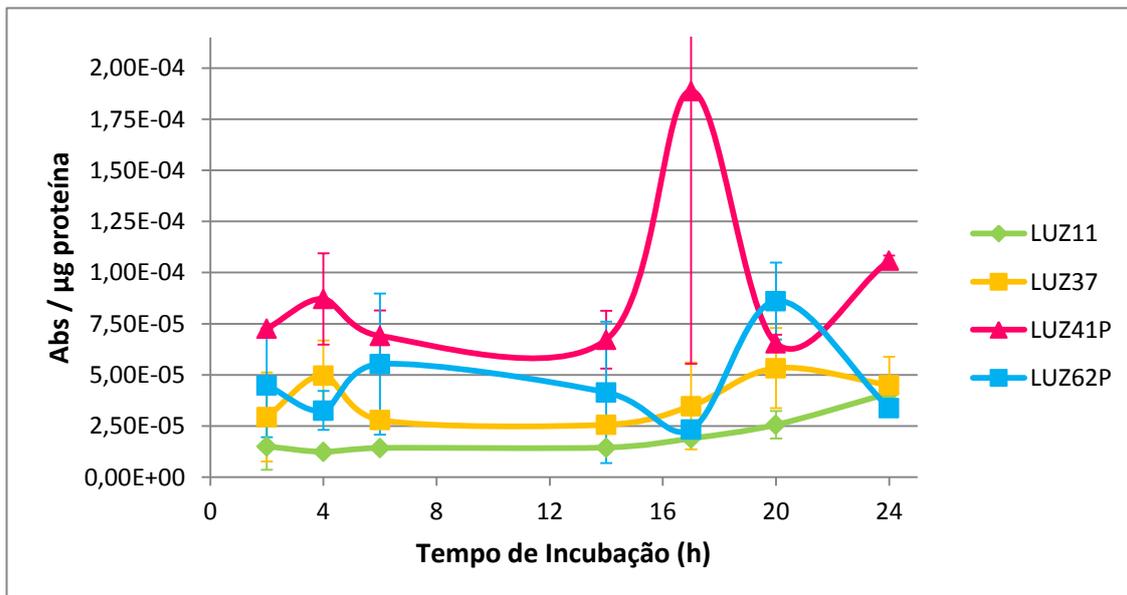


Figura 14 – Acumulação de LUZ11, LUZ37, LUZ41P e LUZ62P em células HT-29 ao longo de 24 horas. Os resultados encontram-se expressos como média \pm desvio padrão, com $n \geq 2$. Os tempos de incubação analisados foram de 2, 4, 6, 14, 17, 20 e 24 horas.

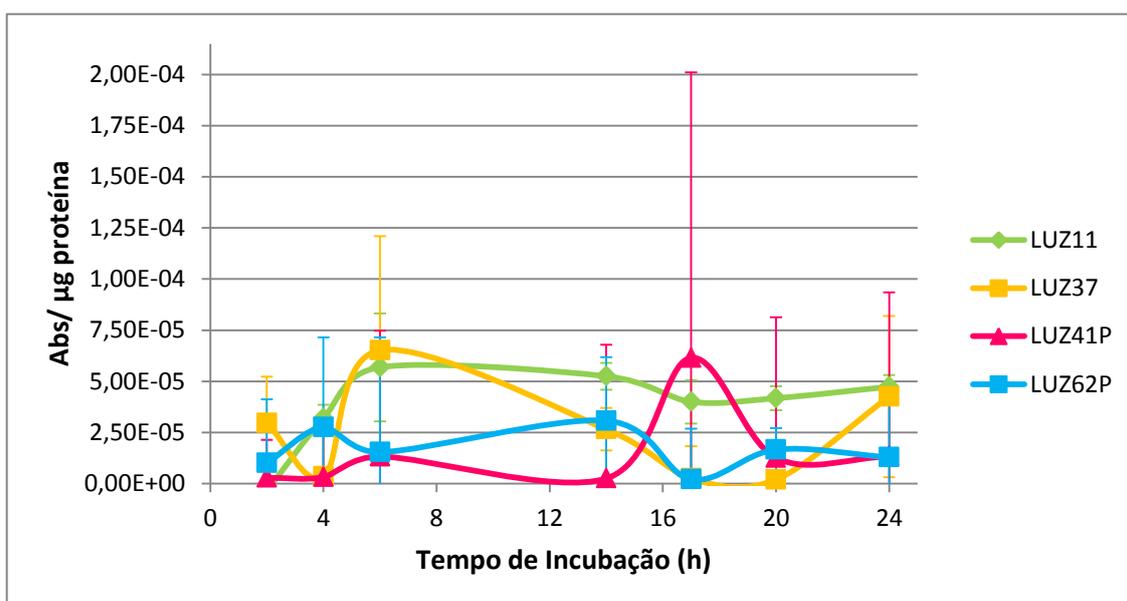


Figura 15 - Acumulação de LUZ11, LUZ37, LUZ41P e LUZ62P em células CT26 ao longo de 24 horas. Os resultados encontram-se expressos como média \pm desvio padrão, com $n \geq 2$. Os tempos de incubação analisados foram de 2, 4, 6, 14, 17, 20 e 24 horas.

Os resultados encontram-se expressos em unidades de absorvância, proporcional à concentração de PS presente na amostra, normalizada pela quantidade de proteína em μg . Desta forma temos apenas a informação da cinética de acumulação celular de cada

PS ao longo do tempo, não sendo possível desta forma concluir qual o PS que mais se acumula nas células, em termos da concentração. Para que isso fosse possível seria necessário determinar curvas de calibração, com a absorvância de cada PS em função da sua concentração, mas tal não se considerou necessário, uma vez que a performance de cada composto será directamente avaliada nos estudos de toxicidade (secção 4.3).

Através da análise da Figura 14 observa-se que a LUZ11 apresenta uma maior acumulação em células HT-29 ao fim das 24 horas de incubação. Este resultado é concordante com resultados obtidos anteriormente para este PS. Nesta linha celular verifica-se ainda que para as LUZ37 e LUZ62P há uma maior acumulação intracelular às 20h, apesar de existir um pico ao fim de 4 horas de incubação para LUZ37 e um pico ao fim de 6 horas de incubação para LUZ62P. De todos, a LUZ41P é o que apresenta um tempo de incubação mais curto, atingindo o máximo às 17 horas.

Relativamente às células CT26 observa-se através da Figura 15 que, com excepção da LUZ41P, a acumulação dos restantes PS não segue uma tendência muito clara, verificando-se flutuações acentuadas ao longo do tempo. Tais flutuações poderão ser justificadas pela variabilidade experimental provocada pelo frequente destacamento, durante as lavagens com PBS, de células CT26 que depois se perderam. Ainda assim, é possível que a LUZ11 atinja o máximo de acumulação após 6h de incubação, mantendo-se depois relativamente constante até às 17h, após as quais mostra alguma diminuição, voltando a aumentar ligeiramente até ao final do ensaio. Apesar deste comportamento e tendo em conta os resultados obtidos nas células HT-29 e outros resultados anteriormente obtidos definiu-se o tempo de incubação de 24h para a LUZ11 nas células CT26, já que ao fim desse tempo o valor de absorvância/ μg proteína não é muito inferior ao verificado às 6h. Na acumulação de LUZ37 e de LUZ62P observam-se 3 picos para diferentes tempos de incubação: 2, 6 e 24h para o primeiro e 4, 14 e 20h para o segundo. Não sendo possível mais uma vez justificar com certeza estas flutuações na acumulação destes PS em células CT26, estas poderão estar relacionadas com uma excessiva variabilidade experimental associada ao problema do destacamento destas células durante as lavagens, já referido anteriormente, e que a normalização dos resultados pela quantidade de proteína não foi capaz de atenuar. Esta variabilidade nos ensaios com esta linha celular traduziu-se num desvio padrão, calculado para os diferentes tempos de incubação, que é notoriamente maior do que nos ensaios com células HT-29. Para estes PS, e tendo em conta os restantes dados, foram seleccionados os tempos mais longos como os óptimos para os ensaios de toxicidade das células (24h

para a LUZ37 e 20h para a LUZ62P). Por fim, para a LUZ41P verifica-se claramente, apesar dos elevados valores de desvio padrão, que o tempo de incubação necessário para atingir o máximo de acumulação nesta linha celular também é de 17 horas.

Resumindo, para os PS LUZ41P, LUZ62P e LUZ11, foram definidos os mesmos tempos de incubação para as duas linhas celulares, 17, 20 e 24 horas, respectivamente. Apenas para o PS LUZ37 se definiu um tempo de incubação diferente para cada linha celular, ou seja, 20 horas para as células HT-29 e 24 horas para as CT26.

A cinética e extensão da acumulação celular de compostos em solução dependem de vários factores, muitos deles relacionados com as propriedades físico-químicas das moléculas, como o peso molecular, a polaridade, ou a tendência para a auto-agregação em solução. A polaridade dos compostos foi anteriormente caracterizada através da determinação dos respectivos logaritmos do coeficiente de partição octanol-água ($\log P_{ow}$). Este define-se pela razão da concentração de um composto dissolvido e, em equilíbrio, num sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, neste caso, octanol e água. Desta forma, compostos mais polares, que se dissolvem mais na fase aquosa, apresentam valores de $\log P_{ow} < 0$, enquanto compostos mais apolares, que se dissolvem mais na fase orgânica, apresentam valores de $\log P_{ow} > 0$ ^{47,48}. Neste estudo de acumulação de PS em células comparando os valores de $\log P_{ow}$ determinados para LUZ11, LUZ41P, LUZ62P e LUZ37 (1,90, 2,19, 2,51 e 3,05 respectivamente) e considerando os tempos de acumulação definidos para cada PS, verifica-se que os resultados são pouco coerentes com a ordem de polaridade dos compostos. Previsivelmente, um composto de menor peso molecular e com características apolares terá maior facilidade em interagir e difundir-se através da membrana celular do que um composto maior e/ou mais polar^{5,24}. Dos compostos testados a LUZ11 é o que mais se aproxima desta previsão, pois apresenta maior peso molecular e maior polaridade, como tal é o que necessita de mais tempo para se acumular nas células em cultura. Relativamente às porfirinas testadas, o seu comportamento é mais difícil de justificar, pois apresentam pesos moleculares relativamente próximos e os tempos de acumulação definidos não seguem a ordem de polaridade. Das três porfirinas, a LUZ37 é a menos polar e a LUZ41P a mais polar. No entanto, a LUZ41P apresenta um tempo de acumulação mais curto, e a LUZ37 apresenta tempos de incubação mais longos (20 e 24 horas).

A agregação dos compostos em meio aquoso é outro factor que também poderá estar a afectar a cinética de acumulação celular das porfirinas em estudo. As moléculas

de porfirina (e seus derivados) com carácter mais apolar (maiores valores $\log P_{ow}$), para além da sua reduzida solubilidade, são também conhecidos pela sua tendência para agregação em meio aquoso ⁵¹. O fenómeno de agregação ocorre quando várias moléculas dissolvidas se associam por intermédio de interacções electrostáticas. As moléculas agregadas continuam a estar dissolvidas, mas as suas propriedades físico-químicas podem ser alteradas em função do grau de agregação. O fenómeno de agregação já foi anteriormente verificado pela ocorrência de alterações espectrais de outros PS apolares após diluição em PBS. A extensão de agregação verificada para cada composto deverá influenciar negativamente a sua capacidade de acumulação celular, devido ao aumento do tamanho com a formação de agregados, o que pode explicar o maior tempo de acumulação necessário para a LUZ37, que com $\log P_{ow}$ maior poderá sofrer mais agregação, relativamente à LUZ41P.

4.3 Actividade Biológica *in vitro*

Os estudos de citotoxicidade de PS em linhas celulares em cultura constituem uma ferramenta importante para a avaliação preliminar do potencial de novas moléculas para aplicação em PDT. Estes estudos representam um primeiro “filtro” que permite seleccionar os candidatos, com base na sua actividade biológica *in vitro*, para as fases seguintes de desenvolvimento. Nesta fase o enfoque encontra-se na avaliação da toxicidade intrínseca, ou seja, na ausência de luz, e da fototoxicidade após irradiação. Estes dois parâmetros podem ser combinados para se obter a EF, que corresponde à relação entre a toxicidade e a fototoxicidade (definidas pelos respectivos IC50) nas condições experimentais definidas ⁴⁹. Nesta perspectiva um PS é tanto melhor quanto menor for a sua toxicidade no escuro e quanto maior for a toxicidade após irradiação. O valor de IC50 corresponde à concentração do composto de teste que provoca uma diminuição da viabilidade celular de 50%.

A avaliação da actividade biológica *in vitro* das três porfirinas candidatas a PS e da LUZ11 em células CT26 e HT-29 teve por base os resultados dos ensaios de toxicidade na ausência de luz e de fototoxicidade após PDT.

Na Figura 16 encontram-se representadas curvas de dose-resposta ilustrativas das experiências de toxicidade no escuro, realizadas em células CT26 (Figura 16A) e HT-29 (Figura 16B), para os quatro PS em estudo.

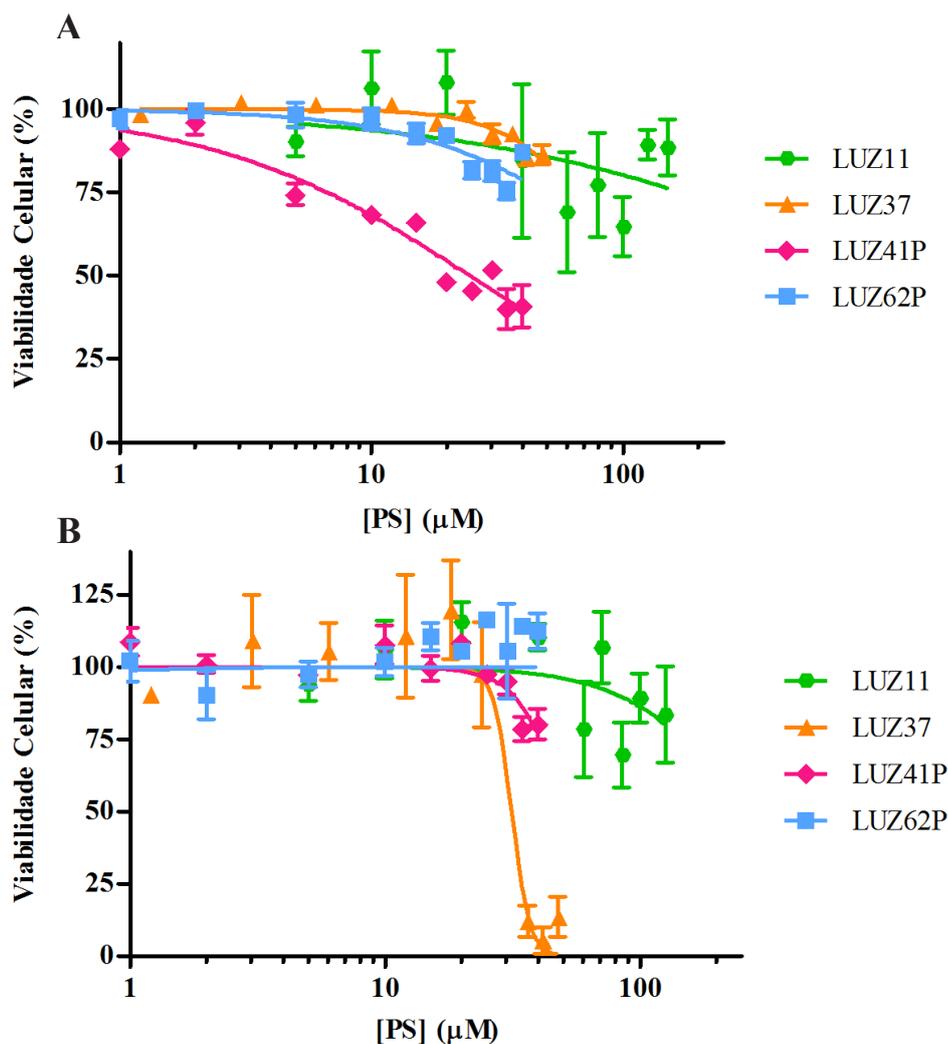


Figura 16 - Toxicidade dos PS no escuro. Curvas de dose-resposta em células CT26 (A) e HT-29 (B) obtidas após a incubação dos compostos em teste na ausência de luz. Os períodos de incubação foram: LUZ11 – 24h, LUZ37 – 20h, LUZ41P – 17h, LUZ62P – 20h, para CT26 e 24h para HT-29. Os resultados de viabilidade celular foram determinados pelo método de redução da resazurina, e calculados relativamente ao controlo negativo. Os resultados encontram-se expressos em média \pm desvio padrão, com $n \geq 3$.

A análise dos resultados de toxicidade na ausência de luz em células CT26 mostra que, na gama de concentrações testada, apenas a LUZ41P origina uma diminuição significativa da viabilidade celular após 24h de incubação, apresentando um IC_{50} de $23,6 \pm 7,9 \mu\text{M}$. Para os outros PS não foi possível testar concentrações mais elevadas devido a limitações de solubilidade em meio aquoso. Por esse motivo, apenas foi possível estimar o valor de IC_{50} a partir da extrapolação da curva de regressão não-linear, para a LUZ37 e para a LUZ62P (Tabela 4). Para a LUZ11 apenas se pode dizer

que o seu IC50 é superior a 150 μM , uma vez que esta foi a concentração mais alta testada.

Relativamente à toxicidade no escuro em células HT-29, a LUZ37 foi o PS que revelou maior toxicidade, apresentando um IC50 de $31,8 \pm 3,6 \mu\text{M}$. A LUZ41P nas concentrações mais elevadas já apresenta alguma toxicidade, mas não o suficiente para reduzir a viabilidade em 50%. Ainda assim, foi possível estimar um IC50 de $50,4 \pm 8,4 \mu\text{M}$, por extrapolação da curva de regressão não-linear. Relativamente à LUZ62P e LUZ11, ambas as moléculas não revelaram toxicidade significativa na gama de concentrações testada. De referir que os resultados obtidos para a LUZ11 são concordantes com os estudos anteriormente realizados.

Tendo em conta as características do PS ideal, este não deve apresentar toxicidade significativa na ausência luz^{1,6,7,15,24}. Sendo assim, há que ter atenção aos resultados de toxicidade da LUZ37 em células HT-29 e da LUZ41P em células CT26, que podem condicionar a sua aplicação em PDT, uma vez que nestas condições apresentam alguma toxicidade no escuro.

Após a avaliação da toxicidade de cada PS na ausência de luz foram definidas as gamas de concentrações para os estudos de fototoxicidade após irradiação. O critério foi identificar intervalos de concentrações que nos ensaios no escuro não apresentaram toxicidade significativa. A Figura 17 apresenta as curvas de dose-resposta ilustrativas das experiências de fototoxicidade realizadas em células CT26 (Figura 17A) e HT-29 (Figura 17B) com os quatro PS em estudo.

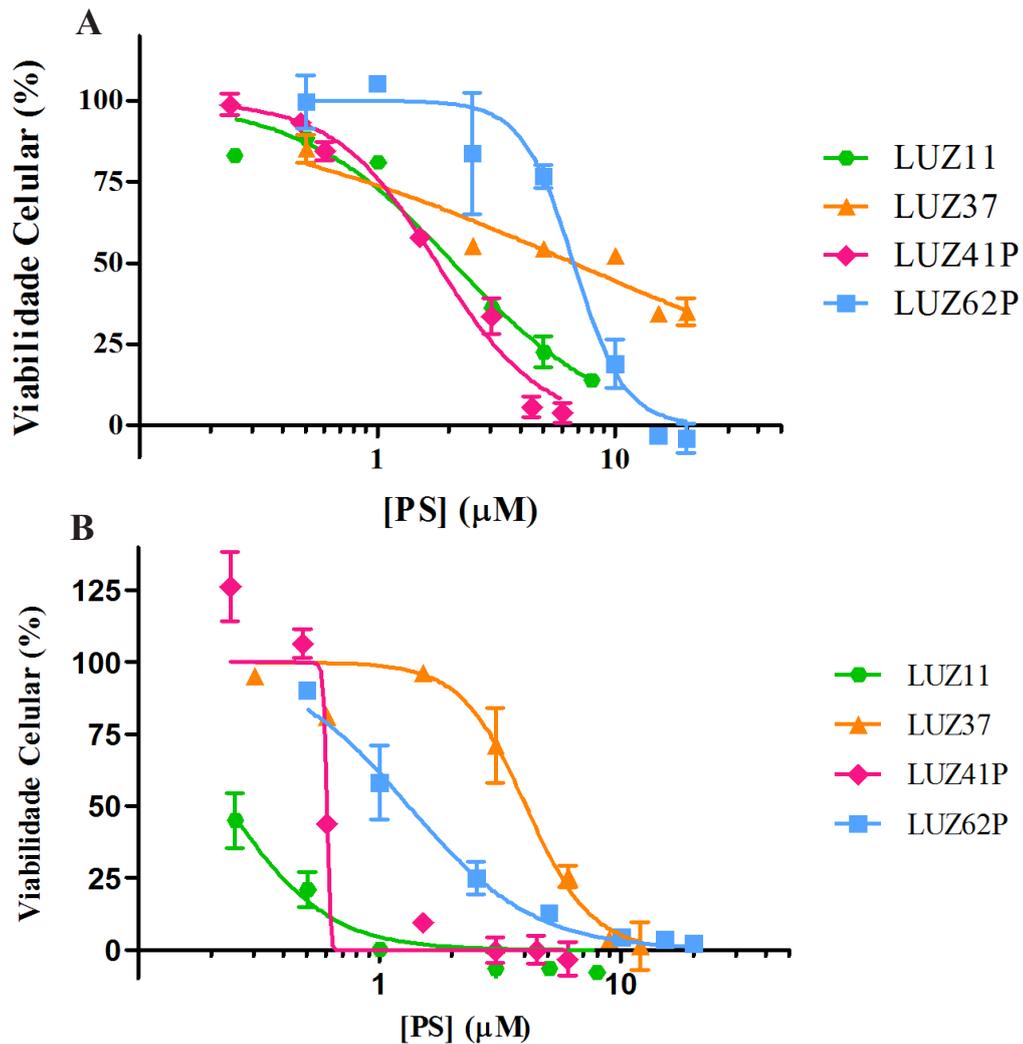


Figura 17 - Fototoxicidade após irradiação. Curvas de dose-resposta em células CT26 (A) e HT-29 (B). Os períodos de incubação dos compostos em teste na ausência de luz foram: LUZ11 – 24h, LUZ37 – 20h, LUZ41P – 17h, LUZ62P – 20h, para CT26 e para HT-29. Após a incubação as células foram irradiadas com luz de λ específico (dose de luz 1 J/cm^2). Os resultados de viabilidade celular foram determinados 24h após a irradiação pelo método de redução da resazurina, e calculados relativamente ao controlo negativo. Os resultados encontram-se expressos em média \pm desvio padrão, com $n=3$.

Através da análise dos resultados apresentados na Figura 17 verifica-se que para os quatro PS, o efeito fotodinâmico, traduzido pela diminuição da viabilidade celular, para uma dose de luz constante, é dependente da concentração de PS. Estes resultados são concordantes com resultados obtidos por vários autores, mostrando efectivamente um efeito de dose-resposta no efeito fotodinâmico *in vitro* de vários PS ^{5,49}.

Nas Tabela 4 Tabela 5 encontram-se sistematizados os valores de IC50, determinados a partir dos resultados de viabilidade celular obtidos na ausência de luz e

após irradiação, para cada um dos PS, em cada linha celular. A partir destes valores foi calculada a EF, dada pelo quociente entre o $IC50_{\text{escuro}}$ e o $IC50_{\text{PDT}}$.

Tabela 4 - Resultados de toxicidade no escuro e fototoxicidade após irradiação para os PS em estudo na linha celular CT26 e respectivos valores de EF. Os valores de $IC50$ foram calculados por regressão não-linear utilizando o *software* GraphPad Prism e encontram-se expressos como média \pm desvio padrão. A EF foi calculada pelo quociente entre o $IC50_{\text{escuro}}$ e o $IC50_{\text{PDT}}$.

CT26	LUZ11	LUZ37	LUZ41P	LUZ62P
$IC50_{\text{escuro}}$ (μM)	> 150	98,5*	23,6 \pm 7,9	146,7* \pm 32,0
$IC50_{\text{PDT}}$ (μM)	1,7 \pm 0,8	6,8	2,1 \pm 1,5	6,6 \pm 0,1
EF	> 89	15	11	22

* valores calculados por extrapolação da curva de regressão não-linear.

Tabela 5 - Resultados de toxicidade no escuro e fototoxicidade após irradiação para os PS em estudo na linha celular HT-29 e respectivos valores de EF. Os valores de $IC50$ foram calculados por regressão não-linear utilizando o *software* GraphPad Prism e encontram-se expressos como média \pm desvio padrão. A EF foi calculada pelo quociente entre o $IC50_{\text{escuro}}$ e o $IC50_{\text{PDT}}$.

HT-29	LUZ11	LUZ37	LUZ41P	LUZ62P
$IC50_{\text{escuro}}$ (μM)	> 150	31,8 \pm 3,6	50,4* \pm 8,4	> 40
$IC50_{\text{PDT}}$ (μM)	0,3 \pm 0,3	3,1 \pm 0,9	0,8 \pm 0,5	10,3 \pm 0,5
EF	> 562	10	63	> 3,9

* valores calculados por extrapolação da curva de regressão não-linear.

Os resultados mostram que, nas condições testadas a LUZ11 e a LUZ41P são os compostos com maior fototoxicidade em ambas as linhas celulares, sendo que o efeito é superior nas HT-29 para os dois compostos. Em termos de EF observa-se que a LUZ11 é claramente o PS com melhor perfil para PDT, pois apresenta uma baixa toxicidade no escuro, associada a uma alta fototoxicidade. Os resultados obtidos para a LUZ11 são muito concordantes com os estudos anteriormente realizados.

Comparando os resultados obtidos para as três porfirinas candidatas a PS, verifica-se que a LUZ62P é a que apresenta a maior EF em células CT26, beneficiando de uma menor toxicidade no escuro. Segue-se a LUZ37 e depois a LUZ41P, que apesar de apresentar maior toxicidade no escuro, também é a que origina um efeito fotodinâmico maior após irradiação.

Nas células HT-29 observa-se que, das três porfirinas, a LUZ41P é a que apresenta uma maior EF. Segue-se a LUZ37 com uma EF de 10,36. Nesta linha celular não foi possível determinar o valor de $IC_{50_{escuro}}$ para a LUZ62P. No entanto, tendo em conta o seu elevado valor de $IC_{50_{PDT}}$ (10,25 μ M) dificilmente se aproximará da LUZ41P em termos EF.

4.4 Mecanismos de Morte Celular Induzidos pela PDT

A avaliação da fototoxicidade dos compostos, após aplicação do protocolo de PDT, demonstrou que todos eles possuem actividade fotodinâmica, ou fototoxicidade, em concentrações que, na ausência de luz, não têm efeito na viabilidade celular. A morte celular por acção da PDT pode ocorrer principalmente através apoptose e/ou necrose. O contributo de cada um destes mecanismos de morte celular para o efeito final da PDT depende do tipo de tumor, das características do PS e dos múltiplos factores que definem o protocolo de tratamento ³.

Este estudo teve como objectivo avaliar quais os mecanismos de morte celular induzidos pelos PS em estudo após PDT, nas linhas celulares CT26 e HT-29. A avaliação dos mecanismos de morte celular teve por base a análise morfológica das células ao microscópio, conjuntamente com a utilização de marcadores de ADN, Hoechst e PI. O marcador Hoechst apresenta cor azul e marca os núcleos de todas as células, viáveis e mortas. É utilizado na detecção de células apoptóticas, já que este corante marca a cromatina condensada de forma mais brilhante, permitindo distinguir células apoptóticas das restantes. O PI é um marcador vermelho que apenas marca células que perderam a sua integridade membranar, permitindo assim a distinção entre células viáveis e não viáveis ⁴⁶.

Para este estudo foram seleccionados os PS que apresentaram maior eficiência fotossensibilizadora: LUZ41P, LUZ62P e LUZ11. Os resultados encontram-se apresentados nas Figura 18 a Figura 23.

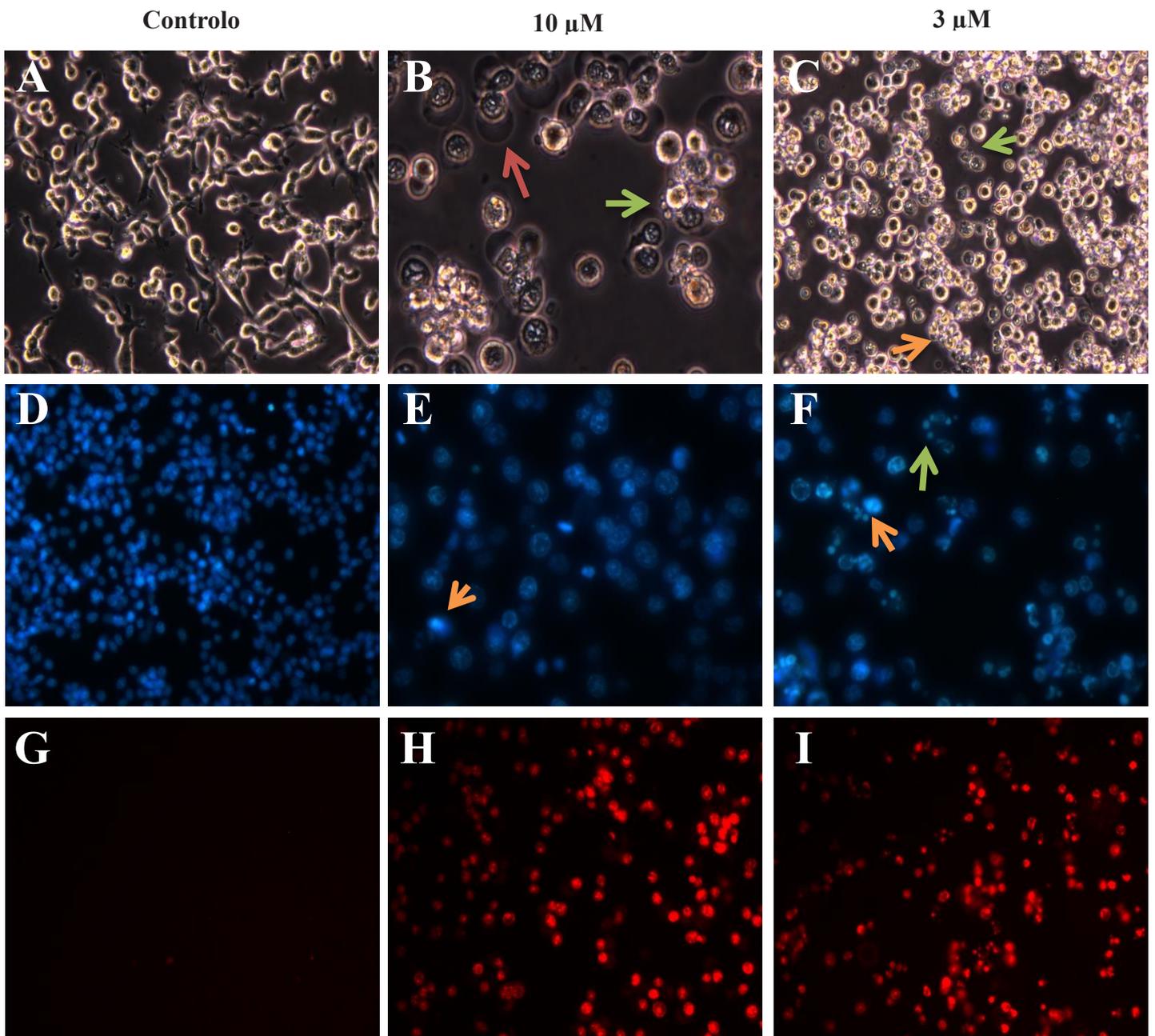


Figura 18 – Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ11 em células CT26. Imagens da morfologia de células não tratadas – Controlo – (A) e após tratamento com 10 μ M (B) e 3 μ M (C) de LUZ11. Nas mesmas condições, células marcadas com Hoechst (D, E, F) e PI (G, H, I). Nas imagens B, D e F a ampliação é de 40x e nas restantes 20x. Seta verde - corpos apoptóticos; seta vermelha - citoplasma translúcido (indicador de necrose); seta laranja - condensação de cromatina.

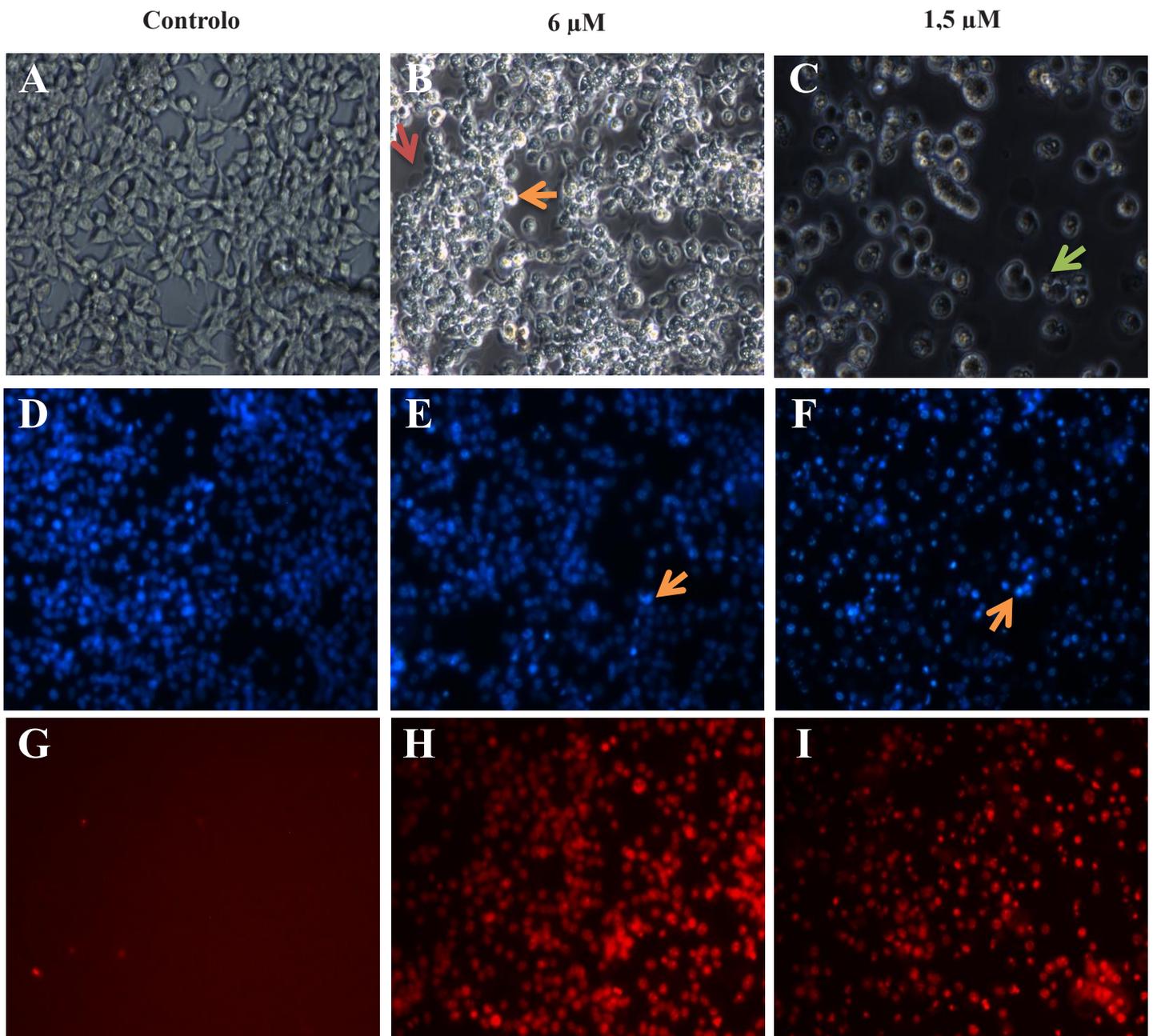


Figura 19 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ41P em células CT26. Imagens da morfologia de células não tratadas – Controlo – (A) e após tratamento com 6 μM (B) e 1,5 μM (C) de LUZ41P. Nas mesmas condições, células marcadas com Hoechst (D, E, F) e PI (G, H, I). Na imagem C a ampliação é de 40x e nas restantes 20x. Seta verde - corpos apoptóticos; seta vermelha - citoplasma translúcido (indicador de necrose); seta laranja - condensação de cromatina.

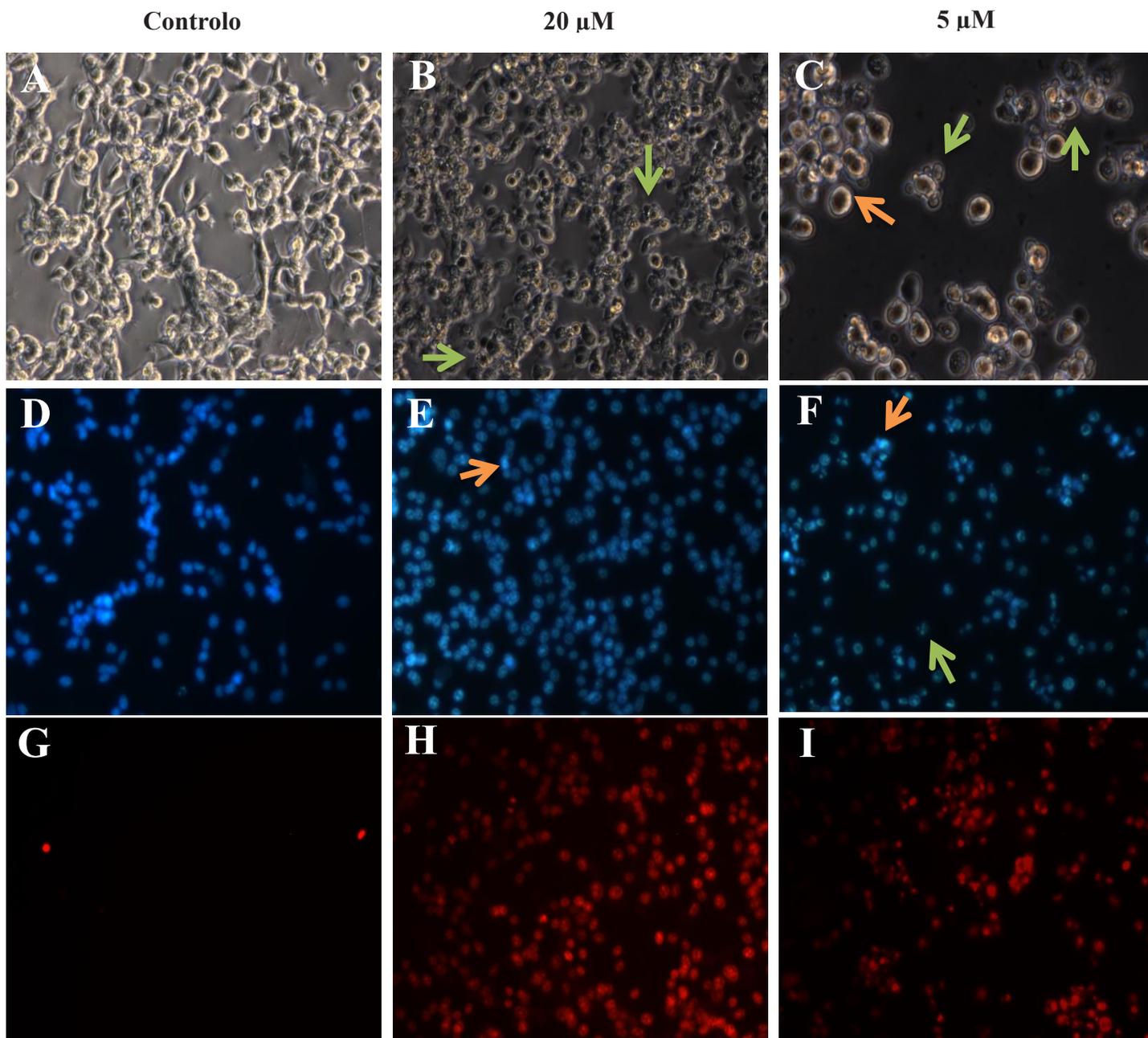


Figura 20 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ62P em células CT26. Imagens da morfologia de células não tratadas – Controlo – (A) e após tratamento com 20 μM (B) e 5 μM (C) de LUZ62P. Nas mesmas condições, células marcadas com Hoechst (D, E, F) e PI (G, H, I). Na imagem C a ampliação é de 40x e nas restantes 20x. Seta verde - corpos apoptóticos; seta laranja - condensação de cromatina.

Através da análise das Figura 18 e Figura 19 observa-se que as células CT26 3 horas após a irradiação na presença das concentrações mais elevadas de LUZ41P (6 μM) e LUZ11 (10 μM) apresentam em simultâneo os dois tipos de mecanismo de morte celular, apoptose e necrose. No entanto, quando se utilizam as concentrações mais baixas destes PS, 1,5 e 3 μM respectivamente, a morte celular ocorre apenas por apoptose. Na imagem B das Figura 18 e Figura 19 é possível verificar que as células

diminuem de tamanho, apresentando-se numa forma redonda, sendo facilmente observável a existência de cromatina condensada e ADN fragmentado, assim como a formação de corpos apoptóticos. Quando se utiliza uma maior concentração destes PS, para além das características das células apoptóticas, observa-se ainda a existência de características de células em necrose como o inchaço da célula e o citoplasma mais translúcido. Relativamente à irradiação das células CT26 na presença de LUZ62P, verifica-se que a morte celular se dá exclusivamente por apoptose em ambas as concentrações testadas, sendo possível observar a existência de corpos apoptóticos e alterações na morfologia das células, que encolhem e ficam mais arredondadas. A coloração com PI revela a ocorrência de morte celular sendo perceptível pelas imagens que esta é mais extensa quando se utiliza a concentração mais elevada de cada PS.

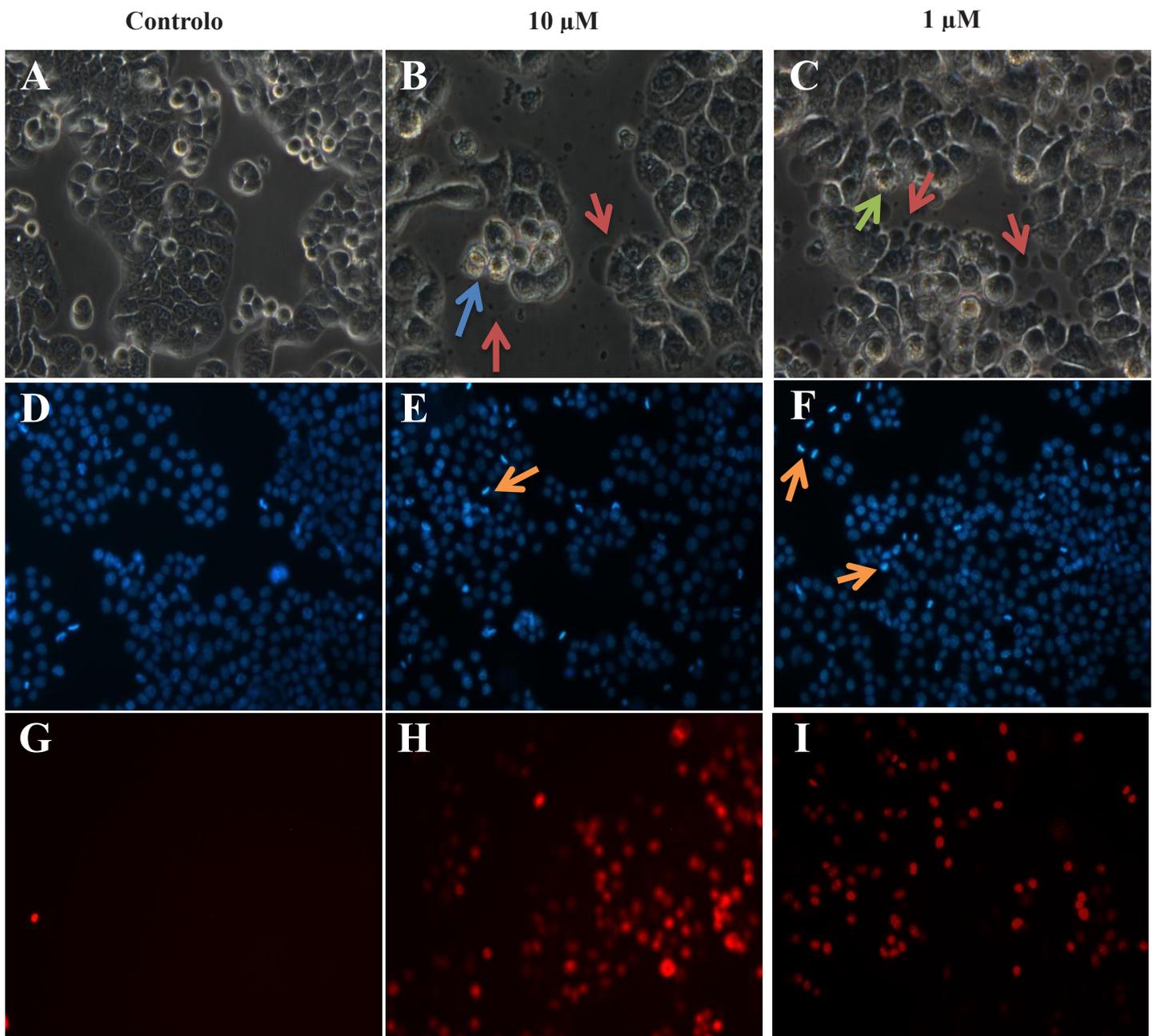


Figura 21 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ11 em células HT-29. Imagens da morfologia de células não tratadas – Controlo – (A) e após tratamento com 10 μ M (B) e 1 μ M (C) de LUZ11. Nas mesmas condições, células marcadas com Hoechst (D, E, F) e PI (G, H, I). Nas imagens B e C a ampliação é de 40x e nas restantes 20x. Seta verde - corpos apoptóticos; seta vermelha - citoplasma translúcido (indicador de necrose); seta laranja - condensação de cromatina; seta azul – células arredondadas e encolhidas (indicador de apoptose).

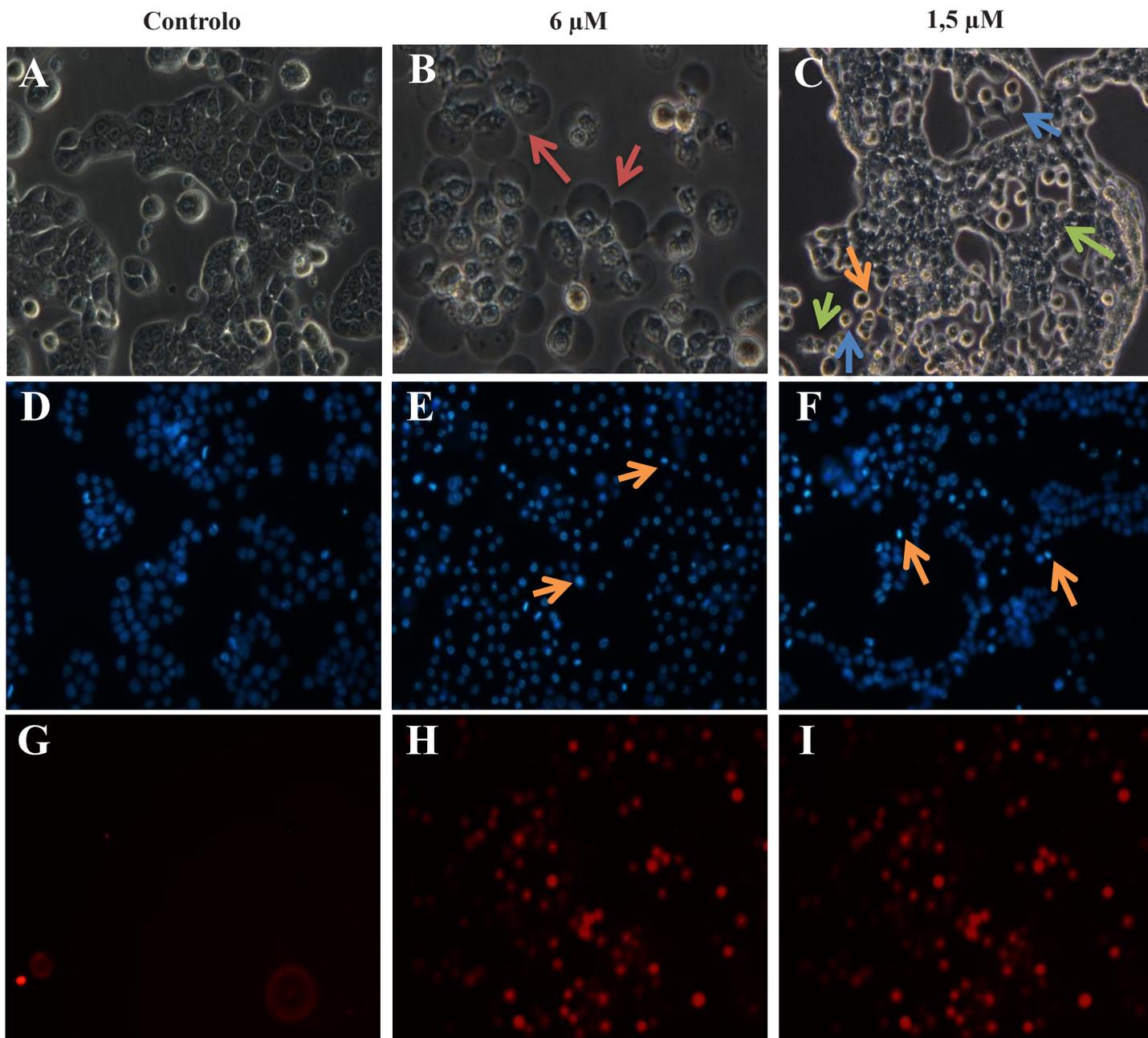


Figura 22 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ41P em células HT-29. Imagens da morfologia de células não tratadas – Controlo – (A) e após tratamento com 6 μM (B) e 1,5 μM (C) de LUZ41P. Nas mesmas condições, células marcadas com Hoechst (D, E, F) e PI (G, H, I). Na imagem B a ampliação é de 40x e nas restantes 20x. Seta verde - corpos apoptóticos; seta vermelha - citoplasma translúcido (indicador de necrose); seta laranja - condensação de cromatina; seta azul – células arredondadas e encolhidas (indicador de apoptose).

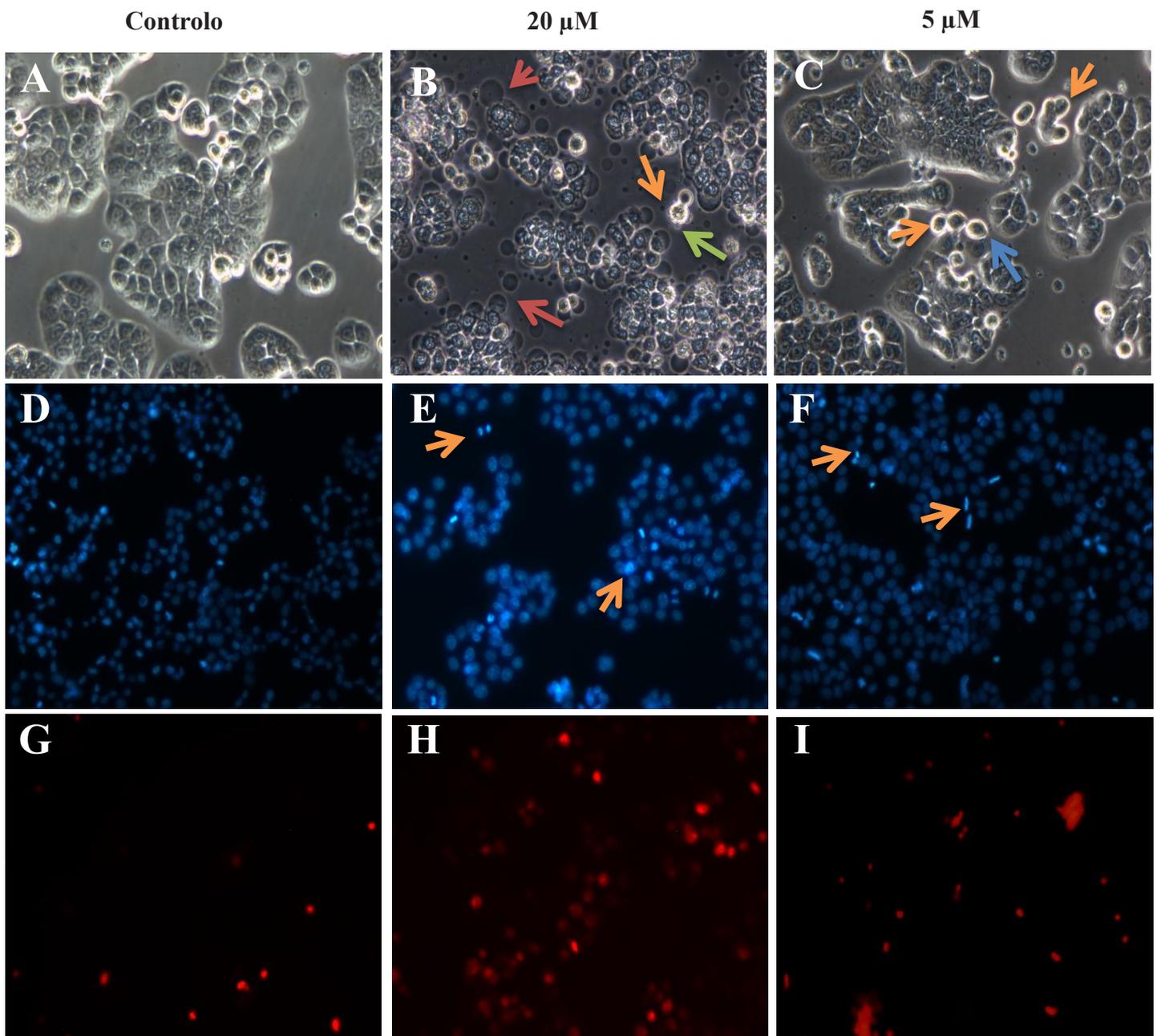


Figura 23 - Avaliação do tipo de morte celular 3 horas após PDT com LUZ62P em células HT-29. Imagens da morfologia de células não tratadas – Controlo – (A) e após tratamento com 20 μ M (B) e 5 μ M (C) de LUZ62P. Nas mesmas condições, células marcadas com Hoechst (D, E, F) e PI (G, H, I). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 20x. Seta verde - corpos apoptóticos; seta vermelha - citoplasma translúcido (indicador de necrose); seta laranja - condensação de cromatina; seta azul – células arredondadas e encolhidas (indicador de apoptose).

Ao analisar os resultados obtidos após a aplicação do protocolo PDT para as células HT-29 verifica-se que, nas células tratadas com a concentração mais alta de

LUZ41P (6 μM) e LUZ62P (20 μM) a morte celular por necrose é o mecanismo predominante. Quando se utilizam as menores concentrações destes dois PS a morte celular ocorre predominantemente por apoptose, verificando-se a formação de corpos apoptóticos e condensação da cromatina. Constata-se ainda que com a concentração de 20 μM de LUZ62P também se verificam processos apoptóticos. Utilizando a concentração mais baixa de LUZ62P, 5 μM , observa-se a possível morte celular por apoptose, caracterizada pela forma mais arredondada das células, no entanto, na imagem da marcação com PI observa-se uma baixa morte celular. Isto poderá indiciar algum problema experimental durante a irradiação das células que tenha resultado numa diminuição da morte celular. Ao utilizar o PS LUZ11 nesta linha celular, observa-se uma mistura de células apoptóticas e necróticas quando se utilizam as duas concentrações de LUZ11, 10 μM e 1 μM . No entanto, quando as células são tratadas com a concentração de 1 μM é encontrado um maior número de células em necrose, o que é o oposto ao que acontece nas células CT26, onde se observa mais morte celular por apoptose na concentração de 1 μM . Este resultado de LUZ11 em células HT-29, vem na direcção contrária a alguns estudos que mostraram que quanto mais intenso for o protocolo de PDT aplicado (doses de PS e/ou de luz mais elevadas) maior a extensão de morte celular por necrose, enquanto para protocolos de menor intensidade as células tendem a morrer por apoptose ³. Esta aparente discrepância poderá ser justificada pela multiplicidade de factores que se conjugam para conduzir ao resultado final da PDT e que já foram referidos. Para ter uma visão mais rigorosa do tipo de protocolo de PDT que favoreceria mais um mecanismo de morte celular do que o outro seria necessário um estudo mais aprofundado, que para além de diferentes doses de PS avaliasse o efeito de diferentes doses de luz.

Este estudo permitiu avaliar quais os efeitos da aplicação da PDT ao nível celular. Verificou-se uma boa correlação destes resultados e dos resultados dos ensaios de fototoxicidade, em termos da ocorrência de morte celular e do efeito dose-resposta. Relativamente aos mecanismos de morte celular observou-se que, com excepção da LUZ62P em células CT26, os PS testados são capazes de induzir os dois tipos de morte celular. A tendência global é que nas concentrações mais baixas ocorre maioritariamente morte celular por apoptose, enquanto para as concentrações mais altas se observam os dois mecanismos em simultâneo. Esta observação vai assim de encontro ao que se defende relativamente à intensidade dos protocolos de PDT e a sua relação com o mecanismo de morte celular predominante, ou seja, protocolos menos agressivos

tendem a favorecer a morte celular por apoptose, enquanto os mais agressivos tendem a favorecer a morte celular por necrose.

5. Conclusões

Este projecto teve como principal objectivo avaliar a actividade biológica *in vitro* de três novas moléculas candidatas a PS, da família das porfirinas, de modo a identificar as moléculas com as melhores características e com maior potencial terapêutico para prosseguirem para a fase seguinte de desenvolvimento farmacêutico.

Os resultados dos ensaios para avaliação da acumulação celular dos compostos mostraram que todos demonstram capacidade para interagirem com as linhas celulares em cultura, sendo que a extensão da acumulação celular parecer variar em função do tempo de incubação. Nos ensaios em células CT26, houve maior dificuldade na identificação do tempo de incubação óptimo, uma vez que estas sofrem um destacamento considerável durante as lavagens com PBS, o que originou uma considerável variabilidade experimental. Ainda assim, foi possível definir os tempos de incubação que maximizam a acumulação celular para cada PS em cada linha celular, não havendo diferenças no tempo de incubação de cada compostos entre as duas linhas celulares, com excepção da LUZ37. Na interpretação dos resultados destes ensaios, verificou-se que a LUZ11 é o que apresenta o comportamento mais próximo com o teoricamente previsto, tendo em consideração o peso molecular e a polaridade. Quanto às três porfirinas, a sua cinética de acumulação é mais difícil de explicar, mas tal poderá dever-se ao facto de sofrerem fenómenos de agregação em meio aquoso devido ao seu carácter mais apolar, o que se sobreporia às restantes propriedades no que diz respeito a velocidade de acumulação celular.

Na etapa seguinte do projecto, foram avaliadas a toxicidade na ausência de luz e a fototoxicidade após a aplicação do protocolo PDT para os quatro PS. Os resultados mostraram que todos demonstraram um efeito fotodinâmico dependente da dose, numa gama de concentrações que na ausência de luz não apresentam qualquer toxicidade. Comparando os quatro PS em termos de EF, verifica-se que a bacterioclorina LUZ11 apresenta de longe o melhor resultado. Na comparação da actividade fotodinâmica das três porfirinas em estudo, o composto que globalmente apresenta melhores resultados nestas condições é a LUZ41P. Para esta avaliação pesa mais os resultados na linha celular humana HT-29, uma vez que será mais representativa da situação clínica.

A diferença verificada entre as duas famílias de moléculas era previsível, na medida em que as bacterioclorinas nestas condições tem uma grande vantagem, que advém da forte absorção de luz a λ mais longos, onde os tecidos biológicos, neste caso o meio de cultura, são mais “transparentes”. Esta característica confere-lhes grande vantagem sobre as porfirinas, no tratamento de lesões mais profundas ⁵. No entanto, existem indicações terapêuticas nas quais a vantagem está do lado das porfirinas. Estas apresentam tendencialmente maior estabilidade química e maior fotoestabilidade (mais resistentes à irradiação) do que as bacterioclorinas, o que pode significar melhor estabilidade em armazenamento e necessidade de menor concentração no tecido alvo, respectivamente. Para além disso, como ilustrado na Tabela 3, as porfirinas apresentam normalmente maiores rendimentos de formação de $^1\text{O}_2$. O facto de absorverem luz a λ mais curtos, com pouca capacidade de penetração nos tecidos, torna-as melhores candidatas para aplicação em tratamentos de PDT de lesões superficiais, como por exemplo em tratamentos dermatológicos, reduzindo o risco de destruição de tecido saudável em zonas mais profundas.

Em relação ao estudo dos mecanismos de morte celular induzidos por estes PS após aplicação de PDT, foi possível observar uma boa concordância com os ensaios de toxicidade, no que diz respeito ao seu efeito fototóxico dependente da dose. Para além disso, em termos globais foi possível confirmar que, tal como descrito na literatura para outros PS, utilizando os quatro PS em estudo é possível obter morte celular por necrose e apoptose, sendo que a utilização de maiores concentrações de PS favorece a morte celular por necrose.

Em suma, apesar destes serem estudos preliminares com vista a avaliação da actividade biológica de PS *in vitro*, poder-se-á dizer que nesta fase a porfirina LUZ41P apresenta o melhor perfil para avançar para as fases seguintes do desenvolvimento não-clínico. Nessa longa, difícil e dispendiosa etapa os principais objectivos são a demonstração da prova-de-conceito num modelo animal relevante para a indicação terapêutica alvo, e a demonstração da segurança, através de uma extensa bateria de estudos de farmacologia, metabolismo e toxicologia.

Sabendo que a taxa de sucesso no desenvolvimento de novos medicamentos é extremamente baixa, fica a esperança de que este trabalho possa representar uma pequena contribuição para o progresso da PDT e para ajudar na luta das pessoas que sofrem com cancro.

Bibliografia

- ¹ Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T.H., Girotti, A. W., Gollnick, S.O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, A., Korbek, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *A Cancer Journal for Clinicians* **61(4)**: 250-281.
- ² Agarwal, M. L., Clay, M. E., Harvey, E. J., Evans, H. H., Antunez, A. R., Oleinick, N. L. (1991). Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in LSI78Y Mouse Lymphoma Cells. *Cancer Research* **51**:5993-5996.
- ³ Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., Hamblin, M.R. (2011). Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* **3**: 2072-6694.
- ⁴ Castano, A.P., Mroz, P., Hamblin, M. R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* **6**: 535–545.
- ⁵ Dąbrowski, J. M., Arnaut, L. G., Pereira, M. M., Urbańska, K., Simões, S., Stochel, G., Cortes, L. (2012). Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: Evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy in vitro. *Free Radical Biology & Medicine* **52**: 1188–1200.
- ⁶ Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**: 279-293.
- ⁷ Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M., Stewart, F. A. (2006). Photodynamic Therapy in Oncology. *The Oncologist* **11**: 1034-1044.
- ⁸ Photodynamic Therapy - An Update. [Internet] Disponível em <<http://www.pacificderm.org/Powerpoints/THoffman.pdf>> [Consult. 3 de Dezembro 2013].

⁹ Alves, Orley Araújo - *Avaliação da eficiência do diodo emissor de luz (LED) emitindo em 460 nm associado à curcumina na fotossensibilização letal de Candida albicans e de Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Mecânica - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. Dissertação de Pós-graduação.

¹⁰ Porfirina. [Internet] Disponível em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Porfirina>> [Consult. 9 de Dezembro 2013].

¹¹ Porfirinas. [Internet] Disponível em <<http://html.rincondelvago.com/porfirinas.html>> [Consult. 9 de Dezembro 2013].

¹² Cancer. [Internet] Disponível em <<http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer#Management>> [Consult. 10 de Dezembro 2013].

¹³ Hematoporphyrin. [Internet] Disponível em <<http://en.wikipedia.org/wiki/Hematoporphyrin>> [Consult. 16 de Dezembro 2013].

¹⁴ Sanchez, Marco Aurelio Andrade - *Isolamento, estudo da atividade biológica e caracterização preliminares dos componentes majoritários do Photogem® por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível e espectrometria de massa*. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 2006. Dissertação de Mestrado.

¹⁵ Calvete, M. J. F., Gomes, A. T. P. C., Moura, N. M. M. (2009). Clorinas em Terapia Fotodinâmica – Síntese e aplicações. *Revista Virtual de Química* 1 (2): 92-103.

¹⁶ Carvalho, Eliana Filipa Anjos - *Síntese de ftalocianinas funcionalizadas com grupos sulfonamida*. Aveiro: Departamento de Química – Universidade de Aveiro, 2009. Dissertação de Mestrado.

¹⁷ Pereira, Ana Mafalda Vaz Martins - *Síntese de novos derivados tetrapirrólicos*. Aveiro: Departamento de Química – Universidade de Aveiro, 2005. Dissertação de Mestrado.

¹⁸ Sharman, W. M., Allen, C., M., van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Therapeutic focus* **4 (11)**: 505-517.

¹⁹ Aveline, B., Hasant, T., Redmond, R. W. (1994). Photophysical and Photosensitizing properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA)*. *Photochemistry and Photobiology* **59 (3)**: 328-335.

²⁰ Resumo das características do Visudyne. [Internet] Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000305/WC500052407.pdf> [Consult. 18 de Dezembro 2013].

²¹ Visudyne®. [Internet] Disponível em <<http://www.rxlist.com/visudyne-drug.htm>> [Consult. 19 de Dezembro 2013].

²² Priority NDA and BLA Approvals in 2000. [Internet] Disponível em <<http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/howdrugsaredevelopedandapproved/drugandbiologicapprovalreports/ucm051267.htm>> [Consult. 19 de Dezembro 2013].

²³ Protoporphyrin IX. [Internet] Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Protoporphyrin_IX.svg> [Consult. 19 de Dezembro 2013].

²⁴ Rossetti, Fábica Cristina – *Nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas*. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2010. Dissertação de Doutorado.

²⁵ Methyl aminolevulinate. [Internet] Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Methyl_aminolevulinate> [Consult. 20 de Dezembro 2013].

- ²⁶ Aminolevulinic acid. [Internet]. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Aminolevulinic_acid> [Consult. 20 de Dezembro 2013].
- ²⁷ Wiegell, S. R., Wulf, H.C. (2006). Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. *American Academy of Dermatology* **54** (4): 647-651.
- ²⁸ Tandon, Y. K., Yang, M. F., Baron, E. D. (2008). Role of photodynamic therapy in psoriasis: a brief review. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **24**: 222-230.
- ²⁹ National Cancer Institute. [Internet]. Disponível em <<http://www.cancer.gov/>> [Consult. 21 de Janeiro 2014].
- ³⁰ Cancer Facts and Figures 2013. [Internet]. Disponível em <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>> [Consult. 27 de Janeiro 2014].
- ³¹ American Cancer Society. [Internet] Disponível em <<http://www.cancer.org>> [Consult. 21 de Janeiro 2014].
- ³² Estádios do Cancro. [Internet]. Disponível em <<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/deteccion-diagnostico/estadificacion>> [Consult. 13 de Janeiro 2014].
- ³³ What to need you know about cancer. [Internet]. Disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/cancer/WYNTK_Cancer.pdf> [Consult. 25 de Janeiro 2014].
- ³⁴ Radiation Therapy Principles. [Internet]. Disponível em <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003019-pdf.pdf>> [Consult. 18 de Novembro 2013].
- ³⁵ Chemotherapy Principles. [Internet]. Disponível em <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002995-pdf.pdf>> [Consult. 15 de Novembro 2013].

³⁶ Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Internet]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx?country=900> [Consult. 28 de Janeiro 2014].

³⁷ Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 for all cancers. [Internet]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx> [Consult. 28 de Janeiro 2014].

³⁸ Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 in Portugal. [Internet]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx?country=620> [Consult. 28 de Janeiro 2014].

³⁹ Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology* **5**: 497-508.

⁴⁰ Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin M.R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**: 1-23.

⁴¹ Understanding Chemotherapy. [Internet]. Disponível em <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003025-pdf.pdf>> [Consult. 23 de Novembro 2013].

⁴² Resazurin Cell Viability Kit. [Internet]. Disponível em <<http://www.cellsignal.com/products/11884.html>> [Consult. 11 de Julho 2013].

⁴³ Bicinchoninic Acid Kit. [Internet] Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-quantitation/bicinchoninic-acid-kit.html>> [Consult. 08 de Julho 2014]

⁴⁴ Almeida, R.D., Manadas, B. J., Carvalho, A.P., Duarte, C.B. (2004). Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1704**: 59– 86.

- ⁴⁵ PARK, J.H., MOON, Y.H., KIM, D.J., KIM, S.A., LEE, J.B., AHN, S.G., YOON, J.H. (2010). Photodynamic therapy with hexenyl ester of 5-aminolevulinic acid induces necrotic cell death in salivary gland adenocarcinoma cells. *Oncology Reports* **24**: 177-181.
- ⁴⁶ Kit de sondas moleculares Hoechst e Iodeto de Propídeo. [Internet]. Disponível em <<http://www.lifetechnologies.com/pt/en/home.html>> [Consult. 09 de Julho 2014].
- ⁴⁷ Coeficiente de partição octanol-água. [Internet]. Disponível em <<http://www.moderna.com.br/lumis/portal/file/fileDownload.jsp?fileId=8A8A8A823721623501373850EBFE7225>> [Consult. 25 de Julho 2014].
- ⁴⁸ Coeficiente de partição octanol-água. [Internet]. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v26n3/15654.pdf>> [Consult. 25 de Julho 2014].
- ⁴⁹ Berlanda, J., Kiesslich, T., Engelhardt, V., Krammer, B., Plaetzer, K. (2010). Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **100**: 173–180.
- ⁵⁰ Informação sobre os ensaios clínicos com LUZ11. [Internet]. Disponível em <<http://clinicaltrials.gov/show/NCT02070432>> [Consult. 28 de Julho 2014].
- ⁵¹ Li, D., Li, P., Lin, H., Jiang, Z., Guo, L., Li, B. (2013). A novel chlorin-PEG-folate conjugate with higher water solubility, lower cytotoxicity, better tumor targeting and photodynamic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **127**: 28-37.
- ⁵² Saavedra, R., Rocha, L. B., Da**ç** browski, J. M., Arnaut, L.G. (2014). Modulation of Biodistribution, Pharmacokinetics, and Photosensitivity with the Delivery Vehicle of a Bacteriochlorin Photosensitizer for Photodynamic Therapy. *ChemMedChem* **9**: 390-398.
- ⁵³ Arnaut, L.G., Pereira, M. M., Da**ç** browski, J. M., Silva, E. F. F., Schaberle, F. A., Abreu, A. R., Rocha, L. B., Barsan, M. M., Urban´ ska, K., Stochel, G., Brett, C. M. A. (2014). Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge

Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chemistry A European Journal*. 20: 1-13.