

Nuno Alexandre Catalão Pina de Almeida

Terapia Fotodinâmica em combinação com Ácido Acetilsalicílico

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Bioquímica na Universidade de Coimbra, orientada pela Senhora Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Senhor Professor Doutor Rui de Albuquerque Carvalho

Julho 2016



Capa:

Imagem de um equipamento de irradiação para Terapia Fotodinâmica Ceramoptec Ceralas.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de quem a consulta conhece que os direitos de autor são pertença do autor da dissertação e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

AGRADECIMENTOS

Chegado o final de mais uma etapa da minha vida, não poderia de deixar de agradecer a todos os que contribuíram para o culminar deste momento, deixando por escrito algumas palavras de apreço e gratificação a todos aqueles que estiveram presentes ao longo desta jornada.

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Orientadora desta dissertação, a oportunidade de realizar este trabalho na sua equipa de investigação e a partilha do seu vasto conhecimento e experiência em diversas áreas, que em grande parte contribuíram para uma evolução do meu rigor científico e pensamento crítico. A sua franqueza, abertura e disponibilidade são algo a que lhe fico eternamente grato.

À Doutora Mafalda Laranjo agradeço o estímulo que me transmitiu para continuar a realizar investigação científica, caso seja possível, durante mais anos da minha vida, pois para mim é um modelo a seguir, conseguindo juntar uma elevada exigência em termos de trabalho a uma disponibilidade e paciência inigualáveis. Agradeço-lhe também eternamente, a confiança que depositou em mim durante este trabalho e todas as críticas e elogios que certamente me fizeram crescer enquanto pessoa e aprendiz de cientista.

Ao Professor Doutor Rui de Albuquerque Carvalho agradeço a disponibilidade para ter acedido a ser o meu Orientador Interno.

Ao Doutor Arménio Coimbra Serra agradeço a preparação e síntese do composto fotossensibilizador utilizado neste trabalho de investigação.

À Professora Doutora Margarida Abrantes agradeço toda a partilha de conhecimentos e experiência científica durante o mestrado, bem como as críticas construtivas e simpatia que serviram para uma melhoria em termos humanos e científicos.

À Doutora Maria João Carvalho agradeço a simpatia e boa disposição que teve para comigo durante a minha estadia no grupo de investigação, a sua ajuda na correção deste manuscrito e a possibilidade que me deu de ajudar a contribuir em partes do seu trabalho científico.

Ao Mestre João Casalta agradeço a sua ajuda preciosa na interpretação e compreensão da análise estatística e a sua disponibilidade para tal, muitas em vezes em detrimento próprio.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves agradeço a sua disponibilidade e o auxílio com os estudos de citometria de fluxo e na interpretação dos mesmos.

Ao Doutor Rui Oliveira, do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra agradeço a ajuda preciosa prestada na análise histopatológica.

À Mestre Salomé Pires agradeço a simpatia, partilha de conhecimentos científicos, de material do laboratório e por fazer os horários da sala de cultura compatíveis para todos.

À Doutora Ana Brito e à Mestre Ana Catarina Mamede agradeço a simpatia, a boa disposição e a partilha de conhecimentos científicos durante o mestrado.

Ao Doutor Fernando Mendes agradeço a constante boa disposição para alegrar toda a gente e os seus conselhos ao nível científico e pessoal.

Ao Mestre Ricardo Teixeira agradeço a partilha de conhecimento científico, ajuda em experiências e as conversas sobre a atualidade futebolística. Ao Mestre Telmo Gonçalves agradeço a partilha de conhecimento científico, ajuda em experiências e conversas sobre

temas variados. Ao Mestre João Encarnação agradeço a partilha de conhecimento científico, ajuda em experiências e boa disposição.

Ao Gonçalo Brites agradeço a constante amena cavaqueira, companheirismo de trabalho que ajudam à boa disposição diária e ajuda com experiências. À Beatriz agradeço a sua simpatia, as palavras de ordem e incentivo constante para a realização deste trabalho, bem como a ajuda com experiências. À Inês agradeço a sua simpatia, companheirismo de trabalho, incentivo para a realização deste trabalho e ajuda com experiências. À Rita Neves agradeço a sua boa disposição diária, disponibilidade, incentivo para a realização deste trabalho e ajuda com experiências. Ao Rafael agradeço a boa disposição e partilha de conhecimentos na área da Medicina. Ao Gonçalo Ferreira agradeço a boa disposição, companheirismo e conversas sobre música alternativa. A todos os restantes que passaram ou que chegaram atualmente ao serviço de Biofísica, agradeço o bom ambiente de trabalho e momentos de descontração.

Como não podia deixar de ser tenho também de agradecer a várias pessoas que tornaram este percurso académico em algo inesquecível e *que levo comigo pra vida*.

À Rita agradeço por ser uma pessoa fantástica e espero que possa passar muitos e bons momentos com ela.

À Maria João agradeço a grande amizade criada nestes anos de curso e os grandes jantares e noites de farra sempre que era possível. À Lídia agradeço também uma grande amizade, conselhos variados e jantaradas. À Raquel agradeço pela amizade e saídas noturnas. À Sofia agradeço pela amizade e pelas grandes tostas que fazia. À Filipa agradeço pela amizade e amena cavaqueira. À Paula agradeço pela amizade e boa disposição. Ao Carlos agradeço pela grande amizade, cafezadas e saídas. Ao Zé Carlos agradeço pela amizade, conversas sobre submarinos e casas flutuantes e jantaradas. Aos Malagaitas agradeço as grandes jantaradas em tempo de festas académicas. Agradeço a todas as outras pessoas que conheci durante a minha vida académica por fazerem com que venha a recordar para todo o sempre este momento da vida.

Agradeço enormemente aos meus pais por todos os valores que me transmitiram, o amor e carinho que me deram e dão e o esforço que fazem para que eu possa ter um bom futuro. Jamais poderia pedir melhores pais.

À minha irmã mais nova agradeço a sua presença e companhia, pois a minha vida seria bastante mais cinzenta sem ela.

Por fim agradeço aos meus avós e restante família por tudo o que fizeram por mim, fazendo também menção ao meu falecido avô António, que é uma das razões porque quero continuar o caminho da investigação científica, para que os doentes oncológicos possam ter uma melhor qualidade de vida, como não lhe foi possível dar.

TRABALHOS APRESENTADOS NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO

Trabalhos apresentados na forma de Comunicação Oral

1. XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia

“Terapia Fotodinâmica em combinação com ácido acetilsalicílico para o tratamento de cancro colorretal e esofágico”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Tralhão J.G., Botelho M.F., Castro-Sousa F.

Trabalho apresentado em Comunicação Oral (Autor apresentador)

3 a 5 de Março de 2016

Hotel Eurostars Oasis Plaza – Figueira da Foz

2. 5º Congresso do CIMAGO

“The synergic effect of Phodynamic Therapy and Acetylsalicylic Acid in Colorectal and Esophagus Cancer Cells”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Sarmento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

Trabalho apresentado em Comunicação Oral (Autor apresentador)

27 e 28 de Janeiro de 2016

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – Coimbra

Trabalhos apresentados em painel

1. Eleventh YES – Young European Scientist - Meeting

“The combined effect of photodynamic therapy and acetylsalicylic acid against colorectal cancer: an *in vitro* and *in vivo* study”

Almeida N., Laranjo M., Brites G., Carvalho MJ, Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Sarmento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

Trabalho aceite para apresentação

15 a 18 de Setembro de 2016

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Porto

2. EACR 24 - 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research

“Phodynamic Therapy combined with Acetylsalicylic Acid: The mechanisms involved in colon and esophagus cancer cells death”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Sarmento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

Trabalho apresentado em Painel
9 a 12 de Julho de 2016
Manchester, Inglaterra

3. EACR 24 - 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research

“The role of reactive oxygen species in photodynamic therapy combined with acetylsalicylic acid in colon and esophagus cancer cells”

Laranjo M., Almeida N., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Sarmiento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

Trabalho apresentado em Painel
9 a 12 de Julho de 2016
Manchester, Inglaterra

4. 2nd International ASPIC Congress

“The mechanism of cell death by photodynamic therapy combined with acetylsalicylic acid in colon and esophagus cancer cells”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Sarmiento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

Trabalho apresentado em Painel (Autor apresentador)
28 e 29 de Abril de 2016
IPO Porto – Porto

5. 2nd International ASPIC Congress

“Acetylsalicylic acid as a possible enhancer of reactive oxygen species and cell death in photodynamic therapy”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Sarmiento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

Trabalho apresentado em Painel (Autor apresentador)
28 e 29 de Abril de 2016
IPO Porto – Porto

6. Tenth YES – Young European Scientist - Meeting

“Combination of photodynamic therapy with acetylsalicylic acid: a possible approach to enhance treatment in human colon and esophagus cancer cells”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Botelho M.F.

Trabalho apresentado em Painel (Autor apresentador)
18 a 20 de Setembro de 2015
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Porto

Artigos publicados sob a forma de resumos em revistas com arbitragem científica

1. “Phodynamic Therapy combined with Acetylsalicylic Acid: The mechanisms involved in colon and esophagus cancer cells death”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C.; Casalta-Lopes J., Sarmento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

European Journal of Cancer Research, 2016, *In press*.

2. “The role of reactive oxygen species in phodynamic therapy combined with acetylsalicylic acid in colon and esophagus cancer cells”

Laranjo M., Almeida N., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C.; Casalta-Lopes J., Sarmento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

European Journal of Cancer Research, 2016, *In press*.

3. “Terapia Fotodinâmica em combinação com ácido acetilsalicílico para o tratamento de cancro colorretal e esofágico”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Tralhão J.G., Botelho M.F., Castro-Sousa F.

Revista Portuguesa de Cirurgia, Suplemento Março 2016, pagina 190.

4. “The synergic effect of Phodynamic Therapy and Acetylsalicylic Acid in Colorectal and Esophagus Cancer Cells”

Almeida N., Laranjo M., Serra A.C., Abrantes M., Pineiro M., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes J., Sarmento-Ribeiro A.B., Botelho M.F.

Publicado em Revista Portuguesa de Pneumologia, Março 2016, Volume 22, Issue number 2, página 1.

Prémios

Melhor comunicação oral em investigação básica e uma das 12 melhores do XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia

RESUMO E ABSTRACT

Resumo

Os cânceros do trato gastrointestinal encontram-se entre os mais comuns em termos de incidência e de mortalidade a nível mundial. Sendo acessíveis por técnicas endoscópicas a terapia fotodinâmica constitui uma possibilidade terapêutica. A terapia fotodinâmica é uma terapêutica com efeitos secundários limitados, aprovada principalmente como tratamento neoadjuvante ou adjuvante em várias patologias, com especial interesse a nível do cancro.

O ácido acetilsalicílico já demonstrou potencial anti-tumoral em diversos tipos de neoplasias *in vitro* e *in vivo*, como o cancro colorretal e esofágico, que frequentemente possuem uma elevada expressão de cicloxigenases. Também a terapia fotodinâmica está muitas vezes associada a uma elevada expressão de cicloxigenases e outros fatores pró-cancerígenos após o tratamento que podem favorecer as recidivas tumorais.

Posto isto, o objetivo principal deste estudo foi a avaliação do efeito terapêutico da associação da terapia fotodinâmica com o ácido acetilsalicílico em linhas celulares tumorais de adenocarcinoma colorretal e esofágico *in vitro* e *in vivo*.

Para a realização destes estudos recorreu-se a diversas técnicas como ensaios para a avaliação de citotoxicidade, citometria de fluxo com recurso a sondas específicas, deteção de proteínas por *western blot*, desenvolvimento de xenotransplantes em ratinhos e análise histopatológica.

A combinação entre a terapia fotodinâmica e o ácido acetilsalicílico diminuiu a atividade metabólica e a viabilidade celular de forma dependente da concentração de fotossensibilizador nas linhas celulares de adenocarcinoma colorretal e esofágico. Quanto à morte celular provocada por esta combinação verificou-se principalmente necrose nas células de adenocarcinoma colorretal e de apoptose nas células de adenocarcinoma esofágico. O ácido acetilsalicílico parece ter um efeito modulatório a nível da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio.

Em relação aos ensaios *in vivo*, a combinação entre a terapia fotodinâmica e o ácido acetilsalicílico demonstrou uma tendência para a diminuição do volume tumoral nos ratinhos tratados. Na análise histopatológica registou-se morte por necrose do tipo isquémico após o tratamento com a combinação entre a terapia fotodinâmica e o ácido acetilsalicílico.

Concluindo, com este estudo foi possível realizar uma primeira avaliação sobre o modo de atuação da combinação da terapia fotodinâmica com o ácido acetilsalicílico e o seu potencial terapêutico *in vitro* e *in vivo* para os cânceros colorretal e esofágico. Serão necessários mais estudos para confirmar se o ácido acetilsalicílico pode constituir um adjuvante na terapia fotodinâmica contra o cancro.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, ácido acetilsalicílico, adenocarcinoma colorretal, adenocarcinoma esofágico, cicloxigenases.

Abstract

Cancers of the gastrointestinal tract are located among the most common in incidence and mortality worldwide. Being accessible by endoscopic techniques photodynamic therapy is a therapeutic possibility. Photodynamic therapy is a therapeutic option with limited adverse effects, mainly used as neoadjuvant or adjuvant treatment of several diseases particularly in oncology.

Acetylsalicylic acid has already demonstrated antitumor potential *in vitro* and *in vivo* studies in several types of cancers such as colorectal, and esophageal cancer, which often have a high expression of cyclooxygenase. Also photodynamic therapy is frequently associated with a high expression of cyclooxygenases and other pro-carcinogenic factors after treatment which can promote tumor recurrence.

The main purpose of this study was to evaluate the therapeutic effect of photodynamic therapy combined with acetylsalicylic acid in tumor cell lines of colorectal and esophageal adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*.

For these studies we have used various techniques such as the evaluation of cytotoxicity, flow cytometry using specific probes, detection of proteins by western blot, development of xenografts in mice and histopathological analysis.

The combination of photodynamic therapy and acetylsalicylic acid decreased metabolic activity and cell viability in a manner dependent of photosensitizer concentration in the colorectal and esophageal adenocarcinoma cell lines of. The type of cell death caused by this combination was mainly necrosis in colorectal adenocarcinoma cells and apoptosis in esophageal adenocarcinoma cells. Acetylsalicylic acid seems to have a modulatory effect on the level of intracellular production of reactive oxygen species.

In *in vivo* assays, the combination of photodynamic therapy and acetylsalicylic acid showed a tendency to decrease tumor volume in treated mice. Histological analysis recorded ischemic necrosis after treatment with the combination of photodynamic therapy and acetylsalicylic acid.

In conclusion, with this study it was possible to make a first assessment of the outcome of the association of photodynamic therapy and acetylsalicylic acid *in vitro* and *in vivo* for the treatment of colorectal and esophageal cancers. Further studies are needed to confirm whether acetylsalicylic acid can be used as adjuvant to photodynamic therapy against cancer.

Keywords: photodynamic therapy, acetylsalicylic acid, colorectal cancer, esophageal cancer, cyclooxygenases.

ÍNDICE

Índice

1. Introdução.....	31
1.1 Cancro	31
1.2 Cancro colorretal.....	31
1.3 Cancro esofágico	33
1.4 Terapia Fotodinâmica	35
1.5 Fotofísica e Fotoquímica na Terapia Fotodinâmica	37
1.6 Fontes luminosas na Terapia Fotodinâmica	39
1.7 Fotossensibilizadores	41
1.7.1 Fotossensibilizadores de 1ª geração.....	43
1.7.2 Fotossensibilizadores de 2ª geração.....	43
1.7.3 Fotossensibilizadores de 2ª geração com aprovação clínica	43
1.7.4 Fotossensibilizadores de 3ª geração.....	47
1.8 Mecanismos de citotoxicidade da PDT	47
1.9 Ação da PDT na promoção de resposta imunitária.....	51
1.10 Aplicação clínica da PDT nos cancros colorretal e esofágico	52
2. Ácido Acetilsalicílico	54
2.1 Farmacocinética e Farmacodinâmica do Ácido Acetilsalicílico	54
2.2 Ácido Acetilsalicílico e Cancro.....	56
2.3 PDT em combinação com Ácido Acetilsalicílico	58
3. Objetivos e contextualização experimental.....	61
4. Materiais e Métodos (<i>IN VITRO</i>)	65
4.1 Culturas celulares.....	65
4.2 Soluções de Ácido Acetilsalicílico e Fotossensibilizador	65
4.3 Terapia combinada.....	66
4.4 Estudos de citotoxicidade.....	66
4.4.1 Avaliação da atividade metabólica por ensaio de redução de MTT	66
4.4.2 Avaliação da viabilidade celular por ensaio de SRB	67
4.5 Citometria de fluxo	67
4.6 Vias de morte celular	68
4.6.1 Avaliação da morte celular	68
4.6.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	69
4.6.3 Deteção da proteína 53 por western blot.....	69
4.7 Avaliação do ciclo celular	70
4.8 Stresse oxidativo	71
4.8.1 Avaliação da produção intracelular de peróxidos.....	71
4.8.2 Avaliação da produção intracelular de anião superóxido.....	71
4.8.3 Avaliação da inibição de espécies reativas de oxigénio.....	72

4.9 Defesas antioxidantes	72
4.9.1. Avaliação da produção intracelular de glutatião reduzido	72
4.9.2 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase	73
4.10 Análise estatística	73
5. Materiais e Métodos (<i>IN VIVO</i>)	74
5.1 Desenvolvimento de xenotransplantes	74
5.2 Tratamentos com PDT e AAS <i>in vivo</i>	74
5.3 Análise histopatológica	75
6. Resultados (<i>IN VITRO</i>)	79
6.1 Citotoxicidade	79
6.2 Vias de morte celular	81
6.2.1 Tipos de morte celular	82
6.2.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	84
6.2.3 Detecção da P53 por western blot	85
6.3 Ciclo celular	85
6.4 Stresse oxidativo	87
6.4.1 Avaliação da produção intracelular de peróxidos.....	87
6.4.2 Avaliação da produção intracelular de anião superóxido.....	87
6.4.3 Avaliação da inibição de espécies reativas de oxigênio.....	88
6.5 Defesas antioxidantes	89
6.5.1 Avaliação da produção intracelular de glutatião reduzido	89
6.5.2 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase	89
7. Resultados (<i>IN VIVO</i>).....	91
7.1 Tratamentos com PDT e AAS <i>in vivo</i>	91
7.2 Análise histopatológica	92
7. Discussão.....	97
7.1 Discussão (<i>IN VITRO</i>).....	97
7.2 Discussão (<i>IN VIVO</i>).....	103
8. Conclusão e perspectivas futuras	109
9. Referências Bibliográficas	113

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

Lista de Abreviaturas, Fórmulas e Símbolos

°C	<i>Celcius</i>
μL	Microlitro
μM	Micromolar
¹ O ₂	Oxigénio singleto
³ O ₂	Oxigénio molecular
AAR	<i>Arachidonic acid</i>
AAS	Ácido acetilsalicílico
ALA	<i>Aminolevulinic acid</i>
AlPcS4	<i>Aluminium(III) phthalocyanine tetrasulfonate chloride</i>
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
AMTPn	<i>9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis- (β-methoxyethyl) – porphycene</i>
AnV-FITC	<i>AnnexinV-fluorescein isothiocyanate</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer protein</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BBr2HPC	5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)clorina
BCA	<i>Bicinchochonic acid</i>
BCL-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma protein</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAPIRI	Combinação entre capecitabina e irinotecano
CAPOX	Combinação entre capecitabina e oxaliplatina
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2 A gene</i>
cm ³	Centímetros cúbicos
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-1/2	<i>Cyclooxygenase 1 and 2</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular patterns</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
DCF	2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH ₂ -DA	<i>2',7'-Dichlorofluorescein diacetate</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FCS	<i>Forward scatter</i>
FOLFIRI	Combinação entre 5-fluoroacilo e irinotecano

FOLFOX	Combinação entre 5-fluoroacilo e oxaliplatina
Gr-1	<i>Granulocyte differentiation antigen-1</i>
GSH	Glutatião reduzido
h	Horas
H&E	Hematoxilina e eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
H-ALA	Derivados hexílicos do ALA
HCE2	<i>Human carboxylesterase 2</i>
Hepes	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HIF-1	<i>Hypoxia inductible factor-1</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia inductible factor-1 alpha</i>
HIF-1β	<i>Hypoxia inductible factor-1 beta</i>
hMLH1	<i>Human MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2</i>
hMSH2	<i>Human MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1</i>
HO•	Radical hidroxilo
HpD	<i>Hematoporphyrin derivative</i>
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
IC95	Intervalo de confiança a 95%
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IL-1β	<i>Interleukin 1 beta</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
J	Joules
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio
M	Molar
M-ALA	Derivados metílicos do ALA
mg/kg	Miligramas por quilograma
mg/mL	Miligramas por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm³	Milímetros cúbicos
m-THPC	<i>m-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazolyl-2) 2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
mW/cm²	Miliwatts por centímetro quadrado
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	<i>Nuclear transcription factor kappa B</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
NPe6	<i>Mono-Laspartyl chlorine e6</i>
O₂•⁻	Anião superóxido
P53	Proteína 53

PARP-1	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PDT	<i>Photodynamic therapy</i>
PEG₄₀₀	Polietilenoglicol 400
PGE₂	<i>Prostaglandin E2</i>
PGH₂	<i>Prostaglandin H2</i>
PGI₂	<i>Prostaglandin I2</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PpIX	<i>Protoporphyrin IX</i>
RIP1/RIP3	<i>kinase receptor interacting proteins 1 and 3</i>
RIPA	Tampão de radioimunoprecipitação
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
S₀	Estado fundamental
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point</i>
SOD	Enzima superóxido dismutase
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
T₁	Estado tripleto estável
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TDLN	<i>Tumor draining lymph nodes</i>
TNF-α	<i>Tumoral necrosis factor alpha</i>
TNM	<i>Tumour, nodes, metastasis</i>
TP53	Gene supressor tumoral da P53
Tris-HCl	<i>Tris (hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
Tris-NaOH	<i>Tris (hydroxymethyl)aminomethane sodium hydroxide</i>
TXA₂	<i>Thromboxane A2</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
λ	Comprimento de onda
$\mu\text{L/g}$	Microlitros por grama

INTRODUÇÃO

1.Introdução

1.1 Cancro

O cancro define um conjunto de doenças, que se caracterizam por uma divisão celular descontrolada, consequência de alterações nos mecanismos de regulação e de proliferação celulares. O cancro pode ter origem em diversos órgãos e possui a particularidade de ser independente das restrições pré-estabelecidas às células normais, nomeadamente da estrutura, da função e da homeostase (Hanahan & Weinberg, 2000; Green *et al.* 2002; National Cancer Institute, 2015). Existem vários tipos de cancro, entre os quais os carcinomas, que se caracterizam por serem o tipo de cancro mais frequente, com origem nas células epiteliais (National Cancer Institute, 2015).

Os tumores malignos apresentam comportamento invasivo, com capacidade de invadir vasos linfáticos e sanguíneos e de migrar para locais distantes da sua origem, onde a possibilidade de extravasamento, de aderência e de colonização são condições para a formação de metástases (Sahai, 2005; Laranjo, 2014; National Cancer Institute, 2015).

O cancro constitui já umas das principais causas de morte em todo o mundo, particularmente nos países desenvolvidos, e prevê-se que a mortalidade aumente ainda mais nas próximas décadas (Bray *et al.* 2012; Torre *et al.* 2015). De acordo com os dados de 2012, estima-se que surgiram cerca de 14,1 milhões de novos casos de cancro e foram registados cerca de 8,2 milhões de óbitos, com a previsão de o número de novos casos aumentar para 20,3 milhões e o número de óbitos aumentar para 13,2 milhões no ano de 2030 (Bray *et al.* 2012; Torre *et al.* 2015).

1.2 Cancro colorretal

O cancro colorretal é uma das principais causas de morte no mundo, constitui o terceiro tipo de cancro mais comum no género masculino e o segundo tipo de cancro mais comum no género feminino (Torre *et al.* 2015). A maior incidência verifica-se em países desenvolvidos como a Austrália, a Nova Zelândia, os Estados Unidos da América, o Canadá e em certas regiões da Europa, em contraste com a China, a Índia, e certas partes de África e da América do Sul, como é demonstrado na Figura 1 (Hagggar & Boushey, 2009; Torre *et al.* 2015).

Entre os diversos fatores de risco associados ao cancro colorretal, inclui-se o envelhecimento. A probabilidade de aparecimento de cancro colorretal aumenta progressivamente após os 40 anos, com 90% dos casos a surgirem após os 50 anos de idade (Hagggar & Boushey, 2009).

A presença de pólipos com potencial neoplástico, nomeadamente adenomas tubulares e das vilosidades, que são lesões precursoras do cancro colorretal, representa cerca de 95% dos casos de cancro colorretal esporádico. Como estas lesões malignas possuem um longo período de latência, compreendido entre 5 a 10 anos, e são assintomáticas, a sua deteção é frequentemente feita já num estágio com presença de malignidade (Hagggar & Boushey, 2009; Triantafillidis *et al.* 2009). Adicionalmente, existem doenças inflamatórias, como a colite

ulcerosa e a doença de Crohn, que aumentam o risco de desenvolvimento de cancro colorretal (Haggar & Boushey, 2009; Triantafillidis *et al.* 2009).

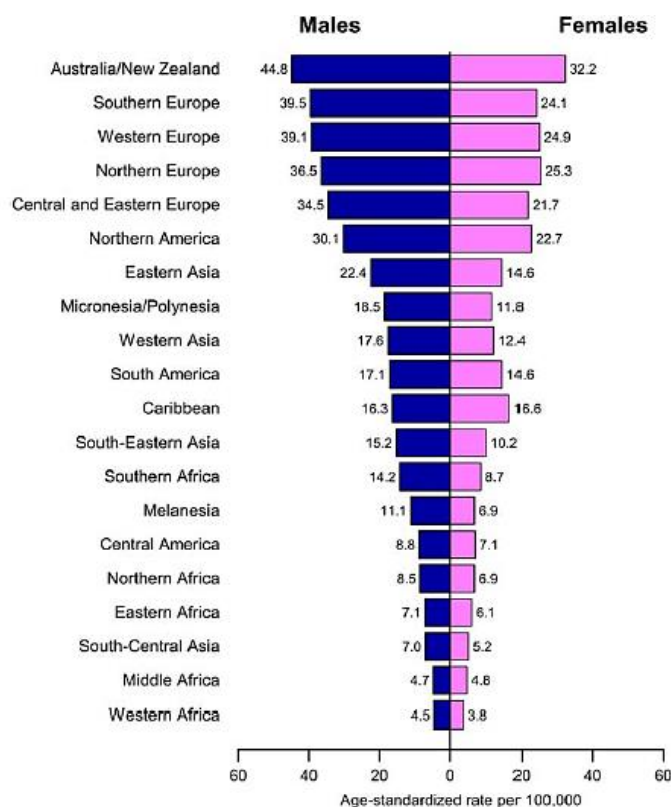


Figura 1. Taxa de incidência do cancro colorretal por região e por género. Retirado de Torre *et al.* 2015.

A componente genética será responsável por cerca de 5 a 10 % dos cancros colorretais, tem por base a hereditariedade de condições como a polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*) e a síndrome de Lynch. No caso da FAP estão descritas mutações no gene supressor tumoral APC e no caso da síndrome de Lynch são devidas a mutações em genes envolvidos em mecanismos de reparação de ADN, mais propriamente os genes hMLH1 (do inglês *human MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2*) e hMSH2 (do inglês *human mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1*) (Haggar & Boushey, 2009; Markowitz & Bertagnolli, 2009).

Constituem ainda fatores de risco uma dieta rica em gorduras saturadas, (Haggar & Boushey, 2009; Huxley *et al.* 2009), o estilo de vida sedentário, a obesidade e o consumo de álcool e de tabaco (Haggar & Boushey, 2009; Huxley *et al.* 2009).

No cancro colorretal o tratamento é influenciado pela localização tumoral, o estágio na altura do diagnóstico e o estado geral do doente (Watanabe *et al.* 2011; DeSantis *et al.* 2014; Van Cutsem *et al.* 2014). No estágio I e no estágio II A, a abordagem utilizada é a excisão cirúrgica do tumor primário, com a remoção da massa tumoral juntamente com os gânglios linfáticos adjacentes (Watanabe *et al.* 2011; DeSantis *et al.* 2014; Van Cutsem *et al.* 2014). A cirurgia pode incluir a polipectomia, para remoção dos pólipos adenomatosos, a colectomia e a proctectomia, para remoção do cólon e do reto, respetivamente (Watanabe *et al.* 2011; DeSantis *et al.* 2014; Van Cutsem *et al.* 2014).

No estádio II B e no estádios III A,B,C e IV, se houver possibilidade de recessão cirúrgica, esta é complementada por quimioterapia neoadjuvante em regime único ou combinada com radioterapia. Na impossibilidade de abordagem cirúrgica o tratamento assenta numa abordagem com quimioterapia e/ou radioterapia adjuvante ou tratamento paliativo (Wolpin *et al.* 2007; Van Cutsem *et al.* 2014; Fakih, 2015).

A quimioterapia é a forma de tratamento principal no cancro colorretal irresssecável, especialmente nos estádios mais avançados onde se verifica a ocorrência de metástases. Entre os principais citostáticos que se usam nos doentes portadores deste tipo de cancro encontram-se o 5-fluororacilo, o irinotecano e a oxaliplatina, que podem ser utilizados em regime isolado ou combinados, como o regime FOLFIRI (combinação do 5-fluororacilo com o irinotecano), o FOLFOX (combinação do 5-fluororacilo com a oxaliplatina), o CAPOX (combinação da capecitabina, que é o pró-fármaco do 5-fluororacilo com a oxaliplatina) ou o CAPIRI (combinação da capecitabina com o irinotecano) (Meyerhardt *et al.* 2005; DeSantis *et al.* 2014; Fakih, 2015; Price *et al.* 2016). A adição de agentes biológicos adjuvantes como o bevacizumab, o panitumumab e o cetuximab é também utilizada conjuntamente com a quimioterapia sistémica de forma a diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia global do tratamento (Meyerhardt *et al.* 2005; Wolpin *et al.* 2007 Fakih, 2015; Price *et al.* 2016).

O estadiamento do cancro colorretal influencia a abordagem terapêutica e tem ainda implicações em termos de sobrevivência a 5 anos como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1. Sistema de classificação com base no tumor, nos gânglios e na presença ou não de metástase (TNM, do inglês tumour, nodes, metastasis) de acordo com os diferentes estádios do cancro colorretal e respetiva taxa de sobrevivência a 5 anos. T (tumor primário); Tx (tumor primário sem acesso); T1 (tumor primário com invasão da submucosa); T2 (tumor primário com invasão de tecido gastrointestinal); T3 (tumor primário com penetração do tecido gastrointestinal e invasão do tecido conjuntivo) e T4 (tumor primário com invasão de outros órgãos ou penetração do peritoneu; N (estado dos gânglios); Nx (gânglios linfáticos regionais sem acesso); N0 (gânglios linfáticos regionais sem presença de metástases); N1 (entre 1 e 3 gânglios linfáticos regionais com presença de metástases) e N2 (4 ou mais gânglios linfáticos com presença de metástases); M (metástases distantes); Mx (a presença ou ausência de metástases distantes não pode ser determinada); M0 (ausência de metástases distantes) e M1 (presença de metástases distantes). Adaptado de Green *et al.* 2002.

Estádio	Classificação TNM	Sobrevivência a 5 anos(%)
I	T1-2, N0, M0	>90
II A	T3, N0, M0	60-85
II B	T4, N0, M0	
III A	T1-2, N1, M0	25-65
III B	T3-4, N1, M0	
III C	T(todos), N2, M0	
IV	T(todos), N(todos), M1	5-7

1.3 Cancro esofágico

Em relação ao cancro esofágico, verifica-se que é o oitavo tipo de cancro mais frequente a nível mundial, com uma estimativa de 455,000 novos casos e 400,200 óbitos no ano de 2012 em todo o mundo (Eslick, 2009; Arnold *et al.* 2014; Torre *et al.* 2015). Este tipo de cancro é três

a quatro vezes mais frequente no gênero masculino do que no feminino (Eslick, 2009; Arnold *et al.* 2014; Torre *et al.* 2015). A sua taxa de incidência tem muita variação entre as diferentes regiões do globo, como demonstra a Figura 2.

O cancro esofágico caracteriza-se por dois subtipos histológicos, o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma (Eslick, 2009; Arnold *et al.* 2014; Torre *et al.* 2015).

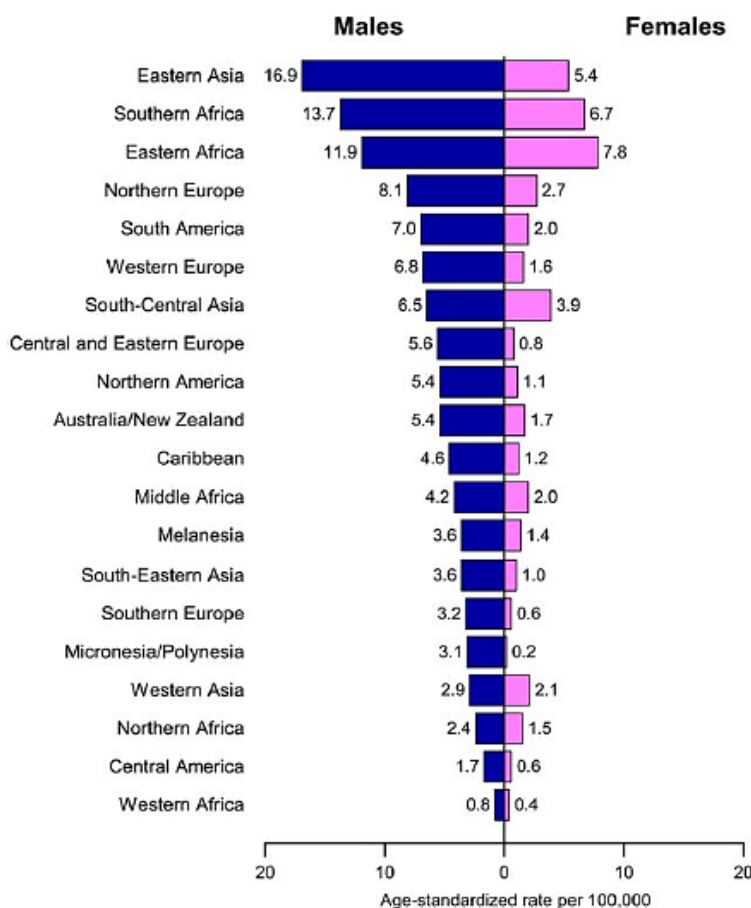


Figura 2. Taxa de incidência do cancro esofágico por região e gênero. Retirado de Torre *et al.* 2015.

O envelhecimento também constitui fator de risco no cancro esofágico. Diversos estudos mostram um aumento progressivo da incidência deste tipo de cancro até aos 75-79 anos (Holmes & Vaughan, 2007; Falk, 2009). Salienta-se ainda a presença de lesões pré-cancerígenas como o esófago de Barrett e a doença de refluxo gastroesofágico, ambas com progressão entre fase sem displasia, com displasia de baixo grau, com displasia de alto grau e, finalmente, adenocarcinoma (Falk, 2009; Ling *et al.* 2011). Na componente genética existem vários marcadores moleculares que estão relacionados com o maior risco de incidência deste tipo de cancro, como as alterações no gene supressor tumoral da P53 (TP53) e no gene *CDKN2A* (do inglês *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2 A gene*) (Falk, 2009).

Outros fatores como a dieta pobre em fibras ou hipercalórica, a ausência de atividade física, a obesidade ou o consumo de álcool e de tabaco têm como consequência o aumento no risco de aparecimento deste tipo de neoplasia (Holmes & Vaughan, 2007; Eslick, 2009; Falk, 2009; Ling *et al.* 2011).

No que respeita às opções terapêuticas para os tumores ressecáveis, incluem-se procedimentos cirúrgicos, como a ablação endoscópica, a recessão da mucosa e a

esofagectomia, com a remoção parcial ou total do esófago e de zonas adjacentes (DeMeester *et al.* 2006; Layke *et al.* 2006; Stahl *et al.* 2010; Mayer *et al.* 2014). A quimioterapia sistêmica à base de fármacos como o 5-fluororacilo, a cisplatina e a mitomicina pode ser utilizada em regime isolado ou combinado com radioterapia para o tratamento do cancro esofágico em estádios iniciais, como em tratamento neoadjuvante (DeMeester *et al.* 2006; Layke *et al.* 2006; Stahl *et al.* 2010; Mayer *et al.* 2014) Para estádios mais avançados, sem possibilidade de recessão cirúrgica e com metastização, a quimioterapia sistêmica surge como principal forma de tratamento, isolada ou em combinação ou a radioterapia. A radioterapia isolada não possui uma grande eficácia no tratamento desta neoplasia (Campbell & Villafior, 2010; Stahl *et al.* 2010; Mayer *et al.* 2014; Wong & Law, 2016).

Tal como no cancro colorretal, o estadiamento determina a taxa de sobrevivência aos 5 anos, como se pode observar na Tabela 2.

Tabela 2. Sistema de classificação tumor, gânglios e metástase (TMN, do inglês inglês tumour, nodes, metastasis) de acordo com os diferentes estádios do cancro esofágico e respetiva taxa de sobrevivência a 5 anos. T (tumor primário); Tx (tumor primário sem acesso); Tis (tumor primário *in situ*); T1 (tumor primário com invasão da submucosa ou *lamina propria*); T2 (tumor primário com invasão de tecido esofágico); T3 (tumor primário com invasão do tecido conjuntivo) e T4 (tumor primário com invasão de órgãos vizinhos); N (estado dos gânglios); Nx (gânglios linfáticos regionais sem acesso); N0 (gânglios linfáticos regionais sem presença de metástases) e N1 (de 1 a 3 gânglios linfáticos regionais com presença de metástases); M (metástases distantes); Mx (presença ou ausência de metástases distantes não pode ser determinada); M0 (ausência de metástases distantes) e M1 (presença de metástases distantes). Para tumores do baixo esófago torácico: M1a (metástases em gânglios linfáticos celíacos); M1b (metástases distantes). Para tumores do esófago mesotorácico: M1a (não aplicável); M1b (outras metástases distantes). Para tumores do alto esófago torácico: M1a (metástases nos gânglios cervicais); M1b (outras metástases distantes. Adaptado de Green *et al.* 2002.

Estadio	Classificação TNM	Sobrevivência a 5 anos(%)
0	Tis, N0, M0	100
I	T1, N0, M0	80
II A	T2-3, N0, M0	40
II B	T1-2, N1, M0	30
III	T3-4, N (todos), M0	15
IV	T (todos), N (todos), M1	0
IV A	T (todos), N (todos), M1a	
IV B	T (todos), N (todos), M1b	

1.4 Terapia Fotodinâmica

As terapêuticas clássicas disponíveis para o tratamento do cancro apresentam limitações em especial o aparecimento de efeitos adversos. A quimioterapia possui uma elevada toxicidade a nível sistémico, devido à falta de especificidade nos seus mecanismos de ação, tendo como consequência uma panóplia de efeitos adversos, entre os quais se destacam as náuseas e os vômitos, a anemia, a alopecia, a imunossupressão, entre outros (Fernando & Jones, 2015). A cirurgia nem sempre evita a recorrência do tumor uma vez que, frequentemente, é difícil remover todos os tecidos afetados de uma forma eficaz (Lucky *et al.* 2015). Quanto à radioterapia, o seu efeito está limitado a uma dose cumulativa de radiação,

com efeitos adversos locais devido à irradiação de tecidos sem lesão (Owadally & Staffurth, 2015).

Atualmente verifica-se que a investigação médica básica está concentrada em refinar as terapêuticas que se encontram aprovadas para uso clínico no tratamento do cancro, mas sempre com a preocupação de desenvolver novas formas alternativas de tratamento que sejam minimamente invasivas, eficazes e com um custo-eficácia acessível (Agostinis *et al.* 2011; Lucky *et al.* 2015).

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) tem ganho o seu espaço como forma de tratamento para diversos tipos de cancro, como o da bexiga, do pulmão, do esófago, da cabeça e pescoço e da pele, bem como para outras patologias não oncológicas, com especial ênfase para a degenerescência macular e diversas doenças do foro dermatológico (Gallagher-Colombo *et al.* 2012; Lucky *et al.* 2015). A sua crescente aprovação para uso terapêutico encontra fundamento na sua baixa invasibilidade, na possibilidade de uso prolongado sem toxicidade cumulativa e na reduzida morbilidade a longo prazo associada a melhoria substancial da qualidade de vida dos doentes (Gallagher-Colombo *et al.* 2012; Lucky *et al.* 2015). Convém ainda referir a sua versatilidade em termos terapêuticos, já que pode ser utilizada como adjuvante após recessão cirúrgica, em regime neoadjuvante e como paliativo em neoplasias inoperáveis (Lucky *et al.* 2015).

A primeira menção a PDT surgiu no final do século XIX, com o termo *fototerapia* a ser descrito pelo investigador *Niels Finsen*, ao qual foi atribuído o prémio Nobel em 1903, pelo tratamento de tuberculose cutânea com recurso a luz ultravioleta (Ackroyd *et al.* 2001; Allison *et al.* 2010; Honigsmann, 2013). No entanto, o primeiro registo experimental do processo de fotossensibilização é datado no início do século XX, quando *Oscar Raab* verificou que a combinação de acridina com luz tinha um efeito tóxico numa preparação de paramécias (Juzeniene *et al.* 2007). Após este evento, *Raab* em conjunto com *Jodlbauer*, *Jesionek* e *Von Tappeiner* exploraram a combinação de luz com certos químicos no tratamento de tumores da pele (Huettnner *et al.* 2000; Allison *et al.* 2010).

A PDT depende de três componentes essenciais: o fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*), a luz, que deve ter comprimento de onda apropriado à ativação do fotossensibilizador, e da disponibilidade de oxigénio (Agostinis *et al.* 2011).

A administração do fotossensibilizador pode ser sistémica, oral ou tópica, com posterior irradiação com luz do espectro visível com um comprimento de onda que se ajuste ao espectro de absorção do fotossensibilizador (Dolmans *et al.* 2003; Brown *et al.* 2004 Robertson *et al.* 2009). O intervalo de tempo entre a administração do fotossensibilizador e a aplicação da luz pode variar entre cinco minutos e várias horas ou dias de acordo com as características do fotossensibilizador e da patologia (Celli *et al.* 2010). Atualmente as áreas de aplicação desta terapia estão a seguir uma tendência de expansão, sendo de uso clínico corrente em oftalmologia, em dermatologia, em medicina dentária assim como no tratamento de infeções (Skupin-Mrugalska *et al.* 2013).

A PDT é particularmente útil no tratamento de lesões superficiais ou de baixa profundidade tendo em conta a penetração ótica da luz (Lucky *et al.* 2015; Wilson & Patterson 2008; Lucky *et al.* 2015). Por outro lado, é preciso compreender a dosimetria na PDT, de modo a limitar situações de iluminação, quer escassa quer excessiva, que tem como consequências ou a falha do tratamento em termos de controlo e recorrência neoplásica ou a indução excessiva de toxicidade para os tecidos normais adjacentes, respetivamente (Wilson &

Patterson 2008; Lucky *et al.* 2015). Ao contrário de outras técnicas ainda não existe equipamento adequado para o seguimento em tempo real da aplicação clínica da terapia fotodinâmica com o acoplamento de sistemas de imagem multimodal, pelo que a dosimetria é usualmente calculada tendo em conta o rendimento da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), o efeito de *photobleaching* do fotossensibilizador e a sua localização subcelular, pelo que o tratamento personalizado pode ser difícil (Wilson & Patterson 2008; Lucky *et al.* 2015).

A hipoxia tumoral também possui um papel relevante, em termos limitantes na terapia fotodinâmica, uma vez que a oxigenação dos tecidos tem influência na sua eficácia global. Esta pode ser afetada ou pela presença de células hipóxicas pré-existentes, que se formaram como resultado da redução do suprimento sanguíneo, ou pela hipoxia induzida pela própria PDT, devido aos seus efeitos a nível vascular e alto consumo local de oxigénio (Celli *et al.* 2010; Lucky *et al.* 2015).

Os tumores sólidos com uma alta fração de células hipóxicas são considerados como sendo resistentes à PDT, pelo que estão associados a um mau prognóstico em termos de eficácia da técnica (Lucky *et al.* 2015). Em termos moleculares, a hipoxia é controlada pelo fator indutor de hipoxia-1 (HIF-1, do inglês *hypoxia inducible factor-1*) que é uma proteína dimérica que engloba duas subunidades: a HIF-1 α (do inglês *hypoxia inducible factor-1 alpha*) e a HIF-1 β (do inglês *hypoxia inducible factor-1 beta*) as quais são fatores de transcrição. A nível funcional a subunidade HIF-1 α é uma proteína citoplasmática, que responde a variações dos níveis de oxigénio enquanto a subunidade HIF-1 β é uma proteína nuclear que é constitucionalmente expressa e independente da presença de oxigénio. Em células normais a HIF-1 α é degradada continuamente, em contraste com o que ocorre em ambiente hipóxico, onde é translocada até ao núcleo, heterodimerizada com HIF-1 β para formar a proteína HIF-1 ativa (Mittra *et al.* 2006; Lucky *et al.* 2015). Após a formação de HIF-1 ativa, a sua ligação tem como resultado a ativação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) bem como de outros fatores angiogénicos, de enzimas glicolíticas e de citoquinas, levando a uma diminuição da resposta terapêutica com a promoção de angiogénese e a recorrência tumoral. A este nível, vários estudos sobre a PDT documentam a sobre-expressão de VEGF e de HIF-1 α após o tratamento, devido a danos vasculares e ao rápido consumo de oxigénio localizado na zona irradiada. Assim, a combinação da terapia fotodinâmica com fármacos que atuam em termos da inibição das vias metabólicas associadas ao crescimento e à recorrência tumoral, tem o potencial de contrariar todos esses efeitos colaterais e de melhorar a eficácia global desta terapêutica (Lucky *et al.* 2015).

1.5 Fotofísica e Fotoquímica na Terapia Fotodinâmica

A maioria dos fotossensibilizadores no seu estado fundamental singlete S_0 tem 2 eletrões com spins opostos localizados numa orbital molecular energeticamente favorável. Após a absorção de luz ocorre a transferência de um desses eletrões para uma orbital molecular com um estado energético mais elevado S_1 , como se pode observar na Figura 3 (Agostinis *et al.* 2011, Laranjo, 2014).

O estado excitado do PS é muito instável. A sua elevada reatividade faz com que ocorra emissão de energia sob a forma de fluorescência e/ou calor, o que determina o regresso ao estado fundamental (S_0) ou, alternativamente, pode formar-se um estado tripleto estável (T_1) através de uma conversão de spin. Nesta circunstância o fotossensibilizador pode seguir duas

vias: decair para o estado fundamental singleto (S_0) com emissão de fosforescência ou transferir a sua energia para o oxigênio molecular (3O_2), a única espécie no sistema que possui um estado fundamental tripleto, levando à formação de ROS (Triesscheijn *et al.* 2006; Agostinis *et al.* 2011; Tancelosky *et al.* 2012).

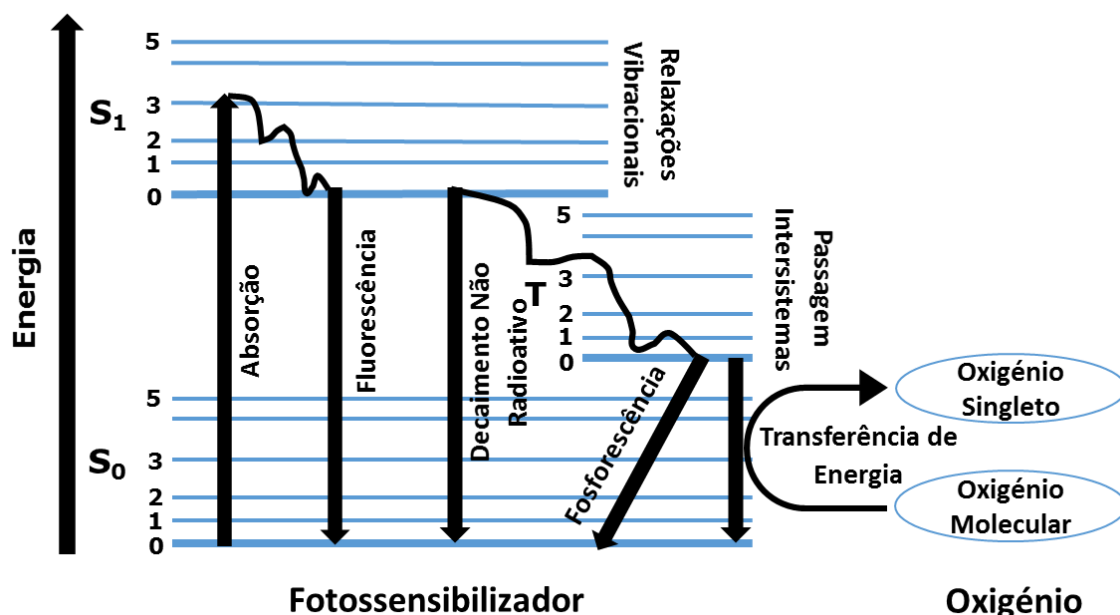


Figura 3. Diagrama de Jablonski para as diferentes fases dos processos fotofísicos e fotoquímicos que caracterizam a PDT. O fotossensibilizador absorve a energia referente à luz que provoca a sua ativação, onde a energia que não é dissipada durante o processo está envolvida num efeito fotodinâmico com transferência de energia para o oxigênio, levando à formação de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Tancelosky *et al.* 2012.

A formação de ROS pode ocorrer por um de dois tipos de reações fotodinâmicas (Figura 4), a reação do tipo I ou a reação do tipo II. A reação do tipo I envolve a transferência de elétrons do fotossensibilizador para substratos orgânicos moleculares no ambiente celular. Após a transferência de elétrons aqueles substratos ficam reduzidos e com capacidade de formar espécies radicalares, como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Caso ocorra uma dismutação ou uma redução num elétron do $O_2^{\bullet-}$ há a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode sofrer a perda de um elétron com formação do radical hidroxilo (HO^{\bullet}), uma poderosa espécie radicalar que oxida indiscriminadamente todos os tecidos (Dolmans *et al.* 2003; Lukšienė 2003; Agostinis *et al.* 2011). Na presença de íons metálicos como o ferro ou o cobre, o radical hidroxilo pode também ser produzido pela reação de Fenton (Laranjo, 2010). Quanto à reação do tipo II, verifica-se a transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio molecular, o que determina a formação do estado singleto (1O_2), reconhecido como a principal ROS nos processos fotoquímicos citotóxicos inerentes à PDT, como se pode observar na figura 4 (Lukšienė 2003; Agostinis *et al.* 2011).

Na PDT a maioria dos fotossensibilizadores está envolvida em reações do tipo II. O 1O_2 formado tem uma elevada reatividade para lípidos, ácidos nucleicos, proteínas e outros substratos biológicos, mas como possui um tempo de semi-vida muito curta, na ordem dos 3×10^{-9} s, comparativamente com outras ROS, existe apenas um efeito citotóxico nas células

onde o PS se acumula e uma reduzida área de efeito em células viáveis ($2-4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$) (Nowis *et al.* 2005; Agostinis *et al.* 2011; Broekgaarden *et al.* 2015).

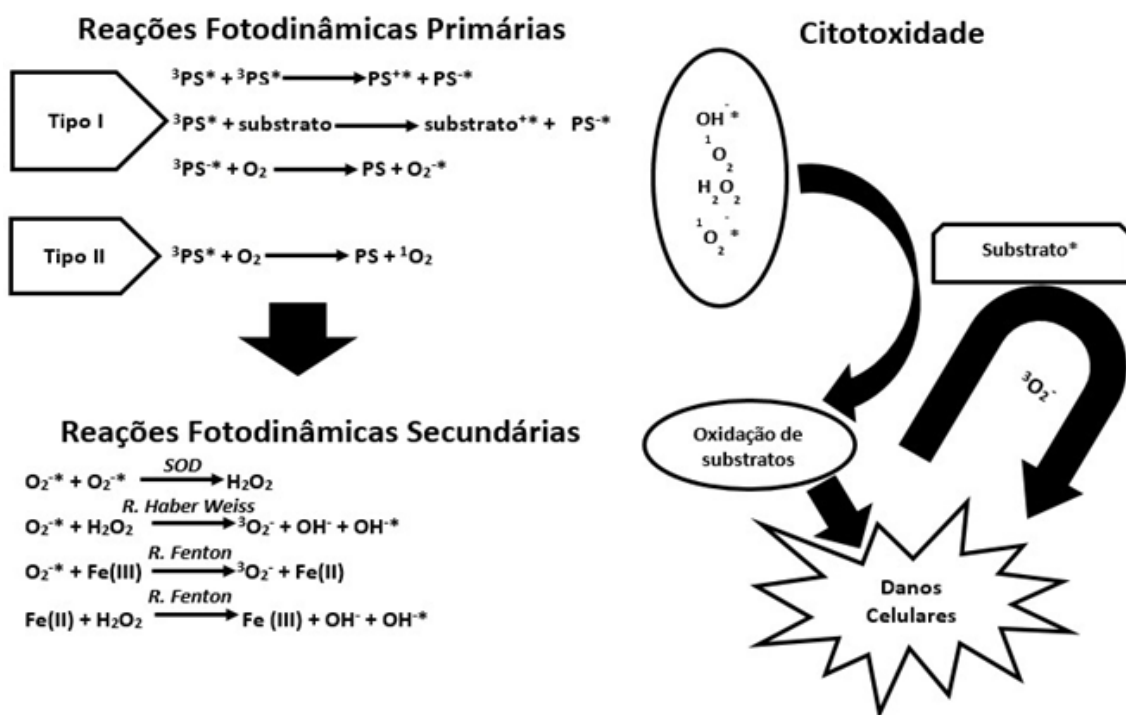


Figura 4. Mecanismos reacionais intervenientes na formação de espécies reativas de oxigénio no contexto da PDT. A PDT exerce o seu efeito citotóxico por reações principais do tipo I e do tipo II, bem como por reações secundárias, onde ocorre dano celular indireto por intermediários ou direto pelas próprias ROS, respetivamente. Adaptado de Laranjo, 2010.

A seletividade na acumulação do PS deriva das características que diferenciam o microambiente tumoral do tecido saudável que o envolve, bem como das características intrínsecas à molécula, como a lipofilicidade, os grupos funcionais ou as glicosilações. Em termos das características próprias do tecido tumoral é de ter em conta a alta capacidade proliferativa das células cancerígenas, com a sobre-expressão de vários recetores e de transportadores membranares, como recetores de lipoproteínas de baixa densidade, recetores de fatores de crescimento, recetores de transferrina, recetores de ácido fólico, recetores de insulina, transportadores de glicose e integrinas. O pH intratumoral ácido, a infiltração de macrófagos, a drenagem linfática, a permeabilidade vascular, o espaço intersticial e a produção de colagénio, são outros fatores a ter em conta, no que respeita a diferenças entre tecido saudável e tumoral que permitem uma internalização seletiva dos fotossensibilizadores na PDT (Nowis *et al.* 2005; Agostinis *et al.* 2011; Sharma *et al.* 2012).

1.6 Fontes luminosas na Terapia Fotodinâmica

A fonte de luz deve emitir radiação com comprimento de onda ótimo para ativar o PS usado durante o tratamento, uma vez que se pretende expor a área a tratar a uma energia que permita a máxima formação de ROS sem comprometer a penetração dos tecidos (Allison *et al.* 2010; Allison *et al.* 2013).

No espectro visível, a luz azul, de menor comprimento de onda, é a que menos consegue penetrar nos tecidos ao passo que a luz vermelha, de maior comprimento de onda, é a que possui um maior poder penetrante podendo, no máximo, atingir cerca de 1 cm de profundidade, conforme representado na Figura 5 (Agostinis *et al.* 2011; Allison *et al.* 2013). Designa-se por janela ótica tecidual a gama de comprimentos de onda entre os 600 nm e os 1200 nm, a qual delimita a luz que consegue penetrar nos tecidos. Menores comprimentos de onda são absorvidos por alguns cromóforos existentes na constituição tecidual, como é o caso da hemoglobina e da melanina (Sandell *et al.* 2011; Allison *et al.* 2013).

Pelas características espectrais dos fotossensibilizadores, no entanto, nem todos os comprimentos de onda desta gama têm a capacidade de gerar o efeito fotodinâmico. Apenas as fontes luminosas que possuam comprimentos de onda de cerca de 800 nm têm energia suficiente para ativar a maior parte das moléculas fotossensibilizadoras (Agostinis *et al.* 2011; Allison *et al.* 2013).

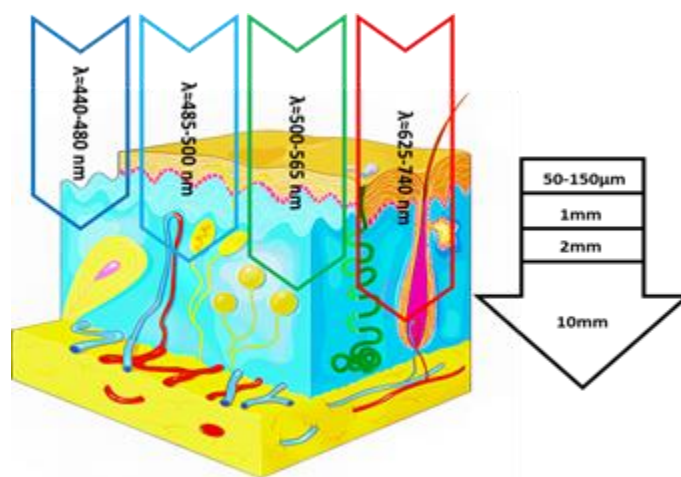


Figura 5. Capacidade de penetração da luz de diferentes comprimentos de onda, desde a epiderme até à derme. A um maior comprimento de onda corresponde um maior poder de penetração até cerca de 1cm. Adaptado de Agostinis *et al.* 2011; Laranjo, 2014 e Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

No que respeita à interação da luz no tecido, o tipo de fonte luminosa pode ser determinante (Allison *et al.* 2010). Podem ser utilizados três tipos de fontes luminosas como as lâmpadas de largo espectro, os díodos ou os lasers (Alexiades-Armenakas *et al.* 2006; Pervaiz *et al.* 2006; Boucher, 2011; Allison *et al.* 2013). As lâmpadas de largo espectro foram usadas inicialmente pelo fácil manuseamento e pelos baixos custos (Alexiades-Armenakas *et al.* 2006; Pervaiz *et al.* 2006). Contudo, apresentam desvantagens, como a perda de energia sob a forma de calor, a luz ser de baixa intensidade e terem algumas limitações no controlo da quantidade de energia entregue (Pervaiz *et al.* 2006). Mais tarde, surgiram os díodos que têm a capacidade de gerar luz de comprimentos de onda mais baixos, com maior energia, contudo o fato de não emitirem luz monocromática, faz com que percam eficácia em termos de dosimetria na superfície alvo comparativamente aos lasers, o que reduz um pouco a sua aplicabilidade (Triesscheijn *et al.* 2006; Awuah & You, 2012).

A utilização de lasers na PDT contribuiu para uma melhor eficácia, já que estes produzem luz monocromática no comprimento de onda pretendido, com a dosimetria controlada de uma forma precisa (Pervaiz *et al.* 2006; Awuah & You, 2012). Existem dois tipos de lasers utilizados na PDT, os de emissão contínua e os de pulso, que são atualmente os mais utilizados na terapia fotodinâmica devido à sua versatilidade comparativamente a outras fontes luminosas. Tanto para os lasers de emissão contínua como para os de pulso, a luz e o consumo de oxigénio são fatores chave para que o tratamento tenha a maior eficácia possível, uma vez que a altas fluências de luz ocorre um maior consumo de oxigénio e, conseqüentemente, uma perda de efeito (Choudhary *et al.* 2009). Atualmente, regista-se um uso preferencial dos lasers de pulso por causa do menor risco de criar cicatrizes e hiper e/ou hipopigmentação cutânea (Pervaiz *et al.* 2006; Choudhary *et al.* 2009; França *et al.* 2012).

A seleção da fonte luminosa deve ter em conta a absorção do fotossensibilizador, as características da patologia (localização, acessibilidade e propriedades do tecido) e o custo (Agostinis *et al.* 2011).

1.7 Fotossensibilizadores

A larga maioria dos fotossensibilizadores utilizados na PDT baseiam-se numa estrutura tetrapirrólica, semelhante ao anel de protoporfirina que constitui o esqueleto da hemoglobina (Agostinis *et al.* 2011). O desenho de um PS ideal deve obedecer a certos requisitos, nomeadamente a autenticidade e pureza química do composto, de forma a permitir análises de controlo de qualidade de baixo custo, boa estabilidade química e boa solubilidade nas formulações farmacológicas usadas em meio biológico. Adicionalmente, deve possuir uma forte absorvância de luz com comprimentos de onda entre os 600 e os 800nm, de modo a permitir a formação de espécies reativas de oxigénio, com uma eliminação rápida das células saudáveis e uma distribuição com retenção específica nos tecidos tumorais, sem toxicidade na ausência de luz (Agostinis *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2014).

Atualmente existem vários fotossensibilizadores alguns dos quais possuem aprovação para o uso clínico e outros encontram-se em ensaios clínicos que revelam potencial para uma futura aprovação (Tabela 3). O Photofrin® (derivado de hematoporfirinas purificadas) foi o primeiro PS a ser aprovado em 1993 no Canadá, com indicação para o cancro da bexiga e mais tarde, à escala global, para diversos tipos de cancro (Agostinis *et al.* 2011; Josefsen & Boyle, 2012; Jiang *et al.* 2014).

Tabela 3. Informações relevantes sobre os fotossensibilizadores aprovados para uso clínico e com potencial para aprovação. Adaptado de Kessel, 2004 e 2015; Laranjo, 2014; Lucky *et al.* 2015 e Ormond *et al.* 2013.

Fotossensibilizador	Nome Comercial	Estrutura	Indicações	Aprovações	Comprimento de onda	Localização subcelular
1ª Geração						
Hematoporfirinas	Photofrin® Photogem® Photosan® Hematoporphyrin Injection®	Porfirina	Pulmão, Bexiga, Esófago, Ovários, Cabeça e Pescoço, Ductos Biliares	Mundial	630 nm	Membrana lipídica celular
2ª Geração						
Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)	Levulan®		Bexiga, Cabeça e Pescoço, Pele, Esófago	Mundial	635 nm	Retículo Endoplasmático
Ésteres hexílicos e metílicos do 5-ALA	Hexvix®* Cysview® Metvix®*	Percursor de Porfirina	*Bexiga (diagnóstico)	Europa	375-400 nm 635 nm	
Derivados monoácidos da benzoporfirina	Visudyne® Verteporfin®	Clorina	Oftalmológicas, Pâncreas e Pulmão	Mundial (AMD)	689-693 nm	Mitocôndria
Meta-tetrahidroxilfenilclorina (mTHPC) ou temoporfin	Foscan®	Clorina	Cabeça e Pescoço, Cérebro, Pulmão, Pele, Próstata e Pâncreas.	Europa, América do Sul e Ásia	652 nm	Mitocôndria e Retículo Endoplasmático
Mono-L-aspartil-clorina e6 (NPe6) ou talaporfin	Laserphyrin® Talaporfin Sodium ou Aptocine®	Clorina	Pulmão e outros tumores sólidos	Ásia	664 nm	Lisossomas
Ftalocianinas de alumínio sulfonadas	Photosens®	Ftalocianina	AMD, Cancros variados	Rússia	675 nm	Lisossomas
Ftalocianinas de sílica	Pc4	Ftalocianina	Linfomas T não-Hodgkin e Pele	Ensaio Clínicos (Fase I) Estados Unidos da América	670 nm	Mitocôndria
Ftalocianinas de zinco	CGP55847	Ftalocianina	Pele e Trato digestivo superior	Ensaio Clínicos (Fase I) Estados Unidos da América	675 nm	Lisossomas
Texafirinas de lutécio ou Motexafirin lutetium	Antrin® LuTex®	Texafirina	Próstata	Ensaio Clínicos (Fase II) Estados Unidos da América	732 nm	Lisossomas
2-[1-hexiloxietil] -2-devinilpirofeoforbideo-a (HPPH)	Photochlor®	Feoforbideo	Esófago e Pulmão	Ensaio Clínicos (Fase II) Mundial	665 nm	Retículo Endoplasmático e Lisossomas
Bacteriofeoforbideos de paládio ou Padaporfin	Tookad®	Bacteriofeoforbideo	Próstata	Ensaio Clínicos (Fase III) Europa	763 nm	Retículo Endoplasmático e Lisossomas
Etiopurpurinas de estanho (SnET ₂) ou Rostaporfin	Photrex®	Purpurina	Pele, Próstata e Mama	Ensaio Clínicos (Fase II) Estados Unidos da América	660 nm	Retículo Endoplasmático e Lisossomas
9-Acetoxi-2,7,12,17-tetrakis- (β-metoxietil) – porficeno	AMTPn®	Porficeno	Pele	Alemanha	610-650 nm	Retículo Endoplasmático e Mitocôndria

1.7.1 Fotossensibilizadores de 1ª geração

1.7.1.1 Photofrin®

O Photofrin® ou derivado de hematoporfirina (HpD, do inglês *hematoporphyrin derivative*), cuja estrutura química está representada na Figura 6, é uma mistura de porfirinas solúveis em água. É ainda o PS mais utilizado na clínica (Agostinis *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2014; Senge *et al.* 2013; Lucky *et al.* 2015).

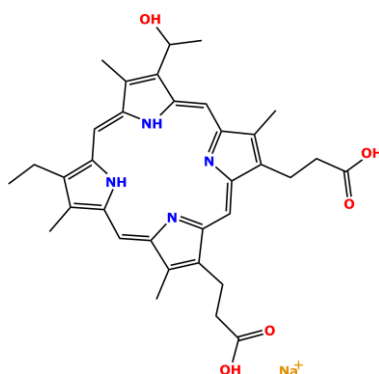


Figura 6. Estrutura química do Photofrin®. Estrutura adaptada de Laranjo, 2014 e desenhada com recurso ao programa ChemDraw® 12.0

O Photofrin® exibe eficácia na destruição tumoral e possui uma limitada toxicidade no escuro (Lucky *et al.* 2015). Contudo o Photofrin® apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, a eficiência moderada, devido ao relativamente reduzido comprimento de onda da luz de ativação (630 nm). Outra desvantagem importante é a fotossensibilidade na pele, que se verifica no intervalo entre administração do fotossensibilizador e a irradiação e também durante um período de tempo após o tratamento (Agostinis *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2014; Ormond *et al.* 2013; Lucky *et al.* 2015).

1.7.2 Fotossensibilizadores de 2ª geração

Os fotossensibilizadores de segunda geração foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar o poder de penetração e a eficácia da terapia fotodinâmica, bem como para alargar o espectro de indicações. A pesquisa e o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores focou-se na obtenção de compostos com um maior comprimento de onda de absorção e maior coeficiente de extinção (Josefsen & Boyle, 2012).

1.7.3 Fotossensibilizadores de 2ª geração com aprovação clínica

1.7.3.1 Ácido 5-aminolevulínico e derivados

O ácido 5-aminolevulínico (ALA do inglês *aminolevulinic acid* ou Levulan®) e os seus derivados hexílicos (H-ALA ou Hexvix®) e metílicos (M-ALA ou Metvix®), cuja estrutura química está representada na Figura 7, são compostos endógenos no organismo humano, envolvidos na biossíntese de grupos heme (Ormond *et al.* 2013; Skupin-Mrugalska *et al.* 2013; Lucky *et al.* 2015).

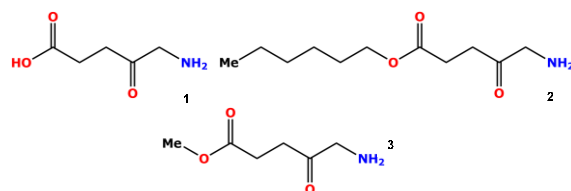


Figura 7. Estruturas químicas do 5-ALA (1), H-ALA (2) e M-ALA (3). Estruturas adaptadas de Lucky et al. 2015 e desenhadas com recurso ao programa ChemDraw® 12.0

A administração exógena de ALA induz a produção de protoporfirina IX (PpIX, do inglês *protoporphyrin IX*), através da via biossintética de grupos heme representada na Figura 8. A toxicidade da PpIX é limitada pois existem mecanismos de excreção que permitem uma rápida eliminação da circulação sistémica. Estes fotossensibilizadores são indicados para o tratamento de tumores superficiais e de outras patologias dermatológicas (Josefsen & Boyle, 2012; Ormond *et al.* 2013).

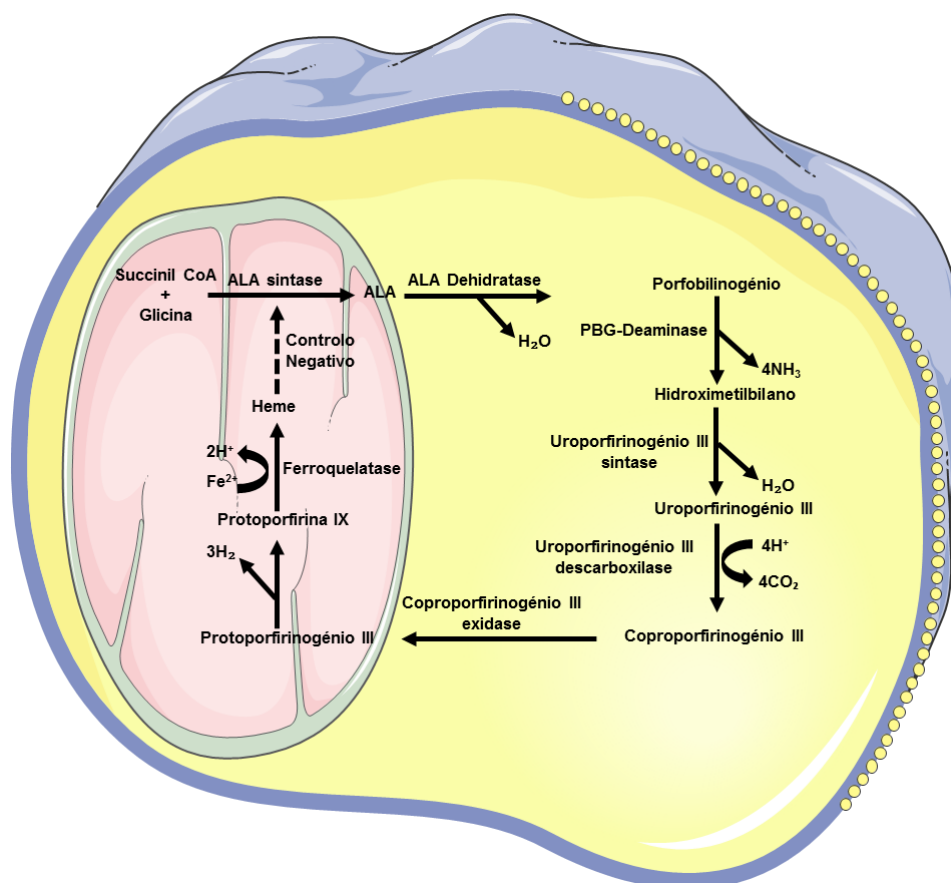


Figura 8. Via metabólica da síntese endógena de PpIX através de 5-ALA. Adaptado de Ormond *et al.* 2013 e Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

De modo a favorecer a absorção de ALA, foram desenvolvidas novas formulações químicas, como ésteres de ALA que, com a consequente diminuição da hidrofiliidade, permitem a sua utilização tópica no tratamento de carcinomas basocelulares, gastrointestinais e lesões relacionadas com a pele (Juzeniene *et al.* 2007; Josefsen & Boyle, 2012; Ormond *et al.* 2013). Os derivados de ALA têm ainda outras aplicações, como a possibilidade de serem

utilizados como traçadores de diagnóstico, principalmente no cancro da bexiga, devido à acumulação seletiva de PpIX no tecido tumoral e possibilidade de visualização quando este é iluminado por luz azul (Josefsen & Boyle, 2012).

1.7.3.2 Clorinas

Na família das clorinas, os fotossensibilizadores que se destacam são a meta-tetrahidroxifenil clorina (m-THPC do inglês *m-tetra(hydroxyphenyl)chlorin*), também designada por temoporfina ou Foscan®, a verteporfina e a Mono-L-aspartil-clorina e6 (NPe6 do inglês *mono-L-aspartyl chlorine e6*), com fórmulas químicas representadas na Figura 9.

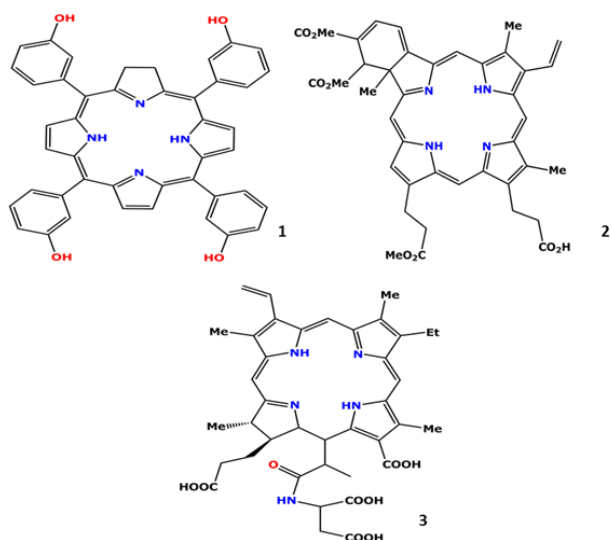


Figura 9. Estruturas químicas das clorinas m-THPC (1), verteporfina (2) e NPe6 (3). Estruturas adaptadas de Ormond et al.2013 e desenhadas com recurso ao programa ChemDraw® 12.0

O m-THPC, a verteporfina e o NPe6 produzem uma elevada quantidade de oxigénio singleto após exposição a luz de comprimentos de onda acima dos 650 nm, o que permite maior penetração da luz nos tecidos (Brown *et al.*2004; Ormond *et al.* 2013; Skupin-Mrugalska *et al.* 2013). Estes fotossensibilizadores são muito ativos e requerem uma baixa concentração de composto e de luz comparativamente ao Photofrin® e ao ALA; contudo requerem também uma iluminação precisa dos tecidos afetados, para que não haja ativação do composto localizado em tecidos saudáveis (Brown *et al.*2004; Ormond *et al.* 2013).

1.7.3.3 Ftalocianinas

Entre as ftalocianinas, as ftalocianinas de alumínio sulfonadas (AIPcS4, do inglês *aluminium(III) phthalocyanine tetrasulfonate chloride*) encontram-se aprovadas para uso clínico na Rússia, cuja estrutura química está representada na Figura 10.

As ftalocianinas estão relacionadas com as porfirinas, pelo que possuem uma estrutura macrocíclica aromática e simétrica (Josefsen & Boyle, 2012). Contudo, estes fotossensibilizadores necessitam de ligações metal-ligando para obter um efeito fotodinâmico. O núcleo com metais de transição possibilita o desvio do comprimento de onda de absorção para o vermelho, o que permite usar luz com comprimentos de onda entre os 670 nm e os 700

nm, em conformidade com a janela ótima de formação de ROS (Josefsen & Boyle, 2012; Ormond *et al.* 2013).

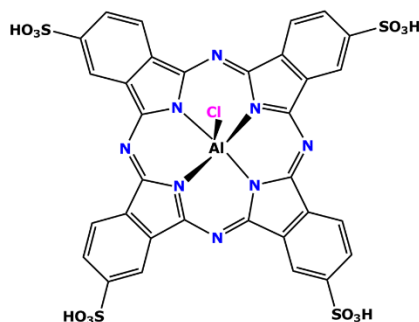


Figura 10. Estrutura química da ftalocianina AlPcS4. Estrutura adaptada de Ormond *et al.* 2013 e desenhada com recurso ao programa ChemDraw® 12.0

Por outro lado, as ftalocianinas possuem uma tendência para agregação em meios aquosos a pH fisiológico pelo que, para se evitar a perda total ou parcial da sua atividade fotodinâmica, podem utilizar-se estratégias como formulações de base lipossomal (Sharman *et al.* 1999; Allison *et al.* 2010; Josefsen & Boyle, 2012). Nestes fotossensibilizadores também são descritos efeitos de fotossensibilidade da pele, com a duração de várias semanas (Ormond *et al.* 2013).

A nível clínico estes fotossensibilizadores demonstram eficácia numa vasta gama de patologias dermatológicas e em diversos tipos de cancro (Sharman *et al.* 1999; Allison *et al.* 2010; Josefsen & Boyle, 2012).

1.7.3.4 Porfíricos

Os porfíricos, que são isómeros modificados das porfirinas, possuem uma cadeia lateral que lhe confere uma captação seletiva a nível tumoral, maior eficiência da produção de ROS e ausência de fotossensibilidade (O'Connor *et al.* 2009). Entre esta família de fotossensibilizadores o 9-acetoxi-2,7,12,17-tetraqui-(β -metoxietil)-porfírico (AMTPn, do inglês *9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porphycene*), cuja estrutura química está representada na Figura 11, destaca-se dos restantes uma vez que possui aprovação para uso clínico na Alemanha para o tratamento de patologias cutâneas, com um comprimento de onda de absorção na ordem dos 600 nm (O'Connor *et al.* 2009; Josefsen & Boyle, 2012).

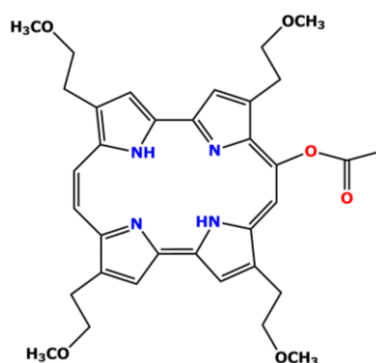


Figura 11. Estrutura química do AMTPn. Estrutura adaptada de Josefsen & Boyle, 2012 e desenhada com recurso ao programa ChemDraw® 12.0

1.7.4 Fotossensibilizadores de 3ª geração

Atualmente, os fotossensibilizadores de 3ª geração encontram-se em desenvolvimento, pelo que se pretende que estes possuam uma ativação por luz de comprimentos de onda cada vez maiores, de modo a ter-se uma maior penetração pela luz nos tecidos. Adicionalmente, é exigido que estes não provoquem reações de fotossensibilidade generalizada durante o tratamento e que sejam ainda mais específicos quanto à distribuição no tecido tumoral (Lucky *et al.* 2015).

Para tal, a investigação tem por base a modificação dos fotossensibilizadores através da adição de conjugados biológicos como péptidos, anticorpos, sequências de DNA ou de RNA antisense, entre outros, para a obtenção de uma maior internalização por interações específicas com o tecido tumoral alvo. Outra alternativa é a utilização de conjugação química ou de encapsulação dos fotossensibilizadores em sistemas de transporte e de libertação de fármacos como lipossomas ou nanopartículas, para se atingir o mesmo efeito (Lucky *et al.* 2015).

Em resumo, a diferença entre os fotossensibilizadores de 2ª e de 3ª geração verifica-se a nível da especificidade da interação com o tecido neoplásico. Contudo, apesar de estes fotossensibilizadores em estudos demonstrarem eficácia anti-tumoral *in vitro*, o mesmo ainda não se verifica em grande parte dos estudos *in vivo*, pelo que a sua utilização em ensaios clínicos ainda se encontra numa fase inicial (Lucky *et al.* 2015).

1.8 Mecanismos de citotoxicidade da PDT

Uma vez que a semivida do $^1\text{O}_2$ é muito curta, a sua difusão nas células será limitada, garantindo que o dano provocado pelo efeito fotodinâmico ocorra muito perto da localização intracelular do PS (Agostinis *et al.* 2011). Devido a esta particularidade, é importante conhecer os locais de acumulação preferenciais dos diferentes fotossensibilizadores. Podemos, por exemplo, referir o Photofrin® que se acumula a nível das membranas lipídicas, o NPe6 e a talaporfina a nível dos lisossomas, a verteporfina a nível das mitocôndrias e o m-THPC a nível do retículo endoplasmático e/ou das mitocôndrias (Agostinis *et al.* 2011).

A morte celular associada à PDT pode ocorrer por apoptose, por necrose ou por autofagia com término em morte, porém a apoptose (Figura 12) é considerada a via predominante (Garg *et al.* 2010; Agostinis *et al.* 2011; Hou *et al.* 2013).

A indução de apoptose pela PDT está na dependência da ativação de duas cascatas apoptóticas conhecidas por via apoptótica extrínseca ou associada a recetores de morte e a via apoptótica intrínseca ou mitocondrial (Uzdensky *et al.* 2008; Garg *et al.* 2010; Agostinis *et al.* 2011; Hou *et al.* 2013). O envolvimento da sinalização por recetores de morte está associado à libertação de citoquinas induzidas por stresse oxidativo por parte da PDT ou pelas células em morte. Por outro lado, está demonstrado que a morte celular apoptótica subsequente à PDT envolve a via mitocondrial na maioria dos modelos em estudo (Almeida *et al.* 2004; Garg *et al.* 2010; Agostinis *et al.* 2011).

A ativação da via apoptótica intrínseca parece depender criticamente dos danos diretos na mitocôndria ou da sinalização por ativação de vias secundárias por dano noutras localizações subcelulares. A permeabilização da membrana mitocondrial após a PDT é um evento letal crucial, que é controlado pelos membros da família BCL-2 (do inglês *B-cell leukemia/lymphoma protein*) e pensa-se que é independente do gene *TP53* envolvido na

regulação do ciclo celular (Almeida *et al.* 2004;Uzdensky *et al.* 2008; Garg *et al.* 2010). Na morte celular por apoptose, as proteínas pró-apoptóticas BAX (do inglês *Bcl-2-associated X protein*) e BAK (do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/killer protein*) são essenciais na PDT, uma vez que a sua ausência inibe esta via de morte. O aumento na expressão de BAX é suficiente para que ocorra ativação de caspases e, conseqüentemente, morte celular por apoptose (Almeida *et al.* 2004;Garg *et al.* 2010; Hou *et al.* 2013).

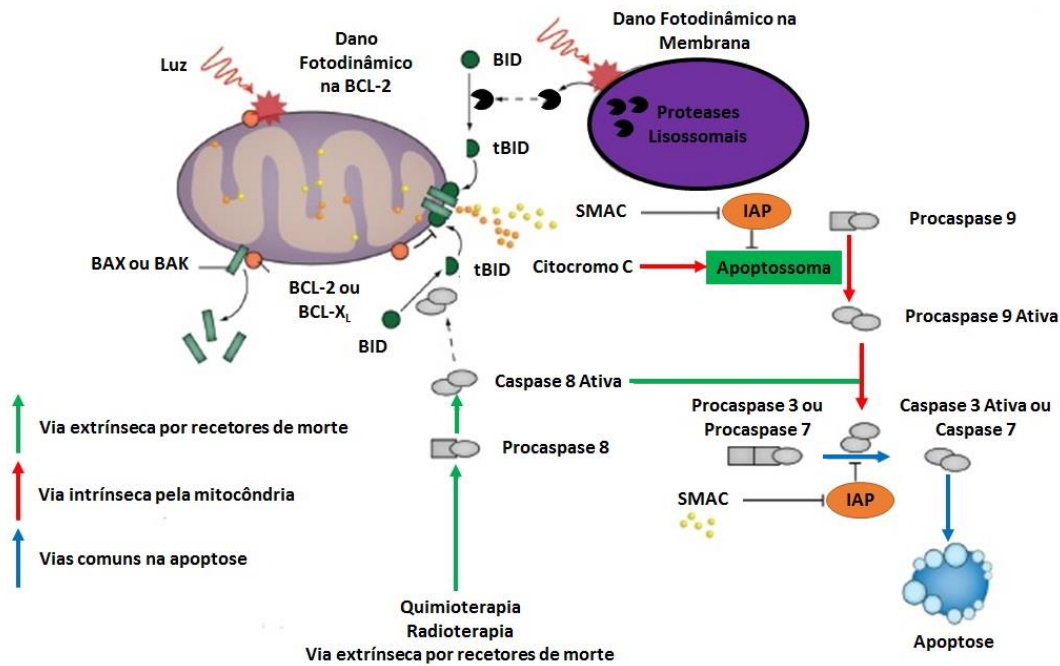


Figura 12. Mecanismos envolvidos na morte por apoptose na PDT. Como se pode observar na figura a apoptose possui duas possíveis vias de ativação, uma através de receptores de morte (via extrínseca) ou por via mitocondrial (via intrínseca). Adaptado de Springer *et al.* 2015

A PDT também pode atuar a nível das proteínas anti-apoptóticas BCL-2, facilitando a permeabilidade membranar mitocondrial mediada por BAX/BAK e a liberação de ativadores de caspases, como o citocromo c, o complexo Smac/DIABLO (do inglês *Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point*) ou outras moléculas pró-apoptóticas, incluindo o fator indutor de apoptose (Garg *et al.* 2010). Porém, quando ocorre acumulação preferencial de PS noutros organelos que não a mitocôndria, tais como o retículo endoplasmático ou os lisossomas, são envolvidos outros marcadores moleculares de ativação da apoptose (Garg *et al.* 2010).

A necrose ocorre quando se está perante a existência de dano irreversível de tecidos (Golstein & Kroemer, 2007; Garg *et al.* 2010; Hou *et al.* 2013). A necrose pode ser programada através de regulação genética, quando as células não conseguem ativar a caspase-8 após a ligação de agonistas dos receptores de morte ou quando não existe a expressão de beclina-1, componentes estes necessários na apoptose e na autofagia, respetivamente (Golstein & Kroemer, 2007; Berghe *et al.* 2014).

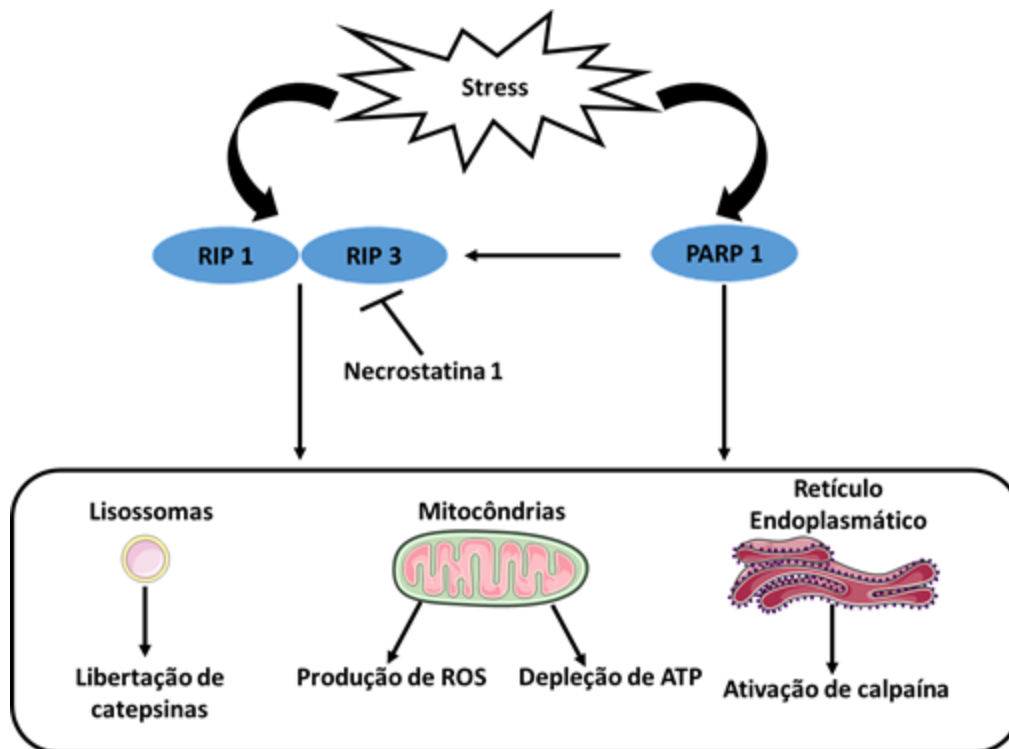


Figura 13. Mecanismos envolvidos na morte por necrose programada. A ativação da via de morte por necrose tem como consequência vários fenômenos ao nível dos organelos celulares, entre os quais a liberação de catepsinas, produção de ROS, depleção de ATP e a ativação de calpaína. Adaptado de Hou et al. 2013 e Servier.com. (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

A geração do complexo proteico RIP1/RIP3 (do inglês *kinase receptor interacting proteins 1 and 3*) leva à ativação de vias de sinalização da necrose programada, que podem ser inibidas pela necrostatina-1 (Berghe *et al.* 2014). Morfologicamente, a necrose é caracterizada pela disrupção da membrana celular e de organelos, com aumento de tamanho das mitocôndrias e do citoplasma (Golstein & Kroemer, 2007; Ouyang *et al.* 2012; Hou *et al.* 2013).

Na necrose, os conteúdos celulares ficam expostos no meio extracelular onde podem atuar como agentes sinalizadores que promovem a inflamação. Os principais desencadeadores da necrose incluem a acumulação excessiva de cálcio por ativação de calpaína, a formação de ROS, a depleção da energia celular, os danos a nível das membranas lipídicas, a destabilização lisossomal e a liberação de catepsinas (Ouyang *et al.* 2012; Hou *et al.* 2013). A sobre-expressão da poli ADP-ribose polimerase 1 (PARP-1, do inglês *poly [ADP-ribose] polymerase 1*) causa a depleção de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*), o que leva à morte celular por necrose através da ativação de vias de sinalização específicas (Ouyang *et al.* 2012; Hou *et al.* 2013).

A autofagia é um processo envolvido na sobrevivência celular durante períodos de inanição ou de stresse devido a privação de fatores de crescimento (Ouyang *et al.* 2012; Liang *et al.* 2016). A sua principal forma é a macroautofagia, como se observa na Figura 14, que se inicia com o envolvimento do conteúdo citosólico pelo fagóforo com formação de autofagossomas. Os autofagossomas fundem-se com lisossomas para formar autolisossomas onde o material envolvido é degradado por enzimas lisossomais. Neste processo pode ocorrer a produção de aminoácidos e de ácidos gordos para suprir necessidades bioenergéticas e

síntese proteica, sendo que a autofagia também pode ser seletiva atuando a nível de diferentes organelos, proteínas, micróbios, entre outros (Ouyang *et al.* 2012; Hou *et al.* 2013; Liang *et al.* 2016).

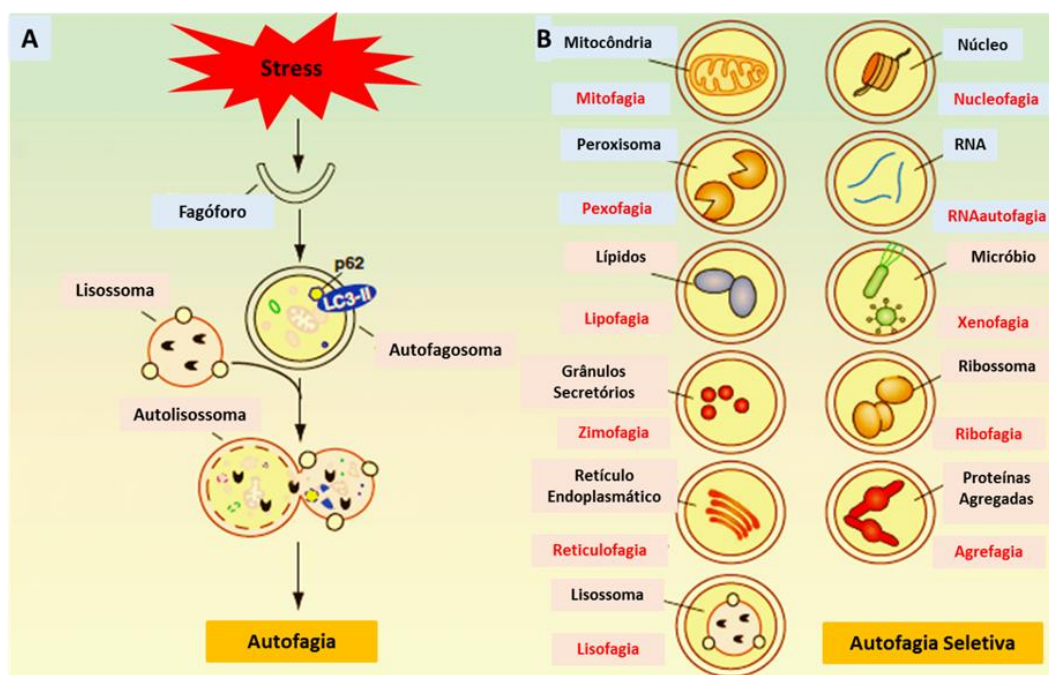


Figura 14. Mecanismos envolvidos na macroautofagia e autofagia seletiva. Adaptado de Hou *et al.* 2013.

A autofagia pode ser estimulada por vários sinais de stresse, sendo o sinal mais comum o stresse oxidativo. A autofagia possui um papel citoprotetor mas também pode desencadear morte, como se verifica após terapêuticas que envolvem espécies reativas de oxigênio como agentes primários de dano (Agostinis *et al.* 2011).

Os fotossensibilizadores que se acumulam preferencialmente nos lisossomas podem causar danos que comprometam a finalização do processo autofágico, o que leva à acumulação de componentes danificados por ROS que potenciam a morte por apoptose (Agostinis *et al.* 2011).

A PDT pode ainda provocar danos a nível dos vasos sanguíneos que se encontram nos tumores, impedindo a chegada de nutrientes, o que constitui um importante mecanismo de destruição de neoplasias (Wang *et al.* 2012). Os danos na vascularização devidos à PDT podem envolver processos de vasoconstrição, de aumento da permeabilidade vascular, de formação de trombos e de paragem do fluxo sanguíneo, conforme esquematizado na Figura 15 (Debefve *et al.* 2006; Wang *et al.* 2012).

O dano das células endoteliais induzido pela PDT causa o rearranjo do seu citoesqueleto o que, por sua vez, determina a retração das mesmas e a abertura de *gap junctions*. Este processo resulta na exposição da matriz membrana dos vasos sanguíneos o que, consequentemente, aumenta a permeabilidade vascular e induz a ligação e a agregação de plaquetas no local danificado (Debefve *et al.* 2006; Novak-Sliwinska *et al.* 2013). As plaquetas ativadas libertam mediadores vasoativos como a serotonina e os tromboxanos, que têm a capacidade de despoletar uma cascata de eventos, incluindo a amplificação da ativação de plaquetas, a coagulação e a vasoconstrição (Debefve *et al.* 2006; Novak-Sliwinska *et al.* 2013).

O resultado final é o colapso dos vasos sanguíneos e a paragem do fluxo sanguíneo com a consequente obstrução permanente ou temporária dos vasos sanguíneos tumorais (Debefe *et al.* 2006; Novak-Sliwinska *et al.* 2013).

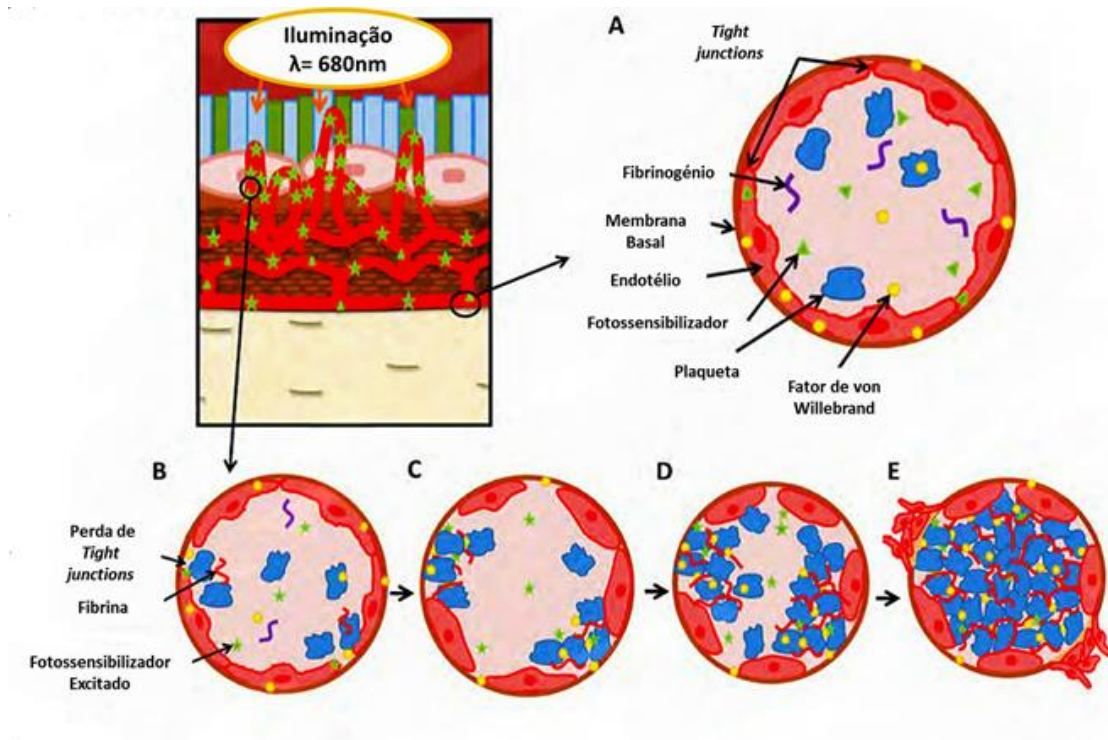


Figura 15. Efeitos da PDT a nível da agregação de plaquetas, formação de trombos e aumento da permeabilidade vascular. A- Captação de PS pelos vasos sanguíneos; B- Ativação do PS nos vasos sanguíneos com o consequente dano no tecido endotelial (perda de *tight junctions*) e conversão de fibrinogénio em fibrina, indicativa de um processo trombótico; C e D- Vasoconstricção e aumento de permeabilidade com infiltração de plaquetas, devido a libertação do fator de von Willebrand, indicando coagulação sanguínea; E- Rutura do endotélio, com paragem do fluxo sanguíneo. Adaptado de Novak-Sliwinska *et al.* 2013.

1.9 Ação da PDT na promoção de resposta imunitária

Uma das particularidades da PDT é a indução de inflamação aguda, que se caracteriza pela produção de várias citocinas e quimoquinas, nas quais se incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumoral necrosis factor alpha*), a interleucina-1 beta (IL-1 β , do inglês *interleukin 1 beta*) e a interleucina-6 (IL-6, do inglês *interleukin 6*). Também é descrito um aumento na expressão de moléculas de adesão, como a E-selectina e a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule 1*), bem como uma rápida acumulação de leucócitos e aumento dos gânglios linfáticos de drenagem tumoral (TDLN, do inglês *tumor-draining lymph nodes*) na área tumoral tratada, como se encontra descrita na Figura 16 (Garg *et al.* 2010; Brackett & Gollnick, 2011; Mroz *et al.* 2011).

O tipo de leucócitos que é predominante na área tumoral afetada pela PDT caracteriza-se por expressar o antigénio de diferenciação de granulócitos 1 (Gr-1, do inglês *granulocyte-differentiation antigen-1*) e por ter semelhança morfológica com os neutrófilos. Sabe-se também que a depleção de leucócitos que expressam Gr-1 está relacionada com um crescimento tumoral a longo prazo (Kousis *et al.* 2007; Brackett & Gollnick, 2011).

Em resumo, verifica-se que a PDT induz uma resposta sistêmica, com neutrofilia, liberação de mediadores pró-inflamatórios e de proteínas do complemento, havendo a presença e a ativação de mecanismos de imunidade inata e adquirida e, conseqüentemente, de imunidade anti-tumoral.

A base da imunidade anti-tumoral observada na PDT está relacionada com a ativação e a maturação de células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*) por células tumorais em morte que, após maturação, migram para TDLN onde ativam as células T (Brackett & Gollnick, 2011). A ativação de DC é resultado do reconhecimento de padrões associados a dano molecular (DAMP, do inglês *damage associated molecular patterns*), como moléculas libertados pelas células em morte após a PDT ou pela presença de recetores que estão expressos nestas células como, por exemplo, os recetores *toll-like*. Um dos DAMP que está envolvido na maturação de DC é a proteína de choque térmico 70 (HSP70, do inglês *heat shock protein 70*), que ao interagir com os recetores *toll-like* existentes nas DC, as transforma em células apresentadoras de antígenos que irão interagir com as células efetoras do sistema imunitário, nomeadamente as células T-CD4⁺ e T-CD8⁺, com a finalidade de se induzir uma resposta anti-tumoral (Garg *et al.* 2010; Brackett & Gollnick, 2011; Mroz *et al.* 2011).

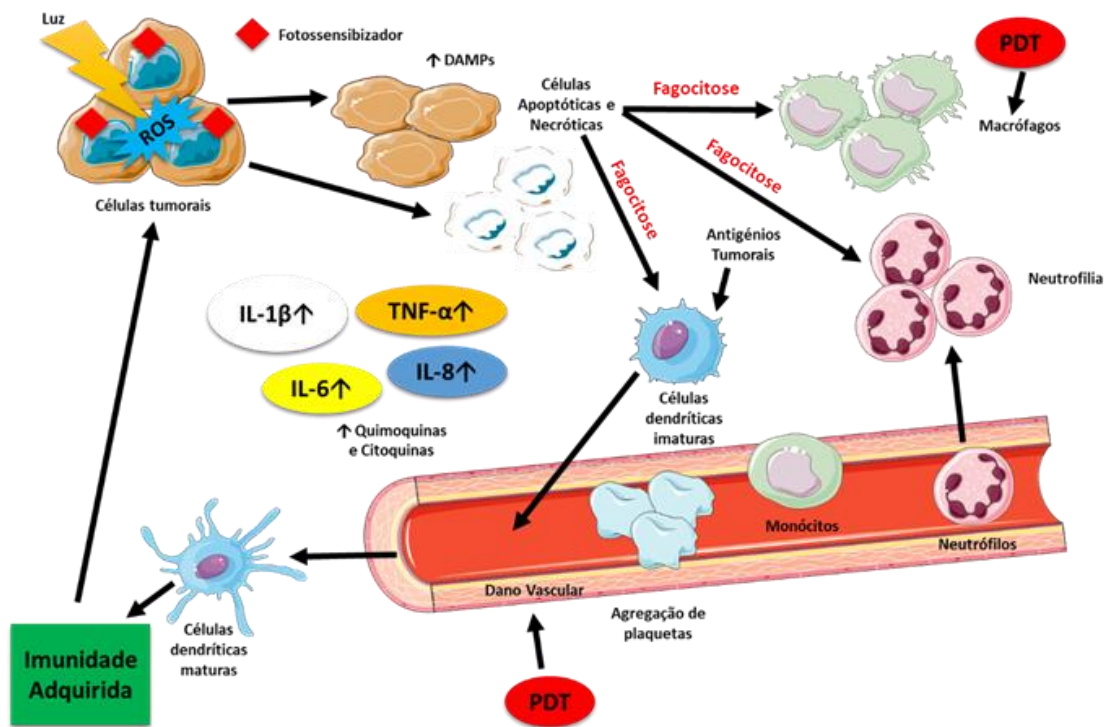


Figura 16. Efeitos da PDT em termos de resposta imunitária. A PDT induz a morte de células tumorais, com liberação de diversos DAMPs, que ao serem captados por DC, levam à sua ativação, maturação e conseqüente resposta imunitária anti tumoral. Adaptado de Garg *et al.* 2010 e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

1.10 Aplicação clínica da PDT nos câncros colorretal e esofágico

Como já foi referido, o cancro colorretal é um dos câncros com maior incidência e mortalidade, pelo que as estratégias atuais para o seu tratamento têm estado dependentes da possibilidade de recesso cirúrgico e da aplicação de quimioterapia. Tendo isto em conta, a

aplicação clínica da PDT neste tipo de neoplasia, está limitada ao seu uso como terapia neoadjuvante e/ou adjuvante relativamente à cirurgia, de forma a se evitar uma possível recorrência tumoral (Shishkova *et al.* 2013).

O primeiro estudo sobre a aplicação da PDT no cancro colorretal é referido por Barre *et al.* que, apesar de ter sido um estudo piloto, incluiu dez doentes em estágio inoperável, que foram submetidos a PDT endoscópica com HpD injetado por via intravenosa na concentração de 2,5 mg/kg e com irradiação 48h após injeção com um laser de 630 nm de comprimento de onda. O seguimento durante 1 mês revelou melhoria sintomática de todos os indivíduos. Adicionalmente, verificou-se que 2 desses 10 doentes tiveram remissão tumoral completa entre os 20 e os 28 meses após a PDT. Contudo, um dos doentes cujo tumor se encontrava num estágio avançado, teve complicações hemorrágicas. Este facto revela mais uma vez a importância da dosimetria na PDT, para que o tratamento seja cada vez mais personalizado e eficaz para cada doente (Barr *et al.* 1990; Shishkova *et al.* 2013). Noutro estudo posterior, realizado por Kashtan *et al.*, uma mulher de 70 anos de idade com recorrência tumoral foi submetida a PDT com Photofrin® administrado por injeção intravenosa na concentração de 2 mg/kg e duas irradiações, uma após 48 h e outra após 96 h. O seguimento durante 10 semanas mostrou uma resposta anti-tumoral completa confirmada por biopsia. Porém após 16 semanas foi observada recorrência da neoplasia (Kashtan *et al.* 1996; Shishkova *et al.* 2013).

Outro estudo clínico realizado por Taber *et al.* que incluiu neoplasias do cólon utilizou o fotossensibilizador NPe6, com administração por via intravenosa numa gama de concentrações compreendida entre os 0,5 mg/kg e os 3,5 mg/kg, com a irradiação a ser efetuada com uma luz laser de argón com comprimento de onda de 664 nm, numa fluência entre os 25 J/cm² e os 100 J/cm², 4h após a injeção de PS. Como resultado, neste estudo observou-se a ausência de toxicidade por parte da PDT, ocorrendo apenas uma ligeira fotossensibilidade nos 11 doentes presentes no estudo, com a presença de necrose a nível tumoral entre as 24 h e as 48 h, sendo que após 8 a 12 semanas do tratamento se registou remissão tumoral completa em alguns casos (Taber *et al.* 1998; Kawczyk-Krupka *et al.* 2015). Outros estudos descreveram respostas individuais o que permitiu concluir que a concentração de 0,5 mg/kg de NPe6 com irradiação com 100 J/cm² era insuficiente para se obter regressão tumoral superior a 50% do tamanho tumoral inicial. Com concentrações de PS inferiores ou iguais a 1,65 mg/kg a regressão tumoral foi transitória contrariamente ao que ocorreu com concentrações superiores a 2,5 mg/kg onde, no final de 12 semanas, houve um melhor controlo do crescimento tumoral (Taber *et al.* 1998; Kawczyk-Krupka *et al.* 2015).

Em relação ao cancro do esofágico, verifica-se que o tipo de tratamento a utilizar está dependente do estágio tumoral, com a PDT a ser utilizada já como primeira linha de tratamento em alguns países, nos casos em que as neoplasias se encontram num estágio inicial. A primeira introdução desta terapêutica foi em contexto paliativo e revelou ser bastante promissora (Shishkova *et al.* 2013). O propósito do tratamento com PDT no cancro esofágico numa fase inicial é a remissão tumoral completa, enquanto na presença de cancro esofágico num estágio avançado e com aparecimento de metástases apenas servirá como uma forma paliativa, de modo a diminuir a progressão tumoral (Pech *et al.* 2005).

A título de exemplo, um estudo realizado por Peche *et al.* com o fotossensibilizador ALA na concentração de 60 mg/kg por via oral, com irradiação a ser efetuada entre 4 a 6h após a ingestão por uma fonte luminosa com 635 nm com uma fluência de 150 J/cm², todos os doentes obtiveram resposta tumoral com efeitos secundários praticamente inexistentes e com

uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 80% (Pech *et al.* 2005). Noutros estudos efetuados com cancro do esófago em estágio inicial verificou-se uma taxa de cura na ordem dos 89% para o PS HpD, de 86% para o PS mTHPC e de 75% para o Photofrin®. No tratamento com mTHPC ativado por luz com comprimento de onda de 514 nm obtiveram-se menos efeitos adversos, comparativamente com a ativação por luz comprimento de onda de 630 nm, apesar deste último ser mais eficiente no tratamento, devido a um efeito fotodinâmico com maior produção de ROS (Shishkova *et al.* 2013). Num estudo realizado por Canto *et al.*, verificou-se que a recessão cirúrgica em doentes com cancro esofágico inicial, combinada com a PDT teve uma taxa de cura de 95,4%, valor superior ao tratamento com PDT isolada que apresentou um valor de 89,7% (Canto *et al.* 2005; Shishkova *et al.* 2013). Outras combinações promissoras para o cancro esofágico foram estudadas por Maier *et al.*, o qual mostrou que a combinação da PDT com braquiterapia teve resultados significativamente melhores em relação ao grupo que apenas recebeu braquiterapia. No estudo de Zhang *et al.*, a combinação de PDT com 5-FU teve como resultado uma melhoria da remissão tumoral, na ordem dos 99%, comparativamente ao grupo que apenas recebeu PDT, com 87% (Maier *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2007; Shishkova *et al.* 2013).

2. Ácido Acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS) é um anti-inflamatório não esteroide com uma massa molar de 180 g/mol que se apresenta sob a forma de cristal ou de pó branco inodoro. Este fármaco exibe múltiplas propriedades farmacológicas para além do efeito anti-inflamatório, como propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-trombóticas (Kim *et al.* 2016). O AAS é o fármaco mais utilizado a nível mundial e há estudos que referem que uma administração regular de AAS a partir dos 50 anos tem como consequência uma redução do risco do aparecimento de múltiplas patologias associadas ao envelhecimento (Vane & Botting, 2003).

2.1 Farmacocinética e Farmacodinâmica do Ácido Acetilsalicílico

Em termos farmacocinéticos o AAS é absorvido rapidamente por difusão passiva na forma de ácido salicílico na mucosa gástrica e jejunal, onde se encontra um pH baixo e a hidrólise é mínima (Rocca & Petrucci, 2012; Gaglia & Clavijo, 2013). A biodisponibilidade após administração oral do AAS é aproximadamente 50%, uma vez que a fração administrada e absorvida do fármaco será inativada por desacetilação pelas carboxilesterases presentes no plasma sanguíneo e no fígado antes de voltar à circulação sistémica, sofrendo um efeito de primeira passagem (Rocca & Petrucci, 2012). Na inativação do ácido acetilsalicílico, a carboxilesterase 2 hepática humana (HCE2, do inglês *human carboxylesterase 2*) é a principal efetora do efeito de primeira passagem, como pode ser observado na Figura 17. Este efeito pode também ocorrer a nível do intestino pela mesma classe de esterases e no sangue periférico por colinesterases presentes no plasma, arilesterases presentes nos eritrócitos e ainda por outras esterases específicas (Rocca & Petrucci, 2012).

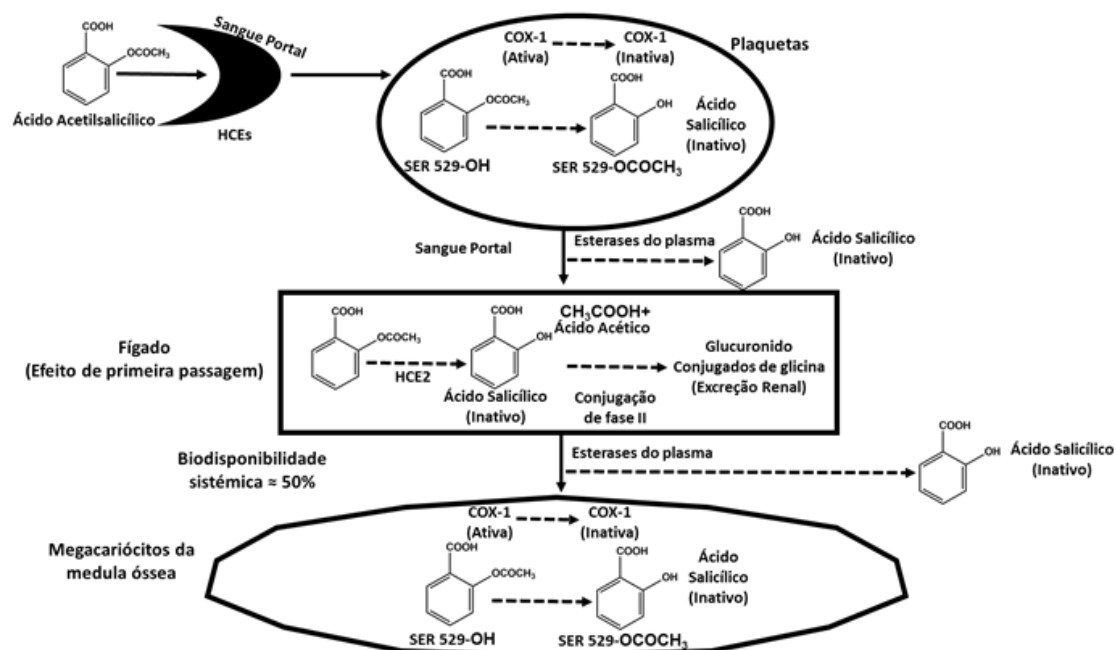


Figura 17. Farmacocinética e farmacodinâmica do AAS. O AAS é absorvido no estômago e no intestino delgado, exercendo o seu efeito farmacodinâmico a nível da acetilação do resíduo serínico 529 da COX-1 presente no sangue portal, sendo biotransformado para a forma inativa de ácido salicílico por esterases presentes no intestino, plasma e fígado. Uma vez na circulação sistêmica o AAS atinge os megacariócitos na medula óssea inibindo as cicloxigenases 1 e 2 e, conseqüentemente, a agregação de plaquetas. Adaptado de Rocca & Petrucci, 2012.

O pico de concentração de AAS no plasma humano após a administração oral é atingido em cerca de 1h, com uma semi-vida de cerca de 20 minutos (Rocca & Petrucci, 2012; Gaglia & Clavijo, 2013).

Tendo em conta a sua farmacodinâmica, verifica-se que o AAS interage com o centro ativo das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e 2 do inglês *cyclooxygenase 1 and 2*), sendo um inibidor não-seletivo das duas isoformas, o que provoca uma acetilação irreversível nas plaquetas presentes no sangue portal, antes do efeito de primeira passagem, com uma duração de aproximadamente 10 dias (Rocca & Petrucci, 2012; Gaglia & Clavijo, 2013). Para a inibição da COX-1 não é necessário uma grande concentração de AAS, pelo que concentrações baixas na ordem dos 30 mg têm eficácia. Contudo, para a inibição da COX-2 são necessárias concentrações consideravelmente mais altas, o que revela uma farmacodinâmica sustentável a nível das plaquetas por parte do AAS, apesar da curta semi-vida plasmática (Fuster & Sweeny, 2011; Rocca & Petrucci, 2012; Gaglia & Clavijo, 2013).

Tanto a COX-1 como a COX-2 estão envolvidas na conversão catalítica do ácido araquidónico (AAR, do inglês *arachidonic acid*), como está descrito na Figura 18, proveniente dos fosfolípidos da membrana celular, em prostaglandina H₂ (PGH₂, do inglês *prostaglandin H2*), sendo esta posteriormente convertida para outros tipos de prostanoides, por isomerases específicas que existem a nível dos tecidos, como o tromboxano A₂ (TXA₂, do inglês *thromboxane A2*) e a prostaglandina I₂ (PGI₂, do inglês *prostaglandin I2*) (Fuster & Sweeny, 2011; Rocca & Petrucci, 2012; Gaglia & Clavijo, 2013). O TXA₂ é gerado principalmente pela COX-1 nas plaquetas, como resposta ao aparecimento de agonistas como o colagénio, a adenosina difosfato e a trombina, ligando-se posteriormente ao seu recetor específico, que se

encontra à superfície das plaquetas e, conseqüentemente induz agregação plaquetária irreversível. Este fenômeno causa vasoconstrição e proliferação do tecido endotelial, bem como a promoção de aterosclerose (Fuster & Sweeny, 2011; Rocca & Petrucci, 2012; Gaglia & Clavijo, 2013). Em contraste a PGI₂ é produzida principalmente pela COX-2 a nível das células vasculares endoteliais, tendo efeitos contrários ao TXA₂, com inibição da agregação plaquetária, vasodilatação e inibição da proliferação endotelial e aterosclerose (Rocca & Petrucci, 2012; Gaglia & Clavijo, 2013).

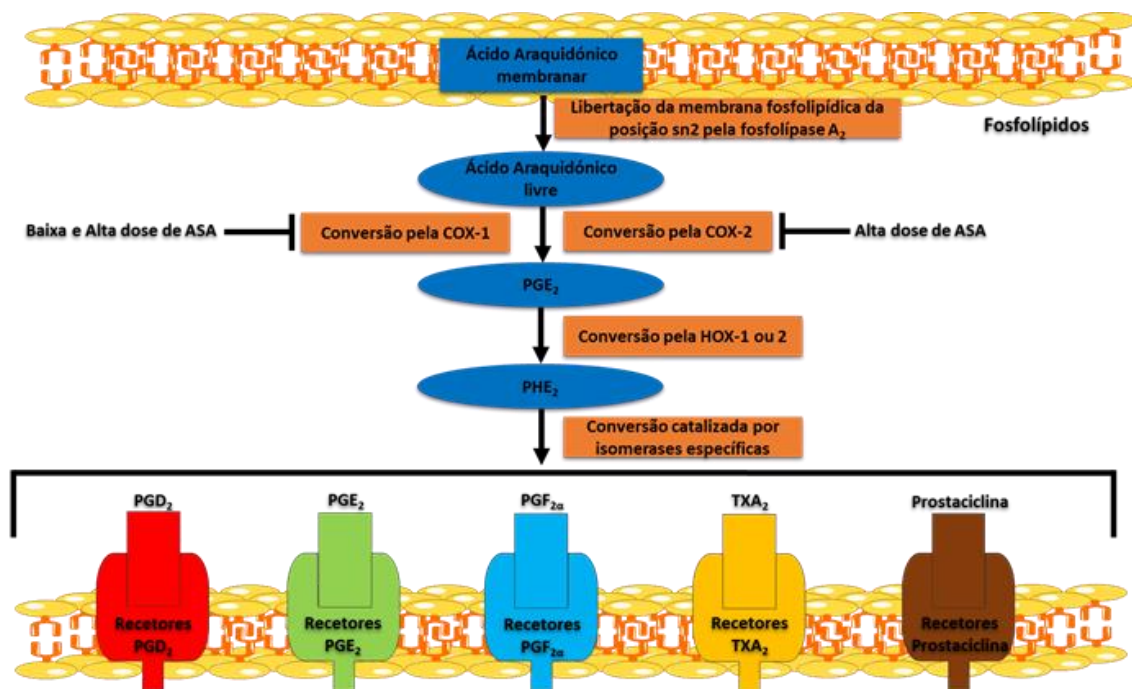


Figura 18. Metabolismo do ácido araquidônico e formação de prostanoídeos. Adaptado de Thun *et al.* 2012 e de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

2.2 Ácido Acetilsalicílico e Cancro

Com o efeito anti-inflamatório do AAS bem documentado e provado em termos clínicos, este fármaco tem vindo a ganhar interesse noutras áreas terapêuticas, nomeadamente na quimioprevenção tumoral (Chan *et al.* 2011; Alfonso *et al.* 2014). Este interesse fundamenta-se por numerosas investigações de índole fundamental, bem como de aplicação clínica da aspirina em diversos tipos de neoplasias, como o cancro colorretal, o cancro esofágico, o cancro da mama, o cancro do fígado e o cancro da pele, aos quais está associado uma redução do risco de incidência e/ou de mortalidade (Ugurlican *et al.* 2011; Alfonso *et al.* 2014). Foi demonstrado experimentalmente que o AAS induz a morte celular por apoptose e possui um efeito antiangiogénico. Pensa-se que este efeito assenta na capacidade de interferir com o metabolismo do AAR, por inativação permanente da COX-1 (constitutiva) e modelação da COX-2 (indutível) pela acetilação dos seus resíduos de serina (Thun *et al.* 2012; Alfonso *et al.* 2014).

Vários estudos apontam para uma variedade de alvos moleculares, contidos em vias metabólicas dependentes da COX, como potenciais alvos do AAS para os seus efeitos anticancerígenos. O AAS e o seu metabolito primário, o salicilato, apresentaram efeito inibitório em termos da expressão da COX-2, quer a nível transcricional como pós-

transcricional. Como consequência verificou-se um decréscimo da síntese de prostaglandinas inflamatórias e aumento da concentração de AAR, com efeitos a nível do aumento da produção de ceramida a partir de esfingomielina, dando-se a promoção de apoptose (Elwood *et al.* 2009). Outra capacidade do AAS a nível da inibição das COX é a alteração do normal funcionamento das plaquetas, que em indivíduos com cancro tem o potencial de diminuir a ativação das mesmas, afetando a progressão das neoplasias e possível metastização (Husain *et al.* 2002).

A COX-2 é também conhecida por ser uma enzima que está sobre-expressa em vários tipos de cancro, como o colorretal e o esofágico, tendo influência em relação à concentração da prostaglandina E2 (PGE₂ do inglês *prostaglandin E2*). A sua acumulação excessiva favorece a angiogénese e a migração celular, bem como promove a resistência à morte celular tumoral por apoptose estando, por isso, associada a um mau prognóstico clínico. Vários estudos referem que a inibição da COX-2 pelo ácido acetilsalicílico, leva a aumento da sobrevivência a longo prazo dos doentes com neoplasias quando esta se encontra sobre-expressa (Sobolewski *et al.* 2010).

Para além da interação evidente entre o AAS e os seus metabolitos, a nível das COX, a contribuição noutras vias não pode ser descartada. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a inibição da quinase IκB, uma das subunidades constituintes do fator nuclear NF-κB (do inglês *nuclear transcription factor kappa B*) que, por sua vez, está envolvido na resposta inflamatória e promoção da angiogénese através de regulação transcricional. A inibição da subunidade não origina a ativação do fator, havendo a promoção de efeitos anticancerígenos (Dikshit *et al.* 2006). Em contradição com estas evidências existem outros estudos, onde a mediação da morte celular por apoptose pela aspirina está dependente da ativação do fator nuclear NF-κB. Um exemplo é o estudo de Stark *et al.* em modelos animais com xenotransplantes de cancro colorretal humano, onde a ativação da via de sinalização pelo AAS se traduz num incremento da morte por apoptose. Com tal resultado fica em aberto a possibilidade de existirem múltiplas vias de ativação de morte celular, tendo em conta diferentes tipos de células e ambientes tumorais distintos (Stark *et al.* 2007).

Outra via de ativação em que o AAS intervém, é a via das quinases reguladas por sinalização extracelular, via essa que está envolvida em inúmeros processos celulares, como a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência. A interferência na sinalização desta via pelo AAS, tem como resultado efeitos antiproliferativos e antiangiogénicos a nível neoplásico (Bruno *et al.* 2012).

O AAS também possui efeitos a nível mitocondrial, levando a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, resultando na libertação de citocromo c, que leva à ativação de vias apoptóticas dependentes de caspases (Zimmermann *et al.* 2000). Adicionalmente, o AAS possui um mecanismo alternativo a nível mitocondrial, relativo à inibição da captação de cálcio por parte das mitocôndrias, sendo que o cálcio livre irá promover a morte celular e efeitos antiproliferativos (Núñez *et al.* 2006).

Um efeito inibitório da enzima 6-fosfofruto-1-cinase por parte do AAS é descrito por Spitz *et al.*, com a atuação do composto nos processos glicolíticos, altamente ativos durante a carcinogénese, com um decréscimo no consumo de glicose e inibição da proliferação celular (Spitz *et al.* 2009).

Em termos de ciclo celular, também se verifica um efeito regulatório a nível das ciclinas A e D1 e de outros fatores, por parte do AAS, havendo paragem do mesmo na fase G₀/G₁ (Law *et al.* 2000; Thoms *et al.* 2007).

2.3 PDT em combinação com Ácido Acetilsalicílico

Uma das principais limitações da PDT reside no fato desta modalidade terapêutica poder levar indiretamente a sobre-expressão de fatores angiogénicos e inflamatórios, no microambiente tumoral, devido a hipoxia local, causada por um rápido consumo das reservas de oxigénio ou por danos a nível vascular (Solban *et al.* 2006; Sobolewski *et al.* 2010). Tendo esta hipótese por base, diversos estudos demonstram uma sobre-expressão de COX-2, de HIF-1 α e de VEGF, após a PDT. Outros fatores pró-angiogénicos e pró-inflamatórios também se encontram sobre-expressos após a PDT, pelo que quando avaliamos as vias de sinalização envolvidas nestes processos, verificamos que as COX têm um papel fundamental na regulação carcinogénica. Posto isto, para se aumentar a possibilidade de obter uma resposta completa e eficiente após a PDT, o uso de inibidores das COX poderá ser uma potencial abordagem terapêutica (Ferrario *et al.* 2002; Mitra *et al.* 2006; Solban *et al.* 2006; Sobolewski *et al.* 2010).

No seguimento desta abordagem, foram efetuados também alguns estudos *in vitro* e *in vivo*, principalmente a nível da utilização de inibidores específicos da COX-2, havendo no geral resultados mais favoráveis na combinação entre PDT e inibidores da COX-2, com a promoção de morte celular e diminuição do crescimento tumoral (Ferrario *et al.* 2002; Makowski *et al.* 2003; Luna *et al.* 2008).

No caso do AAS, a combinação com a PDT tem também potencial para aumentar a eficácia global em relação à terapêutica isolada. Um estudo realizado por Chiavello *et al.* revelou resultados promissores *in vitro* a nível do cancro do pulmão, um tipo de cancro que também apresenta elevada expressão de COX-2 (Chiavello *et al.* 2010). Contudo, todos os mecanismos relativos à morte celular causada por esta combinação ainda são pouco conhecidos. A nível da concentração a usar existe também um parco conhecimento para se obter um melhor efeito terapêutico dentro dos limites permitidos pelo organismo. Finalmente verifica-se a falta de modelos *in vivo* para se comprovar todos os resultados existentes até à data, pelo que é necessário perceber se esta combinação pode futuramente ser aplicado à prática clínica.

OBJETIVOS

3.Objetivos e contextualização experimental

A terapia fotodinâmica tem-se afirmado como uma opção terapêutica em oncologia e por isso é necessário clarificar todos os seus mecanismos de ação e otimizar os seus protocolos de dosimetria, de modo a implementar a sua utilização na prática clínica.

O AAS demonstra também um potencial anti-tumoral que é refletido pelo grande número de ensaios clínicos muitos dos quais ainda em curso, com a finalidade de avaliar os mecanismos de prevenção e de tratamento oncológico.

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do possível efeito sinérgico entre a PDT e o AAS, com base no fotossensibilizador 5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)clorina (BBr2HPC), cuja estrutura se encontra na Figura 19, bem como a avaliação dos mecanismos de ação envolvidos.

Na realização deste estudo experimental pretendeu-se avaliar o efeito combinado da PDT e do AAS, *in vitro*, nas linhas celulares WiDr (linha celular de adenocarcinoma colorretal) e OE19 (linha de adenocarcinoma do esófago), no que se refere à atividade metabólica e à viabilidade celular. Posteriormente, de modo a se obter uma compreensão alargada dos mecanismos envolvidos na combinação, foi objetivo avaliar os tipos de morte celular, as alterações em termos de ciclo celular, os mecanismos de defesa redox e a produção intracelular de ROS.

Finalmente, de modo a estudar o potencial *in vivo* desta combinação numa fase pré-clínica, procedeu-se à realização de xenotransplantes de células tumorais WiDr em ratinhos Balb/c nu/nu.

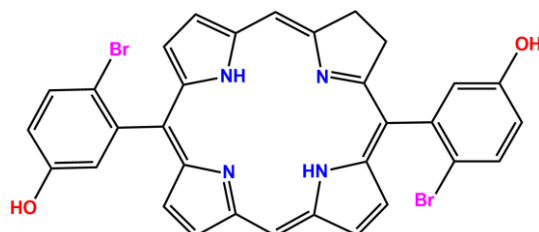


Figura 19. Estrutura química do BBr2HPC. Estrutura adaptada de Teixo, 2013 e desenhada com recurso ao programa ChemDraw® 12.0

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos (*IN VITRO*)

4.1 Culturas celulares

As culturas celulares têm como propósito a propagação de células dispersas para a sua posterior utilização em estudos *in vitro*, sendo que a sua manutenção exige cuidados especiais a nível da assepsia e da esterilidade, de modo a garantir-se a viabilidade das mesmas (Braga, 2012). Para a realização dos estudos *in vitro* foram utilizadas duas linhas celulares humanas, a linha celular WiDr e a linha celular OE19.

A propagação das culturas celulares aderentes teve em conta as especificações dos seus respetivos fornecedores, a ATCC (do inglês *American Type Culture Collection*) para a linha WiDr e a ECACC (do inglês *European Collection of Cell Cultures*) para a linha OE19, sendo estas mantidas a 37°C numa atmosfera com humidade relativa a 95% e 5% de CO₂ numa incubadora Heracell 150.

A propagação da linha celular WiDr efetuou-se em meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma D-5648), enquanto a linha celular OE19 foi propagada em meio de cultura RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute Medium*) (Sigma R6504), com ambos os meios de cultura a serem suplementados com soro bovino fetal a 10%, (FBS; Sigma F7524), 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Sigma A5955) e piruvato de sódio (DMEM: 250µM, RPMI: 1mM; Gibco 11360).

Uma vez que estas linhas celulares foram mantidas em cultura aderente foi necessário destacar as células dos frascos para a preparação de suspensões celulares, de modo a ser possível a realização dos estudos *in vitro*. Para tal, aspiraram-se os meios de cultura dos frascos e fez-se uma lavagem das culturas celulares com solução salina de tampão fosfato (PBS), constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de Na₂HPO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662), com pH de 7,4, incubando-as de seguida com uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma T4049) até estas se destacarem dos frascos. De seguida adicionou-se o dobro do volume de tripsina em meio de cultura, de modo a inativá-la.

Para a contagem do número de células existentes nos frascos, diluiu-se um volume 20 µL de suspensão celular num volume igual de azul de tripano e fez-se a contagem num microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) com ampliação de 10 vezes com, recurso a um hemocitómetro.

De modo a obter-se a concentração celular desejada para cada estudo, adicionou-se o volume necessário de meio de cultura às suspensões celulares obtidas anteriormente.

4.2 Soluções de Ácido Acetilsalicílico e Fotossensibilizador

Uma solução *stock* na concentração de 1 M de AAS foi preparada dissolvendo ácido acetilsalicílico (Sigma A6810) em tampão Tris-HCl na concentração de 1M com pH ajustado a 7,5 pela adição de NaOH na concentração de 10 M e posterior acerto de pH para 7.4. As concentrações de AAS a utilizar foram obtidas através desta solução inicial, de acordo com protocolos realizados anteriormente (Xiang *et al.* 2008; Raza & John, 2012).

As soluções do fotossensibilizador, previamente sintetizado pelo nosso grupo de investigação, foram preparadas através de uma solução *stock* a 1,53 mM de BBr2HPC diluída para as concentrações pretendidas com um solvente composto por uma mistura ternária de água, polietilenoglicol₄₀₀ (PEG₄₀₀) e etanol (50:30:20, v/v/v).

4.3 Terapia combinada

Para a realização dos estudos foram semeadas células em placas de cultura de 24 e de 48 poços ou ainda em frascos de cultura de 25 cm³ e de 75 cm³ consoante o tipo de ensaios, que foram distribuídos pelas condições: controlo, solvente (veículo de administração dos compostos), AAS nas concentrações de 2,5 mM ou de 10 mM e PS em concentrações entre 5 nM e 500 nM associado a AAS. A administração da terapia combinada fez-se adicionando em primeiro lugar o PS e, após irradiação, o AAS.

As placas ou os frascos com as culturas celulares, nas condições acima descritas, foram irradiadas com um fluxo de 7,5 mW/cm² até se atingir os 10 J. A irradiação para o tratamento fotodinâmico foi realizada recorrendo a uma fonte de luz fluorescente equipada com um filtro vermelho ($\lambda_{\text{cut off}} < 560\text{nm}$), sendo que as taxas de fluência da luz foram medidas com um radiómetro (Gigahertz-Optic, X97).

Todos os estudos realizados *in vitro* foram avaliados às 24 h, segundo os diversos métodos abaixo descritos.

4.4 Estudos de citotoxicidade

4.4.1 Avaliação da atividade metabólica por ensaio de redução de MTT

De modo a avaliar-se a atividade metabólica das culturas celulares utilizou-se o ensaio de MTT (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2) 2,5-diphenyltetrazolium bromide*). O princípio deste ensaio consiste no facto de as células metabolicamente ativas, internalizarem o MTT por endocitose, tendo a capacidade de o reduzir com formação de cristais de formazano (Berridge *et al.* 2005; Meerloo *et al.* 2011). A produção do formazano ocorre principalmente na mitocôndria devido à ação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial (Berridge *et al.* 2005; Meerloo *et al.* 2011). Os anéis de tetrazólio do MTT são clivados pelas desidrogenases provenientes deste complexo ocorrendo a formação dos cristais de formazano que podem ser solubilizados e quantificados por espectrofotometria (Berridge *et al.* 2005; Meerloo *et al.* 2011).

Como a quantidade de cristais formados é proporcional à quantidade de células que possuem atividade mitocondrial, este ensaio é considerado um método indireto na determinação da proliferação celular (Berridge *et al.* 2005; Sylvester, 2011).

Para a realização deste ensaio, prepararam-se placas de 48 poços, contendo 80.000 células/mL, que foram incubadas com os compostos em estudo conforme previamente descrito.

Após estes passos, removeu-se o meio de cultura das placas onde as células são cultivadas e procedeu-se à lavagem dos poços com PBS. De seguida adicionam-se 100 µL de uma solução de MTT em PBS com pH de 7,4 (0,5 mg/µL; Sigma M2128) a cada poço das placas e incubaram-se as placas no escuro a 37°C durante cerca de 2 horas. Após a incubação, de modo a solubilizar-se os cristais de formazano adicionaram-se aos poços 100 µL de uma solução de 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação. O

conteúdo de cada poço foi homogeneizado e transferido para placas de 96 poços e a absorvância foi quantificada com o comprimento de onda de 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotômetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

A citotoxicidade foi expressa como a percentagem da inibição nas culturas celulares tratadas em relação às culturas controle.

4.4.2 Avaliação da viabilidade celular por ensaio de SRB

O ensaio de SRB é baseado na ligação do corante aniônico sulforrodamina b (do inglês *sulforhodamine B*) a aminoácidos básicos de proteínas celulares, havendo a formação de complexos, que por um método de avaliação colorimétrica permitem uma estimativa da massa total de proteína, que é diretamente proporcional ao número de células presentes (Papazisis *et al.* 1997; Vichai & Kirtikara, 2006). Este ensaio tem sido muito utilizado *in vitro* para a determinação do conteúdo proteico intracelular tanto de culturas de células aderentes como de células em suspensão. As vantagens deste ensaio comparativamente a outros incluem melhor linearidade e sensibilidade e um baixo custo (Papazisis *et al.* 1997; Pauwels *et al.* 2003).

Para a realização deste ensaio prepararam-se placas de cultura de 24 poços, contendo 250.000 células/mL, que foram tratadas com os compostos conforme descrito previamente. Posteriormente os poços foram lavados com PBS a 4°C após o que se adicionaram 200 µL de ácido acético em metanol, com a finalidade de fixar as células na placa. Passado uma hora adicionaram-se 200 µL de uma solução de SRB a 0,4% (Sigma S9012) e deixaram-se as placas a incubar no escuro durante cerca de duas horas. Após a incubação com o reagente lavaram-se as placas com água de uma forma cuidadosa, para não se destacarem os complexos formados, e de seguida adicionam-se 200 µL de Tris-NaOH com pH de 10,5 para dissolver os complexos.

Finalmente agitaram-se as placas e homogeneizou-se o seu conteúdo, para ser transferido para uma placa de 96 poços, onde a absorvância foi quantificada com o comprimento de onda de 540 nm com um filtro de referência de 690 nm, usando o espectrofotômetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

4.5 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo permite a contagem e a classificação de células e/ou de outras partículas biológicas suspensas em meio líquido. Tendo isto em conta é possível analisar simultaneamente múltiplas características físico-químicas de células através de um aparelho de deteção optoelectrónico (Davey *et al.* 1996; Lo *et al.* 2008).

O aparelho emite um feixe de luz de um comprimento de onda específico que é direcionado para um meio líquido em fluxo, onde vários detetores são apontados ao local onde o fluxo com a suspensão celular é atravessado pelo feixe de luz. O detetor que se encontra na linha do feixe de luz é o FCS (do inglês *forward scatter*), os detetores que se encontram perpendiculares a este são SSC (do inglês *side scatter*), além dos detetores fluorescentes (Lo *et al.* 2008).

As partículas que passam através do feixe dispersam a luz de uma forma específica consoante as suas características físico-químicas, e os corantes químicos intrínsecos ou ligados a elas podem ser excitados, emitindo uma luz de menor frequência do que a fonte de luz. A combinação de luz dispersa e fluorescente é filtrada pelos detetores, sendo a flutuação de

brilho entre cada detetor que possibilita a obtenção das informações relativas à estrutura físico-química de cada partícula sob análise de uma forma individualizada (Davey *et al.* 1996).

O parâmetro FSC estabelece uma correlação com o volume das partículas, enquanto o parâmetro SSC está dependente da complexidade interna das partículas, permitindo-nos obter informações sobre o formato nuclear, a quantidade e o tipo de grânulos citoplasmáticos e a rugosidade membranar (Davey *et al.* 1996).

4.6 Vias de morte celular

4.6.1 Avaliação da morte celular

A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (AnV-FITC, do inglês *AnnexinV-fluorescein isothiocyanate*) e iodeto de propídeo (PI, do inglês *Propidium iodide*). Esta técnica, para além de fazer a distinção entre células viáveis e mortas, consegue distinguir qual o mecanismo envolvido na morte celular, apoptose e a necrose.

O fundamento da técnica tem em conta o facto de, quando na presença de fenómenos apoptóticos, ocorrer uma redistribuição dos fosfolípidos da bicamada lipídica que constitui a membrana celular (Vermes *et al.* 2000). Posto isto, a morte por apoptose caracteriza-se pela translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido que possui carga negativa, do folheto interno da membrana celular para o folheto externo da mesma.

Como a AnV possui uma elevada afinidade por fosfolípidos com carga negativa, liga-se à fosfatidilserina o que permite, quando conjugada com FITC, a determinação da localização da fosfatidilserina na membrana celular e, conseqüentemente, a identificação de células em fase apoptótica inicial.

Quanto ao PI, é um composto com capacidade de se intercalar na dupla cadeia de DNA, pelo que quando a célula perde a integridade membranar por fenómenos necróticos, ocorre a internalização do composto, ligando-se este ao DNA e emitindo fluorescência. No entanto, tem de se ter em conta que a perda de integridade membranar também ocorre na fase mais tardia da apoptose, havendo a internalização de PI pelas células.

Tendo em conta esta dupla marcação, as células são classificadas como vivas se apresentarem uma marcação negativa para AnV-FITC e para o PI; em apoptose inicial se apresentarem uma marcação positiva para AnV-FITC e negativa para o PI; em apoptose tardia se apresentarem uma marcação positiva para AnV-FITC e para o PI e, finalmente, em necrose se apresentarem uma marcação negativa para AnV-FITC e positiva para o PI (Vermes *et al.* 2000; Haywood-Small *et al.* 2006).

Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos, contendo 10^6 células que foram incubadas com os compostos conforme descrito. Após o devido tempo de incubação procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 min. De seguida o *pellet* obtido foi suspenso em 1 mL de PBS seguindo-se nova centrifugação com as mesmas condições.

O *pellet* resultante foi incubado com 100 μ L de tampão de ligação (constituído por 0,01 M de Hepes [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl₂ [Sigma, C4901]), 2,5 μ L de AnV-FITC (Immunostep ANXVFKIT Immunotech) e 1 μ L de PI (KIT Immunotech), durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação procedeu-se à adição de 400 μ L de PBS e fez-se a análise no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences).

Para a análise e quantificação da informação utilizou-se *software* específico (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software) que corre em computador dedicado. Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose.

4.6.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial recorreu-se a uma sonda fluorescente, o JC-1 (do inglês 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide), que se tornou muito utilizada para este fim, devido à capacidade deste catião lipofílico formar agregados facilmente distinguíveis espectralmente de monómeros, consoante o estado energético da membrana mitocondrial, havendo a emissão de fluorescência com diferentes comprimentos de onda (Rana *et al.* 2011; Perelman *et al.* 2012).

Na presença de um potencial de membrana elevado, verifica-se a formação de agregados que emitem fluorescência vermelha (590 nm), mas se houver diminuição desse potencial e/ou despolarização da membrana, a sonda JC-1 é excluída da mitocôndria mantendo-se no citoplasma sob a forma de monómeros que emitem fluorescência verde (529 nm). A razão entre a fluorescência vermelha e verde permite obter uma estimativa sobre o potencial de membrana mitocondrial (Rana *et al.* 2011; Perelman *et al.* 2012).

Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm³, contendo 10⁶ células cada um, submetidos ao tratamento conforme descrito. Procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 min. De seguida o *pellet* obtido foi suspenso em 1 mL de PBS, com adição de 1 µL de JC-1 (Sigma T4069), preparado em DMSO na concentração de 5 mg/mL e posteriormente diluído, para a obtenção de uma concentração final 5 µg/mL. As suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos a 37°C e ao abrigo da luz.

De seguida, centrifugaram-se as suspensões celulares com 2 mL de PBS a 2500 rpm durante 5 min, com a posterior suspensão em 400 µL de PBS.

A deteção foi efetuada no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) com o comprimento de onda de excitação de 488 nm. Os resultados obtidos correspondem à média de intensidade de fluorescência para os agregados e para os monómeros, tendo-se calculado posteriormente a razão monómeros/agregados para cada condição experimental.

4.6.3 Deteção da proteína 53 por western blot

Existem diversas proteínas, como por exemplo a P53, que estão relacionadas com a manutenção da integridade genómica, podendo ter influência na progressão do ciclo celular ou induzir apoptose quando ocorrem erros durante as diversas fases da divisão celular.

Normalmente, este tipo de proteínas em células tumorais encontra-se numa forma alterada ou inexistente, funcionando assim como marcadores tumorais.

Para a determinação da expressão de proteínas, habitualmente recorre-se à técnica de *western blot*, que permite a deteção de proteínas específicas numa determinada amostra de homogeneizado de tecido ou de extrato celular.

A técnica de *western blot* possui a capacidade de separar proteínas de uma determinada amostra através de uma eletroforese em gel, cuja separação é feita tendo em conta o ponto isoelétrico das proteínas, o peso molecular, a carga elétrica ou uma combinação destas

características. Após a migração e conseqüente separação das proteínas, faz-se a transferência das mesmas para uma membrana de nitrocelulose ou de difluoreto de polivinilideno, onde são analisadas e detetadas por anticorpos específicos.

Em primeiro lugar efetua-se a incubação com o anticorpo primário e, de seguida, com o anticorpo secundário responsável pela identificação. Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm³, contendo 2x10⁶ células, tratados conforme descrito. Descartou-se o meio de cultura dos frascos e procedeu-se à sua lavagem com PBS.

Adicionou-se tampão RIPA suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche) e 1 mM de DTT e, com o auxílio de um raspador, soltaram-se as células do frasco, sendo o conteúdo colocado em microtubos. De seguida, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 35% (Sonicador VibraCell, modelo VC50 Sonic and Materials inc. USA), centrifugadas durante 15 minutos a 14000 G e os seus sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, com a devida identificação. As amostras foram mantidas a -80°C até posterior utilização.

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

Para a realização da eletroforese polimerizaram-se géis de acrilamida que foram colocados na tina de corrida com tampão apropriado (Bio-Rad 161-0772) e procedeu-se à disposição das amostras e do padrão de pesos moleculares (Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-Rad). Após o término da eletroforese, onde se usou um potencial constante de 150 V, a eletrotransferência foi efetuada utilizando o sistema Trans-Blot[®] TurboTM Transfer (Bio-Rad), seguindo as indicações do fornecedor. Para a deteção da proteína P53 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-P53 (DO7) preparado em ratinho (sc-47698, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), com a deteção da P53 a pertencer a uma banda a cerca de 53 kDa.

Após a incubação com o anticorpo primário, efetuaram-se lavagens com TBS-T a 1%, com a posterior incubação com o anticorpo secundário apropriado (anti-mouse: RPN5781 GE Healthcare; anti-rabbit: sc-2007 Santa Cruz Biotechbology, Inc.), sob agitação constante e à temperatura ambiente durante cerca de 1 h.

No final da incubação as lavagens foram repetidas e as membranas foram depois incubadas com substrato enzimático (ECF Western Blotting Reagent Pack, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

4.7 Avaliação do ciclo celular

Para a avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo utilizou-se o composto PI. Esta técnica baseia-se no facto de as células, quando em apoptose, serem caracterizadas por fragmentação de DNA e, conseqüentemente, pela perda de DNA nuclear. Como o PI tem a capacidade de se ligar ao DNA, permite a avaliação do conteúdo celular de DNA. A quantidade de corante ligado irá ser proporcional ao conteúdo de DNA.

Com isto, é possível por citometria de fluxo conhecer a distribuição de populações celulares ao longo das diferentes fases do ciclo celular, podendo ser as células classificadas

como células em fase G₀ ou G₁, em fase S e em fase G₂ ou M (Linke *et al.* 1996; Riccardi *et al.* 2006).

Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm³, contendo 10⁶ células cada um, submetidos ao tratamento conforme descrito. Após estes passos procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo celular, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 min. De seguida o *pellet* obtido foi suspenso em 1 mL de PBS com nova centrifugação nas mesmas condições. Ao *pellet* resultante, adicionaram-se 200 µL de etanol a 70% com os tubos em agitação no vórtex, sendo estes incubados durante 30 minutos a 4°C. Após este passo, centrifugaram-se as suspensões celulares com 2 mL de PBS a 2500 rpm durante 5 min. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500 µL de uma solução de PI/RNase (Immunostep PI/RNase) com incubação durante 15 minutos no escuro a 37°C. A deteção foi efetuada no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) com o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

4.8 Stresse oxidativo

4.8.1 Avaliação da produção intracelular de peróxidos

A avaliação da produção intracelular de peróxidos foi realizada com o composto DCFH₂-DA (do inglês, *2',7'-Dichlorofluorescein diacetate*), que é uma sonda não fluorescente e lipossolúvel, que possui a capacidade de penetrar a membrana celular. Após a internalização, acumula-se no citosol, onde ocorre a sua desacetilação por esterases, formando-se o produto 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). O DCFH é um produto intermediário não fluorescente, que é oxidado na presença de peróxidos com formação de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que emite fluorescência no comprimento de onda de 522 nm quando excitado previamente com uma luz com comprimento de onda de 498 nm.

A fluorescência do DCF é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares como, por exemplo, o peróxido de hidrogénio (Dikalov *et al.* 2007; Eruslanov *et al.* 2010).

Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm³, contendo 10⁶ células cada um, que foram submetidos ao tratamento conforme descrito. Posteriormente procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo celular, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 min. De seguida o *pellet* foi suspenso num 1mL de PBS e incubado durante 45 minutos, com ausência de luz a 37°C com 5 µM de DCFH₂-DA (Molecular probes, Invitrogen). De seguida, centrifugaram-se as suspensões celulares com 2mL de PBS para efeitos de lavagem a 2500 rpm durante 5 min, com a posterior ressuspensão em 400µL de PBS.

A deteção efetuou-se no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando-se o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação às culturas celulares controlo, às quais se atribuiu o valor 1.

4.8.2 Avaliação da produção intracelular de anião superóxido

A avaliação da produção intracelular de radical superóxido foi realizada com recurso à sonda DHE (do inglês, *Dihydroethidium*), composto lipofílico com a capacidade de atravessar facilmente a membrana celular para o espaço intracelular, onde ocorre a sua conversão a

etédeo pelo radical superóxido. O etídeo é um composto fluorescente de cor vermelha, que possui a capacidade de se intercalar no DNA, ficando retido no interior da célula.

Esta reação não é totalmente específica, havendo uma oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou pelo ácido hipocloroso (Dikalov *et al.* 2007).

Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm³, tratados conforme descrito. Procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo celular, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 min. De seguida o *pellet* obtido foi suspenso em 1 mL de PBS com adição de 5 µL de DHE (Sigma Aldrich, D7008), com obtenção de uma concentração final de 5 µM. As células foram incubadas durante 15 minutos a 37°C. Após este passo, centrifugaram-se as suspensões celulares com 2 mL de PBS a 2500 rpm durante 5 min, com a posterior ressuspensão em 400 µL de PBS. A deteção foi feita no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) com o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação às culturas celulares controlo, às quais se atribuiu o valor 1.

4.8.3 Avaliação da inibição de espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio têm um papel fundamental na ocorrência de uma reação fotodinâmica, podendo ser um fator promotor ou limitante de um bom resultado terapêutico. Como o oxigénio singlete e o radical hidroxilo são duas das mais importantes espécies reativas de oxigénio na PDT, foram utilizados *quenchers* específicos destas espécies reativas para avaliar os efeitos da sua inibição em termos da atividade metabólica. Para a inibição do oxigénio singlete utilizou-se azida de sódio, enquanto para a inibição do radical hidroxilo utilizou-se D-manitol.

Para a realização deste ensaio, adaptou-se um protocolo experimental de Obata *et al.* (Obata *et al.* 2009), pelo que se prepararam placas de 48 poços, contendo 80.000 células/mL. Neste caso adicionou-se o PS nas concentrações de 5 nM, 50 nM, 200 nM e 500 nM e antes da irradiação, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo 5 mM de azida de sódio (Sigma 71290) ou 40 mM de D-manitol (Sigma M4125). As placas foram irradiadas e incubadas durante 2h. Posteriormente substituiu-se o meio de cultura com adição de AAS na concentração de 2,5 mM. A avaliação foi realizada nas condições acima descritas pelo ensaio de MTT.

4.9 Defesas antioxidantes

4.9.1. Avaliação da produção intracelular de glutatião reduzido

Para a avaliação da produção intracelular de glutatião reduzido (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, utilizou-se a citometria de fluxo com recurso a um composto fluorescente denominado alaranjado de mercúrio. Este composto tem a capacidade de reagir rapidamente com o GSH, formando um produto reacional que emite uma fluorescência intensa de cor vermelha, quando é excitado com um laser de árgon com comprimento de onda de 488 nm (Hedley & Chow, 1994).

Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm³, tratados conforme descrito. Procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo celular, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 min. De seguida o *pellet* obtido foi suspenso num 1 mL de PBS e adicionaram-se 4 µL de alaranjado de mercúrio

na concentração de 10 mM (Sigma M7750). As suspensões celulares foram incubadas no escuro durante 15 minutos a 37°C. Após este passo, centrifugaram-se as suspensões celulares com 2 mL de PBS a 2500 rpm durante 5 min, com a posterior ressuspensão em 400 µL de PBS. A deteção fez-se no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação às culturas celulares controlo, às quais se atribuiu o valor 1.

4.9.2 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma defesa antioxidante presente no organismo, que é responsável pela catalisação da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 . Para a avaliação da atividade desta enzima foi utilizado o SOD Assay Kit-WST (Sigma, 19160, Switzerland). Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm³, tratados conforme descrito.

Após 24h, descartou-se o meio de cultura dos frascos e procedeu-se à sua lavagem com PBS. Adicionou-se tampão RIPA (tampão de radioimunoprecipitação) e, com o auxílio de um raspador, soltaram-se as células do frasco, sendo o conteúdo colocado em microtubos. De seguida, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 35% (Sonicador VibraCell, modelo VC50 Sonic and Materials inc. USA) e centrifugadas durante 15 minutos a 14000 G. Os sobrenadantes transferiram-se para novos microtubos, com a devida identificação e guardados a -80°C. Para a determinação da quantidade da proteína usou-se o método de BCA (*bicinchononic acid*, BCATM protein assay kit, Pierce) e para a determinação da SOD foi utilizado o *kit* referido de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram apresentados como a razão entre a atividade da SOD e a concentração de proteína total.

4.10 Análise estatística

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

A comparação da atividade metabólica e conteúdo proteico das culturas celulares submetidas a tratamento foi realizada com o teste t-student para uma amostra, nas condições com distribuição normal e homogeneidade das variâncias e o teste de Mann Whitney caso tal não se verificasse, tendo sido comparado o valor amostral de cada grupo com o valor de normalização de 100%

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

Os valores das condições experimentais obtidos nos estudos de avaliação da expressão da P53 por western blot, análise da concentração intracelular de anião superóxido e de peróxidos e na análise da superóxido dismutase e do glutatião reduzido as comparações foram realizadas com o teste t-student para uma média e utilizado o valor de normalização 1.

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

5. Materiais e Métodos (*IN VIVO*)

5.1 Desenvolvimento de xenotransplantes

Como nos estudos *in vitro*, os resultados obtidos podem ser diferentes em relação a um organismo vivo, tendo em conta as condições de ambiente controlado que são utilizadas, os estudos *in vivo* são extremamente importantes para se aferir sobre o real potencial de uma determinada terapêutica. Ao nível oncológico, sabendo de antemão que, sendo um tumor uma entidade pluricelular com uma elevada complexidade, o desenvolvimento de um modelo animal é essencial para se perceber se a PDT combinada com ácido acetilsalicílico terá eficácia.

Para o efeito, foram utilizados ratinhos Balb/c nu/nu, adquiridos aos Laboratórios Internacionais Charles River, Inc (Espanha) com 6 semanas de idade, sendo estes mantidos numa sala climaticamente apropriada com ciclos de 12 horas de luz diárias, livre acesso a ração padrão de laboratório para murinos nude e água devidamente filtrada. Todos os dias foi assegurado o bem-estar de todos os animais em estudo, sendo utilizados 37 animais.

A estirpe de ratinhos Balb/c nu/nu foi a escolhida para este estudo, por ser deficitária em linfócitos T, uma vez que são animais atímicos, permitindo o desenvolvimento de xenotransplantes com relativa facilidade. Os linfócitos T são a principal subpopulação linfocitária envolvida na resposta imunitária inata, a sua ausência permite que o organismo do animal aceite células estranhas sem aparente rejeição.

Para a realização deste estudo foram inoculadas 10^7 células da linha celular WiDr, também utilizada previamente nos estudos *in vitro* anteriormente mencionados. A inoculação das células foi realizada subcutaneamente ao nível da região dorsal, uma vez que é uma boa área para a expansão do xenotransplante, devido a uma boa vascularização que satisfaz as necessidades metabólicas das células tumorais e também por ser uma zona de fácil monitorização do desenvolvimento tumoral.

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

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

Com L a corresponder ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor (Dagrosa et al., 2003).

5.2 Tratamentos com PDT e AAS *in vivo*

Quando os xenotransplantes atingiram um volume tumoral de cerca de 250mm^3 , os ratinhos foram distribuídos aleatoriamente por 4 grupos, cuja descrição é referida de seguida.

Para a realização destes estudos os ratinhos foram divididos em 4 grupos experimentais, constituídos por um grupo com tumores sem tratamento, um grupo com tumores com injeção diária de 200mg/kg de AAS, um grupo com tumores com injeção de 0,5mg/kg de PS com irradiação às 24h após administração e um grupo com tumores com injeção de 0,5mg/kg de PS com irradiação às 24h após administração mais injeção diária de 200mg/kg de AAS. Todos os estudos efetuados tiveram um período de duração de 12 dias.

Aos ratinhos do grupo 2 foi administrada diariamente uma solução de 200mg/kg de ácido acetilsalicílico foi por via intraperitoneal, com base num protocolo experimental de Sclabas *et al.* (Sclabas *et al.* 2005).

No caso do grupo 4 referente à combinação de PDT e AAS, primeiro foi administrado por via intraperitoneal o PS BBr2HPC numa concentração de 0,5mg/kg.

Passadas 24 horas da administração do PS a irradiação dos animais foi feita utilizando um dispositivo de luz laser CeramOptec Ceralas PDT com uma potência de 0,13 watts durante 1500 segundos perfazendo um total de 180 joules. Após a irradiação foi realizada a administração de AAS.

Para a irradiação os animais foram submetidos a anestesia, sendo que para o efeito, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de 2 µL/g de uma solução que continha uma proporção de 3:1 de quetamina (50 mg/mL; Ketalar®, Parke-Davis, Pfizer Laboratories Lda.) e clorpromazina (2,5 %, Largatil®, Rhône-Poulenc Rorer, Laboratórios Vitória).

A monitorização dos xenotransplantes foi efetuada de 2 em 2 dias durante 12 dias, sendo que se avaliaram as dimensões tumorais de modo a se calcular a variação de volume relativamente às dimensões iniciais, aquando do início do procedimento experimental, segundo a seguinte fórmula:

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

Com VTR a representar o volume tumoral relativo, V_x a representar o volume tumoral obtido em cada dia de avaliação e V_0 a representar o volume tumoral obtido no início do procedimento experimental sem qualquer tipo de tratamento.

Na análise inferencial dos estudos *in vivo* foi utilizada a estimativa de Kaplan-Meier, para avaliar o tempo necessário para ser atingido o volume tumoral relativo de 1,5 (Heitjan *et al.*, 1993). Foram traçadas curvas de sobrevivência e determinadas sobrevivências medianas com o respetivo intervalo de confiança a 95% (IC95). A comparação entre os grupos foi realizada recorrendo ao teste log-rank, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas, sendo considerada uma significância de 5%.

5.3 Análise histopatológica

No final dos 12 dias de tratamento segundo os diferentes grupos experimentais os animais foram occisados por deslocamento cervical e os respetivos tumores excisados para análise histológica em pelo menos 1 rato de cada grupo. As amostras foram fixadas em

formalina tamponada a 10%, com posterior desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol e envolvimento em parafina. Ainda na preparação das amostras para análise fez-se microtomia aleatória e coloração com base na técnica de hematoxilina e eosina (H&E) em lâminas. A observação microscópica foi realizada num microscópio Nikon ACT-1 equipado com câmara digital Nikon DMXM120F e computador dedicado com o *software* Nikon eclipse 80i.

O processamento das amostras e a observação microscópica das lâminas coradas foi realizado no Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

RESULTADOS

6. Resultados (IN VITRO)

6.1 Citotoxicidade

Foram realizados estudos de citotoxicidade por forma a avaliar o potencial da combinação do fotossensibilizador BBr2HPC com o AAS, em termos da atividade metabólica e da viabilidade celular em duas linhas celulares tumorais humanas, a linha WiDr de adenocarcinoma colorretal e a linha OE19 de adenocarcinoma esofágico.

A atividade metabólica celular foi, de modo global, significativamente reduzida após o tratamento com a combinação de PDT com o AAS, tanto na linha celular WiDr, como na linha celular OE19.

Nas células de adenocarcinoma colorretal (WiDr) tratadas com AAS nas concentrações de 2,5 mM e AAS na concentração de 10 mM verificou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica em relação às células controlo apenas na concentração de 10 mM, com um valor de $72,8 \pm 4,2\%$ ($p=0,010$). No que respeita ao tratamento com AAS *per se* com a concentração de 2,5 mM não se verificou efeito significativo nesta linha celular. Nas culturas celulares em que se associou a administração de AAS na concentração de 2,5 mM com a PDT também se registaram diferenças significativas em relação às células controlo, com uma atividade metabólica de $72,2 \pm 2,5\%$ ($p<0,001$) para a administração de PS na concentração de 5 nM; de $18,0 \pm 3,6\%$ ($p<0,001$) para a administração de PS na concentração de 50 nM; de $0,14 \pm 0,05\%$ ($p<0,001$) para a administração de PS na concentração de 200 nM e de $0,09 \pm 0,09\%$ ($p<0,001$) para a administração de PS na concentração de 500 nM. No caso das culturas celulares em que se associou a administração de AAS na concentração de 10 mM com a PDT observou-se uma atividade metabólica de $40,2 \pm 4,3\%$ ($p<0,001$) para a concentração de PS de 5 nM; de $22,6 \pm 3,6\%$ ($p<0,001$) para a concentração de PS de 50 nM; de $0,30 \pm 0,11\%$ ($p<0,001$) para a concentração de PS de 200 nM e de $0,32 \pm 0,10\%$ ($p<0,001$) para concentração de PS de 500 mM. Estes resultados estão representados graficamente na Figura 20.

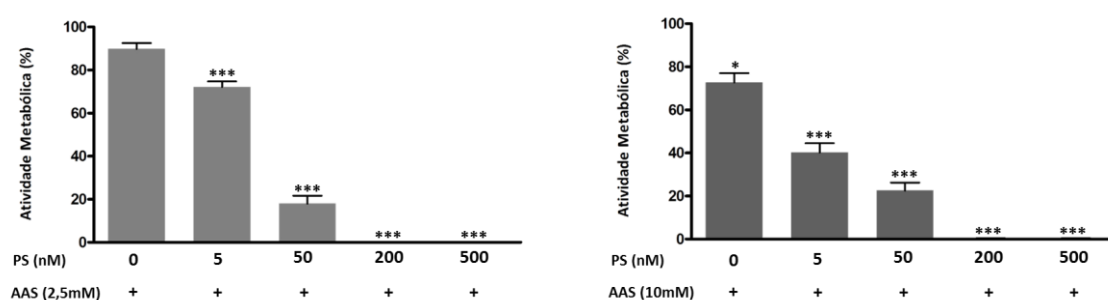


Figura 20. Atividade metabólica das células de adenocarcinoma colorretal submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM (esquerda) e na concentração de 10mM (direita), com avaliação às 24 horas. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ($n=6$). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$ e *** significa $p < 0,001$.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014), no qual se utilizaram as mesmas condições do fotossensibilizador BBr2HPC *per se* verificou-se que, de facto, a citotoxicidade foi superior na combinação terapêutica do que

na PDT com as concentrações de PS de 5 nM, com uma redução da atividade metabólica de $99,5\pm 0,39\%$ para $72,2\pm 2,5\%$ ($p<0,001$); para a concentração de PS de 50 nM, verificou-se uma redução da atividade metabólica de $58,3\pm 0,5\%$ para $18,0\pm 3,6\%$ ($p<0,001$) e para a concentração de PS de 200 nM, verificou-se uma redução da atividade metabólica de $6,7\pm 0,6\%$ para $0,14\pm 0,05\%$ ($p<0,001$).

Nas células de adenocarcinoma esofágico (OE19) tratadas com AAS nas concentrações de 2,5 mM e de 10 mM verificou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica em relação às células controlo, com valores de $81,8\pm 5,0\%$ ($p=0,040$) e de $60,2\pm 5,0\%$ ($p<0,001$), respetivamente. A terapia combinada com base na concentração de AAS de 2,5 mM induziu alterações significativas em relação às células controlo, com a diminuição da atividade metabólica para a concentração de PS de 5 nM, que apresentou um valor de $82,9\pm 2,4\%$ ($p<0,001$); de 50 nM que apresentou com um valor de $21,2\pm 3,4\%$ ($p<0,001$); de 200 nM que apresentou um valor de $0,90\pm 0,20\%$ ($p<0,001$) e de 500 nM que apresentou um valor de $0,49\pm 0,06$ ($p<0,001$). No caso das culturas celulares em que se associou a administração de AAS na concentração de 10 mM com a PDT observou-se uma atividade metabólica de $61,7\pm 6,2\%$ ($p=0,010$) para a concentração de PS de 5 nM; de $17,5\pm 3,8\%$ ($p<0,001$) para a concentração de PS de 50 nM; de $1,46\pm 0,28\%$ ($p<0,001$) para a concentração de PS de 200 nM e de $0,47\pm 0,06$ ($p<0,001$) para a concentração de PS de 500 nM, valores também significativamente inferiores ao controlo, como se observa na Figura 21.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014), no qual se utilizaram as mesmas condições do fotossensibilizador BBR2HPC *per se* verificou-se que a atividade metabólica das culturas celulares tratadas com a PDT em combinação com o AAS na concentração de 2,5 mM ($82,9\pm 2,4\%$) foi significativamente inferior à das culturas celulares tratadas apenas com PDT com a concentração de 5 nM de PS ($100,0\pm 0,13\%$) ($p<0,001$).

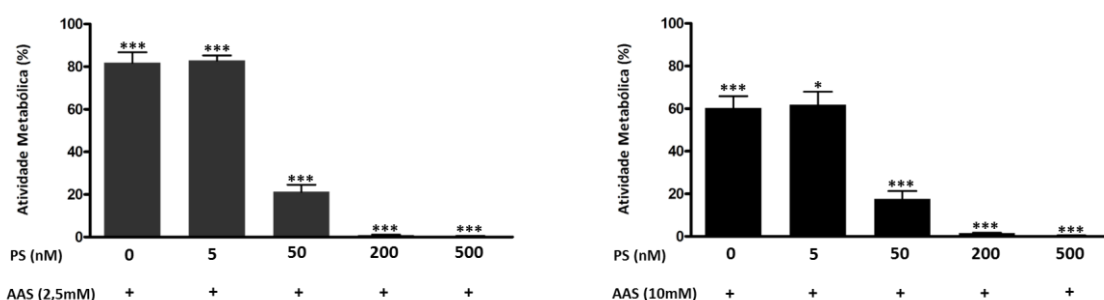


Figura 21. Atividade metabólica das células de adenocarcinoma esofágico submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM (esquerda) e na concentração de 10mM (direita), com avaliação às 24 horas. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$ e *** significa $p<0,001$.

De forma complementar à avaliação da atividade metabólica, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular nas duas linhas celulares WiDr e OE19. Neste estudo e nos estudos subsequentes o AAS foi administrado sempre na concentração de 2,5 mM.

Nas células de adenocarcinoma colorretal verificou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação às células controlo em todas as condições experimentais. As culturas celulares incubadas com AAS apresentaram uma viabilidade celular de $97,8\pm 0,73\%$

($p < 0,001$), inferior ao controlo. No caso das culturas celulares tratadas com a associação de AAS e da PDT obtiveram-se valores de viabilidade de $97,9 \pm 0,53\%$ ($p < 0,001$) para o PS na concentração de 5 nM; de $64,8 \pm 3,5\%$ ($p < 0,001$) para o PS na concentração de 50 nM e de $21,8 \pm 1,8\%$ ($p < 0,001$) para o PS na concentração de 200 nM, como se pode observar na Figura 22.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014) verificou-se que a associação da PDT com o AAS não determinou uma maior diminuição da viabilidade do que a PDT *per se*. De facto, para o PS na concentração de 50 nM obteve-se uma viabilidade celular de $37,0 \pm 5,2\%$ enquanto na terapêutica combinada se obteve um valor superior de $64,8 \pm 3,5\%$ ($p < 0,001$). Para o PS na concentração de 200 nM obteve-se uma relação semelhante ($19,0 \pm 3,2\%$ vs. $21,8 \pm 1,8\%$, respetivamente; $p < 0,001$).

Nas células de adenocarcinoma esofágico verificou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação às células controlo em todas as condições experimentais realizadas, com um valor de $97,3 \pm 0,39\%$ ($p = 0,028$) para o AAS; de $97,0 \pm 0,35\%$ ($p = 0,003$) para a associação com PS na concentração de 5 nM; de $91,2 \pm 0,68\%$ ($p < 0,001$) para a associação com PS na concentração de 50 nM e de $10,7 \pm 0,80\%$ ($p < 0,001$) para a associação de PS na concentração 200 nM, como se pode observar na Figura 22.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014) verificou-se um aumento da viabilidade celular no tratamento combinado em relação à PDT *per se*. Assim, para a concentração de PS de 50 nM, obteve-se um valor de $50,0 \pm 5,9\%$ versus $91,2 \pm 0,68\%$ ($p < 0,001$), obtido para a combinação com AAS. No entanto, relativamente à concentração de PS de 200 nM verificou-se uma diminuição da viabilidade celular de $14,0 \pm 3,8\%$ para $10,7 \pm 0,80\%$ ($p < 0,001$) em relação à terapia combinada.

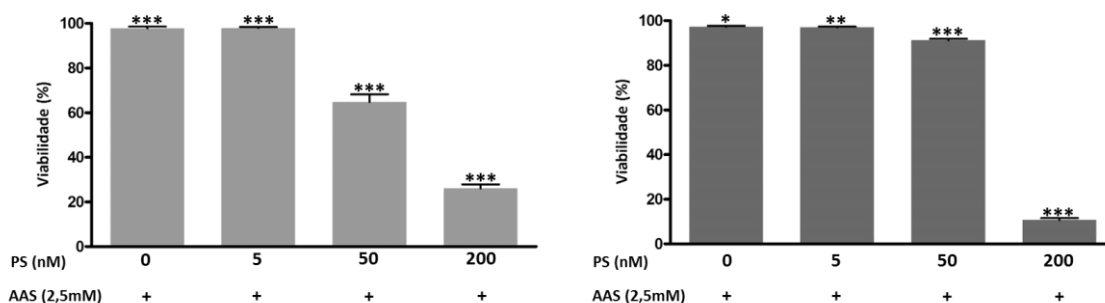


Figura 22. Viabilidade celular das células de adenocarcinoma colorretal (esquerda) e esofágico (direita) submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM, com avaliação às 24 horas. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes realizadas em duplicado ($n=8$). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

6.2 Vias de morte celular

De forma a se caracterizarem os mecanismos envolvidos na terapia combinada com base no fotossensibilizador BBr2HPC e no AAS foram realizados diversos estudos, nomeadamente, a avaliação dos tipos de morte celular com base na exposição da fosfatidilserina na membrana celular e na integridade da membrana, o potencial de membrana mitocondrial e a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular como a P53.

6.2.1 Tipos de morte celular

A viabilidade celular e o número de células em morte por apoptose inicial, por apoptose tardia e por necrose foram influenciados pela terapia combinada com base no fotossensibilizador BBr2HPC, de um modo geral, em ambas as linhas celulares, com dependência da concentração de PS, como se pode observar nas Figuras 23 e 24.

Em termos de viabilidade celular nas células do adenocarcinoma colorretal verificou-se diminuição do número de células vivas na terapêutica combinada com o aumento da concentração do PS em relação às células controlo. Esta diminuição foi significativa com a concentração de PS de 200 nM, para um valor de $23,5 \pm 1,3\%$ ($p < 0,001$). A apoptose inicial nas células do adenocarcinoma colorretal aumentou de uma forma dependente da concentração de PS em relação às células controlo, com um aumento significativo para o valor de $8,1 \pm 1,6\%$ ($p = 0,022$) com a concentração de PS de 5 nM. A apoptose tardia ou necrose também registou um aumento significativo com na concentração de PS de 200 nM, com um aumento para o valor de $16,1 \pm 1,8\%$ ($p < 0,001$). A necrose aumentou de forma significativa na concentração de PS de 200 nM, para o valor de $54,9 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$).

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014) verificou-se que a terapia combinada determinou uma diminuição significativa da morte celular por apoptose tardia ou necrose, de $31,0 \pm 8,6\%$ para $16,1 \pm 1,8\%$ ($p = 0,008$) com a concentração de PS de 200 nM. No entanto, a morte celular por necrose aumentou significativamente após o tratamento combinado, passando de $25,0 \pm 15,9\%$ para $54,9 \pm 3,7\%$ ($p = 0,008$).

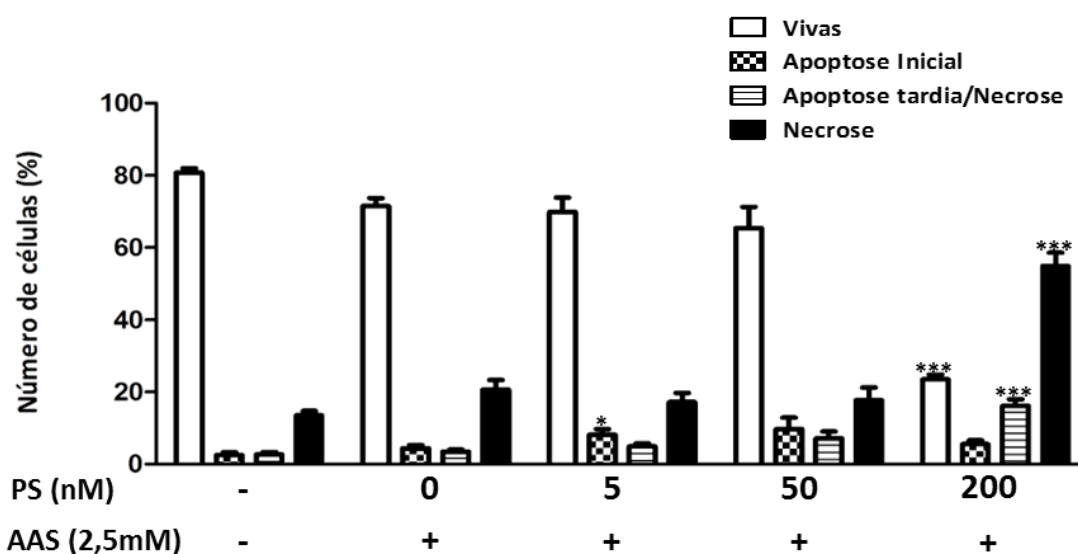


Figura 23. Viabilidade celular e tipos de morte celular das células de adenocarcinoma colorretal submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM, com avaliação às 24 horas. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia ou necrose e em necrose. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ($n=6$). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$ e *** significa $p < 0,001$.

Em termos de viabilidade celular nas células do adenocarcinoma esofágico verificou-se diminuição do número de células vivas com o aumento da concentração do PS em relação às

células controlo, registando-se significância com a concentração de PS de 50 nM e de 200 nM, com viabilidades de $54,5 \pm 4,1\%$ ($p=0,005$) e de $53,2 \pm 3,2\%$ ($p<0,001$), respetivamente. A apoptose inicial nas células do adenocarcinoma esofágico aumentou de uma forma dependente da concentração de PS em relação às células controlo, com um aumento significativo com as concentrações de PS, com valores de $13,8 \pm 1,4\%$ ($p=0,022$) para a concentração de 5 nM, valores de $20,7 \pm 1,3\%$ ($p<0,001$) para a concentração de 50 nM e para valores de $28,2 \pm 2,5\%$ ($p<0,001$) para a concentração de 200 nM. A apoptose tardia ou necrose também registou um aumento significativo em relação às células controlo, com as concentrações de PS de 50 nM e de 200 nM, para valores de $12,4 \pm 3,3\%$ ($p=0,022$) e de $8,3 \pm 1,5\%$ ($p=0,047$), respetivamente.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014), no qual se utilizaram as mesmas condições do fotossensibilizador BBr2HPC *per se* no tratamento das linhas celulares, verificou-se uma diminuição significativa em termos de viabilidade celular por parte da terapia combinada com AAS, com uma diminuição de $78,0 \pm 3,8\%$ para $70,0 \pm 2,0\%$ ($p=0,004$) com a concentração de PS de 5 nM e uma diminuição de $71,9 \pm 5,9\%$ para $54,5 \pm 4,1\%$ ($p=0,012$) com a concentração de PS de 50 nM. Em termos de apoptose inicial observou-se um aumento significativo de $13,0 \pm 2,9\%$ para $20,7 \pm 1,3\%$ ($p=0,008$) com a concentração de PS de 50 nM.

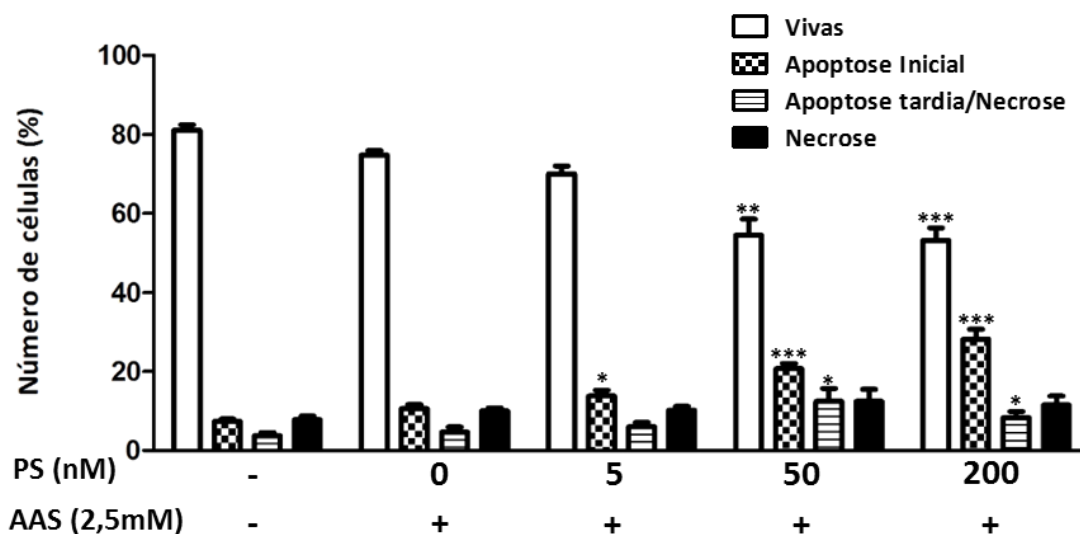


Figura 24. Viabilidade celular e tipos de morte celular das células de adenocarcinoma esofágico submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM, com avaliação às 24 horas. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia ou necrose e em necrose. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ($n=6$). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

De uma forma geral, as células do adenocarcinoma colorretal aparentam ser mais suscetíveis à PDT combinada com AAS, pelo menos para as concentrações mais elevadas de PS. Na terapia fotodinâmica, tanto a apoptose como a necrose são tipos de morte celular predominantes, pelo que a uma maior concentração de PS, corresponde uma tendência para a morte por necrose, com o oposto a verificar-se para a apoptose. A adição de AAS às células de

adenocarcinoma esofágico parece alterar este paradigma com a morte por apoptose a ser predominante para as concentrações mais elevadas de PS.

6.2.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria possui uma grande relevância em termos de regulação dos mecanismos intervenientes na morte celular por apoptose por via intrínseca. A disrupção do potencial de membrana mitocondrial é uma característica distintiva da apoptose, cujo resultado é o desacoplamento da cadeia respiratória e consequente libertação do citocromo C.

Nas células de adenocarcinoma colorretal tratadas verificou-se que a razão monómeros/agregados teve um aumento gradual, dependente do aumento da concentração de PS, em relação às células controlo. Esta situação corresponde a uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Assim, para a terapêutica combinada observou-se um aumento significativo da razão monómeros/agregados para o valor de $3,8 \pm 0,7\%$ ($p=0,030$) com a concentração de PS de 50 nM e para o valor de $4,6 \pm 0,4\%$ ($p<0,001$), com a concentração de PS de 200 nM, como se pode observar na Figura 25.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014) verificou-se que a terapêutica combinada influenciou significativamente menos a razão monómeros/agregados do que a PDT *per se* quando o PS foi usado nas concentrações de 5 nM e de 200 nM combinada com AAS, o que corresponde a um aumento em termos de potencial de membrana mitocondrial, com uma diminuição de $4,4 \pm 0,5\%$ para $3,4 \pm 0,3\%$ ($p=0,004$) com a concentração de PS de 5 nM e de $16,7 \pm 1,3\%$ para $4,6 \pm 0,4\%$ ($p<0,001$) com a concentração de PS de 200 nM.

Em relação às células de adenocarcinoma esofágico observou-se igualmente um aumento gradual da razão monómeros/agregados, dependente do aumento da concentração de PS, em relação às células controlo. Assim, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial foi significativa com a concentração de PS de 50 nM e com a concentração de PS de 200 nM, com valores da razão monómeros/agregados de $3,7 \pm 0,2\%$ ($p<0,001$) e de $4,4 \pm 0,9\%$ ($p<0,001$), respetivamente, como se observa na Figura 25.

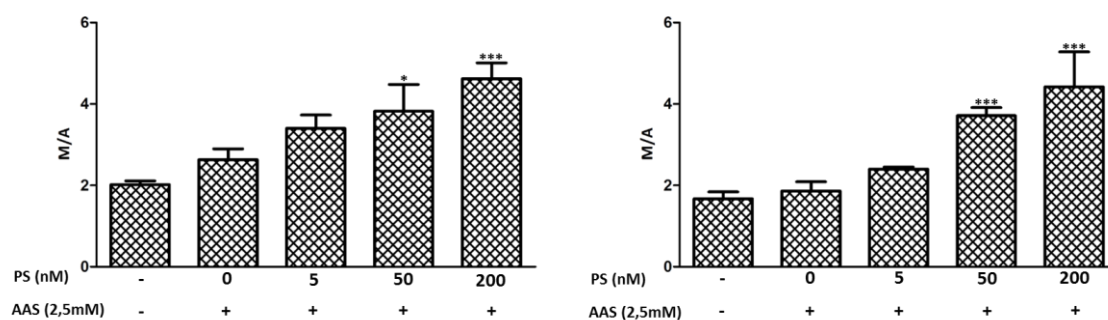


Figura 25. Potencial de membrana mitocondrial nas células de adenocarcinoma colorretal (esquerda) e células de adenocarcinoma esofágico (direita) submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM, com avaliação às 24 horas. Os resultados estão representados na forma de razão entre monómeros/agregados (M/A). De acordo com o potencial de membrana mitocondrial, a sonda JC-1 pode estar tanto na forma monomérica ou agregada, sendo que um aumento na razão M/A é indicativo de uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes realizadas em duplicado ($n=8$). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa $p<0,05$ e *** significa $p<0,001$.

6.2.3 Detecção da P53 por western blot

A proteína P53 é uma proteína supressora tumoral que é ativada em resposta a um variado número de estímulos, como o stress oxidativo, danos no DNA, hipoxia, sobre-expressão de oncogenes e alterações metabólicas (Zawacka-Pankau *et al.* 2008). Sabe-se que a proteína P53 regula a resposta anti-tumoral na quimioterapia e na radioterapia induzindo a morte por apoptose; contudo, na terapia fotodinâmica ainda não se conhece na totalidade o papel desta proteína nessa mesma resposta (Acedo & Zawacka-Pankau, 2015).

Na linha celular de adenocarcinoma colorretal não se verificaram diferenças significativas entre as células controlo e as células tratadas com a combinação de PDT com AAS, como se pode observar na Figura 26.

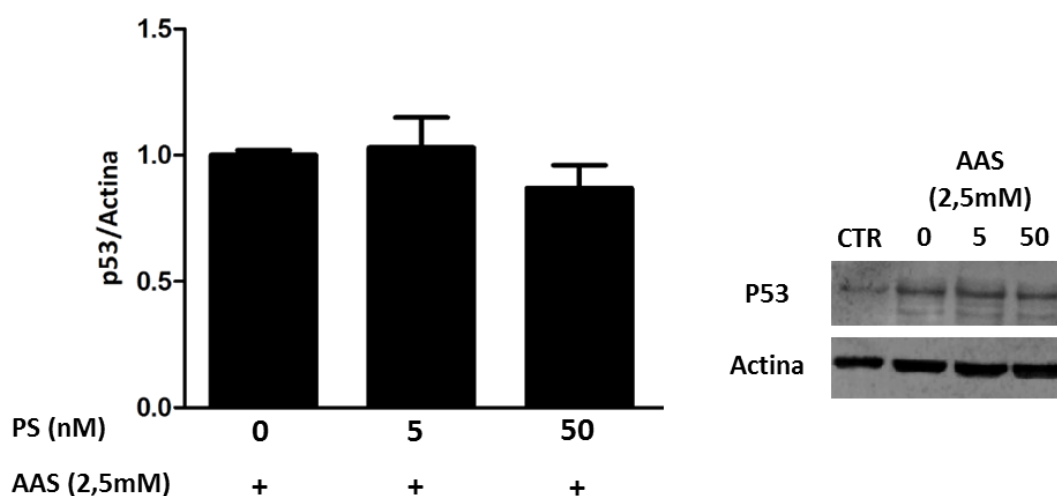


Figura 26. Expressão da proteína p53, nas células de adenocarcinoma colorretal submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre as intensidades de fluorescência da p53 e da actina e os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controlo (razão p53/actina do controlo igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). Não se observaram diferenças significativas entre as condições. O imunoblot é representativo de uma experiência.

6.3 Ciclo celular

Apesar de não se ter verificado localização dos fotossensibilizadores a nível do núcleo celular, o stress oxidativo gerado no processo fotodinâmico pode induzir alterações mensuráveis no ciclo celular, pelo que se avaliou o conteúdo de DNA das células tratadas com recurso ao PI. Esta técnica permite seguir as progressivas alterações de cromossomas, de 2n para n, de forma a ser possível a distinção das diferentes fases do ciclo celular. Tendo em conta os resultados obtidos, verificou-se que em ambas as linhas celulares não existiam grandes alterações no ciclo celular, pelo que a PDT combinada com o AAS pouco influenciou o ciclo celular, como se pode observar nas Figuras 27 e 28.

Nas células de adenocarcinoma colorretal tratadas não se verificaram alterações significativas em termos de ciclo celular, em relação às células controlo.

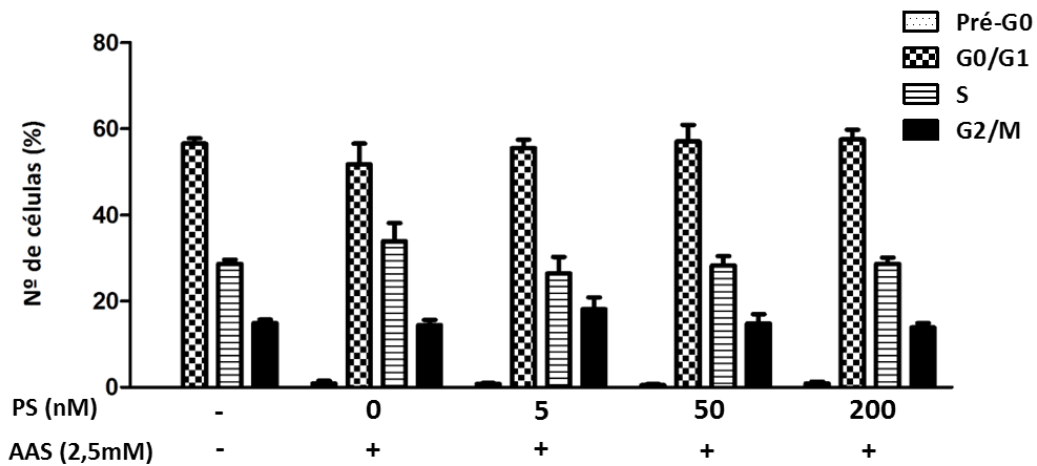


Figura 27. Ciclo celular das células de adenocarcinoma colorretal submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células nas fases pré-G₀, G₀/G₁, S e G₂/M. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). Não se observaram diferenças significativas entre as condições.

Em relação às células do adenocarcinoma esofágico verificou-se o aparecimento de uma população celular na fase pré-G₀ significativa em relação às células controlo, relacionada com a morte por apoptose. Esta população pré-G₀, com a concentração de PS de 200 nM, apresentou um valor de 18,3±2,6% (p<0,001). A população celular na fase G₀/G₁ também sofreu um aumento significativo em relação ao controlo com as concentrações de PS de 5 nM e de 50 nM, com valores de 71,2±1,1% (p=0,010) e de 74,5±0,99% (p<0,001), respetivamente. Na fase G₂/M verificou-se uma diminuição da população celular para valores de 9,9±0,4% (p<0,001) com a concentração de PS de 5 nM e para valores de 8,3±0,6% (p<0,001) com a concentração de 50 nM.

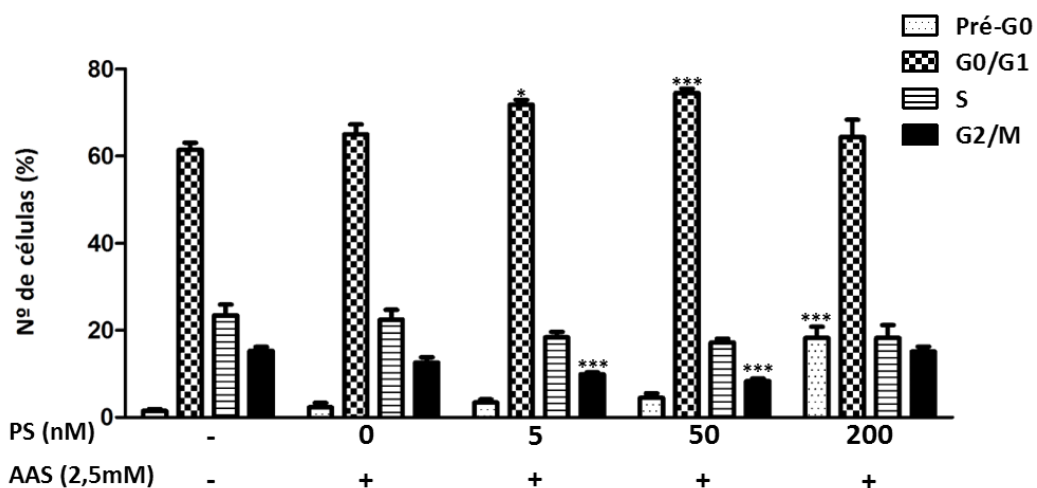


Figura 28. Ciclo celular das células de adenocarcinoma esofágico submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células nas fases pré-G₀, G₀/G₁, S e G₂/M. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa p <0,05 e *** significa p <0,001.

6.4 Stresse oxidativo

A formação de ROS durante o processo fotodinâmico é um evento crucial para a morte celular. Posto isto, foram avaliados os níveis intracelulares de diferentes ROS que intervêm na PDT.

6.4.1 Avaliação da produção intracelular de peróxidos

Verificou-se um desequilíbrio da produção intracelular de peróxidos nas células da linha celular de adenocarcinoma humano colorretal em relação ao controlo, como se pode verificar na Figura 29. Assim ocorre um decréscimo significativo da produção de peróxidos nas células tratadas com a combinação de PDT e AAS em relação ao controlo, com a concentração de PS de 200 nM associada a AAS, para o valor de $0,27 \pm 0,1\%$ ($p < 0,001$). Em relação às células do adenocarcinoma humano esofágico verificou-se produção de peróxidos intracelulares com todas as condições em relação às células controlo, como demonstra a Figura 29.

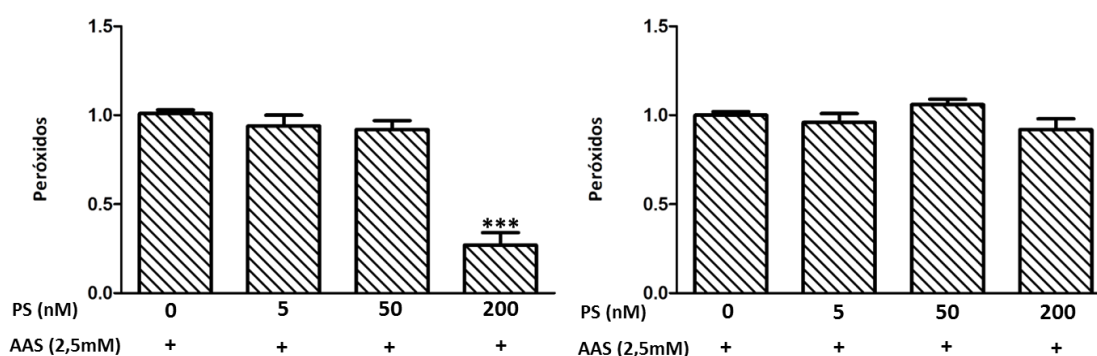


Figura 29. Produção intracelular de peróxidos nas células de adenocarcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de adenocarcinoma esofágico (à direita) submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controlo. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ($n=6$). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *** que significa $p < 0,001$.

6.4.2 Avaliação da produção intracelular de anião superóxido

No que respeita ao anião superóxido registou-se a manutenção da concentração em ambas as linhas celulares tratadas, em relação às células controlo, como demonstra a Figura 30. Apenas, nas células de adenocarcinoma esofágico e para a concentração de PS de 200 nM ocorreu uma diminuição significativa em relação às células controlo, com um valor de $0,90 \pm 0,01\%$ ($p < 0,001$).

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014), no qual se utilizaram as mesmas condições de fotossensibilizador BBr2HPC *per se* no tratamento das linhas celulares, verificou-se uma diminuição significativa na produção de anião superóxido por parte da PDT combinada com AAS, variando os valores de $1,42 \pm 0,18\%$ para $0,90 \pm 0,01\%$ ($p < 0,001$) com a concentração de PS de 200 nM.

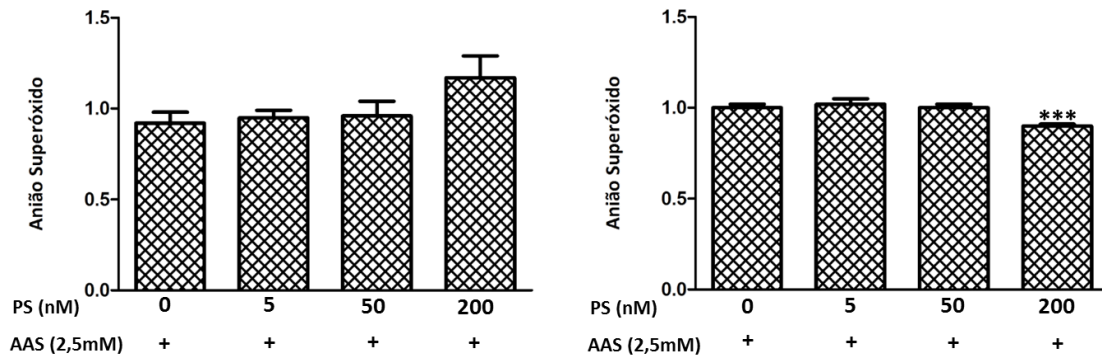


Figura 30. Produção intracelular de anião superóxido nas células de adenocarcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de adenocarcinoma esofágico (à direita) submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controlo. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *** que significa $p < 0,001$.

6.4.3 Avaliação da inibição de espécies reativas de oxigénio

De modo a avaliar a influência das ROS na terapia combinada de PDT com AAS utilizou-se um *quencher* do oxigénio singlete, a azida de sódio. Na linha celular de adenocarcinoma colorretal verificou-se, no geral, uma menor inibição significativa da atividade metabólica para as células tratadas com a concentração de 5 mM de azida de sódio em relação às células controlo, e com um aumento significativo da atividade metabólica para as várias concentrações de PS com aumentos de $72,2 \pm 2,5\%$ para $85,6 \pm 2,6\%$ ($p = 0,015$) com a concentração de 5 nM, de $18,0 \pm 3,6\%$ para $57,4 \pm 2,6\%$ ($p < 0,001$) com a concentração de 50 nM, de $0,14 \pm 0,1\%$ para $2,3 \pm 0,4\%$ ($p < 0,001$) com a concentração de 200 nM e de $0,1 \pm 0,1\%$ para $0,9 \pm 0,1\%$ ($p = 0,010$) com a concentração de 500 nM, como se pode observar na Figura 31. Em relação à linha celular de adenocarcinoma esofágico observa-se, de igual modo, uma quebra na inibição da atividade metabólica, relativamente às células controlo, com a adição de 5 mM de azida de sódio, com um aumento significativo da atividade metabólica para o AAS *per se*, bem como para várias concentrações de PS de 50nM, 200nM e 500nM, com aumentos de $81,8 \pm 5,0\%$ para $110,8 \pm 2,9\%$ ($p < 0,001$); de $21,2 \pm 3,4\%$ para $92,6 \pm 3,5\%$ ($p < 0,001$); de $0,9 \pm 0,2\%$ para $11,7 \pm 1,7\%$ ($p < 0,001$) e de $0,5 \pm 0,1\%$ para $1,1 \pm 0,2\%$ ($p = 0,038$), respetivamente, como se pode verificar na Figura 31.

Em relação ao manitol, que é um *scavenger* do radical hidroxilo (HO^\cdot) verifica-se que nas células de adenocarcinoma colorretal a sua presença diminui a inibição da atividade metabólica das células tratadas em relação às células controlo, verificando-se um aumento significativo da atividade metabólica com as concentrações de PS com valores de $72,2 \pm 2,5\%$ para $85,8 \pm 1,7\%$ ($p < 0,001$) com a concentração de 5 nM, de $18,0 \pm 3,6\%$ para $37,1 \pm 3,3\%$ ($p = 0,010$) com a concentração de 50 nM, de $0,14 \pm 0,1\%$ para $1,5 \pm 0,3\%$ ($p < 0,001$) com a concentração de 200 nM e de $0,09 \pm 0,1\%$ para $0,7 \pm 0,1\%$ ($p = 0,035$) com a concentração de 500 nM, como se pode observar na Figura 32. Nas células de adenocarcinoma esofágico observa-se também o aumento da atividade metabólica em relação às células controlo, em presença de manitol, com um aumento significativo da atividade metabólica de $21,2 \pm 3,4\%$ para $73,1 \pm 3,0\%$ ($p < 0,001$) com a concentração de PS de 50 nM e de $0,5 \pm 0,1\%$ para $1,0 \pm 0,2\%$ ($p = 0,039$) com a concentração de PS de 500 nM, como se pode ver na Figura 32.

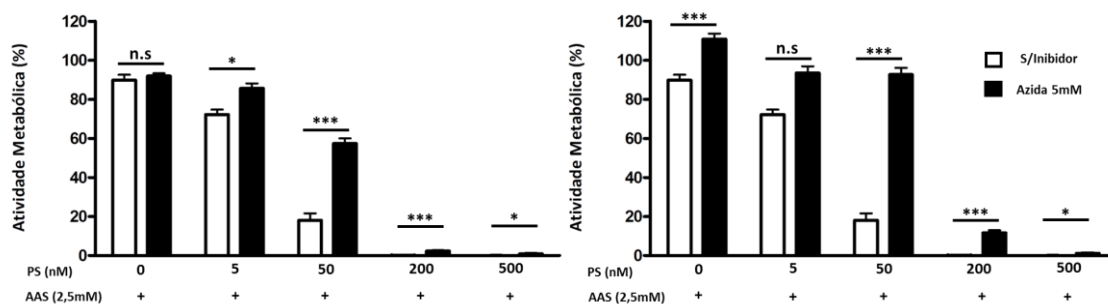


Figura 31. Atividade metabólica das células de adenocarcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de adenocarcinoma do esôfago (à direita) submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas, na presença de um *quencher* de oxigênio singlete (1O_2). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa p <0,05 e *** significa p <0,001. n.s.=não significativo.

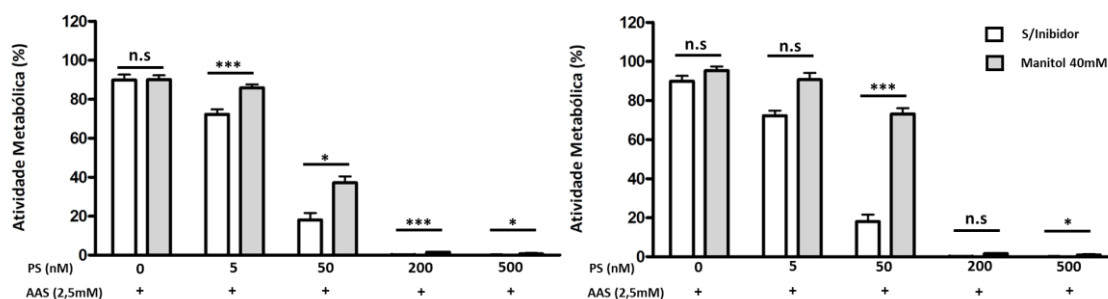


Figura 32. Atividade metabólica das células de adenocarcinoma colorretal (à esquerda) e nas células de adenocarcinoma do esôfago (à direita), submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas, na presença de d-manitol, um *scavenger* de radical hidroxilo (HO^{\cdot}). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes realizadas em duplicado (n=8). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com *, em que * significa p <0,05 e *** significa p <0,001 n.s.=não significativo.

6.5 Defesas antioxidantes

6.5.1 Avaliação da produção intracelular de glutatião reduzido

O glutatião reduzido é uma defesa antioxidante que tem como função a metabolização de vários peróxidos e de espécies radiculares. Nas células de adenocarcinoma colorretal e de adenocarcinoma esofágico verificou-se que não existiram alterações significativas no conteúdo intracelular de glutatião reduzido em relação às células controlo, como se pode observar na Figura 33.

6.5.2 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase é uma das principais defesas antioxidantes a nível do organismo, possuindo três isoformas com localizações distintas em termos celulares, com a superóxido dismutase de manganês a estar localizada na mitocôndria, a de cobre e de zinco a serem encontradas no citosol e a extracelular a estar ligada à matriz extracelular (Saczko *et al.* 2008).

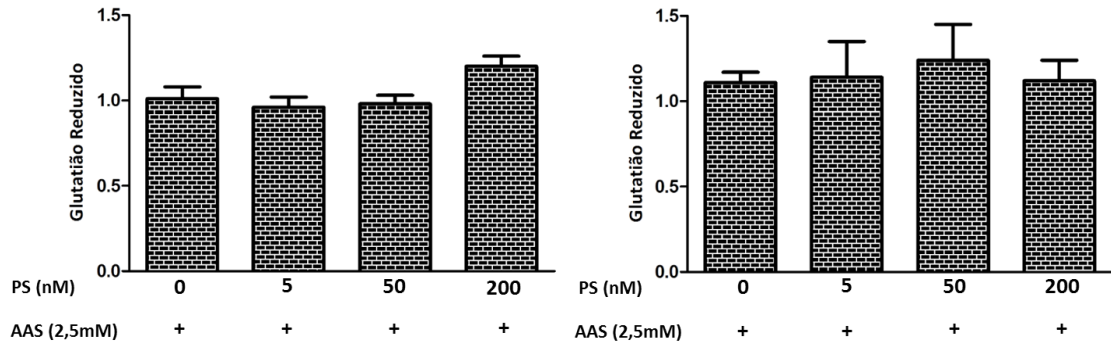


Figura 33. Produção intracelular de glutatião reduzido nas células de adenocarcinoma colorretal (à esquerda) e adenocarcinoma esofágico (à direita) submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controlo. Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). Não se observaram diferenças entre as condições.

Em termos de PDT, a superóxido dismutase pode limitar parcialmente o efeito fotodinâmico por remoção de ROS do organismo (Dolgachev *et al.* 2005). Na linha celular de adenocarcinoma colorretal verificou-se apenas um aumento significativo da atividade da enzima superóxido dismutase em relação às células controlo, por parte das células tratadas com AAS, com uma atividade de $1,31 \pm 0,04\%$ ($p=0,004$), como se pode observar na Figura 34.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014), verificou-se uma diminuição significativa em termos da atividade da enzima superóxido dismutase por parte da combinação de PDT com o AAS, com redução de $1,26 \pm 0,15\%$ para $0,99 \pm 0,08\%$ ($p=0,042$) com a concentração de PS de 5 nM.

Em relação às células de adenocarcinoma esofágico não se verificaram alterações significativas em termos da atividade da enzima superóxido dismutase por parte das células tratadas em relação ao controlo, como demonstra a Figura 34.

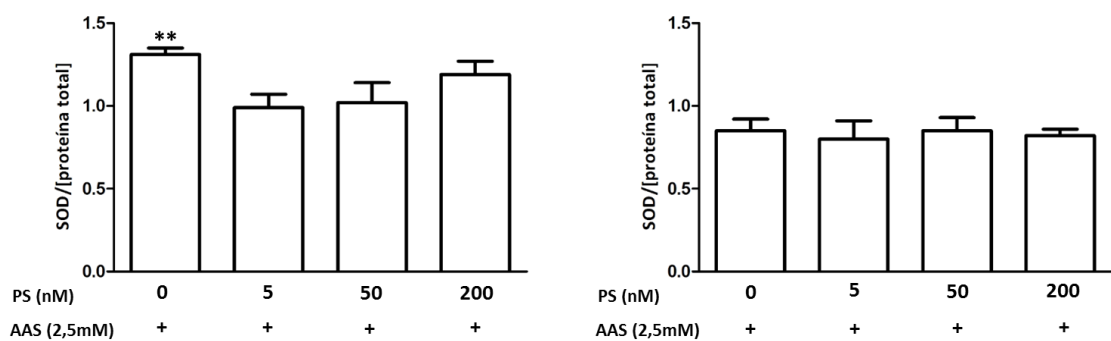


Figura 34. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas células de adenocarcinoma colorretal (à esquerda) e adenocarcinoma esofágico (à direita) submetidas à PDT em associação com AAS na concentração de 2,5mM com avaliação às 24 horas. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a absorvância obtida e a concentração de proteína total e os gráficos representam a alteração relativamente a culturas celulares controlo (razão SOD/proteína total do controlo igual a 1). Os gráficos representam a média e o erro padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n=6). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com ** que significa $p < 0,01$.

Comparando com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014) verificou-se uma diminuição significativa da atividade da enzima superóxido dismutase por parte das células tratadas com a combinação PDT com o AAS, com uma redução de $1,19 \pm 0,06\%$ para $0,80 \pm 0,30\%$ ($p=0,018$) com a concentração de PS de 5 nM, de $1,33 \pm 0,11\%$ para $0,85 \pm 0,25\%$ ($p<0,001$) com a concentração de PS de 50 nM e de $1,48 \pm 0,22\%$ para $0,82 \pm 0,08\%$ ($p=0,009$) com a concentração de PS de 200nM.

7.Resultados (*IN VIVO*)

7.1 Tratamentos com PDT e AAS *in vivo*

Em estudos anteriores, realizados pelo grupo de investigação, foi possível estabelecer com sucesso um modelo animal de xenotransplante de adenocarcinoma colorretal baseado na linha celular WiDr, utilizada anteriormente nos estudos *in vitro*, em ratinhos atímicos Balb/c nu/nu (Laranjo *et al.* 2013).

Na Figura 35 estão representados os resultados obtidos, com a média e o erro padrão do volume relativo dos xenotransplantes de cada grupo experimental, com o grupo de controlo a ser constituído por 12 animais, o grupo de AAS por 9 animais, o grupo de PDT *per se* por 10 animais e o grupo de terapia combinada por 6 animais. Utilizando ainda os valores experimentais foram estabelecidas curvas pela estimativa de Kaplan-Meier, cuja representação se encontra na Figura 36, com a definição do ponto de corte do volume tumoral relativo superior a 1,5. Desta forma obtiveram-se 31 eventos (83,8%) num universo de 37 ratinhos.

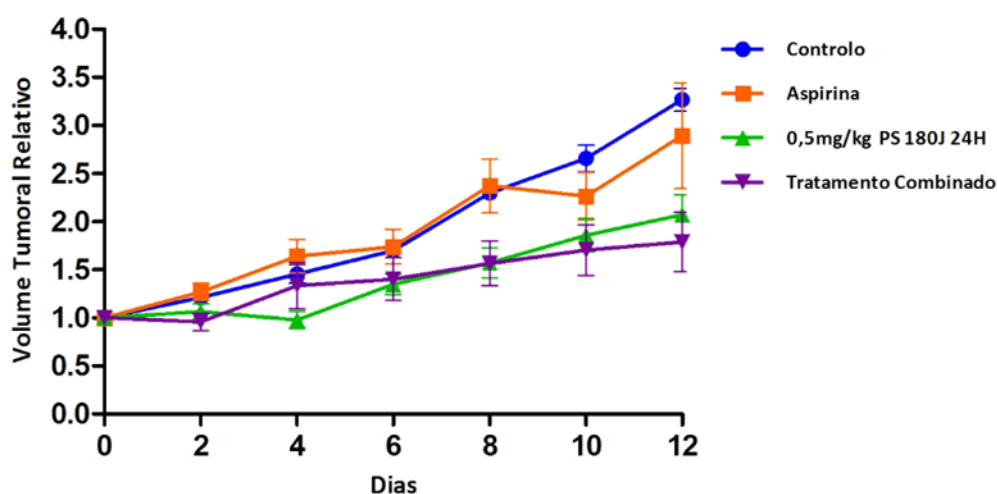


Figura 35. Crescimento tumoral relativo dos xenotransplantes de cancro colorretal nos ratinhos controlo não submetidos a tratamento e dos xenotransplantes nos 3 grupos de ratinhos submetidos a tratamento. Os resultados representam a média e o erro padrão dos valores experimentais obtidos. Estes resultados foram obtidos em co-autoria com a Doutora Mafalda Laranjo.

Durante o período experimental de 12 dias, verificou-se que todos os ratinhos do grupo de controlo atingiram o ponto de corte estabelecido, com um tempo mediano até ao evento de 6 dias com um intervalo de confiança a 95% (IC95%) de [5,4;6,6]. No grupo experimental

submetido a injeção de 200 mg/kg de AAS, 16,7% dos animais não atingiram o volume tumoral relativo de 1,5, sendo o tempo mediano até ao evento de 4 dias, com um IC95% de [1,6;6,4].

No grupo com administração de 0,5 mg/kg de PS e irradiação a 180 J, 24h após a administração, verificou-se que 20% dos animais não atingiram o ponto de corte estabelecido, apresentando um tempo mediano até ao evento de 8 dias com um IC95% de [5,5;10,5]. No grupo de tratamento combinado, observou-se que 33,3% dos animais não atingiram o ponto de corte estabelecido, com um tempo mediano até ao evento de 10 dias com um IC95% de [3,2;16,8].

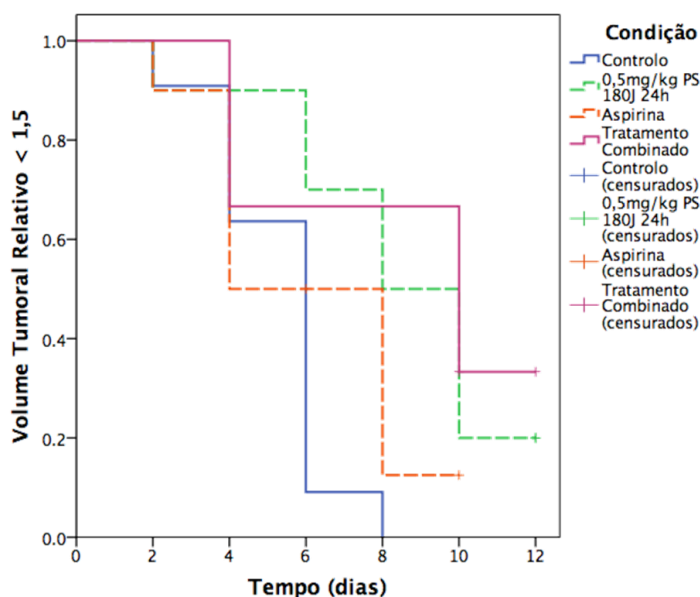


Figura 36. Curvas de Kaplan-Meier que traduzem a probabilidade de o volume tumoral relativo atingir 1,5 vezes o volume inicial. Os resultados representam a média e o erro padrão dos valores experimentais obtidos. Estes resultados foram obtidos em co-autoria com a Doutora Mafalda Laranjo.

A comparação das curvas obtidas através de teste de log-rank mostrou a existência de diferenças significativas entre os quatro grupos ($p=0,024$). Contudo, em comparação com o controlo apenas o tratamento com PDT demonstra uma diminuição significativa na progressão tumoral ($p=0,019$). O tratamento combinado, apesar de não apresentar significância estatística, parece mostrar uma tendência para a diminuição. De referir também que entre os grupos com tratamento não se verificaram diferenças com significância estatística.

7.2 Análise histopatológica

As imagens que representam a histologia dos tumores excisados após a monitorização e a ocisão dos ratinhos estão representadas nas Figuras 38, 39 e 40. A Figura 38 representa os cortes histológicos dos ratinhos do grupo de controlo. Na Figura 38 A e B, com ampliações de 40x e 100x, respetivamente, foi possível observar-se uma lesão expansiva, com um padrão sólido constituído por pequenas ilhas e grandes maciços com áreas *minor* de padrão glandular, o que é correspondente a uma neoplasia de alto grau com baixa diferenciação. Ainda há registo de uma grande área de necrose, característica deste tipo de tumores indiferenciados, e infiltração de macrófagos contendo hemossiderina, que é um pigmento derivado da metabolização da hemoglobina associado a hemorragias causadas pela incapacidade de a

neovascularização acompanhar o crescimento tumoral. Na Figura 38 C foi possível observar-se o citoplasma eosinófilo das células tumorais e os seus núcleos hiper cromáticos, com aumento da relação núcleo/citoplasma e intensa atividade mitótica, com formas atípicas.

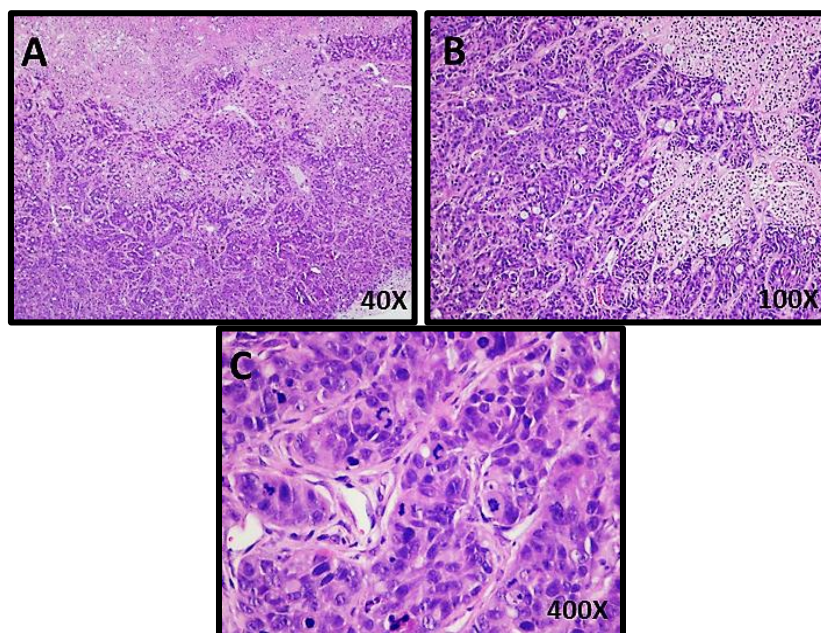


Figura 38. Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de um xenotransplante de ratinhos do grupo de controle. A imagem A foi obtida com ampliação de 40x, a imagem B foi obtida com uma ampliação de 100x e a imagem C com uma ampliação de 400x.

No caso das imagens da Figura 39, que correspondem a um exemplo de xenotransplante de um ratinho tratado com AAS verifica-se igualmente uma lesão expansiva de padrão sólido constituído por pequenas ilhas e grandes maciços com áreas *minor* de padrão glandular, correspondentes a uma neoplasia de alto grau com baixa diferenciação, como se pode observar nas Figuras 39 A e B. Adicionalmente observa-se a presença de necrose com infiltração linfoplasmocitária na periferia tumoral e aparecimento de macrófagos contendo hemossiderina. Na Figura 39 C observam-se células tumorais com citoplasma eosinófilo, núcleos hiper cromáticos, com aumento da relação núcleo/citoplasma e intensa atividade mitótica, com formas atípicas.

Em relação às imagens da Figura 40, que correspondem a um xenotransplante de ratinho do grupo de tratamento combinado verifica-se a presença de uma lesão expansiva de padrão sólido constituído por pequenas ilhas e grandes maciços com áreas *minor* de padrão glandular, com a correspondência a uma neoplasia de alto grau pouco diferenciada, como se pode observar nas Figuras 40 A e B. Adicionalmente observa-se necrose do tipo isquémico e infiltração linfoplasmocitária na periferia tumoral. Na Figura 40 C observam-se células tumorais com citoplasma eosinófilo, núcleos hiper cromáticos, com aumento da relação núcleo/citoplasma e intensa atividade mitótica, com formas atípicas.

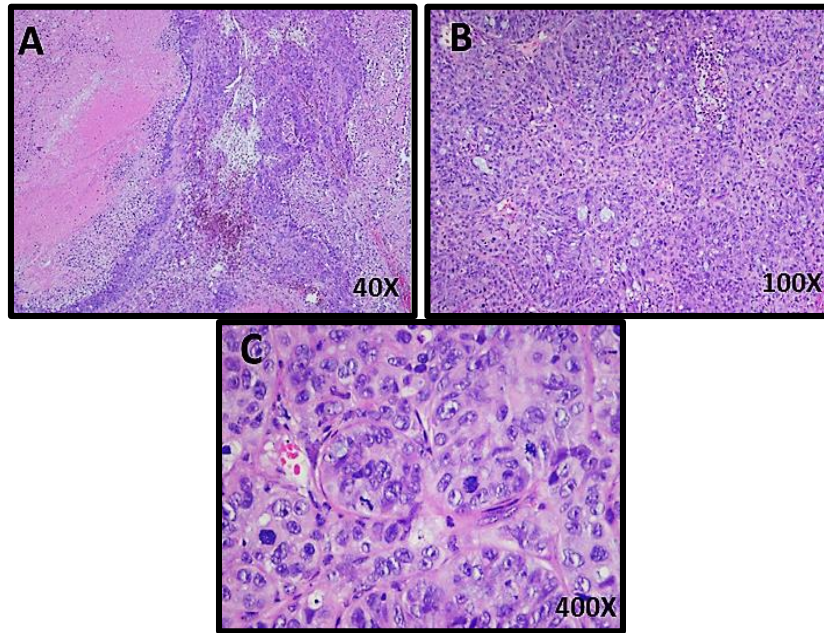


Figura 39. Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de um xenotransplante de ratinhos do grupo com administração de 200mg/kg de AAS. A imagem A foi obtida com ampliação de 40x, a imagem B foi obtida com uma ampliação de 100x e a imagem C com uma ampliação de 400x.

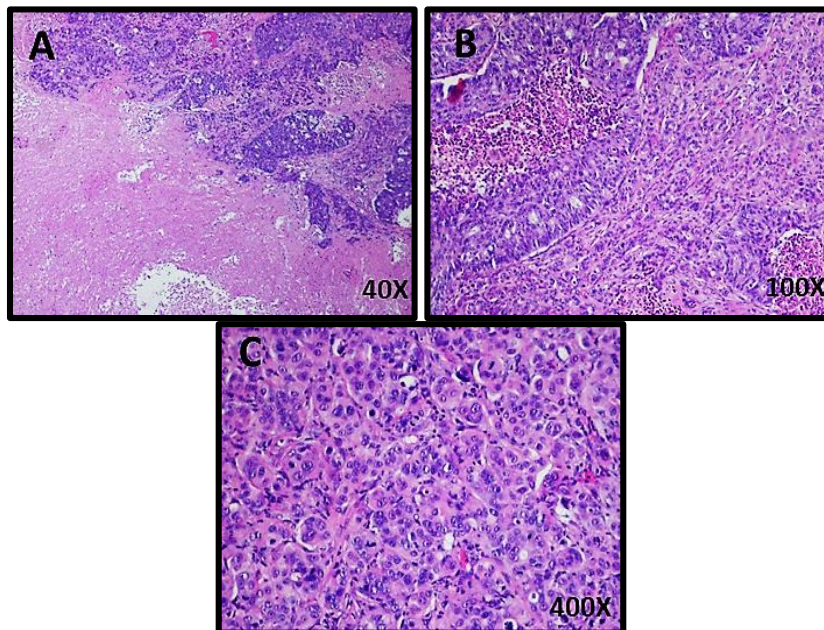


Figura 40. Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de um xenotransplante de ratinhos do grupo de tratamento combinado. As imagens A foi obtida com ampliação de 40x, a imagem B foi obtida com uma ampliação de 100x e a imagem C com uma ampliação de 400x.

DISCUSSÃO

7. Discussão

7.1 Discussão (IN VITRO)

O fotossensibilizador BBr2HPC previamente sintetizado e caracterizado tem propriedades fotoquímicas apropriadas para a sua utilização em PDT, tanto *in vitro* como *in vivo*, como se pode verificar em estudos anteriores (Braga, 2012; Laranjo, 2014; Teixo, 2013). Os valores de IC₅₀ para este PS obtidos para as linhas celulares WiDr e OE19 são bastante reduzidos, na ordem dos nanomolar. De facto, o IC₅₀ obtido, após 24 horas de incubação, para as células da linha celular WiDr é de 58,5 nM e para as células da linha celular OE19 é de 35,0 nM (Laranjo, 2014). Como se sabe, os adenocarcinomas do trato gastrointestinal podem ser acessíveis por técnicas endoscópicas, tais como a endoscopia digestiva alta ou a colonoscopia. Esta possibilidade é uma vantagem adicional pois, quando em presença de um estágio tumoral inicial, a PDT poderá ser uma alternativa viável aos tratamentos convencionais ou poderá ser utilizada como modalidade neoadjuvante ou, até, adjuvante (Laranjo, 2014).

O AAS possui atividade anti-tumoral em diversos tipos de neoplasias, incluindo os carcinomas colorretal e esofágico. Esta evidência surgiu de diversos estudos *in vitro* realizados com linhas celulares cancerígenas, nos quais concentrações de AAS compreendidas entre o micromolar e o milimolar, induziram morte celular por apoptose, paragem do ciclo celular, senescência celular, entre outras (Li *et al.* 2000; Luciani *et al.* 2007; Hossein *et al.* 2012; Raza *et al.* 2012). As linhas celulares WiDr e OE19 possuem ainda uma elevada expressão de cicloxigenases, nomeadamente de COX-2, que são um alvo molecular do AAS (Sakai *et al.* 2006; Burnat *et al.* 2010). A elevada expressão de COX-2 está relacionada com o aumento da produção de fatores pró-carcinogénicos e com possibilidade de recorrência tumoral (Hendrickx *et al.* 2003; Luna *et al.* 2008). Como também se encontra documentado o aumento da expressão de COX-2 após a PDT, o AAS em combinação com a PDT foi utilizado neste trabalho de modo a verificar a potencial melhoria da eficácia global do tratamento nas linhas celulares WiDr e OE19 (Hendrickx *et al.* 2003; Luna *et al.* 2008).

A avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de redução de MTT é um método simples e fiável para se avaliar o efeito de substâncias *in vitro*, tendo por base a capacidade redutora das enzimas mitocondriais (McHale & McHale, 1988; Hamid *et al.* 2004). Contudo a redução de MTT pode ser afetada por diversos fatores como, por exemplo, algumas substâncias que atuam a nível mitocondrial (Collier & Pritsos, 2003), presença de proteínas de resistência e de efluxo (Vellonen *et al.* 2004), bem como alterações no metabolismo celular, que poderão levar a uma estimativa da viabilidade inferior ou superior à realidade.

Os resultados obtidos pelo ensaio de redução de MTT demonstraram que o AAS induziu uma diminuição significativa da atividade metabólica com o aumento da concentração, nas células de adenocarcinoma esofágico, uma vez que se verificou um decréscimo da mesma em relação às células controlo não tratadas para as concentrações de AAS de 2,5 mM e de 10 mM, com valores de 81,2±5,0% e de 60,2±5,7%. Nas células de adenocarcinoma colorretal tratadas com AAS na concentração de 2,5 mM, não se verificam diferenças significativas em relação às células controlo, o mesmo não se verificando para a concentração de 10 mM, para a qual se verificou um decréscimo significativo da atividade metabólica em relação ao controlo, com um

valor de $72,8 \pm 4,2\%$. Estes resultados corroboram estudos *in vitro* anteriores que verificaram que a citotoxicidade do AAS em linhas celulares tumorais aumenta com o aumento da concentração (Li *et al.* 2000; Luciani *et al.* 2007; Hossein *et al.* 2012; Raza *et al.* 2012). Outro fator importante é o tempo de incubação, que estudos anteriores mostraram influenciar a citotoxicidade (Li *et al.* 2000; Luciani *et al.* 2007; Hossein *et al.* 2012; Raza *et al.* 2012). Neste trabalho apenas se utilizou como referência o tempo de incubação de 24h, tendo por base os estudos de Chiavello *et al.* (Chiavello *et al.* 2010).

No que diz respeito à terapia combinada da PDT com o AAS, verificou-se um decréscimo significativo da atividade metabólica dependente do aumento da concentração de PS em ambas as linhas celulares. Em comparação com resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014), no qual se utilizaram as mesmas condições do fotossensibilizador BBr2HPC *per se*, verificou-se que a combinação entre PDT e AAS na linha celular de cancro colorretal induziu uma diminuição significativa na atividade metabólica com as concentrações de PS de 5 nM, 50 nM e 200 nM. Na linha celular de cancro esofágico, a diminuição da atividade metabólica apenas se verificou com a concentração de 5 nM. A hipótese possível para explicar este diferente comportamento é a possibilidade de que para as concentrações mais elevadas de PS deixar de existir sinergia entre a PDT e o AAS, com o PS a exercer um efeito antagónico sobre o AAS, pois tem uma maior citotoxicidade. Contudo, para a confirmação desta hipótese seria necessária a avaliação do índice de combinação, o que poderia ser feito pelo método de Chou & Talalay (Chou, 2010).

Como complemento do ensaio de redução de MTT foi realizado o ensaio de SRB para avaliação da viabilidade celular. Este ensaio tem em conta o conteúdo proteico, que é corado pela sulforrodamina b fornecendo uma estimativa do número de células presentes (Papazisis *et al.* 1997; Vichai & Kirtikara, 2006). Os resultados obtidos pelo ensaio de SRB demonstraram um decréscimo significativo na viabilidade celular com o aumento da concentração de PS para ambas as linhas celulares. A PDT, com concentração de PS de 50 nM, em associação com o AAS determinou uma maior diminuição da viabilidade na linha celular de adenocarcinoma colorretal do que na linha celular de adenocarcinoma esofágico. Contudo, em relação à concentração de PS de 200 nM verificou-se o oposto. Estes resultados podem estar relacionados com o diferente tipo de morte celular induzido pela terapêutica e que estará na dependência do tipo celular e da concentração. Para algumas condições de tratamento, ao contrário do que seria de prever, verificou-se que a viabilidade celular foi significativamente superior quando foi usado o tratamento de combinação do que quando foi usada a PDT *per se*, nomeadamente nas células de adenocarcinoma colorretal com as concentrações de PS de 50 nM e de 200 nM, e nas células de adenocarcinoma esofágico como a concentração de PS de 50 nM.

No que respeita ao tratamento de combinação, a atividade metabólica obtida pelo ensaio de redução de MTT foi inferior à obtida pelo ensaio de SRB. Num estudo realizado por Spitz *et al.*, estes autores verificaram que o AAS causava a inibição da enzima PFK (do inglês *6-phosphofructo-1-kinase*) na linha celular tumoral de mama MCF-7, de forma dependente da concentração. A inibição desta enzima tem influência a nível do metabolismo glicolítico e na produção de ATP, com o conseqüente decréscimo da glicose e depleção de ATP, o que poderá justificar a baixa atividade metabólica (Spitz *et al.* 2009). Um estudo de Raza *et al.* em células de hepatocarcinoma HepG2, refere também a inibição dos complexos I e IV da cadeia

respiratória mitocondrial, bem como a redução dos níveis de ATP após a incubação com AAS (Raza *et al.* 2012).

Estes diferentes comportamentos da atividade metabólica e da viabilidade celular poderá ainda estar relacionada com a indução de senescência por parte do AAS nas células tumorais. Um estudo de Jung *et al.* demonstrou a indução de senescência nas linhas celulares de cancro colorretal SW620 e HCT-116 após a adição de várias concentrações de AAS, por ativação da enzima AMPK (do inglês *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*), que está relacionada com processos bioenergéticos celulares (Jung *et al.* 2015).

Para se conhecerem melhor os mecanismos envolvidos no efeito da combinação entre a PDT e o AAS recorreu-se à citometria de fluxo para a avaliação dos tipos de morte celular envolvidos, com a apoptose a ser avaliada pela externalização da fosfatidilserina da bicamada fosfolipídica através da marcação com a anexina V-fluorocromo isotiocianato de fluoresceína e a necrose a ser avaliada pelo registo de perda da integridade da membrana citoplasmática através da marcação com iodeto de propídeo.

Nas células de adenocarcinoma colorretal tratadas com a PDT associada ao AAS verificou-se uma propensão para a morte celular por necrose, com o aumento da concentração de PS, registando-se significância para este tipo de morte com a concentração de 200 nM relativamente às células controlo. Para concentrações de PS mais baixas, observou-se morte por apoptose, significativa em relação às células controlo. Em estudo anterior realizado pelo grupo de investigação onde foi avaliada a PDT com base no fotossensibilizador BBr2HPC também se verificou uma tendência para morte por necrose para as concentrações mais elevadas e para a morte por apoptose para as concentrações menores.

No caso das células de adenocarcinoma esofágico verificou-se uma situação distinta. A combinação entre a PDT e o AAS promoveu significativamente a morte celular mas principalmente por apoptose. Estes resultados nas células de adenocarcinoma esofágico são diferentes dos resultados obtidos anteriormente pelo grupo de investigação com este PS (Laranjo, 2014). O aumento da concentração de PS determinava um *shift* de morte apoptótica para a morte necrótica. Estes dados demonstram que nestas células o AAS tem um efeito maior na regulação dos mecanismos de morte celular comparando com as células de adenocarcinoma colorretal.

Na base da regulação dos mecanismos de morte celular com o tratamento fotodinâmico existem diversos parâmetros a ter em conta como, por exemplo, a localização intracelular do fotossensibilizador que, ao se localizar em organelos celulares diferentes, irá ter influência em tipos de morte celular diferentes. O fotossensibilizador BBr2HPC utilizado neste estudo experimental possui uma co-localização em pelo menos três organelos celulares distintos, as mitocôndrias, os lisossomas e o retículo endoplasmático. Esta diferente localização poderá explicar a ativação de diferentes mecanismos de morte celular de acordo com a concentração de PS, conforme se observou nos estudos anteriores efetuados pelo grupo de investigação (Laranjo, 2014).

Diversos estudos realizados com diferentes fotossensibilizadores em outras linhas celulares tumorais como a linha celular de glioblastoma T98G (Miki *et al.* 2015), a linha celular de adenocarcinoma do pulmão CL1-0 (Ji *et al.* 2010), as linhas celulares de carcinoma do colo do útero HeLa e SiHa (Haywood-Small *et al.* 2006; Panzarini *et al.* 2011), a linha de melanoma humano G361 (Malina *et al.* 2016), a linha de carcinoma esofágico de células escamosas Eca-109 (Che *et al.* 2011) e a linha de adenocarcinoma colorretal HT-29 (Mikeš *et al.* 2007),

referem que o tipo de morte que se verifica com a PDT depende essencialmente da concentração de PS, do tempo de incubação após administração, da localização subcelular, da fluência da fonte de luz utilizada e do próprio tipo de células tumorais, o que está de acordo com os nossos resultados. Em relação ao tipo de morte causado pelo AAS, diversos estudos relatam maioritariamente a morte celular por apoptose de linhas celulares tumorais tratadas com diferentes concentrações (Zimmermann *et al.* 2000; Luciani *et al.* 2007; Raza *et al.* 2011; Hossein *et al.* 2012). Contudo, neste estudo experimental, tanto na linha celular de adenocarcinoma colorretal como na linha celular de adenocarcinoma esofágico não se verificou nenhum tipo de morte celular significativo em relação às células controlo com a concentração utilizada de AAS.

O potencial de membrana mitocondrial é gerado pela cadeia transportadora mitocondrial através da condução de um fluxo de partículas carregadas desde a matriz até ao citoplasma, criando-se assim um gradiente eletroquímico (Wang *et al.* 2005). A perda do potencial de membrana mitocondrial está relacionada com a morte celular, geralmente por apoptose. A perda do potencial de membrana mitocondrial é verificada antes da alteração morfológica celular característica dos diferentes tipos de morte celular como a condensação da cromatina e a disrupção de organelos celulares (Tian *et al.* 2008).

No tratamento combinado da PDT com o AAS verificou-se a diminuição do potencial de membrana mitocondrial para ambas as linhas celulares tratadas com o aumento da concentração de PS, com a diminuição a ser significativa para as concentrações mais elevadas de PS, ou seja, com as concentrações de 50 nM e de 200 nM. Comparando estes resultados com os obtidos na avaliação dos tipos de morte celular, a diminuição progressiva do potencial de membrana mitocondrial nas células de adenocarcinoma esofágico refuta o aparecimento de morte por apoptose nesta linha celular, uma vez que a perda do potencial de membrana mitocondrial está relacionada com morte por apoptose. No caso da linha celular de adenocarcinoma colorretal, apesar da diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial, não se regista morte significativa por apoptose.

As mesmas linhas celulares tumorais em estudo tratadas com o fotossensibilizador BBr2HPC *per se* também sofreram diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial (Laranjo *et al.* 2014). A disrupção do potencial de membrana mitocondrial também já foi observada após lesão fotooxidativa em organelos como os lisossomas (Sasnauskienė *et al.* 2009; Quiogue *et al.* 2009; Liu *et al.* 2011) e o retículo endoplasmático (Kessel & Reinert Jr, 2007), o que poderá explicar porque nem sempre a perda de potencial de membrana mitocondrial está associada a morte por apoptose. O AAS também já foi referido como capaz de induzir perda de potencial de membrana mitocondrial em algumas linhas celulares tumorais, como em células de hepatocarcinoma HepG2 (Hossein *et al.* 2012; Raza & John, 2012), em que se demonstrou o seu efeito a nível da mitocôndria.

Quanto à proteína supressora tumoral P53 a sua expressão em células normais é baixa, mas em resposta a variados tipos de stresse a sua expressão pode aumentar, com a consequente paragem do ciclo celular na fase G₀/G₁ até que os danos no DNA que possam ocorrer sejam reparados. A maioria das mutações na P53 têm como resultado a expressão de uma proteína não funcional, que poderá reprimir qualquer P53 *wild-type* remanescente. Adicionalmente as P53 mutadas podem adquirir características pró-oncogénicas completamente independentes da P53 *wild-type* (Muller & Vousden, 2013). A P53 tem uma elevada importância na resposta anti-tumoral na quimioterapia e na radioterapia através da

promoção da morte celular por apoptose, enquanto na terapia fotodinâmica a sua ação ainda não é totalmente conhecida (Acedo & Zawacka-Pankau, 2015). Já foram reportados vários estudos sobre a influência da P53 na PDT, onde se verificou que em linhas celulares que expressem uma P53 *wild-type* a terapia fotodinâmica é mais eficiente comparativamente a linhas celulares que possuam uma P53 mutada ou a não expressem (Fisher *et al.* 1998; Mikeš *et al.* 2009). Contudo, os efeitos da PDT não são exclusivos para linhas celulares tumorais que apenas contenham uma P53 *wild-type* pelo que linhas celulares que expressem uma P53 mutada a PDT também poder ser eficaz, como no caso das linhas celulares WiDr e OE19 usadas neste estudo. Podemos assim assumir que, seguramente, existem mecanismos alternativos na PDT para além da indução de morte celular por parte da P53.

A linha celular de adenocarcinoma colorretal WiDr expressa uma P53 mutada, devido a uma mutação pontual no gene *TP53*, no codão 273, onde o aminoácido arginina é trocado pela histidina (Ahmed *et al.* 2013), enquanto na linha de adenocarcinoma esofágico OE19 a expressão da P53 mutada é devida a uma mutação *frameshift* com inserção de um nucleótido de adenina no codão 310 no gene *TP53* (Tym *et al.* 2015).

No caso da linha celular de adenocarcinoma colorretal, não foi detetada nenhuma alteração significativa nos níveis de expressão da P53 por parte da terapia combinada entre PDT e AAS em relação às células controlo. O fotossensibilizador BBr2HPC *per se* levou à diminuição da expressão da P53 (Laranjo, 2014), facto que pode estar relacionado com a geração de hipoxia (Abrantes, 2013). No caso da terapêutica combinada, a manutenção da expressão da P53 pode ser devida à supressão da hipoxia por parte do AAS. De facto, existem estudos que referem a inibição das vias de sinalização da hipoxia pelo AAS (Khaidakov *et al.* 2011).

O tratamento combinado entre a PDT e o AAS não induziu alterações significativas no ciclo celular na linha de adenocarcinoma colorretal humano em relação às células controlo, à semelhança do tratamento com a PDT *per se* (Laranjo, 2014). Em contraste, na linha celular de adenocarcinoma esofágico verificam-se alterações significativas, com aumento da população celular em fase pré-G₀ com a concentração de 200 nM de PS, aumento esse que parece estar relacionado com a morte por apoptose, o que é corroborado pelas alterações do potencial de membrana mitocondrial e avaliação dos tipos de morte celular. Adicionalmente, observou-se para as concentrações de PS de 5 nM e de 50 nM o aumento significativo das populações celulares em fase G₀/G₁ acompanhado de diminuição significativa das populações celulares em fase G₂/M. Posto isto, a adição de AAS à linha celular de adenocarcinoma esofágico parece influenciar a progressão do ciclo celular. De facto, existem estudos em diversas linhas celulares onde o AAS (Luciani *et al.* 2007; Raza *et al.* 2012) *per se* e em estudo com a PDT (Chiavello *et al.* 2010) que demonstraram a paragem do ciclo celular na fase G₀/G₁.

Em relação ao stresse oxidativo, avaliaram-se as espécies reativas de oxigénio com importância no processo fotodinâmico, por citometria de fluxo. Verificou-se uma diminuição significativa na produção intracelular de peróxidos no tratamento combinado com a concentração mais elevada de PS, de 200 nM, na linha celular de adenocarcinoma colorretal.

Na linha celular de adenocarcinoma esofágico não se verificaram alterações significativas na produção intracelular de peróxidos. O tratamento fotodinâmico com base no fotossensibilizador BBr2HPP *per se* (Laranjo, 2014), por sua vez, determinou descida significativa dos níveis de peróxidos intracelulares. Naturalmente que a presença de AAS influencia a produção destas ROS nas células OE19. É de referir também que existem estudos

que verificaram o aumento de peróxidos intracelulares em linhas celulares tumorais tratadas com AAS (Raza *et al.* 2011), contudo as concentrações de AAS utilizadas são superiores às usadas no nosso estudo.

Na avaliação da produção intracelular de anião superóxido, não se verificaram diferenças significativas nas células de adenocarcinoma colorretal tratadas com a combinação entre PDT e AAS, contudo nas células de adenocarcinoma esofágico observou-se uma diminuição significativa na produção de anião superóxido para a concentração de PS de 200 nM. A PDT com o fotossensibilizador BBr2HPC nas mesmas linhas celulares levou ao aumento significativo da produção intracelular de anião superóxido (Laranjo, 2014). Esta diferença parece depender da adição de AAS e de características inerentes ao tipo celular. Não existem registros exatos sobre a regulação da produção intracelular de anião superóxido pelo AAS, pelo menos em linhas celulares tumorais, porém em vários estudos é reportado o potencial antioxidante do AAS na regulação dos níveis de ROS em diversas patologias (Dragomir *et al.* 2004; Maharaj *et al.* 2006).

Em paralelo realizou-se também a determinação da presença de oxigênio singleto e do radical hidroxilo, de um modo indireto, com a utilização de azida de sódio e de d-manitol. A azida de sódio é um *quencher* específico de oxigênio singleto que é utilizado em diversos estudos biológicos, entre os quais quando se pretende avaliar o efeito da PDT (Engel *et al.* 2008; Obata *et al.* 2009; Bancirova, 2010). Já o d-manitol é um *scavenger* específico do radical hidroxilo (Seckin *et al.* 2008; Obata *et al.* 2009; Komagoe *et al.* 2010). Com a adição tanto de azida de sódio como de d-manitol verificou-se um decréscimo significativo na inibição da atividade metabólica por parte das células tratadas em relação ao controlo, com tendência para uma menor inibição com o aumento da concentração do PS. Observando-se os resultados das duas linhas celulares tumorais por nós estudadas parece que o oxigênio singleto tem uma maior influência na terapia combinada nas células de adenocarcinoma esofágico, mas quais se registou um aumento significativo da atividade metabólica com adição de azida de sódio. Em contrapartida as células de adenocarcinoma colorretal parecem ser mais suscetíveis ao efeito do d-manitol.

Em estudos anteriores verificou-se um efeito semelhante na inibição da produção de oxigênio singleto e de radical hidroxilo (Laranjo, 2014), no entanto, com concentrações inferiores de azida de sódio (5x mais no presente estudo) e de d-manitol (10x mais no presente estudo). Esta comparação revela o potencial do AAS na modulação do efeito destas ROS, principalmente nas células de adenocarcinoma esofágico, que sofrem morte por apoptose e perda do potencial de membrana mitocondrial, ocorrências características de danos oxidativos por ROS na mitocondrial.

De forma a contrariar a indução de stresse oxidativo pelas ROS o organismo possui várias defesas antioxidantes, entre as quais alguns substratos como a glutatona (GSH), o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol e a enzima antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) (Valko *et al.* 2016). As células tumorais possuem níveis basais de ROS superiores em comparação com as células normais, pelo que as suas defesas antioxidantes têm maior expressão e atividade, pelo que são necessários níveis mais elevados de ROS para causar danos irreparáveis que impeçam a promoção da proliferação e da diferenciação celulares (Buldak *et al.* 2014).

Neste estudo, em termos da avaliação da produção intracelular de glutatião reduzido verificou-se que na terapia combinada entre PDT e AAS não houve registo de diferenças

significativas em relação aos níveis basais deste substrato, tanto nas células de adenocarcinoma colorretal como nas células de adenocarcinoma esofágico, 24 horas após o tratamento. Nestas células a PDT *per se* levou a um decréscimo significativo do glutatião reduzido 2 horas após o tratamento fotodinâmico (Laranjo 2014). Um estudo de Vad *et al.*, também corrobora estes resultados, uma vez que em células de melanoma B16-F0, a adição de AAS teve um efeito de depleção significativa da GSH até 3 horas após a adição de AAS (Vad *et al.* 2014). Em conjunto, todas estas evidências parecem apontar para uma depleção transiente de GSH poucas horas após o tratamento, com os seus níveis basais a serem progressivamente repostos, à medida que a concentração de ROS presentes diminui.

Em relação à avaliação da atividade da enzima SOD, verificou-se um aumento significativo nas células de adenocarcinoma colorretal com adição de AAS em relação às células controlo. Um efeito semelhante foi observado num estudo de Adachi *et al.*, no qual a utilização de sulindac, um fármaco anti-inflamatório não esteroide tal como o AAS, levou ao aumento da atividade da SOD após 24 horas em células de carcinoma colorretal DLD-1 (Adachi *et al.* 2007). O AAS parece, pois, mais uma vez possuir um efeito modulatório em alguns tipos de ROS, em especial na quantificação de oxigénio singlete e do radical hidroxilo. Comparando ainda com resultados previamente obtidos pelo grupo de investigação com o fotossensibilizador BBr2HPC *per se* nas mesmas linhas celulares (Laranjo, 2014), verificou-se o reforço desta hipótese, uma vez que nesse estudo a atividade da SOD teve um aumento significativo com a concentração de PS em ambas as linhas celulares contrariamente ao que aqui se verifica. Por conseguinte, tendo em conta os resultados obtidos na avaliação de defesas antioxidantes põe-se a hipótese de que os níveis celulares a que estas defesas se encontram não parecem limitar a eficácia do tratamento combinado entre PDT e AAS nestas linhas celulares tumorais de adenocarcinoma colorretal e esofágico.

7.2 Discussão (*IN VIVO*)

Os modelos pré-clínicos de cancros humanos são indispensáveis na descoberta e no desenvolvimento de novas formulações anticancerígenas, apesar de não serem perfeitos dada a característica heterogeneidade genética e epigenética dos mesmos e a multiplicidade de vias de regulação afetadas (Peterson & Houghton, 2004; Ruggeri *et al.* 2014). Os modelos de xenotransplantes heterotópicos com implantação de linhas celulares tumorais em roedores geneticamente idênticos e imunocomprometidos permitem avaliar diversos parâmetros em termos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, bem como a eficácia anti-tumoral e a tolerabilidade de novas abordagens terapêuticas, de modo simples, reproduzível e de baixo custo, com a obtenção de dados biológicos importantes com possível translação clínica (Peterson & Houghton, 2004; Ruggeri *et al.* 2014)

De forma a complementar os resultados experimentais *in vitro* obtidos, procedeu-se ao desenvolvimento de um modelo *in vivo* de xenotransplante heterotópico de cancro colorretal com base na linha celular tumoral WiDr, cuja utilização já demonstrou resultados promissores para avaliação da terapia fotodinâmica baseada no fotossensibilizador BBr2HPC (Laranjo, 2014). Este modelo animal de xenotransplante heterotópico de cancro colorretal com base na linha celular tumoral WiDr, já otimizado para efeitos de boa reprodutibilidade, consistiu na injeção subcutânea de 10^7 células na região dorsal de ratinhos atímicos Balb/c nu/nu. Os animais incluídos nos grupos em estudo foram sujeitos a administração diária de 200 mg/kg de AAS por injeção intraperitoneal, administração de 0,5mg/kg do fotossensibilizador BBr2HPC por

injeção intraperitoneal, com irradiação após 24 horas ou ambos os tratamentos, de acordo com o descrito nos Materiais e Métodos.

Nos resultados obtidos *in vivo*, verificou-se ausência de toxicidade para os animais em estudo, uma vez que não houve registo de mortes causadas pela administração de qualquer uma das modalidades de tratamento *per se* ou em combinação. Em relação ao peso, durante a monitorização dos animais, não se registaram variações que ponham em causa o tratamento (dados não apresentados). Em relação ao volume tumoral verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa, em comparação com os xenotransplantes controlo, nos animais tratados com o fotossensibilizador BBr2HPC *per se*, apesar de no final dos 12 dias de tratamento, os ratinhos do grupo com administração de AAS e com administração combinada, possuírem um volume tumoral relativo tendencialmente inferior a estes. No caso dos ratinhos de tratamento combinado, o volume tumoral relativo foi inferior ao dos tratados apenas com BBr2HPC, pelo que o pequeno número de animais incluídos neste grupo pode ter influenciado a falta de significância estatística. Os efeitos anti-tumorais do AAS *in vivo* já foram verificados em diversos estudos como, por exemplo, por Hossain *et al.*, onde a administração diária de 100 mg/kg de AAS, durante um período de 21 dias, a ratinhos com xenotransplantes de cancro hepático com a linha HepG2, limitou o crescimento tumoral (Hossain *et al.* 2012). O mesmo se verificou para um estudo de Pathi *et al.*, com a administração diária de 200 mg/kg de AAS, durante 10 dias, a ratinhos com xenotransplantes de cancro colorretal da linha celular RKO (Pathi *et al.* 2012). Outros estudos em xenotransplantes de osteossarcoma (Liao *et al.* 2015) e de melanoma (Vad *et al.* 2014) também referem a eficácia anti-tumoral do AAS pelo que apesar de neste estudo não haver diferenças significativas, a administração de AAS, parece tender para diminuir o crescimento tumoral relativamente ao controlo.

Quanto à terapia combinada entre PDT e AAS, faltam estudos *in vivo* para corroborar os resultados obtidos. Contudo, comparando estes resultados com os obtidos *in vivo* com terapias combinadas entre PDT e inibidores das COX verifica-se que os resultados são semelhantes. Um estudo de Makowski *et al.* refere a eficácia anti-tumoral da combinação entre PDT e inibidores das COX-2 num modelo murino de cancro colorretal baseado na linha celular C-26, com a administração dos inibidores das COX-2 a potenciar a atividade anti-tumoral após a administração de Photofrin® (Makowski *et al.* 2003). Outro estudo com terapia combinada entre PDT e inibidores das COX-2, realizado por Ferrario *et al.*, com modelos murinos baseados na linha celular de fibrossarcoma radioresistente RIF demonstrou, igualmente, eficácia na redução do crescimento tumoral (Ferrario *et al.* 2002). Com base nestas evidências, e sendo o AAS também um inibidor das COX, os resultados por nós obtidos parecem ser promissores. A modificação de alguns parâmetros experimentais poderá melhorar os resultados obtidos. Pode ser interessante por exemplo um maior tempo de monitorização experimental dos ratinhos com adição de AAS após a PDT, pois nos estudos referidos (Ferrario *et al.* 2002; Makowski *et al.* 2003) o tempo experimental foi consideravelmente maior, havendo diferenças significativas entre as condições em estudo.

No final dos 12 dias de monitorização, os animais foram occisados e os xenotransplantes retirados para a realização de estudos de histopatologia. A análise histológica foi realizada com recurso à coloração com H&E. Os resultados obtidos pela análise histológica confirmaram a presença de necrose. Nos xenotransplantes do grupo de controlo a presença de células necróticas deveu-se certamente à incapacidade de a neoangiogénese conseguir acompanhar o crescimento tumoral, havendo a formação de zonas hipóxicas, que são características deste

tipo de tumores de alto grau com baixa diferenciação. Relativamente, aos xenotransplantes sujeitos a tratamento combinado verificou-se morte celular por necrose isquémica, o que comprova que nesta situação a morte por necrose é devida ao tratamento em si e não às características intrínsecas da neoplasia. Este tipo de morte vem a confirmar que a adição do AAS em combinação com a PDT tem potencial na limitação do crescimento tumoral pela supressão de vasos sanguíneos. Contudo é necessária a realização de estudos que confirmem a expressão de VEGF para comprovar esta hipótese.

Nos xenotransplantes tratados analisados por histologia, verificou-se uma lesão expansiva de padrão sólido constituído por pequenas ilhas e por grandes maciços com áreas *minor* de padrão glandular, com a presença de células tumorais com intensa atividade mitótica e formas atípicas, pelo que isto é um indicador de que existem ainda células tumorais viáveis para o crescimento tumoral. Uma das razões para tal acontecer, está do facto de a fonte de luz utilizada para a irradiação dos animais, ser uma fibra ótica que dispersa a luz unidireccionalmente, o que determina zonas sub-iluminadas nos xenotransplantes que, por sua vez, levarão ao estímulo do crescimento tumoral. Uma distribuição homogénea da luz no xenotransplante evitaria essa ocorrência (Laranjo, 2014).

Nos xenotransplantes tratados também se verificou a presença de infiltrações linfoplasmocitárias na periferia dos mesmos, o que é característico da PDT (Dougherty *et al.* 1998; Castano *et al.* 2006), traduzindo-se numa possível resposta imunitária inata dos animais em estudo.

Os dados obtidos com os estudos *in vivo*, permitem-nos dizer que, apesar de haver um certo potencial na combinação entre PDT e o AAS, são necessários mais estudos para comprovar se esta associação terá um verdadeiro impacto clínico dos tratamentos já existentes para o tratamento dos cancros colorretal e esofágico.

CONCLUSÃO

8. Conclusão e perspectivas futuras

Depois de apresentados e discutidos os resultados obtidos no trabalho experimental que conduziu a esta tese, existem algumas conclusões a salientar, bem como perspetivar a continuação deste trabalho no futuro.

O fotossensibilizador BBr2HPC associado ao AAS diminui consideravelmente a atividade metabólica das células dos adenocarcinomas colorretal e esofágico, bem como a viabilidade celular, de forma dependente da concentração de PS. Nas linhas tumorais tratadas com a combinação entre a PDT e o AAS verificou-se a presença de tipos de morte celular distintos, com a morte por necrose a ser prevalente na linha celular de adenocarcinoma colorretal, enquanto na linha celular de adenocarcinoma esofágico a morte por apoptose é a mais frequente. Esta divergência de tipos de morte predominantes, isto é, morte por apoptose e por necrose está na dependência de vários fatores, nomeadamente, a concentração do fotossensibilizador, o tipo celular e a presença de AAS. A combinação entre PDT e AAS também apresentou efeitos a nível da regulação de vários tipos de ROS, tanto as ROS características das reações fotodinâmicas do tipo II como do tipo I.

Os estudos *in vivo* mostraram que a combinação entre a PDT e o AAS tem potencial a nível anti-tumoral, contudo têm de ser feitos mais estudos para se perceber realmente se o AAS constitui uma mais valia como adjuvante na PDT.

Em termos de perspectivas futuras, seria interessante realizar-se a avaliação do possível efeito sinérgico da combinação PDT e AAS *in vitro* pelo método de Chou & Talalay. A existência de diferentes tipos de morte celular em ambas as linhas celulares levam a propor futuramente o estudo da expressão de diversas proteínas chave na regulação dos mesmos, como por exemplo, das proteínas caspases, do fator nuclear NF- κ B, entre outros. Adicionalmente seria interessante fazer um estudo das espécies reativas de nitrogénio, uma vez que alguns autores referem a promoção do AAS nessas vias de sinalização e o seu efeito na terapia fotodinâmica é ainda pouco conhecido.

Quanto aos estudos *in vivo*, futuramente propõe-se o aumento dos dias de monitorização dos animais e a administração de diferentes concentrações de PS e de AAS, de modo a se conseguir um conhecimento mais alargado dos efeitos desta combinação. Será também importante aumentar os estudos de histopatologia com diversos marcadores, como o Ki-67 para a avaliação da proliferação celular e o VEGF para avaliação da angiogénese.

BIBLIOGRAFIA

9.Referências Bibliográficas

Abrantes, A.M. Hipoxia tumoral - metabonómica e imagem. Universidade de Coimbra (2013).

Acedo, P. & Zawacka-Pankau, J. p53 family members - important messengers in cell death signaling in photodynamic therapy of cancer? *Photochemical & Photobiological Sciences* **14**, 1390-1396, doi:10.1039/c5pp00251f (2015).

Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. & Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* **74**, 656-669, doi:10.1562/0031-8655 (2001).

Adachi, M. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. *Histology and Histopathology* **22**, 437-442 (2007).

Agostinis, P. *et al.* Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* **61**, 250-281, doi:10.3322/caac.20114 (2011).

Ahmed, D. *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* **2**, doi:10.1038/oncsis.2013.35 (2013).

Alexiades-Armenakas, M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clinics in Dermatology* **24**, 16-25, doi:10.1016/j.clindermatol.2005.10.027 (2006).

Alfonso, L., Ai, G., Spitale, R. C. & Bhat, G. J. Molecular targets of aspirin and cancer prevention. *British Journal of Cancer* **111**, 61-67, doi:10.1038/bjc.2014.271 (2014).

Allison, R. R. & Moghissi, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **10**, 331-341, doi:10.1016/j.pdpdt.2013.03.011 (2013).

Allison, R. R. & Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical endoscopy* **46**, 24-29, doi:10.5946/ce.2013.46.1.24 (2013).

Allison, R. R. & Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **7**, 61-75, doi:10.1016/j.pdpdt.2010.02.001 (2010).

Almeida, R. D., Manadas, B. J., Carvalho, A. P. & Duarte, C. B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1704**, 59-86, doi:10.1016/j.bbcan.2004.05.003 (2004).

Arnold, M., Soerjomataram, I., Ferlay, J. & Forman, D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut* **64**, 381-387, doi:10.1136/gutjnl-2014-308124 (2015).

Awuah, S. G. & You, Y. Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy. *Rsc Advances* **2**, 11169-11183, doi:10.1039/c2ra21404k (2012).

Bancirova, M. Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and Cypridina luciferin analogues. *Luminescence* **26**, 685-688, doi:10.1002/bio.1296 (2011).

Barr, H., Krasner, N., Boulos, P. B., Chatlani, P. & Bown, S. G. PHOTODYNAMIC THERAPY FOR COLORECTAL-CANCER - A QUANTITATIVE PILOT-STUDY. *British Journal of Surgery* **77**, 93-96, doi:10.1002/bjs.1800770132 (1990).

Berg, K., Golab, J., Korbelik, M. & Russell, D. Drug delivery technologies and immunological aspects of photodynamic therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences* **10**, 647-648, doi:10.1039/c1pp90010b (2011).

Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review, Vol 11* **11**, 127-152, doi:10.1016/s1387-2656(05)11004-7 (2005).

Boucher, D. in *Annual Congress of the International-Academy-Laser-Medicine-and-Surgery (Laser Florence)*. 73-86 (2011).

Brackett, C. M. & Gollnick, S. O. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochemical & Photobiological Sciences* **10**, 649-652, doi:10.1039/c0pp00354a (2011).

Braga, M. Terapia Fotodinâmica em Associação com o Ácido Ascórbico. Universidade de Coimbra (2012).

Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. & Forman, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncology* **13**, 790-801, doi:10.1016/s1470-2045(12)70211-5 (2012).

Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T. M., Hamblin, M. R. & Heger, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer and Metastasis Reviews* **34**, 643-690, doi:10.1007/s10555-015-9588-7 (2015).

Brown, S. B., Brown, E. A. & Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology* **5**, 497-508, doi:10.1016/s1470-2045(04)01529-3 (2004).

Bruno, A., Dovizio, M., Tacconelli, S. & Patrignani, P. Mechanisms of the antitumoural effects of aspirin in the gastrointestinal tract. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **26**, e1-e13, doi:10.1016/j.bpg.2012.10.001 (2012).

Buldak, R. J., Buldak, L., Kukla, M., Gabriel, A. & Zwirska-Korczala, K. SIGNIFICANCE OF SELECTED ANTIOXIDANT ENZYMES IN CANCER CELL PROGRESSION. *Polish Journal of Pathology* **65**, 167-175, doi:10.5114/pjp.2014.45779 (2014).

Burnat, G., Majka, J. & Konturek, P. C. BILE ACIDS ARE MULTIFUNCTIONAL MODULATORS OF THE BARRETT'S CARCINOGENESIS. *Journal of Physiology and Pharmacology* **61**, 185-192 (2010).

Campbell, N. P. & Villaflor, V. M. Neoadjuvant treatment of esophageal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 3793-3803, doi:10.3748/wjg.v16.i30.3793 (2010).

Cardoso, S. M., Santos, S., Swerdlow, R. H. & Oliveira, C. R. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *Faseb Journal* **15**, 1439+, doi:10.1096/fj.00-0561fje (2001).

Castano, A. P., Mroz, P. & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer* **6**, 535-545, doi:10.1038/nrc1894 (2006).

Celli, J. P. *et al.* Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. *Chemical Reviews* **110**, 2795-2838, doi:10.1021/cr900300p (2010).

Chan, A. T. *et al.* Aspirin in the Chemoprevention of Colorectal Neoplasia: An Overview. *Cancer Prevention Research* **5**, 164-178, doi:10.1158/1940-6207.capr-11-0391 (2012).

Chou, T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research* **70**, 440-446, doi:10.1158/0008-5472.can-09-1947 (2010).

Choudhary, S., Nouri, K. & Elsaie, M. L. Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers in Medical Science* **24**, 971-980, doi:10.1007/s10103-009-0716-x (2009).

Choy, H. & Milas, L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: A rational advance? *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 1440-1452, doi:10.1093/jnci/djg058 (2003).

Collier, A. C. & Pritsos, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochemical Pharmacology* **66**, 281-287, doi:10.1016/s0006-2952(03)00240-5 (2003).

Corti, L. *et al.* Outcome of patients receiving photodynamic therapy for early esophageal cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **47**, 419-424, doi:10.1016/s0360-3016(00)00450-8 (2000).

Dagrosa, M. A. *et al.* Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **57**, 1084-1092, doi:10.1016/s0360-3016(03)00778-8 (2003).

Datki, Z. *et al.* Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin* **62**, 223-229, doi:10.1016/j.brainresbull.2003.09.011 (2003).

Davey, H. M. & Kell, D. B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: The importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews* **60**, 641-& (1996).

Debefve, E., Pegaz, B., Ballini, J. P., Konan, Y. N. & van den Bergh, H. Combination therapy using aspirin-enhanced photodynamic selective drug delivery. *Vascular Pharmacology* **46**, 171-180, doi:10.1016/j.vph.2006.09.006 (2007).

DeMeester, S. R. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: A review of the disease and its treatment. *Annals of Surgical Oncology* **13**, 12-30, doi:10.1245/aso.2005.12.025 (2006).

DeSantis, C. E. *et al.* Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* **64**, 252-271, doi:10.3322/caac.21235 (2014).

Dikalov, S., Griendling, K. K. & Harrison, D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**, 717-727, doi:10.1161/01.HYP.0000258594.87211.6b (2007).

Dikshit, P., Chatterjee, M., Goswami, A., Mishra, A. & Jana, N. R. Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 29228-29235, doi:10.1074/jbc.M602629200 (2006).

Din, F. V. N. *et al.* Aspirin Inhibits mTOR Signaling, Activates AMP-Activated Protein Kinase, and Induces Autophagy in Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* **142**, 1504-+, doi:10.1053/j.gastro.2012.02.050 (2012).

Din, F. V. N., Dunlop, M. G. & Stark, L. A. Evidence for colorectal cancer cell specificity of aspirin effects on NF kappa B signalling and apoptosis. *British Journal of Cancer* **91**, 381-388, doi:10.1038/sj.bjc.6601913 (2004).

Dolgachev, V. *et al.* A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **332**, 411-417, doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.141 (2005).

Dolmans, D., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* **3**, 380-387, doi:10.1038/nrc1071 (2003).

Dougherty, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 889-905, doi:10.1093/jnci/90.12.889 (1998).

Dovizio, M., Tacconelli, S., Sostres, C., Ricciotti, E. & Patrignani, P. Mechanistic and pharmacological issues of aspirin as an anticancer agent. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **5**, 1346-1371, doi:10.3390/ph5121346 (2012).

Dragomir, E. *et al.* Aspirin rectifies calcium homeostasis, decreases reactive oxygen species, and increases NO production in high glucose-exposed human endothelial cells. *Journal of Diabetes and Its Complications* **18**, 289-299, doi:10.1016/j.jdiacomp.2004.03.003 (2004).

Elwood, P. C., Gallagher, A. M., Duthie, G. G., Mur, L. A. J. & Morgan, G. Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet* **373**, 1301-1309, doi:10.1016/s0140-6736(09)60243-9 (2009).

Engel, E. *et al.* Light-induced decomposition of indocyanine green. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **49**, 1777-1783, doi:10.1167/iovs.07-0911 (2008).

Eruslanov, E. & Kusmartsev, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **594**, 57-72, doi:10.1007/978-1-60761-411-1_4 (2010).

Eslick, G. D. Epidemiology of Esophageal Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* **38**, 17-+, doi:10.1016/j.gtc.2009.01.008 (2009).

Fakih, M. G. Metastatic Colorectal Cancer: Current State and Future Directions. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 1809-+, doi:10.1200/jco.2014.59.7633 (2015).

Falk, G. W. Risk Factors for Esophageal Cancer Development. *Surgical Oncology Clinics of North America* **18**, 469-+, doi:10.1016/j.soc.2009.03.005 (2009).

Fernando, J. & Jones, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery - Oxford International Edition* **33**, 131 – 135, doi: 10.1016/j.mpsur.2015.01.005 (2015).

Ferrario, A., von Tiehl, K., Wong, S., Luna, M. & Gomer, C. J. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Research* **62**, 3956-3961 (2002).

Firczuk, M. *et al.* Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **16**, 208-224, doi:10.2741/3684 (2011).

Fisher, A. M. R., Rucker, N., Wong, S. & Gomer, C. J. Differential photosensitivity in wild-type and mutant p53 human colon carcinoma cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **42**, 104-107, doi:10.1016/s1011-1344(97)00130-9 (1998).

Franca, K. *et al.* Lasers for cutaneous congenital vascular lesions: a comprehensive overview and update. *Lasers in Medical Science* **28**, 1197-1204, doi:10.1007/s10103-012-1220-2 (2013).

Fuster, V. & Sweeny, J. M. Aspirin A Historical and Contemporary Therapeutic Overview. *Circulation* **123**, 768-778, doi:10.1161/circulationaha.110.963843 (2011).

Gaglia, M. A., Jr. & Clavijo, L. Cardiovascular Pharmacology Core Reviews: Aspirin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* **18**, 505-513, doi:10.1177/1074248413503043 (2013).

Gallagher-Colombo, S. M., Maas, A. L., Yuan, M. & Busch, T. M. Photodynamic Therapy-Induced Angiogenic Signaling: Consequences and Solutions to Improve Therapeutic Response. *Israel Journal of Chemistry* **52**, 681-690, doi:10.1002/ijch.201200011 (2012).

Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J. & Agostinis, P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis* **15**, 1050-1071, doi:10.1007/s10495-010-0479-7 (2010).

Golstein, P. & Kroemer, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 37-43, doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001 (2007).

Graham, A. J. *et al.* Defining the optimal treatment of locally advanced esophageal cancer: A systematic review and decision analysis. *Annals of Thoracic Surgery* **83**, 1257-1264, doi:10.1016/j.athoracsur.2006.11.061 (2007).

Greene FL, Balch CM, Fleming ID, et al., eds. AJCC cancer staging handbook. 6th ed. New York: Springer, (2002).

Gulbake, A., Jain, A., Jain, A., Jain, A. & Jain, S. K. Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **22**, 582-599, doi:10.3748/wjg.v22.i2.582 (2016).

Haggar, F. A. & Boushey, R. P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery* **22**, 191-197, doi:10.1055/s-0029-1242458 (2009).

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. & Bullock, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro* **18**, 703-710, doi:10.1016/j.tiv.2004.03.012 (2004).

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9 (2000).

Haywood-Small, S. L., Vernon, D. I., Griffiths, J., Schofield, J. & Brown, S. B. Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G(0)/G(1) cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **339**, 569-576, doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.046 (2006).

Hedley, D. W. & Chow, S. EVALUATION OF METHODS FOR MEASURING CELLULAR GLUTATHIONE CONTENT USING FLOW-CYTOMETRY. *Cytometry* **15**, 349-358, doi:10.1002/cyto.990150411 (1994).

Heitjan, D. F., Manni, A. & Santen, R. J. STATISTICAL-ANALYSIS OF IN-VIVO TUMOR-GROWTH EXPERIMENTS. *Cancer Research* **53**, 6042-6050 (1993).

Hendrickx, N. *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 52231-52239, doi:10.1074/jbc.M307591200 (2003).

Holmes, R. S. & Vaughan, T. L. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Seminars in Radiation Oncology* **17**, 2-9, doi:10.1016/j.semradonc.2006.09.003 (2007).

Honigsmann, H. History of phototherapy in dermatology. *Photochemical & Photobiological Sciences* **12**, 16-21, doi:10.1039/c2pp25120e (2013).

Hossain, M. A. *et al.* Aspirin induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells in a nude mouse xenograft model. *International Journal of Oncology* **40**, 1298-1304, doi:10.3892/ijo.2011.1304 (2012).

Hou, W. *et al.* Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death & Disease* **4**, doi:10.1038/cddis.2013.493 (2013).

Huettner, C. S., Zhang, P., Van Etten, R. A. & Tenen, D. G. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nature Genetics* **24**, 57-60 (2000).

Husain, S. S., Szabo, I. L. & Tarnawski, A. S. NSAID inhibition of GI cancer growth: Clinical implications and molecular mechanisms of action. *American Journal of Gastroenterology* **97**, 542-553 (2002).

Husain, S. S., Szabo, I. L. & Tarnawski, A. S. NSAID inhibition of GI cancer growth: Clinical implications and molecular mechanisms of action. *American Journal of Gastroenterology* **97**, 542-553 (2002).

Huxley, R. R. *et al.* The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer* **125**, 171-180, doi:10.1002/ijc.24343 (2009).

Ji, H. T., Chien, L. T., Lin, Y. H., Chien, H. F. & Chen, C. T. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. *Molecular Cancer* **9**, doi:10.1186/1476-4598-9-91 (2010).

Jiang, Z., Shao, J. W., Yang, T. T., Wang, J. & Jia, L. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **87**, 98-104, doi:10.1016/j.jpba.2013.05.014 (2014).

Josefsen, L. B. & Boyle, R. W. Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics. *Theranostics* **2**, 916-966, doi:10.7150/thno.4571 (2012).

Juzeniene, A., Peng, Q. & Moana, J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences* **6**, 1234-1245, doi:10.1039/b705461k (2007).

Kashtan, H., Haddad, R., Yossiphov, Y., BarOn, S. & Skornick, Y. Photodynamic therapy of colorectal cancer using a new light source - From in vitro studies to a patient treatment. *Diseases of the Colon & Rectum* **39**, 379-383, doi:10.1007/bf02054050 (1996).

Kawczyk-Krupka, A. *et al.* Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: The state of the art in clinical trials. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **12**, 545-553, doi:10.1016/j.pdpdt.2015.04.004 (2015).

Keepers, Y. P. *et al.* COMPARISON OF THE SULFORHODAMINE-B PROTEIN AND TETRAZOLIUM (MTT) ASSAYS FOR INVITRO CHEMOSENSITIVITY TESTING. *European Journal of Cancer* **27**, 897-900, doi:10.1016/0277-5379(91)90142-z (1991).

Kessel, D. & Reiners, J. J., Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 1024-1028, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x (2007).

Kessel, D. Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **8**, 1009-1014 (2004).

Kessel, D. More Adventures in Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 15188-15193, doi:10.3390/ijms160715188 (2015).

Khaidakov, M., Szwedko, J., Mitra, S. & Mehta, J. L. Angiostatic Effects of Aspirin in Hypoxia-Reoxygenation Are Linked to Modulation of TGF beta 1 Signaling. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* **16**, 105-110, doi:10.1177/1074248410378505 (2011).

Kim, S. *et al.* PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research* **44**, D1202-D1213, doi:10.1093/nar/gkv951 (2016).

Komagoe, K., Takeuchi, H., Inoue, T. & Katsu, T. Application of an Oxygen Electrode to Evaluate Superoxide Anion-scavenging Ability. *Analytical Sciences* **26**, 903-906 (2010).

Kousis, P. C., Henderson, B. W., Maier, P. G. & Gollnick, S. O. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by Neutrophils. *Cancer Research* **67**, 10501-10510, doi:10.1158/0008-5472.can-07-1778 (2007).

Laranjo, M. Acção intracelular da terapia fotodinâmica. Universidade de Coimbra (2010).

Laranjo, M. *et al.* 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: Photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **10**, 51-61, doi:10.1016/j.pdpdt.2012.05.003 (2013).

Laranjo, M. *Fotossensibilizadores para Terapia e Imagem em Oncologia*. Universidade de Coimbra. (2014).

Law, B. K. *et al.* Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70(s6k) and down-regulation of c-Myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 38261-38267, doi:10.1074/jbc.M005545200 (2000).

Layke, J. C. & Lopez, P. P. Esophageal cancer: A review and update. *American Family Physician* **73**, 2187-2194 (2006).

Li, M. *et al.* Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: A potential for chemoprevention. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **9**, 545-549 (2000).

Liao, D. *et al.* Aspirin Suppresses the Growth and Metastasis of Osteosarcoma through the NF-kappa B Pathway. *Clinical Cancer Research* **21**, 5349-5359, doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-0198 (2015).

Linke, S. P., Clarkin, K. C., DiLeonardo, A., Tsou, A. & Wahl, G. M. A reversible, p53-dependent G(0)/G(1) cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & Development* **10**, 934-947, doi:10.1101/gad.10.8.934 (1996).

Liu, L., Zhang, Z. & Xing, D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radical Biology and Medicine* **51**, 53-68, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.042 (2011).

Lo, K., Brinkman, R. R. & Gottardo, R. Automated Gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. *Cytometry Part A* **73A**, 321-332, doi:10.1002/cyto.a.20531 (2008).

Lu, M. *et al.* Aspirin sensitizes cancer cells to TRAIL-Induced apoptosis by reducing survivin levels. *Clinical Cancer Research* **14**, 3168-3176, doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-4362 (2008).

Luciani, M. G., Campregher, C. & Gasche, C. Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G(1) arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM. *Carcinogenesis* **28**, 2207-2217, doi:10.1093/carcin/bgm101 (2007).

Lucky, S. S., Soo, K. C. & Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews* **115**, 1990-2042, doi:10.1021/cr5004198 (2015).

Luksiene, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* **39**, 1137-1150 (2003).

Luna, M., Wong, S., Ferrariol, A. & Gomer, C. J. Cyclooxygenase-2 expression induced by Photofrin photodynamic therapy involves the p38 MAPK pathway. *Photochemistry and Photobiology* **84**, 509-514, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00299.x (2008).

Maharaj, H., Maharaj, D. S. & Daya, S. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against oxidative neurotoxicity. *Metabolic Brain Disease* **21**, 189-199, doi:10.1007/s11011-006-9012-7 (2006).

Maier, A. *et al.* Palliation of advanced esophageal carcinoma by photodynamic therapy and irradiation. *Annals of Thoracic Surgery* **69**, 1006-1009, doi:10.1016/s0003-4975(99)01440-x (2000).

Malina, L. *et al.* The in vitro cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy. *Toxicology in Vitro* **34**, 246-256 (2016).

Mao, W.-M., Zheng, W.-H. & Ling, Z.-Q. Epidemiologic Risk Factors for Esophageal Cancer Development. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **12**, 2461-2466 (2011).

Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* **361**, 2449-2460, doi:10.1056/NEJMra0804588 (2009).

Mayer, R. J., Venook, A. P. & Schilsky, R. L. Progress Against GI Cancer During the American Society of Clinical Oncology's First 50 Years. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 1521-1530, doi:10.1200/jco.2014.55.4121 (2014).

McHale, A. P. & McHale, L. USE OF A TETRAZOLIUM BASED COLORIMETRIC ASSAY IN ASSESSING PHOTORADIATION THERAPY INVITRO. *Cancer Letters* **41**, 315-321, doi:10.1016/0304-3835(88)90293-5 (1988).

Mendelsohn, J. Personalizing Oncology: Perspectives and Prospects. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 1904-1911, doi:10.1200/jco.2012.45.3605 (2013).

Meyerhardt, J. A. & Mayer, R. J. Drug therapy - Systemic therapy for colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* **352**, 476-487, doi:10.1056/NEJMra040958 (2005).

Mikes, J. *et al.* Necrosis predominates in the cell death of human colon adenocarcinoma HT-29 cells treated under variable conditions of photodynamic therapy with hypericin. *Photochemical & Photobiological Sciences* **6**, 758-766, doi:10.1039/b700350a (2007).

Miki, Y., Akimoto, J., Moritake, K., Hironaka, C. & Fujiwara, Y. Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces concentration-dependent programmed necroptosis in human glioblastoma T98G cells. *Lasers in Medical Science* **30**, 1739-1745, doi:10.1007/s10103-015-1783-9 (2015).

Mitra, S. *et al.* Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 3268-3274, doi:10.1158/1535-7163.mct-06-0421 (2006).

Mroz, P., Hashmi, J. T., Huang, Y.-Y., Lang, N. & Hamblin, M. R. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Review of Clinical Immunology* **7**, 75-91, doi:10.1586/eci.10.81 (2011).

Muller, P. A. J. & Vousden, K. H. p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology* **15**, 2-8, doi:10.1038/ncb2641 (2013).

Nowak-Sliwinska P, Weiss A, Sickenberg M, Griffioen AW, van den Bergh H (2013) The Role of Photodynamic Therapy in Non-malignant and Malignant Eye Disorders. *J Anal Bioanal Tech* S1:007. doi: 10.4172/2155-9872.S1-007

Nowis, D. *et al.* Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica* **52**, 339-352 (2005).

Nunez, L. *et al.* Cell proliferation depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake: inhibition by salicylate. *Journal of Physiology-London* **571**, 57-73, doi:10.1113/jphysiol.2005.100586 (2006).

Obata, M. *et al.* In Vitro Heavy-Atom Effect of Palladium(II) and Platinum(II) Complexes of Pyrrolidine-Fused Chlorin in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**, 2747-2753, doi:10.1021/jm8015427 (2009).

O'Connor, A. E., Gallagher, W. M. & Byrne, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* **85**, 1053-1074, doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x (2009).

Ormond, A. B. & Freeman, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* **6**, 817-840, doi:10.3390/ma6030817 (2013).

Ouyang, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation* **45**, 487-498, doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x (2012).

Owadally, W. & Staffurth, J. Principles of cancer treatment by radiotherapy. Surgery - Oxford International Edition **33**, 127 – 130, doi: 10.1016/j.mpsur.2014.12.008 (2014).

Panzarini, E., Inguscio, V. & Dini, L. Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy. *Cell Death & Disease* **2**, doi:10.1038/cddis.2011.51 (2011).

Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A. & Kortsaris, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods* **208**, 151-158, doi:10.1016/s0022-1759(97)00137-3 (1997).

Pathi, S. *et al.* Aspirin Inhibits Colon Cancer Cell and Tumor Growth and Downregulates Specificity Protein (Sp) Transcription Factors. *Plos One* **7**, doi:10.1371/journal.pone.0048208 (2012).

Patrono, C. & Rocca, B. Aspirin: Promise and resistance in the new millennium. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **28**, S25-S32, doi:10.1161/atvbaha.107.160481 (2008).

Pauwels, B. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **51**, 221-226, doi:10.1007/s00280-002-0557-9 (2003).

Pech, O. *et al.* Long-term results of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for superficial Barrett's cancer and high-grade intraepithelial neoplasia. *Gastrointestinal Endoscopy* **62**, 24-30, doi:10.1016/s0016-5107(05)00333-0 (2005).

Perelman, A. *et al.* JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death & Disease* **3**, doi:10.1038/cddis.2012.171 (2012).

Pervaiz, S. & Olivo, M. Art and science of photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **33**, 551-556, doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04406.x (2006).

Peterson, J. K. & Houghton, P. J. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. *European Journal of Cancer* **40**, 837-844, doi:10.1016/j.ejca.2004.01.003 (2004).

Price, T. J. *et al.* Update on optimal treatment for metastatic colorectal cancer from the ACTG/AGITG expert meeting: ECCO 2015. *Expert Review of Anticancer Therapy* **16**, 557-571, doi:10.1586/14737140.2016.1170594 (2016).

Quiogue, G. *et al.* in *12th World Congress of the International-Photodynamic-Association (IPA) on Photodynamic Therapy - Back to the Future.* (2009).

Rana, P., Nadanaciva, S. & Will, Y. Mitochondrial membrane potential measurement of H9c2 cells grown in high-glucose and galactose-containing media does not provide additional predictivity towards mitochondrial assessment. *Toxicology in Vitro* **25**, 580-587, doi:10.1016/j.tiv.2010.11.016 (2011).

Raza, H. & John, A. Implications of Altered Glutathione Metabolism in Aspirin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells. *Plos One* **7**, doi:10.1371/journal.pone.0036325 (2012).

Raza, H., John, A. & Benedict, S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *European Journal of Pharmacology* **668**, 15-24, doi:10.1016/j.ejphar.2011.06.016 (2011).

Redlak, M. J., Power, J. J. & Miller, T. A. Role of mitochondria in aspirin-induced apoptosis in human gastric epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **289**, G731-G738, doi:10.1152/ajpgi.00150.2005 (2005).

Regula, J. *et al.* PHOTSENSITIZATION AND PHOTODYNAMIC THERAPY OF ESOPHAGEAL, DUODENAL, AND COLORECTAL TUMORS USING 5-AMINOLEVULINIC ACID-INDUCED PROTOPORPHYRIN-IX - A PILOT-STUDY. *Gut* **36**, 67-75, doi:10.1136/gut.36.1.67 (1995).

Riccardi, C. & Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* **1**, 1458-1461, doi:10.1038/nprot.2006.238 (2006).

Robertson, C. A., Evans, D. H. & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **96**, 1-8, doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001 (2009).

Ruggeri, B. A., Camp, F. & Miknyoczki, S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical Pharmacology* **87**, 150-161, doi:10.1016/j.bcp.2013.06.020 (2014).

Saczko, J. *et al.* Photooxidative action in cancer and normal cells induced by the use of Photofrin((R)) in photodynamic therapy. *Folia Biologica* **54**, 24-29 (2008).

Sahai, E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**, 87-96, doi:10.1016/j.gde.2004.12.002 (2005).

Sandell, J. L. & Zhu, T. C. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *Journal of Biophotonics* **4**, 773-787, doi:10.1002/jbio.201100062 (2011).

Sasnauskienė, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V. & Kirveliėne, V. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis* **14**, 276-286, doi:10.1007/s10495-008-0292-8 (2009).

Sclabas, G. M. *et al.* Nuclear factor kappa B activation is a potential target for preventing pancreatic carcinoma by aspirin. *Cancer* **103**, 2485-2490, doi:10.1002/cncr.21075 (2005).

Seckin, B., Sekmen, A. H. & Turkan, I. An Enhancing Effect of Exogenous Mannitol on the Antioxidant Enzyme Activities in Roots of Wheat Under Salt Stress. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 12-20, doi:10.1007/s00344-008-9068-1 (2009).

Senge, M. O. & Radomski, M. W. Platelets, photosensitizers, and PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **10**, 1-16, doi:10.1016/j.pdpdt.2012.08.004 (2013).

Sharma, S. K. *et al.* Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Israel Journal of Chemistry* **52**, 691-705, doi:10.1002/ijch.201100062 (2012).

Shishkova, N., Kuznetsova, O. & Berezov, T. Photodynamic therapy in gastroenterology. *Journal of gastrointestinal cancer* **44**, 251-259, doi:10.1007/s12029-013-9496-4 (2013).

Skupin-Mrugalska, P. *et al.* Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug Discovery Today* **18**, 776-784, doi:10.1016/j.drudis.2013.04.003 (2013).

Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L. & Diederich, M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International journal of cell biology* **2010**, 215158-215158, doi:10.1155/2010/215158 (2010).

Solban, N., Selbo, P. K., Sinha, A. K., Chang, S. K. & Hasan, T. Mechanistic investigation and implications of photodynamic therapy induction of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Research* **66**, 5633-5640, doi:10.1158/0008-5472.can-06-0604 (2006).

Spitz, G. A., Furtado, C. M., Sola-Penna, M. & Zancan, P. Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochemical Pharmacology* **77**, 46-53, doi:10.1016/j.bcp.2008.09.020 (2009).

Spring, B. Q., Rizvi, I., Xu, N. & Hasan, T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. *Photochemical & Photobiological Sciences* **14**, 1476-1491, doi:10.1039/c4pp00495g (2015).

Stahl, M., Budach, W., Meyer, H. J., Cervantes, A. & Grp, E. G. W. Esophageal cancer: Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **21**, v46-v49, doi:10.1093/annonc/mdq163 (2010).

Stark, L. A. *et al.* Aspirin activates the NF-kappa B signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis* **28**, 968-976, doi:10.1093/carcin/bgl220 (2007).

Sylvester, P. W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols* **716**, 157-168, doi:10.1007/978-1-61779-012-6_9 (2011).

Taber, S. W., Fingar, V. H., Coats, C. T. & Wieman, T. J. Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e(6) (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: A phase I clinical study. *Clinical Cancer Research* **4**, 2741-2746 (1998).

Tacelosky, D. M. *et al.* Calcium Phosphosilicate Nanoparticles for Imaging and Photodynamic Therapy of Cancer. *Discovery Medicine* **71**, 275-285 (2012).

Teixo, R. Terapia Fotodinâmica: Uma Abordagem no Retinoblastoma. Universidade de Coimbra (2013).

The website of the National Cancer Institute 2015, Acedido em 23 de maio de 2016. <http://www.cancer.gov>

Thun, M. J., Jacobs, E. J. & Patrono, C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nature Reviews Clinical Oncology* **9**, 259-267, doi:10.1038/nrclinonc.2011.199 (2012).

Tian, Y. Y. *et al.* Mitochondria-involved apoptosis induced by MPPa mediated photodynamic therapy. *Laser Physics Letters* **5**, 746-751, doi:10.1002/lapl.200810052 (2008).

Torre, L. A. *et al.* Global Cancer Statistics, 2012. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* **65**, 87-108, doi:10.3322/caac.21262 (2015).

Triantafillidis, J. K., Nasioulas, G. & Kosmidis, P. A. Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Risk Factors, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies. *Anticancer Research* **29**, 2727-2737 (2009).

Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M. & Stewart, F. A. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* **11**, 1034-1044, doi:10.1634/theoncologist.11-9-1034 (2006).

Tym, J. E. *et al.* canSAR: an updated cancer research and drug discovery knowledgebase. *Nucleic Acids Research* **44**, D938-D943, doi:10.1093/nar/gkv1030 (2016).

Ugurlucan, M. *et al.* Aspirin: from a historical perspective. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* **7**, 71-76 (2012).

Uzdensky, A. B. Signal transduction and photodynamic therapy. *Current Signal Transduction Therapy* **3**, 55-74, doi:10.2174/157436208783334277 (2008).

Vad, N. M., Kudugunti, S. K., Wang, H., Bhat, G. J. & Moridani, M. Y. Efficacy of acetylsalicylic acid (aspirin) in skin B16-F0 melanoma tumor-bearing C57BL/6 mice. *Tumor Biology* **35**, 4967-4976, doi:10.1007/s13277-014-1654-1 (2014).

Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuca, K. & Musilek, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology* **90**, 1-37, doi:10.1007/s00204-015-1579-5 (2016).

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D. & Grp, E. G. W. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **25**, 1-9, doi:10.1093/annonc/mdu260 (2014).

Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition* **731**, 237-245, doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20 (2011).

Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 134-146, doi:10.1038/nrm3737 (2014).

Vane, J. R. & Botting, R. M. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research* **110**, 255-258, doi:10.1016/s0049-3848(03)00379-7 (2003).

Vellonen, K. S., Honkakoski, P. & Urtti, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**, 181-188, doi:10.1016/j.ejps.2004.07.006 (2004).

Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* **243**, 167-190, doi:10.1016/s0022-1759(00)00233-7 (2000).

Vichai, V. & Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* **1**, 1112-1116, doi:10.1038/nprot.2006.179 (2006).

Wang, W., Moriyama, L. T. & Bagnato, V. S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. *Laser Physics Letters* **10**, doi:10.1088/1612-2011/10/2/023001 (2013).

Wang, Y., He, Q. Y., Sun, R. W. Y., Che, C. M. & Chiu, J. F. Gold(III) porphyrin 1a induced apoptosis by mitochondrial death pathways related to reactive oxygen species. *Cancer Research* **65**, 11553-11564, doi:10.1158/0008-5472.can-05-2867 (2005).

Watanabe, T. *et al.* Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology* **17**, 1-29, doi:10.1007/s10147-011-0315-2 (2012).

Wheeler, J. B. & Reed, C. E. Epidemiology of Esophageal Cancer. *Surgical Clinics of North America* **92**, 1077+, doi:10.1016/j.suc.2012.07.008 (2012).

Wilson, B. C. & Patterson, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology* **53**, R61-R109, doi:10.1088/0031-9155/53/9/r01 (2008).

Wolpin, B. M. & Mayer, R. J. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* **134**, 1296-1310, doi:10.1053/j.gastro.2008.02.098 (2008).

Wong, I. Y.-H. & Law, S. Surgery in the era of neoadjuvant therapy for cancer of the esophagus. *Esophagus* **13**, 105-109, doi:10.1007/s10388-016-0523-y (2016).

Xiang, S. *et al.* Aspirin inhibits ErbB2 to induce apoptosis in cervical cancer cells. *Medical Oncology* **27**, 379-387, doi:10.1007/s12032-009-9221-0 (2010).

Yano, T., Muto, M., Minashi, K., Ohtsu, A. & Yoshida, S. Photodynamic therapy as salvage treatment for local failures after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Gastrointestinal Endoscopy* **62**, 31-36, doi:10.1016/s0016-5107(05)00545-6 (2005).

Zawacka-Pankau, J., Krachulec, J., Grulkowski, I., Bielawski, K. P. & Selivanova, G. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: Recent advances. *Toxicology and Applied Pharmacology* **232**, 487-497, doi:10.1016/j.taap.2008.07.012 (2008).

Zhang, N. Z., Zhu, Y., Pan, W., Ma, W. Q. & Shao, A. L. Photodynamic therapy combined with local chemotherapy for the treatment of advanced esophagocardiac carcinoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **4**, 60-64, doi:10.1016/j.pdpdt.2006.12.002 (2007).

Zimmermann, K. C., Waterhouse, N. J., Goldstein, J. C., Schuler, M. & Green, D. R. Aspirin induces apoptosis through release of cytochrome c from mitochondria. *Neoplasia* **2**, 505-513, doi:10.1038/sj.neo.7900120 (2000).