



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Marcação radioativa e Biodistribuição de um Fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica

Pedro Miguel dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho
Co-orientador: Prof. Doutor Jorge Manuel Maia Pereira

Covilhã, Outubro de 2012

"Nem tudo o que pode ser contado conta, e nem tudo o que conta pode ser contado."

Albert Einstein

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, diretora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela oportunidade que me deu de realizar este projeto, pela orientação, críticas e conselhos na revisão do trabalho e constante profissionalismo demonstrado.

Ao Professor Doutor Jorge Manuel Maia Pereira, agradeço pela imensa disponibilidade e orientação prestada, pelos conselhos e críticas construtivas, assim como pela dedicação e simpatia demonstrada ao longo de todo o trabalho.

À Mestre Mafalda Laranjo, um exemplo de trabalho e dedicação, o meu sincero obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade e apoio que me ajudaram a ultrapassar os obstáculos existentes.

Ao Professor Doutor Arménio Serra, pelo apoio imprescindível na síntese do composto, por todo o apoio, disponibilidade e conselhos prestados ao longo deste ano de trabalho.

À Mestre Margarida Abrantes, agradeço pela cooperação nas mais variadas tarefas e pelas suas sugestões sempre pertinentes e valiosas.

Ao Mestre João Casalta, pela disponibilidade constante em me ajudar neste trabalho, pela valiosa e indispensável ajuda na análise estatística dos resultados deste projeto, pelo apoio, pelas palavras de incentivo e pela amizade.

Às Mestres Salomé Pires, Catarina Mamede, Sara, Ana Brito e Rita Gomes e ao Mestre Fernando Mendes pelo incentivo, pela disponibilidade permanente, pelos conselhos sábios, dando-me o exemplo de que é possível ultrapassar qualquer obstáculo.

Aos meus colegas Daniela, Marta, Patrícia, Liliana, Rita, Miguel, Vanessa, Mónica, Ricardo e Marcos o meu muito obrigado pela amizade, companheirismo, boa disposição e constantes palavras de apoio.

Por fim, não menos importante, agradeço à minha família pelo apoio que me deu, mas sobretudo agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram independentemente das minhas escolhas. A eles devo tudo o que alcancei.

Resumo

A terapia fotodinâmica constitui uma modalidade terapêutica promissora no combate ao cancro. Como os fotossensibilizadores exibem uma elevada seletividade para as células tumorais, vários têm sido marcados com radionuclídeos, uma vez que a marcação radioativa de fotossensibilizadores pode fornecer informações profícuas para a otimização de protocolos PDT, já que permite estudar a biodistribuição de uma forma não invasiva, identificar os órgãos-alvo e estudar a sua farmacocinética e as suas vias de excreção.

O objetivo principal deste trabalho consistiu na marcação radioativa do composto 2CPP com ^{99m}Tc e o desenvolvimento de um sistema de um controlo de qualidade da marcação radioativa para avaliar a sua pureza radioquímica.

Numa primeira fase do trabalho procedeu-se à otimização do processo de marcação do complexo ^{99m}Tc -2CPP. Após a otimização, realizaram-se estudos em *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* consistiram em estudos de captação do ^{99m}Tc -2CPP e do ^{99m}Tc -livre pelas linhas celulares adenocarcinoma colorretal (WiDr) e carcinoma pulmonar de não pequenas células (H1299) e estudos de citotoxicidade do 2CPP nas linhas celulares WiDr, H1299 e colangiocarcinoma (TFK-1). Os estudos *in vivo* consistiram em estudos de biodistribuição realizados em ratinhos balb/c normais e em ratinhos balb/c atímicos com xenotransplantes.

Foi desenvolvido um procedimento de marcação radioativa adequado e um controlo de qualidade preciso que permitiram alcançar um elevado grau de pureza radioquímica (>90%). Além disso, o complexo marcado apresentou uma elevada estabilidade temporal no soro sanguíneo humano. Os resultados dos estudos de captação mostraram que o ^{99m}Tc -2CPP apresenta uma captação máxima de aproximadamente 7 e 5 vezes superior à captação do ^{99m}Tc -livre pelas linhas WiDr e H1299, respetivamente. Os estudos de citotoxicidade revelaram que o composto 2CPP não tem efeito anti-proliferativo. Os estudos de biodistribuição mostraram que o ^{99m}Tc -2CPP foi excretado pela via urinária e pela via entero-hepatobiliar.

Assim, conclui-se que foi possível otimizar um procedimento de marcação e um de controlo de qualidade precisos para o complexo ^{99m}Tc -2CPP, obtendo-se um elevado grau de pureza radioquímica e uma elevada estabilidade temporal no soro sanguíneo. Conclui-se também que o composto 2CPP não apresenta efeito fototerapêutico e que o complexo ^{99m}Tc -2CPP não se apresenta como um possível agente de imagem para os tumores avaliados.

Palavras-chave

Terapia fotodinâmica, marcação radioativa, controlo de qualidade, medicina nuclear, estudos de biodistribuição

Abstract

Photodynamic therapy is a promising therapeutic strategy against cancer. As photosensitizers have an increased selectivity to tumour cells, several have been labelled with radionuclides. The radioactive labelling of photosensitizers can give rise to useful information for the optimization of PDT protocols, allowing non-invasive studies of biodistribution; the detection of target organs; as well as studies of pharmacokinetics and excretions pathways.

The main goal of the present work was to develop a protocol for the radioactive labelling of the compound 2CPP with ^{99m}Tc , as well as the development of a quality control system capable to evaluate the radioactive labelling and its radiochemical purity.

The first stage of the work comprised the optimization of the labelling process of the complex $^{99m}\text{Tc}2\text{CPP}$. Afterwards, *in vitro* and *in vivo* studies were carried out. The *in vitro* studies were performed to characterize the uptake of ^{99m}Tc -2CPP and ^{99m}Tc -free by colorectal adenocarcinoma cell lines (WiDr) and non-small cell lung cancer (H1299) and to study the cytotoxicity effect of 2CPP in WiDr, H1299 and cholangiocarcinoma (TFK-1) cells. The *in vivo* studies were developed to characterize the biodistribution of the labelled compounds and were carried out in balb/c mice and in athymic balb/c mice with xenografts.

The developed radioactive labelling and the quality control protocols, have shown to be quite accurate allowing to achieve a high radiochemical purity degree (>90%), moreover, the labelled complex showed a high stability in human blood serum over time. The ^{99m}Tc -2CPP complex presents a maximum uptake of approximately 7 and 5 times the uptake of ^{99m}Tc -free by the cell lines WiDR and H1299, respectively. The cytotoxicity studies revealed that the compound 2CPP does not have antiproliferative effect. The biodistribution studies showed that ^{99m}Tc -2CCP was excreted by the urinary tract and by *hepatobiliary excretion system*.

In summary, it was possible to accurately optimize a labelling and quality control protocols to the complex ^{99m}Tc -2CPP with a high radiochemical purity degree and high stability in blood serum over time. Finally, the results suggest that the compound 2CPP does not have phototherapeutic effect and the complex ^{99m}Tc -2CPP is not a plausible potential imaging agent for the studied tumours.

Keywords

Photodynamic therapy, radioactive labelling, quality control, nuclear medicine, biodistribution studies

Índice

Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1 Cancro	1
2 Terapia fotodinâmica	4
2.1 Princípio da PDT	5
2.2 Fotossensibilizadores	7
2.2.1 Fotossensibilizadores utilizados na prática clínica	9
2.2.1.1 Photofrin®	9
2.2.1.2 Foscan®	10
2.2.1.3 Ácido 5-aminolevulínico	11
2.2.1.4 Photochlor®	12
2.2.1.5 Laserphyrin®	12
2.2.1.6 Visudyne®	13
2.2.1.7 Purlytin™	13
2.2.1.8 Lutrin®	14
2.2.1.9 Tookad®	14
2.2.1.10 Photosens®	14
2.3 Seletividade Tumoral	15
2.4 Localização subcelular.....	15
2.5 Mecanismos de destruição tumoral induzidos por PDT	16
2.5.1 Destruição direta	16
2.5.1.1 Apoptose	17
2.5.1.2 Autofagia.....	18
2.5.1.3 Necrose.....	20
2.6 Efeitos vasculares	21
2.7 Resposta Imune	22

2.8	Luz	23
2.9	Oxigénio.....	24
2.10	Dosimetria	25
2.11	Vantagens e Limitações	26
3	Radiomarcção de fotossensibilizadores	27
Capítulo 2	31
Objetivos	31
Capítulo 3	33
Materiais e métodos	33
1.	Estudos de química.....	33
2.	Marcação de 2CPP com ^{99m} Tc.....	35
3.	Controlo de qualidade.....	35
4.	Estudos <i>in vitro</i>	38
4.1	Culturas Celulares	38
4.2	Estudos de Captação	39
4.3	Determinação da viabilidade celular.....	41
4.4	Estudos de citotoxicidade	41
4.4.1	Avaliação da Proliferação Celular pelo ensaio do MTT	41
5.	Estudos <i>in vivo</i>	43
5.1	Estudos de biodistribuição em animais normais.....	43
5.2	Biodistribuição em ratinhos com xenotransplantes.....	43
5.3	Imagiologia.....	44
6.	Estabilidade no soro sanguíneo humano	44
7.	Determinação do coeficiente de partição.....	44
8.	Análise estatística.....	45
Capítulo 4	47
Resultados	47
1.	Estudos de química.....	47
1.1	Síntese do 2CPP	47

2.	Marcação e controlo de qualidade do ^{99m}Tc -2CPP.....	49
3.	Estudos <i>in vitro</i>	55
3.1	Estudos de captação e determinação da viabilidade celular	55
3.2	Estudos de citotoxicidade	56
4.	Estudos <i>in vivo</i>	58
4.1	Estudos de biodistribuição em ratinhos normais	59
4.2	Estudos de biodistribuição em ratinhos com xenotransplantes.....	59
4.3	Imagiologia.....	62
5.	Coeficiente de partição octanol/água.....	62
Capítulo 5	63
Discussão	63
Capítulo 6	69
Conclusão e perspectivas futuras	69
Bibliografia	71

Lista de Figuras

Figura 1- Perfil de tratamento da PDT. Adaptado de Yano, S. et al ⁸	5
Figura 2- Mecanismos PDT: Indução de estados excitados e formação das ROS ⁸	7
Figura 3 - Estrutura química do Photofrin [®]	9
Figura 4 - Estrutura química do Foscan [®]	10
Figura 5 - Estrutura química do ALA.....	11
Figura 6 - Estrutura química do Photochlor.....	12
Figura 7 - Estrutura química do Laserphyrin [®]	12
Figura 8 - Estrutura do Visudyne [®]	13
Figura 9 - Estrutura química do Purlytin TM	13
Figura 10 - Estrutura química do Lutrin [®]	14
Figura 11 - Estrutura química do Tookad [®]	14
Figura 12 - Estrutura química do Photosens [®]	14
Figura 13- As duas principais vias convergem levando à ativação das caspases efetoras.....	18
Figura 14- Indução da autofagia por danos foto-oxidativos nos organelos intracelulares..	20
Figura 15- Esquema representativo do procedimento de síntese do 2CPP.....	37
Figura 16- Representação esquemática de uma tira de microcromatográfica ascendente.....	37
Figura 17- Esquema representativo das ROI's. A) Total e B) Base.....	37
Figura 18- Equipamento <i>LigandTracer</i> , utilizado para a realização de estudos de captação. .	39
Figura 19- Esquema representativo dos quatro quadrantes (L) da câmara de <i>neubauer</i> utilizados na determinação da viabilidade celular.....	42
Figura 20- Espectro do 3,4-di-(metoxicarbonilmetoxy) benzaldeído, obtido por RMN.....	47
Figura 21- Espectro da porfirina desprotegida obtido por RMN.....	48
Figura 22- Espectro do composto 2CPP obtido por RMN e MS.....	48
Figura 23- Efeito do pH na eficiência de marcação do ^{99m} Tc-2CPP. Controlo de qualidade inicial.....	50
Figura 24- Efeito da massa de cloreto estanhoso na eficiência de marcação do ^{99m} Tc-2CPP. .	50
Figura 25- Efeito da variação da temperatura de incubação na eficiência de marcação do ^{99m} Tc-2CPP. Controlo de qualidade inicial.....	51
Figura 26- Efeito do tempo na estabilidade do ^{99m} Tc-2CPP. Controlo de qualidade adaptado.....	52
Figura 27- Estabilidade do ^{99m} Tc-2CPP no soro sanguíneo humano.....	52
Figura 28- Efeito do tempo na eficiência de marcação (normal) e a estabilidade no soro sanguíneo humano do ^{99m} Tc-2CPP.....	53
Figura 29- Efeito do pH na eficiência de marcação do ^{99m} Tc-2CPP. Controlo de qualidade adaptado.....	53
Figura 30- Efeito da massa de cloreto estanhoso na eficiência de marcação do ^{99m} Tc-2CPP. Controlo de qualidade adaptado.....	54

Figura 31- Efeito da temperatura de incubação na eficiência de marcação de ^{99m}Tc -2CPP. Controle de qualidade adaptado.	54
Figura 32- Perfil de captação do ^{99m}Tc -2CPP pelas células WiDr, efetuado no <i>Ligand Tracer</i> e perfil de captação do ^{99m}Tc -livre na Linha WiDr, efetuado manualmente.	55
Figura 33- Perfil de captação do ^{99m}Tc -2CPP pelas células H1299, efetuado no <i>Ligand Tracer</i> e perfil de captação do ^{99m}Tc -livre na Linha H1299, efetuado manualmente.	56
Figura 34- Perfis dose-resposta das diferentes linhas celulares ao tratamento fotodinâmico com 2CPP para vários tempos. (A) Células WiDr, (B) células H1299, (C) células TFK-1.	57
Figura 35- Perfis dose-resposta das diferentes linhas celulares ao 2CPP sem ativação pela luz para vários tempos (A) Células WiDr, (B) células H1299, e (C) células TFK-1.	58
Figura 36- Biodistribuição em % atividade injetada/grama de tecido/fluido/órgão do complexo ^{99m}Tc -2CPP em ratinhos <i>Balb/c</i> normais.	59
Figura 37- Biodistribuição em % atividade injetada/grama de tecido/fluido/órgão do complexo ^{99m}Tc -2CPP em ratinhos <i>Balb/c nu/nu</i> com xenotransplantes da linha celular WiDr.	60
Figura 38- Biodistribuição em % atividade injetada/grama de tecido/fluido/órgão do complexo ^{99m}Tc -2CPP em ratinhos <i>Balb/c nu/nu</i> com xenotransplantes da linha celular H1299.	60
Figura 39- Razão tumor/músculo.	61
Figura 40- Imagens estáticas do ^{99m}Tc -2CPP adquiridas com a câmara-gama de em ratinhos com tumor. As imagens A, B, C e D foram obtidas aos 30, 90, 180 e 270 min, respetivamente, após a administração do radiofármaco.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 Valores dos R_f 's para o $^{99m}\text{Tc}04 -$, $^{99m}\text{Tc-R/H}$ e $^{99m}\text{Tc-2CPP}$ determinados por microcromatografia de camada fina.	36
Tabela 2 - Intervalos de confiança a 95% da razão tumor/músculo obtidos em ratinhos com xenotransplantes da linha WiDr e H1299 para os diferentes tempos de biodistribuição.	61

Lista de Acrónimos

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
2CPP	meso-bis[3,4-bis(carboximetileoni)fenil porpirina]
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
AJCCS	<i>American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting</i>
AP-1	Do inglês, <i>ativador protein</i>
Apaf-1a	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Atg	Do inglês, <i>family of autophagy-related genes</i>
ATP	Do inglês, Adenosine triphosphate
bcl-2	B-cell leukaemia/lymphoma
λ	Comprimento de onda
CPM	Contagens por minuto
DCs	Do inglês, Dendritic cells
DISC	Do Inglês, <i>death-induced signaling complex</i>
DMEM	DulBecco's Modified Eagle's Medium
DMRI	Degenerativa macular relacionada com a idade
DNA	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	<i>German collection of microorganisms and cell cultures</i>
DTPA	<i>Diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetrAcetic acid</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HDL	Do inglês, <i>High density lipoprotein</i>
HIF	Do inglês, <i>hypoxia-inducible factor</i>
HpD	Do inglês, <i>hematophorin derivative</i>
IC	Do inglês, <i>internal conversion</i>)
ISC	Do inglês, <i>crossing intersistem</i>
ITLC-SG	<i>Instant Thin Layer Cromatography Sílica Gel</i>
K_2CO_3	Carbonato de potássio
L	Litro
LDL	Do inglês, Low density lipoprotein
MBq	Megabecquerel
mL	Mililitros
mTHPC	meta-tetrahidroxifenilclorina
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolim bormide)
NaCl	Cloreto de Sódio
NF- κ B	Do inglês, <i>nuclear factor kappa B</i>
Nm	Nanómetros
$\text{O}_2^{\cdot\cdot}$	Anião superóxido
OH^{\cdot}	Radical hidroxilo
P	Coeficiente de partição

PBS	Do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
Pc	Do inglês, <i>phthalocyanines</i>
PDT	Do Inglês, <i>Photodynamic Therapy</i>
PET	Do inglês, <i>positron emission tomography</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
Rf	Fator de retenção
RIP1	Receptor interacting protein 1
ROI's	Do inglês, <i>regions of interest</i>
ROS	Do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
rpm	Rotações por minutos
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S0	Estado fundamental
S1	Primeiro estado excitado singleto
Sn	Estado excitado singleto
Sn'	Sub-níveis vibracionais
SnCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto estanhoso dihidratado
SPECT	Do ingles, <i>single photon emission computerized tomography</i>
T1	Estado excitado tripleto
T3,4BCPC	<i>5,10,15,20-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleoxyl)]chorin</i>
TA	Temperatura ambiente
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UICC	<i>Union for International Control Cancer</i>
VEGF	Do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>

Capítulo 1

Introdução

1 Cancro

O cancro é uma doença que se caracteriza por um crescimento anormal de células que provoca um desequilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular, evoluindo para uma população de células que podem invadir tecidos e metastizar à distância levando a uma morbilidade considerável que, se não tratada, pode levar à morte do hospedeiro¹.

Cerca de 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por cancro foram estimadas no mundo em 2008, sendo que 56% dos casos e 64% das mortes ocorreram nos países em desenvolvimento. O cancro da mama nas mulheres é o mais diagnosticado e que provoca maior número de mortes, tanto nos países desenvolvidos como nos países em vias de desenvolvimento. Por outro lado, nos homens, o cancro do pulmão é o mais diagnosticado em ambos os grupos de países, mas em termos de mortalidade só nos países em desenvolvimento é que provoca maior número de mortes, porque nos países desenvolvidos este é, habitualmente, precedido pelo cancro da próstata. A seguir a estes, os cancros mais comuns são os cancros do estômago e do fígado nos homens e os cancros do colo do útero e do pulmão nas mulheres, isto nos países em vias de desenvolvimento. Já nos países desenvolvidos, são seguidos pelos cancros do pulmão e colorretal nas mulheres e o cancro colorretal e o cancro do pulmão ou próstata nos homens².

A taxa de incidência de todos os tipos de cancro nos países desenvolvidos é aproximadamente duas vezes superior à dos países em vias de desenvolvimento, porém, a taxa de mortalidade global não é muito superior. Esta discrepância de valores entre a taxa de incidência e de mortalidade nos dois grupos de países, para um determinado cancro, deve-se às diferenças regionais na prevalência e distribuição dos fatores de risco, práticas de diagnóstico, e/ou disponibilidade e utilização dos serviços de tratamento².

O cancro é uma família complexa de doenças, sendo um processo complexo que evolui por *multi-steps*. Do ponto de vista clínico, é um largo grupo de doenças, que varia na idade de aparecimento, taxa de crescimento, estado de diferenciação celular, detetabilidade, grau de invasão, potencial de metastização, resposta ao tratamento, e prognóstico. Do ponto de vista molecular e biológico, o cancro pode ser um número relativamente pequeno de doenças causadas por defeitos moleculares similares nas funções celulares, resultantes de tipos de alterações comuns. E, por último, o cancro é uma doença de expressão de genes anómalos,

Introdução

sendo que existem inúmeros mecanismos pelos quais ocorrem estas alterações de genes. Estes podem ocorrer por via direta, danos ocorridos no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), como por exemplo, mutações de genes, translocações, amplificações, deleções, perda de heterozigotia, ou por mecanismos resultantes de uma transcrição ou translação anómala. O resultado final é um desequilíbrio entre a replicação e a morte celular numa população de células tumorais que induzem o crescimento do tecido tumoral. Já nos tecidos normais, há um equilíbrio entre a replicação celular e a morte celular¹.

Os tumores assemelham-se aos tecidos normais pelo menos nas fases iniciais do seu crescimento e desenvolvimento. Podem desenvolver-se em qualquer tipo de tecido ou órgão que contenha células capazes de se dividirem. Ainda que possam crescer rápida ou lentamente, a sua taxa de crescimento, geralmente, excede a dos tecidos normais adjacentes¹.

Os cancros dividem-se em benignos e malignos. A capacidade para distinguir ambos é crucial na determinação da escolha do tratamento mais adequado, bem como do prognóstico. Há características que diferem entre eles; os tumores malignos invadem e destroem os tecidos normais adjacentes, enquanto os tumores benignos são, normalmente, encapsulados não invadindo os tecidos adjacentes. Contudo, os tumores benignos podem crescer de tal modo que podem começar a exercer pressão nos nervos ou vasos sanguíneos, ou podem segregar substâncias ativas, como por exemplo hormonas, que podem, eventualmente, alterar os mecanismos de homeostase normal. Os tumores malignos metastizam através dos vasos linfáticos ou sanguíneos para gânglios linfáticos ou outros tecidos ou órgãos. Por sua vez, os tumores benignos permanecem localizados e não metastizam. As células tumorais malignas tendem a ser anaplásticas, ou menos diferenciadas do que as células normais do tecido do qual têm origem. Já as células dos tumores benignos parecem-se mais com as células dos tecidos normais do que com as células dos tumorais malignos^{1,3}.

Os cancros podem ser classificados segundo a sua origem. O termo *carcinoma* usa-se quando a origem é epitelial e *sarcoma* quando a origem advém do tecido mesenquimal. São exemplos destes, o adenocarcinoma da mama, fibrossarcoma, condrossarcoma, etc. A maioria dos tumores malignos surgem do tecido epitelial¹.

A classificação histológica de malignidade é determinada de acordo com o grau de diferenciação de um cancro e com base na sua taxa de crescimento. Por norma, pensa-se que, os tumores menos diferenciados são mais agressivos e mais metastáticos do que os tumores mais diferenciados. De facto, esta maneira de avaliar o grau de malignidade não é muito adequada para muitos tumores. Mas, para alguns tumores epiteliais, tais como carcinomas colo do útero, do endométrio e da tiroide, a classificação histológica é um índice bastante preciso de malignidade e prognóstico. Tendo por base as características histológicas, os tumores classificam-se como grau I (75% a 100% de diferenciação), grau II (50% a 75%), grau 2

III (25% a 50%) e grau IV (0% a 25%). Métodos mais recentes de classificação de malignidade consideram também a atividade mitótica, a infiltração nos tecidos adjacentes, a quantidade de tecido estromal no ou à volta do tumor¹. Embora, a classificação dos tumores baseada no critério acima descrito ajude a determinar o potencial maligno de um tumor, assim como a determinar o prognóstico do paciente, é necessária uma linguagem universal para fornecer critérios estandardizados entre médicos sobre a extensão da doença. As duas maiores agências, a *Union for International Control Cancer* (UICC) e a *American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting* (AJCCS), têm juntado esforços nesse sentido. Ambas as agências utilizam um sistema de classificação TNM, no qual a categoria T define o tumor primário; N, o envolvimento de gânglios linfáticos; e M, a presença ou ausência de metástases¹. A definição da extensão da doença maligna segundo estas categorias é designada por estadios. Estes estadios vão do I ao IV e a maioria dos cancros progride através dos quatro. No estadio I ($T_1N_0M_0$) o tumor está confinado ao órgão de origem e não há evidências de propagação por via vascular ou ganglionar. O tumor pode, na maior parte das vezes, ser removido por ressecção cirúrgica. No estadio II ($T_2N_1M_0$) o tumor primário já se encontra espalhado pelos tecidos adjacentes e gânglios linfáticos próximos ao tumor. O tumor é operável, contudo, devido à sua propagação local, pode não ser removido totalmente. No estadio III ($T_3N_2M_0$) o tumor primário é grande, com fixação a estruturas profundas. Os nódulos linfáticos estão envolvidos podendo atingir mais do que 3 cm de diâmetro e fixado aos tecidos subadjacentes. Neste estadio o tumor não é, geralmente, ressecável. NoO estadio IV ($T_4N_3M_1$) o tumor primário é enorme, podendo atingir mais de 10 cm de diâmetro e invade os tecidos subadjacentes ou circundantes. Existem gânglios linfáticos extensamente envolvidos e há evidência de metástases à distância^{1,4}. O crescimento tumoral tem um número de propriedades previsíveis. As taxas de incidência de vários cancros estão fortemente relacionadas a fatores ambientais e ao estilo de vida, e os cancros apresentam algumas particularidades no crescimento, entre as quais a capacidade de crescer de uma forma descontrolada, a capacidade de invasão dos tecidos envolventes, e o potencial de metastizar à distância. As células tumorais quando vistas microscopicamente parecem ser menos diferenciadas que as normais, possuindo características próprias, tais como possuírem um núcleo com nucléolos não só em grande número como enormes³. Pensa-se que a grande maioria dos cancros surge de um único clone de células, cujo precursor pode ter sido alterado por um carcinogénio. A média de idades de diagnóstico é superior a 65 anos e os cancros malignos surgem de uma acumulação de alterações¹. Essas alterações podem resultar de suscetibilidades genéticas a agentes ambientais, como químicos, radiação, vírus, bactérias ou parasitas; ou ainda agentes produzidos endogenamente, tais como radicais livres^{1,5}. Há frequentemente um longo período de latência que, em muitos casos pode exceder 20 anos, entre o início das agressões até ao aparecimento de um tumor perceptível clinicamente. Ao longo desse período, ocorre proliferação, mas esta pode ser limitada pelas defesas do hospedeiro ou pela falta de aporte sanguíneo. Durante a fase de progressão tumoral, as

células adquirem autonomia, independência a fatores de crescimento, e insensibilidade a fatores inibitórios, passando a possuir um potencial replicativo infinito. Para além disso, as células tumorais adquirem a capacidade de formar novos vasos, de invasão e de metastização, escapando deste modo aos mecanismos naturais de controlo, os quais, em condições normais conduziriam à morte celular⁶.

Alguns autores defendem que a progressão tumoral ocorre de uma forma gradual, caracterizada por alterações moleculares adicionais. Neste processo, imperam as células com a vantagem no crescimento e/ou sobrevivência, dando origem a uma contínua expansão clonal da população de células tumorais. Os efeitos acumulados e combinados destas modificações levam a uma completa transformação tumorigénica⁷.

Para que se obtenha sucesso no combate ao cancro é crucial que o diagnóstico seja feito numa fase precoce da doença pois, caso contrário, se existir progressão do processo de metastização, a doença torna-se letal. As terapias convencionais, nomeadamente, a cirurgia, quimio e radioterapia são eficazes, mas falta-lhes seletividade para destruírem as células espalhadas pelo organismo, para além do tumor primário. A quimio e radioterapia induzem efeitos secundários no organismo que causam desconforto e mau estar aos doentes. Por isso, é indispensável o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento que sejam direcionados para o tecido tumoral, salvaguardando os tecidos normais.

Existem algumas terapêuticas recentes que apresentam grande especificidade, e com resultados promissores, nomeadamente, a Terapia Fotodinâmica.

2 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT, do Inglês *Photodynamic Therapy*) é uma terapêutica inovadora, minimamente invasiva, aprovada para utilização em determinados tipos de cancro e doenças não-neoplásicas. A PDT pode constituir uma alternativa às terapias convencionais, nomeadamente, à quimio e radioterapia^{8,9,10}. A sua origem remonta ao tempo do antigo Egipto, Grécia e Índia¹¹. Segundo o livro sagrado Indiano, *Atharva Veda*, que remonta aos anos 1400 A.C¹², estes povos antigos utilizavam a luz solar em combinação com uma planta fotossensibilizadora para curar várias doenças da pele, entre as quais o vitiligo e a psoríase⁹. Porém, foi só a partir do início do século XX que a PDT, como modalidade terapêutica propriamente dita, começou a desenvolver-se. Isto deve-se em grande parte ao trabalho realizado pelo aluno de medicina Alemão, Oscar Raab, que trabalhando com o professor Herman von Tappeiner em Munich, descobriu o efeito fotodinâmico da laranja de acridina em protozoários e paramécias, na presença de luz solar¹³⁻¹⁶. Três anos mais tarde, o mesmo grupo publicou o primeiro tratamento em doentes¹⁴.

Nos anos a seguir, a fototoxicidade e a fluorescência da hematoporfirina foi investigada minuciosamente¹⁴. Na década de 60 do século XX, Lipson e Baldes sintetizaram um composto derivado de hematoporfirina (HpD, do inglês *hematophorin derivative*) com o intuito de aumentar a acumulação do corante pelo tumor e, subsequentemente, este composto foi utilizado como marcador fluorescente para o diagnóstico do cancro. Mas, em 1972, Diamond *et al.* mostraram que o HpD, para além de ser uma ferramenta de diagnóstico, podia também ter aplicações terapêuticas, ao evidenciar a sua eficácia em gliomas em ratinhos¹⁷. Subsequentemente, em 1975, Dougherty *et al.* demonstraram a erradicação completa de tumores da mama após tratamento com HpD. Em 1976, Kelly e Snell realizaram o primeiro estudo clínico de HpD, no tratamento do cancro da bexiga. Ainda nesta mesma década, em 1978, Dougherty *et al.* mostraram uma série de resultados de casos de sucessos obtidos em doentes tratados com PDT. Após estes resultados, os estudos com PDT intensificaram-se, e vários casos clínicos foram publicados, mostrando as potencialidades da PDT no tratamento de vários tipos de tumores, como o cancro da bexiga, tumores cerebrais, tumores intraoculares, cancro do pâncreas e do fígado, etc^{17,18}.

Apesar dos resultados promissores da PDT no tratamento oncológico, só em 1993, é que o primeiro fotossensibilizador foi aprovado, no Canadá, tratando-se de um derivado de HpD designado por Photofrin[®], para o tratamento do cancro da bexiga¹⁹⁻²¹. Este foi posteriormente, em 1995, aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA), para o tratamento do cancro esofágico, e mais tarde em vários países na Europa. Hoje, existem já vários fotossensibilizadores aprovados em vários países para aplicações em PDT.

2.1 Princípio da PDT

O princípio de funcionamento da PDT baseia-se na administração intravenosa ou oral de um fotossensibilizador, composto químico que pode ser excitado pela luz visível de comprimento de onda (λ) específico. Após a sua administração, consegue acumular-se nos tecidos-alvo (células tumorais), posteriormente o tecido alvo é irradiado o que leva à ativação do fotossensibilizador e consequente destruição do tumor^{12,22}, na figura 1 está representado o perfil de tratamento da PDT.

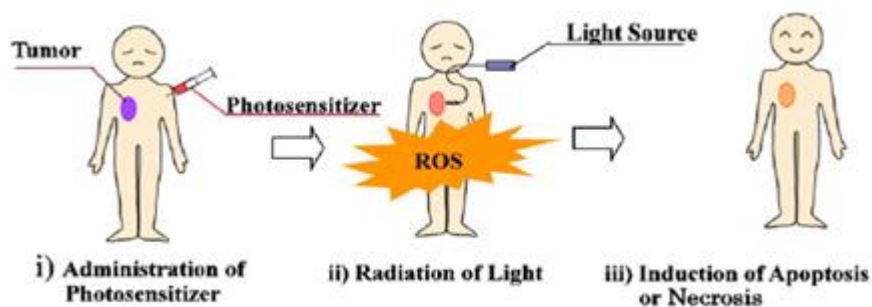


Figura 1- Perfil de tratamento da PDT. Adaptado de Yano, S. et al⁸.

A ativação do fotossensibilizador por absorção de luz provoca a passagem do seu estado fundamental (S_0), para um estado excitado de curta duração, nanossegundos, designado por estado excitado singleto (S_n), o qual é formado por vários sub-níveis vibracionais (S_n'). Neste estado, o fotossensibilizador perde rapidamente a sua energia decaindo através dos vários sub-níveis até ao primeiro estado excitado singleto (S_1) por conversão interna (IC, do inglês *internal conversion*). Neste estado, o fotossensibilizador pode experimentar dois tipos de processos, um radiativo e um não radiativo. No processo radiativo, o fotossensibilizador regressa ao S_0 , por emissão de fluorescência. No processo não radiativo, os eletrões sofrem uma inversão de *spin*, processo designado de cruzamento intersistema (ISC, do inglês *crossing intersystem*), passando a um estado excitado tripleto (T_1)^{23,24}, figura 2. A produção deste estado pelo fotossensibilizador determina os seus efeitos fototerapêuticos e a probabilidade da formação do estado tripleto por fóton absorvido é referido como sendo o rendimento quântico tripleto do fotossensibilizador. Deste modo, uma elevada formação do estado tripleto é requerida para uma elevada eficácia do fotossensibilizador. Neste estado, o fotossensibilizador pode dissipar a sua energia e regressar ao S_0 através de um processo de emissão radiativa, designado de fosforescência, figura 2, ou pode sofrer *queching* (processos de desexcitação não radiativos). Os mecanismos de *queching* do estado excitado tripleto ocorrem segundo dois tipos de reações fotodinâmicas, do Tipo I e do Tipo II, figura 2. Na reação do Tipo I, o fotossensibilizador no estado T_1 reage diretamente com o/os substrato/s, tais como membranas das células ou moléculas, havendo transferência de um eletrão ou um próton entre ambos, dando origem a um radical anião ou um radical catião, respetivamente^{8,23}. Na presença de oxigénio, e como estes radicais livres são espécies altamente instáveis, a maioria reage instantaneamente para produzir o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este radical pode criar espécies altamente reativas, radicais hidroxilo (OH^{\cdot}), por reação com peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Estes, uma vez gerados, podem reagir com o substrato. Por sua vez, na reação do Tipo II, o fotossensibilizador no estado T_1 pode transferir a sua energia diretamente ao oxigénio molecular, cujo estado fundamental por si só é também um estado tripleto, produzindo o estado excitado do oxigénio, oxigénio singleto (1O_2).

O oxigénio singleto é uma espécie altamente reativa, com tempo de semivida muito curto, que reage diretamente com moléculas biológicas próximas do seu local de formação, dentro de um raio de ação aproximadamente 20 nanómetros (nm) e com tempo de duração de aproximadamente 40 nanossegundos¹¹. Todavia, recentemente tem-se sugerido que o tempo de duração do oxigénio singleto ronde os 6 microssegundos e que o raio de difusão seja aproximadamente 300 nm *in vivo*^{11,25}. Teoricamente, o oxigénio singleto só pode interagir com moléculas próximas e estruturas que se encontrem dentro do raio de ação. As espécies reativas de oxigénio (ROS, do Inglês *reactive oxygen species*), formadas pela reação

fotodinâmica são conhecidas por despoletar várias reações com biomoléculas entre as quais: resíduos de aminoácidos em proteínas, lípidos insaturados como o colesterol e bases dos ácidos nucleicos, etc. Estas interações provocam danos, potencial destruição das membranas celulares e desativação de enzimas, induzindo morte celular. O oxigênio singlete é considerado a principal espécie citotóxica formada durante o processo fotodinâmico^{8,11,26}. Ambas as reações (Tipo I e II) ocorrem em simultâneo, e a razão entre elas depende do tipo de fotossensibilizador usado, da concentração de substrato e da quantidade de oxigênio disponível. Há evidências de que a reação do Tipo II predomina na indução das lesões celulares, uma consequência da interação entre o fotossensibilizador irradiado e o oxigênio molecular.

A eficiência da reação do Tipo II depende da duração (tempo de semivida) do estado tripleto e do rendimento quântico tripleto do fotossensibilizador. Ambos os parâmetros têm sido implicados na eficácia do fotossensibilizador, estando também envolvidos na distinção dos dois Tipos de reações fotodinâmicas (Tipo I e II). É de realçar que o efeito fotodinâmico de um fotossensibilizador não se deve única e exclusivamente ao mecanismo da reação do Tipo II. Existe um determinado número de fotossensibilizadores em que o seu estado tripleto é demasiado curto para que a reação do Tipo II ocorra. Um desses exemplos é a *copper metallated octamethylbenzochlorin*, cujo tempo de duração é menor do que 20 nanossegundos mas que, no entanto, é considerado um agente PDT eficiente¹¹.

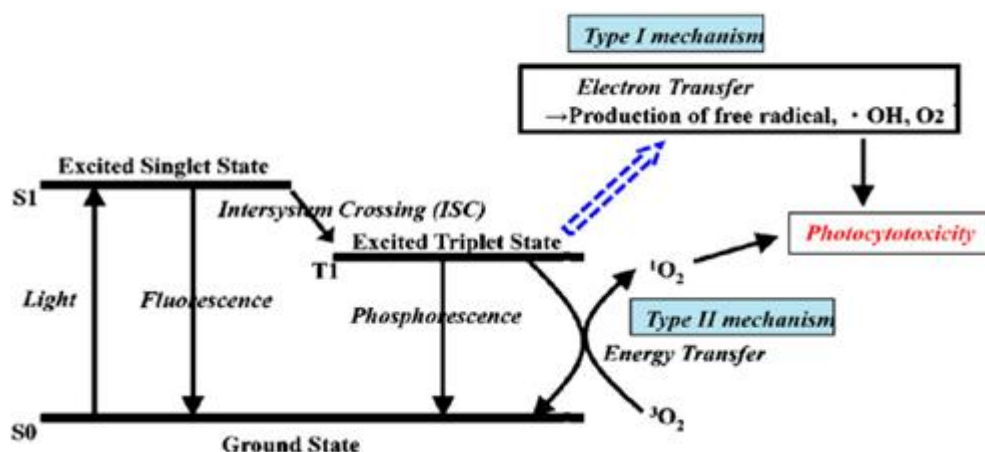


Figura 2- Mecanismos PDT: Indução de estados excitados e formação das ROS⁸.

2.2 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores são determinantes para a PDT^{24,27}. Muita investigação tem sido feita no sentido de encontrar um fotossensibilizador com as características ideais. As características indispensáveis de qualquer fotossensibilizador são a sua capacidade preferencial para se acumular no tecido alvo, via de formação de espécies citotóxicas, e a

Introdução

indução de um efeito biológico desejável¹¹. Mas para ser um fotossensibilizador ideal para PDT deve possuir as seguintes características: 1) pureza e estabilidade química, 2) absorver luz de λ mais longos (600-850 nm) permitindo maior penetração nos tecidos pela luz, 3) ter uma elevada retenção nos tecidos-alvo em comparação com os outros tecidos, 4) possuir características fotofísicas apropriadas, como, elevado rendimento quântico tripleto, elevado rendimento quântico de oxigênio singlete e apresentar um estado tripleto com um tempo de semivida elevado, 5) não apresentar citotoxicidade no escuro, i.e. na ausência de irradiação com luz 6) ser eliminado rapidamente pelos tecidos normais^{8,11,24,27-31}, 7) deve possuir uma estrutura anfifílica, ou seja, solúvel em água mas contendo um grupo hidrofóbico para facilitar a passagem através das membranas celulares^{11,27,31} e 8) não deve provocar efeitos mutagênicos ou carcinogênicos^{28,31}. Estas características definem teoricamente um fotossensibilizador ideal, no entanto, é necessário ter em conta, para além das propriedades biológicas, físicas e químicas, as condições que respondam às necessidades do doente. Deste modo, o clínico tem que optar pelo fotossensibilizador que lhe parece ser o mais apropriado face às necessidades da situação em causa e com as melhores características clínicas³¹.

O primeiro fotossensibilizador aprovado foi o Photofrin[®] e posteriormente vários fotossensibilizadores foram desenvolvidos. Os fotossensibilizadores são habitualmente divididos em três gerações. Os de primeira geração, os fotossensibilizadores são do tipo porfirínico, incluindo a hematoporfirina e seus derivados¹⁶. Estes têm sido intensamente estudados e submetidos a ensaios clínicos.

Apesar do sucesso destes fotossensibilizadores, nomeadamente, do Photofrin[®] (o fotossensibilizador mais utilizado na prática clínica), estes apresentam muitos inconvenientes, particularmente, possuem baixo coeficiente de extinção que implica a administração de grandes quantidades de composto para obter uma resposta fototerapêutica eficiente, baixa penetração nos tecidos pela luz devido ao seu máximo de absorção não passar dos 630 nm e baixa velocidade de eliminação o que causa de fotossensibilidade prolongada da pele após o tratamento²⁴⁻²⁷. Estes inconvenientes levaram ao desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, uma segunda geração que inclui vários derivados de porfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas. Estes fotossensibilizadores são compostos com propriedades farmacocinéticas e físico-químicas melhoradas, tendo uma maior eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio. Possuem uma banda de absorção com λ mais longos (650-800 nm) e provocam uma menor fotossensibilidade prolongada da pele^{24,27,28}.

A grande maioria destes compostos é hidrofóbica, levando a uma maior captação pelos tumores em relação aos tecidos normais. Contudo, compostos com características hidrofóbicas podem apresentar problemas de solubilidade. A terceira geração surge devido à fraca solubilidade de muitos dos fotossensibilizadores²⁷.

Por isso, vários trabalhos recentes têm-se focado no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos, isto é, sistemas que transportam fotossensibilizadores até ao tecido alvo, com o intuito de melhorar a seletividade e a especificidade dos fotossensibilizadores e de aumentar a captação tumoral. Têm sido estudadas muitas estratégias de entrega, e alguns veículos transportadores de fotossensibilizadores apresentam grande potencial, tais como emulsões de lipossomas e nanopartículas. Embora estes sistemas de entrega de fármacos possam aumentar o efeito fototerapêutico observado, podem, no entanto, de forma inadvertida diminuir o rendimento quântico de oxigénio singleto: o oxigénio singleto formado tem que se difundir para fora do sistema e, como o raio de ação do oxigénio singleto é curto devido ao seu pequeno tempo de semivida, pode não conseguir alcançar o alvo e eliciar o efeito desejado. De forma a contornar este problema, uma alternativa possível é ligar diretamente os fotossensibilizadores a moléculas biologicamente ativas, tais como anticorpos. Estes compostos de terceira geração apresentaram-se promissores contra células tumorais colorretais, *in vitro*¹¹.

2.2.1 Fotossensibilizadores utilizados na prática clínica

Existem muitos fotossensibilizadores que alcançaram bons resultados no tratamento oncológico. Contudo, só alguns estão disponíveis comercialmente, enquanto outros ainda se encontram em ensaios clínicos. Infelizmente, nem todos os doentes com cancro têm acesso aos poucos que estão comercialmente disponíveis¹⁶. De seguida apresenta-se uma breve descrição acerca dos fotossensibilizadores aprovados para a prática clínica e de alguns que se apresentam como promissores mas que ainda se encontram em fase de ensaios clínicos.

2.2.1.1 Photofrin®

O Photofrin® é um derivado de hematoporfirina, conhecido também por *Porfimer Sodium*; como mencionado anteriormente, este foi o primeiro fotossensibilizador aprovado para o uso na prática clínica. Corresponde a uma mistura de monómeros, dímeros e oligómeros de hematoporfirina nos quais as unidades de porfirina estão ligadas por ligações éter, éster e C-C. Dependendo do processo de produção o produto final pode ter diferentes quantidades desses subcomponentes. Mas, apesar destas diferenças, clinicamente as várias formas aparentam ter um comportamento semelhante. Esta mistura mostrou localizar-se principalmente nos tecidos tumorais, e apresenta uma atividade anticancerígena bastante boa quando combinada com luz de λ

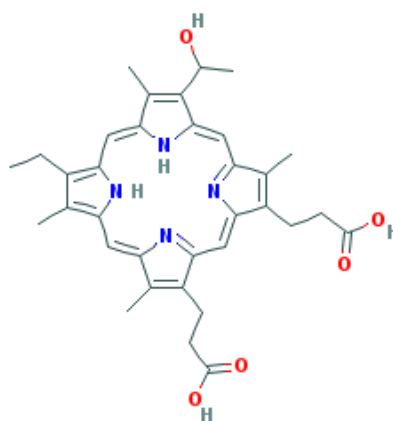


Figura 3 - Estrutura química do Photofrin®. Retirado de *The PubChem Project*.

Introdução

correspondente ao vermelho²¹. O Photofrin[®] apresenta o pico de absorção máximo nos 630 nm e exibe um coeficiente de extinção molar relativamente baixo, como consequência, é inevitável o uso de altas concentrações de composto e luz para obter um efeito terapêutico eficiente. A administração do Photofrin[®] faz-se por via intravenosa, 2-5 mg/kg, seguida de irradiação com luz de λ de 630 nm, com energia de 100-200 J.cm⁻², 24-48 h após a injeção⁸. As maiores desvantagens deste fotossensibilizador residem numa fotossensibilidade prolongada da pele^{8,11}, uma vez que o tempo de eliminação varia de 4-8 semanas⁸ e uma baixa penetração nos tecidos pela luz devido ao fraco pico de absorção (630 nm)^{8,11}. Primeiramente foi aprovado para o tratamento do cancro da bexiga e, posteriormente, para outros tipos de cancros, nomeadamente, pulmão e esófago⁸.

2.2.1.2 Foscan[®]

A meta-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC), conhecida também por Temoporfin ou Foscan[®], nome comercial, é um fotossensibilizador da segunda geração com grande capacidade de acumulação nos tumores e com excelente fotocitotoxicidade⁸. A sua banda de absorção está centrada nos 652 nm, o que aumenta o poder de penetração da luz nos tecidos. A administração deste é feita também por via intravenosa, no entanto, requer quantidades muito mais baixas do que o Photofrin[®], entre 0,15 mg/kg. A irradiação faz-se entre 24-96h após a injeção, com luz visível de λ de 652 nm, com energia de 5-20 J.cm⁻²⁸. A eficácia terapêutica do Temoporfin é 100 vezes

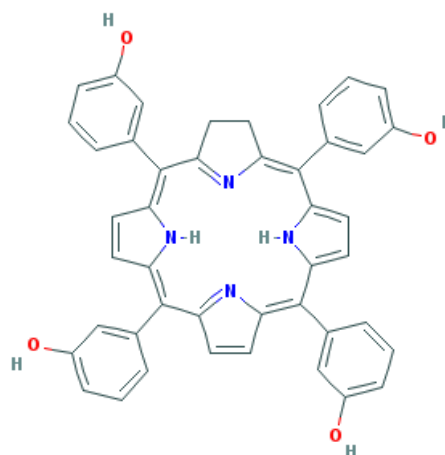


Figura 4 - Estrutura química do Foscan[®]. Retirado de *The PubChem Project*.

superior à do Photofrin para a mesma quantidade fototerapêutica^{8,32,21,16,11,28}, isto é, a concentração de fármaco x quantidade de luz, permitindo assim o uso de concentração de fármaco e tempos de iluminação muito mais baixos para alcançar os mesmos resultados⁸. Porém, o Temoporfin é um fármaco que requer longos períodos até à eliminação, que podem atingir as 6 semanas^{8,16}, sendo mais comumente referidas 2-4 semanas¹⁶.

O Temoporfin tem sido intensamente investigado no uso contra cancros da pele, esófago e pulmão^{8,16}, e foi aprovado na Europa em 2001, para tratamentos paliativos de cancros do pescoço e cabeça^{8,32,21,16,11,28}. Encontram-se a decorrer ensaios clínicos em fase II na Europa, USA e Canadá para este fotossensibilizador contra o cancro da cabeça e pescoço, carcinoma nasofaríngeo, e carcinoma do ducto biliar⁸.

2.2.1.3 Ácido 5-aminolevulínico

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é um pró-fármaco utilizado no tratamento e imagem de vários câncros.

O ALA por si só não é um fotossensibilizador, mas é um precursor do heme^{8,11,16,21}. O heme é o componente estrutural principal da hemoglobina e mioglobina e de muitos fotossensibilizadores. O heme

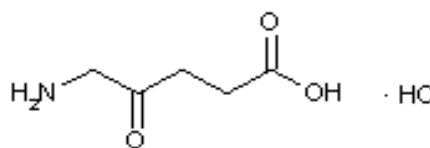


Figura 5 - Estrutura química do ALA⁸.

por si não é um bom fotossensibilizador devido ao curta tempo de semivida dos seus estados excitados¹¹, mas o seu precursor imediato, protoporfirina IX, é um fotossensibilizador eficiente^{8,11,33}. O heme é sintetizado a partir da glicina e succinil coenzima A. O passo limitante na via de biossíntese é controlado por um mecanismo de *feedback* negativo no qual a concentração de heme regula a produção de ALA. No entanto, este controlo de *feedback* pode ser contornado pela adição excessiva de ALA artificial exógeno às células. As células reagem produzindo protoporfirina IX a uma velocidade mais rápida do que a enzima ferroquelatase pode convertê-lo em heme.

A ativação da protoporfirina IX pode ser realizada com luz azul (410 nm), verde (510 nm) ou vermelha (635 nm).

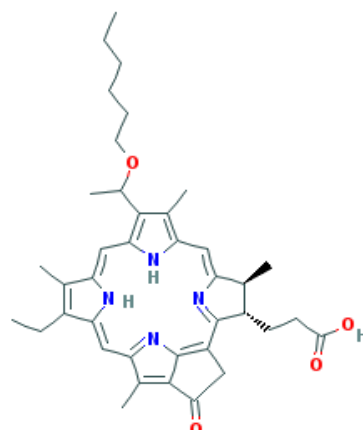
O ALA, comercializado como Levulan[®], tem-se mostrado promissor por administração oral ou intravenosa, e também por administração tópica, no tratamento de doenças dermatológicas, tanto malignas, como não malignas, entre as quais a psoríase, a doença de Bowen (carcinoma de células escamosas *in situ*) e o Hirsutismo.

O ALA mostra uma maior acumulação nos tecidos tumorais em comparação com outros fotossensibilizadores administrados por via intravenosa. Altas concentrações deste fotossensibilizador, ou seja, da protoporfirina IX após administração, são geralmente alcançados dentro de algumas horas, sendo esta uma das maiores vantagens do ALA em relação a outros fotossensibilizadores. O tempo de eliminação do ALA é relativamente curto, aproximadamente 1-2 dias após a administração^{11,21}.

Numa tentativa de melhorar a baixa biodisponibilidade quando o ALA é administrado topicamente, têm sido explorados derivados esterificados de ALA com propriedades farmacológicas melhoradas¹¹. O Metvix[®], um metil éster do ALA está a ser comercializado para o tratamento do carcinoma das células basais e outras doenças dermatológicas, na Noruega. Por outro lado, um héxil éster (Hervix) foi aprovado para o diagnóstico do cancro da bexiga.^{8,11,33}

2.2.1.4 Photochlor®

O Photochlor®, nome comercial do derivado de clorina (3-(1-Hexyloxyethyl)-3-divinylpyropheophorbide-a), é um fotossensibilizador da segunda geração que apresenta alta lipofilicidade^{8,16}. Foi concebido para penetrar na membrana celular, apresenta maior acumulação do que o Photofrin® ou mesmo do que o Termofrin®. Este fotossensibilizador não é metabolizado, no entanto, é removido do plasma e eliminado



lentamente. O λ de ativação, 665 nm, permite uma boa penetração nos tecidos pela luz^{8,16,33}.

Figura 6 - Estrutura química do Photochlor. Retirado de *The PubChem Project*.

A administração faz-se por via intravenosa, 0,15mg/kg, seguida de irradiação com luz visível de λ de 665 nm, com energia de 150 J.cm⁻², 24-48h após a injeção^{8,16}. O Photochlor® tem sido utilizado para o tratamento do esófago de Barret, cancro esofágico, cancro do pulmão⁸ e carcinoma de células basais^{8,16,33}.

2.2.1.5 Laserphyrin®

A mono-L-aspartil-clorina-e6 (Laserphyrin®) é um fotossensibilizador da segunda geração solúvel em água com um tempo de acumulação nos tumores muito pequeno. Apresenta uma banda de absorção máxima nos 654 nm, o que permite uma boa penetração nos tecidos pela luz. É administrado por via intravenosa, 0,5-3,5 mg/kg. Quatro horas após a injeção o tecido alvo irradia-se com luz visível de λ de 654 nm, 150 J.cm⁻² de energia. O tempo de eliminação é curto, apenas 3-7 dias após injeção, e a baixa acumulação na pele de Laserphyrin® reduz significativamente a fotossensibilidade da mesma. Este fotossensibilizador foi pela primeira vez aprovado no Japão em 2003 para o uso na prática clínica contra o cancro do pulmão em estadios iniciais da doença. Encontram-se a decorrer ensaios clínicos de fase III para o cancro do fígado, e da cabeça e pescoço^{8,16}.

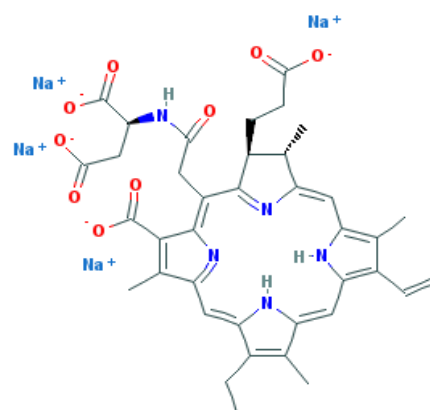


Figura 7 - Estrutura química do Laserphyrin®. Retirado de *The PubChem Project*.

2.2.1.6 Visudyne®

Visudyne®, nome comercial do derivado mono-ácido da benzoporfirina, é também um fotossensibilizador da segunda geração. O Visudyne® apresenta uma forte absorção nos 690 nm, permitindo uma maior penetração nos tecidos pela luz do que qualquer um dos fotossensibilizadores até agora referidos. A administração do Visudyne® é feita por via intravenosa, 0,3 mg/kg. A irradiação realiza-se 3-5 h após a injeção, com luz de λ de 690 nm, com energia de 50 J.cm^{-2} . Este fotossensibilizador é rapidamente eliminado e

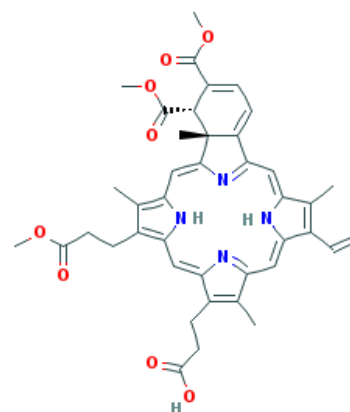


Figura 8 - Estrutura do Visudyne®. Retirado de *The PubChem Project*.

a fotossensibilidade da pele é de apenas algumas horas. O Visudyne® tem tendência a acumular-se em tecidos com elevada neovascularização. Devido a esta característica foi aprovado em vários países para o uso clínico da doença degenerativa macular relacionada com a idade (DMRI), doença que leva a cegueira devido ao crescimento anormal dos vasos sanguíneos sob o plexo coroide do olho, e está a ser testado (ensaio clínico de fase III) para cancro cutâneos e psoríase^{8,11,16}. Uma abordagem inovadora tem sido empregue em osteossarcomas caninos, tumores com uma alta vascularização. Como vários tumores humanos apresentam altos níveis de neovascularização, tais como os sarcomas e os glioblastomas, estes poderiam ser alvo de ensaios clínicos, já que os tratamentos oncológicos disponíveis ainda apresentam varias limitações¹⁶.

2.2.1.7 Purlytin™

Etiopurpurina de *estanho* é uma purpurina sintética obtida pela degradação da clorofila¹⁶. É um fotossensibilizador que apresenta um rendimento quântico de formação oxigénio tripleto aproximadamente 20 vezes superior ao do Photofrin®⁸. O seu pico de absorção máximo é nos 660 nm, o que permite uma boa penetração pela luz. A administração do Purlytin™ é 1,2 mg/kg, seguida de irradiação com luz de 660 nm, com energia de 200 J.cm^{-2} , 24 h após a injeção. O Purlytin™ tem sido amplamente investigado, e estão a decorrer ensaios clínicos em fase II/III para o tratamento de metástases cutâneas do cancro da mama e para o sarcoma de Kaposi em doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida^{8,11,16}.

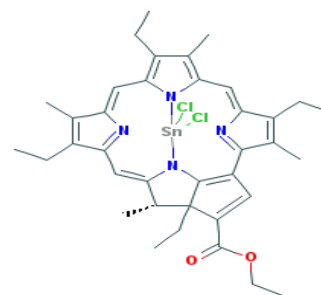


Figura 9 - Estrutura química do Purlytin™. Retirado de *The PubChem Project*.

2.2.1.8 Lutrin®

Lutetium tetraphyrin é um fotossensibilizador hidrofílico da segunda geração, com alta seletividade tumoral e com uma excreção rápida, cerca de 1 dia. Apresenta um máximo de absorção num λ bastante longo, 732 nm, o que possibilita uma grande penetração nos tecidos pela luz. O Lutrin® administra-se com 0,6-7,2 mg/kg, seguido de irradiação com luz de λ 732 nm, 150 J.cm⁻² de energia, 3 h após a injeção^{8,16}. Tem sido aprovado para o tratamento do cancro da próstata e cancro cervical, e encontram-se a decorrer ensaios clínicos (fase I/II/III) para o cancro da mama e para o sarcoma de Kaposi⁸.

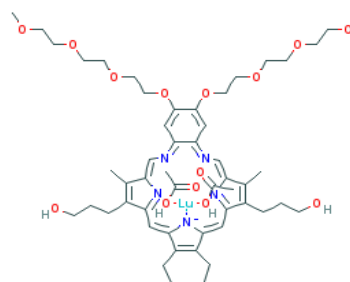


Figura 10 - Estrutura química do Lutrin®. Retirado de *The PubChem*

2.2.1.9 Tookad®

O Tookad® é um fotossensibilizador da segunda geração que apresenta características lipofílicas. Tem a vantagem de ser removido rapidamente da circulação, em menos de 20 minutos e pode dizer-se que a fototoxicidade da pele é insignificante, uma vez que esta é aproximadamente 1,3 h. O Tookad® apresenta um máximo de absorção nos 762 nm, e tem um alto rendimento quântico devido ao efeito do átomo pesado (paládio). Administra-se por via intravenosa, 2-4 mg/kg, seguida de irradiação com luz de λ de 772 nm, energia de 360 J.cm⁻², 0,5 h após a injeção⁸. O Tookad® tem sido amplamente investigado para o cancro da próstata e para além de se terem publicado vários estudos sobre o assunto¹⁶, encontram-se a decorrer ensaios clínicos em fase III para o tratamento do mesmo com Tookad®⁸.

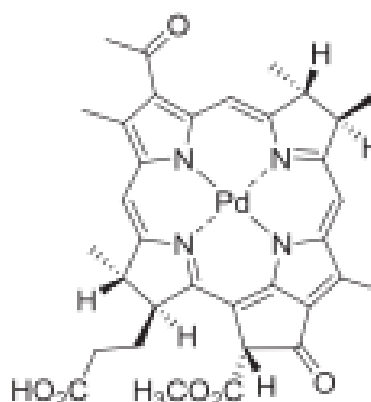
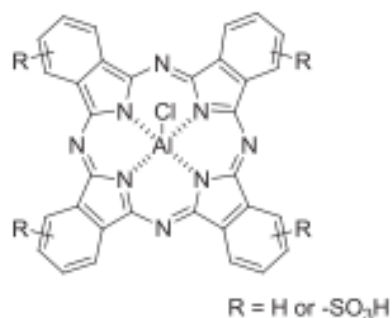


Figura 11 - Estrutura química do Tookad®⁸.

2.2.1.10 Photosens®

A ftalocianina sulfonada de alumínio, Photosens®, é um fotossensibilizador da segunda geração. A sulfonação aumenta significativamente a solubilidade das ftalocianinas em solventes polares, incluindo a água¹¹. Este derivado de ftalocianina apresenta um pico de absorção máximo nos 675 nm. O Photosens® administra-se por via intravenosa, 0,5-0,8 mg/kg,



seguida de irradiação com luz de λ de 675 nm, energia de 150 J.cm⁻², 24-72h após a injeção⁸.

O Photosens[®] entrou em ensaios clínicos para o tratamento contra vários tipos de cancro, nomeadamente, pele, mama e pulmão^{8,11,16}. Recentemente, numa tentativa de melhorar a seletividade tissular, foi desenvolvida uma formulação lipossomal de ftalocianina de zinco, e encontra-se em ensaios clínicos (fase III), na Suíça, para o tratamento do carcinoma de células escamosas⁸.

2.3 Seletividade Tumoral

A maior característica principal da PDT é a grande seletividade dos fotossensibilizadores pelas células tumorais. Os mecanismos que estão envolvidos nesta acumulação dos fotossensibilizadores nos tecidos tumorais após uma administração sistémica ainda não estão completamente elucidados²⁴. No entanto, há alguns fatores hipotéticos que, presumivelmente, podem influenciar esta retenção acrescida dos fotossensibilizadores pelos tumores. Um facto que se tem sugerido é a associação dos fotossensibilizadores às lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *Low density lipoprotein*)^{24,34}, uma vez que as células tumorais expressam um elevado número de recetores membranares de LDL, imprescindível para o seu rápido crescimento tumoral^{24,35,36}. Porém, este mecanismo continua a ser debatido porque existem alguns fotossensibilizadores que apresentam alta afinidade para as LDL e que, no entanto, apresentam baixa seletividade tumoral. Por outro lado, há fotossensibilizadores cuja afinidade para as LDL mas que a sua seletividade tumoral é elevada²⁴.

O grau de lipofilicidade/hidrofílico dos fotossensibilizadores é outro fator que influencia, muito, a seletividade dos fotossensibilizadores, uma vez que um elevado grau de lipofilicidade induz um aumento na captação tumoral^{16,24}. Além disso, um grande espaço intersticial e especialmente uma grande vasculatura tumoral associada a uma baixa drenagem linfática, provavelmente, induzem um aumento da concentração de fotossensibilizadores nos tumores²⁴.

É sugerido que uma ligação dos fotossensibilizadores a constituintes intersticiais extracelulares, tais como lípidos, fibrina e colagénio pode favorecer a retenção dos fotossensibilizadores nos tecidos tumorais. Além disso, um aumento do processo glicolítico anaeróbio em tumores hipóxicos provoca acidose no fluido intersticial, o que associado a um aumento global da carga negativa da membrana plasmática das células tumorais, eventualmente, fomenta a retenção tumoral dos fotossensibilizadores que se tornam mais protonados em condições acídicas²⁴.

2.4 Localização subcelular

A localização subcelular dos fotossensibilizadores tem um papel importante no efeito terapêutico. As ROS formadas pela reação fotodinâmica têm um tempo de semivida muito curto, o que implica que o seu raio de ação é limitado basicamente ao seu local de

Introdução

formação/vizinhança muito próxima. Deste modo, os sítios onde ocorrem os danos subcelulares estão estritamente relacionados com a localização subcelular do fotossensibilizador. Hoje em dia, sabe-se que lesões suficientes num determinado organelo ou num componente essencial podem induzir morte celular. Há estudos que demonstram que os fotossensibilizadores podem localizar-se dentro de diferentes organelos celulares, como a mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomas e membranas plasmáticas^{13,18,22-24}. Quase nenhum dos fotossensibilizadores utilizados em PDT se localiza no núcleo, por isso este tipo de tratamento induz poucos danos no DNA, o que sugere um baixo potencial carcinogénico^{18,22,24}.

Alguns estudos evidenciam que há uma realocização de determinados fotossensibilizadores depois da irradiação, sugerindo que para além do sítio primário, os danos provocados podem estender-se rapidamente para outros locais subcelulares^{16,22}.

A localização subcelular natural dos fotossensibilizadores é determinada em grande parte devido à estrutura química da molécula. As características estruturais mais importantes são a carga iónica de ligação a qual pode variar de -4 (aniónica) a +4 (catiónica), o grau de hidrofiliidade/hidrofobicidade que é expresso pelo coeficiente de partição n-octanol/água, e o grau de assimetria existente na molécula. Os fotossensibilizadores que são hidrofóbicos e que possuem uma carga negativa ≤ 2 podem difundir-se através da membrana plasmática e, posteriormente, distribuírem-se em outras membranas intracelulares. Por outro lado, os fotossensibilizadores menos hidrofóbicos e que possuem uma carga negativa > 2 tendem a ser demasiado polares para se difundirem através da membrana, sendo captados por endocitose^{13,23}.

2.5 Mecanismos de destruição tumoral induzidos por PDT

A extensão dos efeitos citotóxicos provocados pela PDT *in vivo* é multifactorial e depende do fotossensibilizador utilizado, da sua localização no momento da irradiação, do tempo entre a administração do fotossensibilizador e a irradiação, do tipo de tumor e do seu nível de oxigenação.

Estes fatores regulam o papel de três processos independentes que contribuem para a destruição eficiente do tumor: destruição direta das células tumorais, destruição da vascularização tumoral e ativação de uma resposta imune. Pensa-se que o controlo do tumor a longo prazo resulta da combinação destes processos. A PDT *in vivo* tem mostrado reduzir o número de células tumorais clonogénicas através do dano fotodinâmico provocado diretamente pelas ROS^{22,23}.

2.5.1 Destruição direta

A destruição direta das células tumorais deve-se aos danos fotodinâmicos de carácter irreversível provocados ao nível molecular em determinados alvos subcelulares. A natureza

molecular dos alvos foto-oxidados influência grandemente as vias de sinalização e os tipos de morte que são posteriormente despoletados pela PDT. Comumente, os fotossensibilizadores localizados na mitocôndria ou no retículo endoplasmático induzem morte celular por apoptose, mas isto dentro de um certo limite de stresse oxidativo. Os fotossensibilizadores localizados na membrana plasmática ou nos lisossomas podem adiar ou bloquear a apoptose, induzindo morte celular por necrose²². Todavia, há evidências de que a autofagia pode ser induzida pela PDT. A autofagia é ativado numa tentativa da célula tentar reparar e sobreviver aos danos provocados em certos organelos fundamentais. Se esta resposta fracassar, é transformado num sinal de morte celular²².

Assim, os mecanismos letais iniciados pelo processo fotodinâmico englobam as três principais morfologias de morte celular, ou seja, a apoptose, necrose e autofagia.

2.5.1.1 Apoptose

A apoptose que é, indiscutivelmente, a forma de morte celular mais bem estudada, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, na homeostase celular e no cancro. Devido às suas características, a indução de apoptose é certamente o tipo de morte celular pretendido pela maior parte dos sistemas de PDT. Bioquimicamente, a apoptose está na dependência de uma família de proteases especializadas, as caspases²². A ativação das caspases ocorre principalmente através ativação de recetores de morte, via extrínseca, ou por via intrínseca onde a mitocôndria tem um papel central, figura 13. A via extrínseca é desencadeada pela ligação dos ligandos de morte (FasL, TNF- α , TRAIL) aos seus recetores de morte à superfície das células (receptor Fas, TNF-RI, TRAIL-RI). Este evento induz o agrupamento dos recetores de morte e a formação intracelular de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do Inglês *death-induced signaling complex*), um complexo oligomérico iniciador das pró-caspases-8/-10 resultando em ativação por clivagem proteolítica. Por sua vez, estas caspases, uma vez ativadas, clivam as pró-caspases-3/-7 que induzem a apoptose^{22,37,38}.

A via intrínseca é a via predominantemente ativada pela PDT. Nesta via, sinais tais como a libertação de iões de cálcio do retículo endoplasmático ou de proteínas pró-apoptóticas Bax ou Bak, levam à perda do potencial de membrana da mitocôndria, originando a permeabilização das membranas mitocondriais. Estes eventos provocam a libertação de várias proteínas apoptogénicas para o citoplasma. Este evento tem sido proposto como sendo um ponto de não retorno em muitos programas de morte celular. As proteínas libertadas, que apresentam um fator preponderante na apoptose, incluem ativadores de caspases tais como o citocromo c, o AIF (*apoptosis-inducing factor*), entre outros, e promovem as próximas fases da apoptose. O citocromo c por ligação ao Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) e na presença de ATP ou dATP induzem o recrutamento e ativação da pró-caspase-9 através da formação de um complexo heptamérico designado de apoptossoma. A caspase-9, uma vez

Introdução

ativada, cliva e ativa a caspase-3/-7 e a via termina no mesmo fim metabólico que a via extrínseca³⁷.

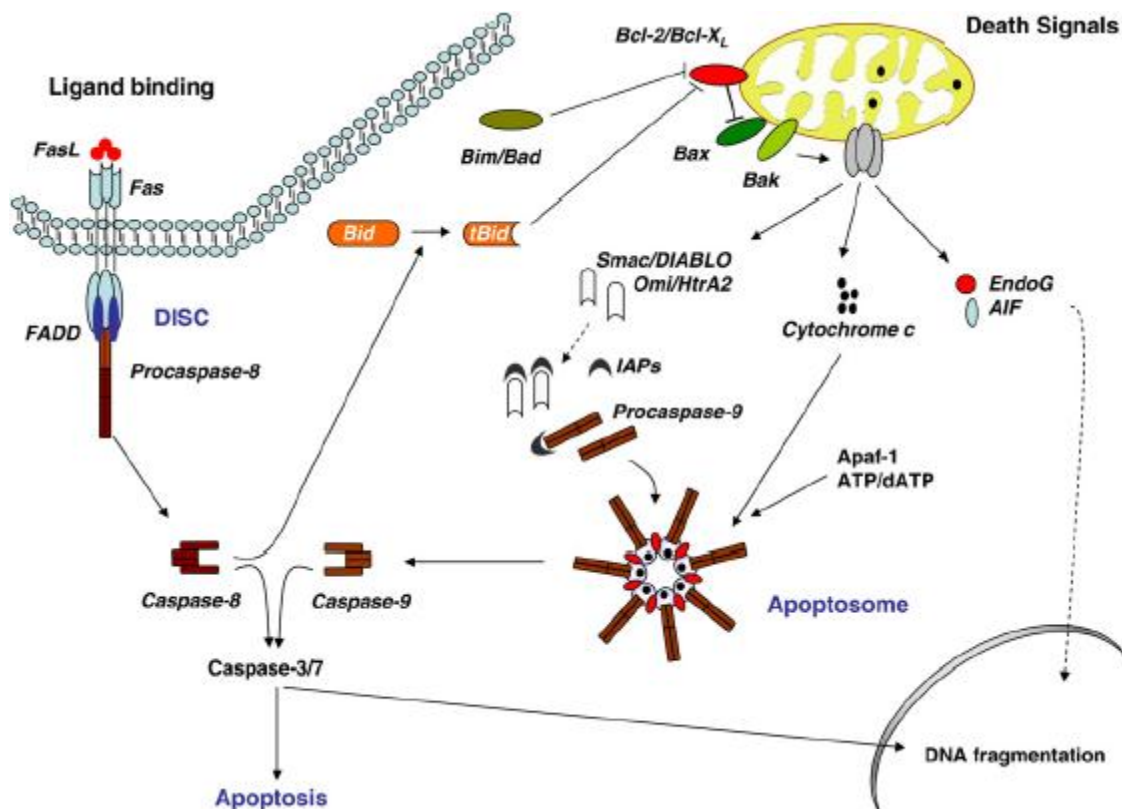


Figura 13 - As duas principais vias convergem levando à ativação das caspases efetoras. A ligação de um ligando de morte, pertencente à superfamília do TNF- α , ao seu recetor induz a formação do DISC, levando à ativação do iniciador procaspase-8 na via extrínseca da apoptose. Subsequentemente a caspase-8 leva à ativação proteolítica da caspase-3/-7. A via intrínseca ou mitocondrial é ativada pela libertação de fatores apoptogénicos do espaço intermembranar da mitocôndria para o citoplasma. A libertação do citocromo c para o citoplasma induz a formação do apoptossoma que ativa a pro-caspase-9, a qual cliva e ativa a caspase-3/-7. A ativação desta caspase induz os mecanismos morfológicos e bioquímicos da apoptose, incluindo a fragmentação do DNA. A libertação do AIF da mitocôndria e a sua translocação para o núcleo induz fragmentação do DNA²².

A expressão das proteínas Bcl-2 tem sido associada a uma resposta favorável em PDT e pode ser usada para prever a resposta global do cancro à PDT²³.

A libertação de cálcio para o citoplasma provocada pelos danos ocorridos no retículo endoplasmático, ou a libertação de caderinas ou de outras hidrolases pelos danos provocados na membrana lipossomal, acabam por promover a apoptose mitocondrial. Assim, os danos provocados na mitocôndria ativam diretamente a apoptose, enquanto as lesões provocadas no retículo endoplasmático e/ou no lisossoma promovem a via mitocondrial central da apoptose²².

2.5.1.2 Autofagia

A autofagia é um processo altamente controlado em que organelos celulares, incluindo organelos completos, são captados para vesículas membranares, fundidas com lisossomas,

para degradação e reutilização dos componentes celulares^{22,39}. Este processo é controlado pela família de genes associados à autofagia (*Atg*, do inglês *family of autophagy-related genes*)^{18,22}.

A autofagia é regulada pelas vias de sinalização da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) classe I e II, as quais têm sido relacionadas com a inibição ou indução da autofagia, respetivamente. A formação e realização do sequestro das vesículas é um processo que é altamente controlado por vários reguladores autofágicos dos quais Atg/Beclin 1 e Atg8/LC3²².

A contribuição funcional deste processo na morte celular é ainda incerta, assim como é incerto se a autofagia contribui diretamente para a morte celular ou se é um mecanismo fracassado para preservar a viabilidade. No entanto, vários estudos realizados apontam que a autofagia regula o desenvolvimento e progressão do cancro, assim como regula a resposta a terapias citotóxicas²².

Estudos recentes mostraram que a PDT pode induzir autofagia, eventualmente, devido à alta reatividade das ROS produzidas. A autofagia é iniciada numa tentativa de remover os organelos lesados ou para degradar agregados de proteínas, produzidas pelas reações fotodinâmicas, as quais não podem ser removidas pela ubiquitina. No entanto, como a autofagia é um processo autolimitado, é possível que a sua persistência induza um colapso metabólico e bioenergético suficiente para provocar a morte celular²².

A localização subcelular específica ou o organelo celular onde ocorrem danos provocados pelas ROS, são fatores que influenciam o resultado do processo autofágico, figura 14. Estudos em células de mamíferos mostram que a mitofagia, uma forma especializada de autofagia na qual há ativação por danos na mitocôndria, muitas vezes precede a apoptose e requer a inibição de caspases para ser bem sucedida. O que ainda não está completamente bem esclarecido é se a mitofagia atrasa a morte celular, por evitar a libertação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria ou se acelera a morte celular por degradação da produção ATP²².

Células em que o retículo endoplasmático é o principal organelo lesado e a mitocôndria não sofre grandes alterações, como no caso de células deficiente em Bax, a autofagia pode ter como alvo o retículo endoplasmático por um mecanismo de degradação que resulta na ativação de vias de morte celular, embora o mecanismo ainda não se conheça. Em células onde a mitocôndria sofreu permeabilização das membranas e as caspases são ativadas em resposta à PDT, a função da via autofágica iniciada por dano no retículo endoplasmático pode estar envolvida. Estudos recentes em células de mamíferos onde o retículo endoplasmático é o principal alvo para degradação autofágica, a autofagia foi induzida após stresse do retículo endoplasmático. Contudo, são necessários mais estudos para identificar os mediadores moleculares que podem estar implícitos na indução autofagia e tentar perceber melhor a interação entre a autofagia e a maquinaria apoptótica em células de cancro expostas a PDT²².

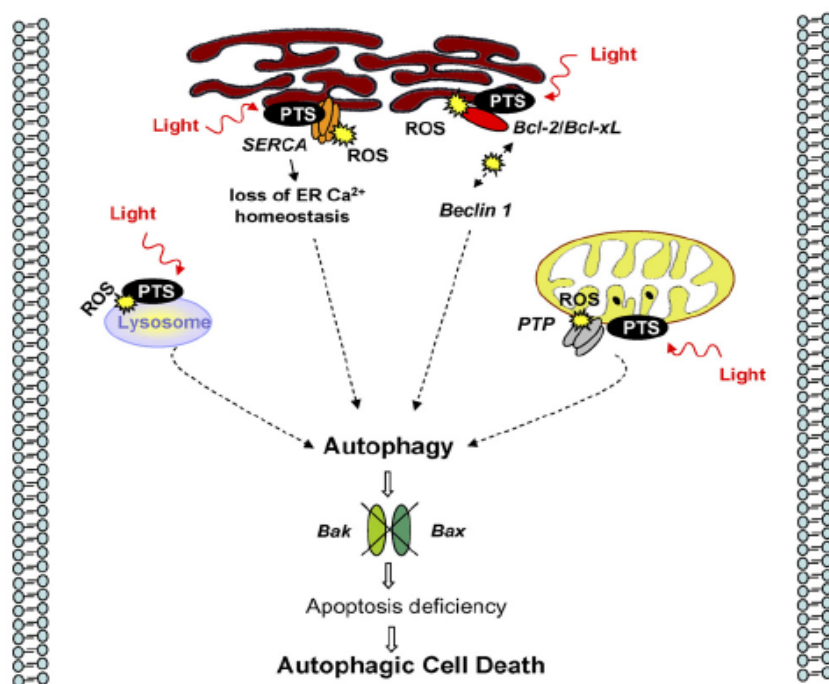


Figura 14- Indução da autofagia por danos foto-oxidativos nos organelos intracelulares. Danos ocorridos em organelos chave, tais como o retículo endoplasmático, mitocôndria e lisossomas a autofagia pode ser induzida como parte de uma via de sobrevivência numa tentativa de remover os organelos disfuncionais. Danos no retículo endoplasmático ou especificamente nas proteínas anti-apoptóticas Bcl-2/Bcl-xL, podem alterar a interação com a Beclin 1, favorecendo a autofagia. Em células apoptoticamente deficientes, células sem proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, a autofagia é induzida²².

2.5.1.3 Necrose

A necrose é morfologicamente caracterizada pelo aumento do volume celular e ruptura da membrana plasmática, resultando numa reação inflamatória devido à libertação do conteúdo celular e moléculas pró-inflamatórias^{22,23}. É sugerido que o processo de necrose resulte de uma catástrofe bio-energética com depleção de ATP a um nível incompatível com a sobrevivência celular²². Contudo, apesar de a necrose ser definida há muito tempo como sendo uma forma de morte celular passiva e desorganizada, evidências recentes sugerem que a morte por necrose pode ser programada ativamente como parte de uma via de transdução de sinal. Por exemplo, o envolvimento do TNF e dos recetores Fas em certas linhas celulares iniciam necrose por ativação de RIP1 (receptor interacting protein 1), sob a inibição de caspases. Além disso, RIP1 tem sido sugerido como um elemento chave na cascata necrótica mediada por c-Jun N-terminal kinase (JNK) ativada pela PARP-1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1) após lesão por stress oxidativo. Isto sugere que, em determinadas circunstâncias, a morte celular por necrose pode recorrer à ativação de um programa intracelular em resposta a estímulos específicos²².

A necrose é o principal tipo de morte induzido quando os fotossensibilizadores se localizam na membrana plasmática, provavelmente, devido à perda da integridade da mesma. Estudos

realizados com o Photofrin[®] e com a ftalocianina de zinco (II), mostraram uma incapacidade em manter o fluxo de íons através da membrana plasmática e uma brusca redução de ATP²².

A grande diferença entre a necrose *versus* a autofagia e a apoptose é a existência de uma resposta inflamatória provocada pela necrose, no entanto, pode gerar uma resposta imunológica anti-tumoral⁴⁰.

2.6 Efeitos vasculares

O crescimento dos tumores sólidos deve-se à sua habilidade em adquirir um aporte sanguíneo adequado. Muitos trabalhos têm-se focado no desenvolvimento de agentes antiangiogênicos, e mais recentemente, tem-se tornado evidente que a destruição da vascularização tumoral representa um caminho complementar para o desenvolvimento de novas oportunidades terapêuticas⁴¹.

Foi reconhecido desde o início dos anos 80, que um mecanismo adicional indireto coexiste com o efeito citotóxico da PDT, que é o efeito de obstrução vascular o qual provoca morte por indução de isquemia e, portanto, fornece outra via para o tratamento dos câncros sólidos. Posteriormente, vários estudos pré-clínicos demonstraram que os mecanismos relativos aos efeitos vasculares variam com os fotossensibilizadores e tecidos-alvo⁴¹.

A irradiação dos fotossensibilizadores, confinados na circulação sanguínea ou acumulados nas células endoteliais ou ainda ligados às paredes dos vasos, induzem um dano colateral nas células endoteliais, que se caracteriza pela perda das *tight* junções. Estes danos primários dentro do lúmen dos vasos conduzem à formação de trombos e induzem uma cascata de reações, nomeadamente, agregação plaquetar, libertação de moléculas vasoconstritoras, adesão linfocitária e aumento da permeabilização vascular. Este colapso microvascular associado a microhemorragia pode causar severa hipóxia tissular^{41,42}.

Os fotossensibilizadores ligados a moléculas transportadoras como a albumina, lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high density protein*) ou LDL, aparentam ter uma maior afinidade para as células endoteliais e para o endotélio microvascular porque existe uma grande quantidade de recetores específicos para estas proteínas. Este facto pode levar a uma maior captação e retenção pelos tecidos tumorais. Embora se possa esperar que a localização do fotossensibilizador em ambos os compartimentos, tecido alvo e tecido vascular, possa produzir um efeito combinado forte, muitos investigadores têm mostrado que a resposta tumoral, cujo alvo é o tecido vascular não está correlacionada com a concentração celular do fotossensibilizador no tumor tratado⁴¹. Assim, na PDT com alvo no tecido vascular próximo do tumor, a irradiação deve ser aplicada quando a concentração do fotossensibilizador é máxima no plasma, ou seja, durante e após administração do fotossensibilizador de modo a maximizar o efeito da PDT^{41,43}.

2.7 Resposta Imune

Vários estudos sugerem que a PDT induz uma resposta imune no hospedeiro. Esta tanto pode ser imunoestimulatória como imunossupressiva. Uma resposta imunoestimulatória pode melhorar ainda mais os efeitos terapêuticos no tumor primário assim como nas metástases⁴¹.

Existem pelo menos três fatores preponderantes que evidenciam estar relacionados com a indução de uma forte resposta imune após o tratamento com PDT⁴⁴. A PDT induz stresse oxidativo que desencadeia uma variedade de vias de transdução do sinal celular, que levam ao aumento da expressão de proteínas de choque ou chaperonas, principalmente as HSP70, e à ativação de fatores transcricionais que regulam a expressão de vários genes. Os fatores transcricionais ativados com maior interesse são o fator nuclear Kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) e a proteína ativadora-1 (AP-1, do inglês *ativador protein*), os quais regulam a expressão de várias citocinas e quimiocinas, tais como, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , e G-CSF^{44,45}. Algumas destas podem desempenhar papéis importantes na regulação da resposta imune do hospedeiro, envolvendo tanto células linfoides como não linfoides⁴¹. Um envolvimento massivo de citocinas na resposta imune induzida contribui para aumentar a eficácia terapêutica através da modulação de mediadores inflamatórios e imunológicos importantes⁴⁵.

Outro fator importante que contribui para que a PDT induza uma resposta imune são os danos pró-inflamatórios que ocorrem nas membranas celulares e nas paredes dos vasos sanguíneos do tumor tratado durante e após o tratamento fotodinâmico. Conseqüentemente, ocorre recrutamento de células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*), neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos⁵⁰⁻⁴⁶. Alguns estudos evidenciam que uma acumulação rápida de um grande número de neutrófilos no local tratado provoca um maior impacto sobre a destruição tumoral. Por sua vez, a depleção dos mesmos diminui a taxa de ablação tumoral⁴².

A natureza, a taxa e a extensão de células tumorais mortas após a PDT podem também ter um papel relevante na determinação da resposta imune antitumoral. Grandes quantidades de restos celulares são formadas no local do tumor. Estes detritos facilitam a captação e a apresentação de antígenos pelos macrófagos e células dendríticas, assegurando o reconhecimento pelos linfócitos T e sua subsequente ativação⁴⁴. Após ativação dos linfócitos a sua ação, não se limita ao local tratado, podendo agir a distância, em especial sobre as metástases do tumor, conseqüentemente. Embora a PDT seja um tipo de tratamento localizado para o local do tumor, os seus efeitos podem ser sistêmicos através da indução de uma resposta imune⁴².

Apesar de a PDT ter a capacidade de estimular uma resposta imune antitumoral, esta nem sempre se verifica. A explicação para este acontecimento pode ser devido à disfunção das células dendríticas causada pelo tumor e que leva a uma resposta imunossupressiva⁴⁵.

2.8 Luz

Ao realizar um tratamento de PDT, é indispensável que a luz seja entregue de uma forma adequada ao tecido alvo, para que o efeito fototerapêutico seja eficaz. Para tal, é necessário compreender de que forma a luz se propaga através dos vários tecidos e quais os efeitos associados aos processos de absorção e dispersão da luz. A importância de ambos os processos depende do tipo de tecido e do λ da luz utilizado.

Os tecidos biológicos são suspensões coloidais heterogêneas causadas pela presença de macromoléculas, organelos celulares, camadas intersticiais, etc. Em presenças de meios coloidais, o feixe de luz sofre dispersão, diminuindo assim a direcionalidade do mesmo. A absorção deve-se principalmente a cromóforos endógenos existentes nos tecidos, tais como hemoglobina, mioglobina e citocromos^{23,47}.

A fonte de luz deve possuir características espectrais adequadas que coincidam com o λ de máxima de absorção do fotossensibilizador, de forma a produzir o máximo de ROS^{23,47}. A fotossensibilização pode ser eventualmente afetada por cromóforos endógenos, tais como a melanina, a qual compete com o fotossensibilizador pela absorção de luz.

Qualquer fonte de luz, até mesmo o sol (muitas vezes de forma não intencional), pode ser usada como aplicador de irradiação em PDT⁴⁸. No início, a PDT era realizada com recurso a lâmpadas convencionais que produziam muito calor (rendimento luminoso baix, policromáticas) ou até simples projetores, e ambos produziam luz incoerente, cujo *output* era definido através de filtros. As intensidades de luz emitidas por esses aparelhos eram baixas, e para além disso os locais de irradiação estavam restritos a locais de fácil acesso, como a pele^{47,49}. Hoje em dia, estes tipos de fontes ainda são utilizados, mas em estudos *in vitro* e em estudos pré-clínicos *in vivo* de tumores implantados na pele ou sob a mesma⁴⁷. As vantagens da utilização deste tipo de fonte são o seu baixo custo e simplicidade^{47,49}.

O desenvolvimento de lasers foi um importante passo em PDT, os quais hoje em dia são as fontes de luz *standard* para aplicações clínicas com PDT. Isto deve-se às suas características de caráter monocromático, elevado *output*, e fácil acoplamento de fibras óticas para entrega de luz via endoscópica em cavidades corporais ou implantes intersticiais^{47,49}. Os lasers podem ser utilizados para fins terapêuticos e podem também ser utilizados como ferramenta de diagnóstico⁴⁷. Dos lasers mais utilizados encontram-se os lasers de corantes sintonizáveis, devido à sua versatilidade em relação à seleção do λ . Um dos avanços recentes na prática clínica com PDT é o desenvolvimento de lasers de diodo e que se encontram disponíveis com λ compatível para os fotossensibilizadores atualmente utilizados. Estes lasers apresentam excelentes vantagens, pois são relativamente baratos, pequenos, pelo que podem ser facilmente transportados, bastante fiáveis e não requerem um sistema de refrigeração externo^{47,49}.

Atualmente, os lasers monocromáticos coerentes e as fibras óticas de fio único proporcionam a flexibilidade requerida para uma entrega adequada da luz a lesões localizadas em qualquer parte do corpo, por técnicas endoscópicas ou intracavitárias. A escolha do sistema de entrega de luz é regida pelas características do sistema de laser, pela natureza e pela localização do tecido em causa. A ponta da fibra ótica pode ser ajustável às características da lesão. Como por exemplo, a introdução de lentes na ponta da fibra ótica proporciona um espalhamento uniforme do feixe sobre a área do tecido alvo e pode uniformizar a intensidade^{47,49}. Estas propriedades são de extrema relevância para o *design* e computação dos alvos óticos ou modificações do tipo de fibras.

Recentemente, tem-se investigado um novo método endoscópico para PDT, que permite a visualização e verificação da luz no tecido alvo, através da utilização de uma câmara de vídeo. Este tipo de equipamento é mantido a 1-2 cm do alvo⁴⁷.

2.9 Oxigénio

Quando a PDT surgiu como tratamento anticâncer, esperava-se que este tipo de tratamento pudesse não ser afetado pela pressão parcial de oxigénio, ou que pelo menos que fosse eficiente num ambiente pobre em oxigénio. Contudo, está provado que com pressões muito reduzidas de oxigénio, o efeito fototerapêutico é muito menos eficiente, e que as células tumorais hipóxicas de tumores sólidos são geralmente resistentes à PDT^{41,47,50}. Existem dois tipos de hipóxia: 1) células hipóxicas pré-existentes, resultado da pobre vascularização existente em determinadas zonas de muitos tumores sólidos; 2) o processo de PDT, por si só, pode induzir hipóxia aguda devido à rápida depleção local do suplemento de oxigénio. Assim, a formação de ROS e a eficácia terapêutica pode ser afetada pela pressão parcial de oxigénio intratumoral, pela saturação de oxigénio da hemoglobina e pelo microambiente dos tumores sólidos⁴¹. A pressão de O₂ pode ser medida por eléctrodos sensíveis ao oxigénio. Altos níveis de expressão do fator-1 induzível por hipóxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible factor*), e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) são muitas vezes usados como indicadores de hipóxia. Portanto, a monitorização da oxigenação dos tecidos tumorais durante a reação fotodinâmica é essencial para entender os mecanismos fisiológicos básicos e a dosimetria da PDT. Várias práticas têm sido propostas para superar a hipóxia provocada pela depleção de O₂ induzida durante a reação fotodinâmica, como por exemplo, a diminuição da potência ou a irradiação fracionada através de intervalos controlados de luz e escuro^{18,41,47}.

Estas práticas servem para estimular a oxigenação tissular e a reperfusão tumoral compensando a carência de oxigénio provocada pelo processo fotodinâmico. Embora se tenha relatado algum melhoramento da resposta tumoral, foram observadas algumas lacunas nestas técnicas. A redução da potência luminosa e da energia luminosa global, e o fracionamento da

quantidade de luz interferem somente com a depleção de O₂, e não com as células hipóxicas pré-existentes, e para além disso, é necessário aumentar o tempo de tratamento^{18,41}.

Outros métodos têm sido propostos para combater a hipóxia, como por exemplo, a utilização de câmaras de O₂ hiperbáricas, o aumento da solubilidade do oxigênio, indução de hipotermia, etc. Induzir hipotermia tumoral durante a PDT pode acarretar algumas vantagens, nomeadamente, o aumento da ligação do oxigênio à hemoglobina (o efeito de Bohr), a diminuição da atividade metabólica, e o diminuição da reparação dos danos subletais. Estudos realizados em ratos mostraram um aumento no efeito terapêutico, quando os tumores dos ratos foram arrefecidos até 5 °C¹⁸.

Por outro lado, ensaios clínicos em que a PDT foi realizada em câmaras com O₂ hiperbárico evidenciaram melhorias significativas da resposta ao tratamento. A hiperoxigenação mostrou aumentar o tempo de sobrevivência de doentes com carcinoma esofágico. Outros estudos pré-clínicos mostraram que a hiperoxigenação normobárica é tão eficaz, senão mais, do que a oxigenação hiperbárica. Esta hiperoxigenação pode oxigenar células hipóxicas pré-existentes e torná-las mais suscetíveis à PDT e, ao mesmo tempo, compensar a depleção de oxigênio resultante da reação fotodinâmica^{18,41}.

2.10 Dosimetria

A dosimetria é um aspeto muito importante em PDT. A dosimetria permite uma distribuição de dose, uniforme ou não, sobre a área do tecido alvo da PDT, e quantifica o que é captado pelos tecidos normais. Evidentemente, a quantidade ideal de luz para PDT iria somente produzir danos letais na área dos tecidos malignos e poupar os tecidos normais adjacentes. Por outras palavras, a luz suficiente para se obter uma densidade apropriada de fótons absorvidos para obtenção do sucesso da PDT teria que cobrir o tumor tridimensionalmente. Infelizmente, esse sistema de dosimetria ainda não existe^{10,51}.

Sem uma dosimetria adequada não se pode explicar as falhas resultantes da falta de uma quantidade apropriada de fotossensibilizador, de luz ou até mesmo da disponibilidade de O₂. A inexistência de dosimetrias precisas impediu a PDT de mostrar o seu pleno potencial como modalidade terapêutica. Algum trabalho tem-se feito nesta área, nomeadamente, no desenvolvimento de ferramentas de modelagem precisas e sistemas de planeamento quantitativo para a prática clínica^{10,51}.

Estudos têm estabelecido um modelo quantitativo PDT, que combina cálculos dosimétricos de luz baseados no método Monte Carlo com um grupo de equações para cálculo de taxas, com o intuito de entender o processo fotobiológico da PDT^{10,51}. Este modelo pode fornecer informações muito úteis para otimizar a distribuição da luz e a dose de fármaco de modo a maximizar o efeito terapêutico¹⁰.

2.11 Vantagens e Limitações

A PDT é uma modalidade terapêutica, pouco invasiva e oferece várias vantagens em relação às terapias convencionais⁵². Esta modalidade terapêutica requer uma única administração e uma única exposição à luz, não causa mau estar aos doentes, para além disso, pode ser realizada em regime ambulatorio, ao contrário das terapêuticas convencionais, em especial, na quimio e na radioterapia, em que o tratamento para além de ser demorado causa efeitos adversos aos doentes⁵³.

O tratamento fotodinâmico pode ser repetido várias vezes no mesmo local se necessário. Pode ser realizado depois da cirurgia, quimio ou radioterapia. Pode também ser utilizado para tratar diferentes tumores, incluindo tumores resistentes aos outros tratamentos. Estudos recentes têm explorado o potencial da PDT intraoperativa em doentes com doenças peritonias⁵⁴.

A seletividade do fotossensibilizador para o tecido tumoral permite uma alta direcionalidade, que possibilita que este tipo de tratamento seja altamente localizado⁵⁵. Uma vez que o tempo de semivida das ROS formadas pela reação fotodinâmica, não permite que estas se difundam do local onde são formadas, os tecidos normais são salvaguardados. Adicionalmente, como o processo fotodinâmico não provoca a produção de calor, as fibras de colagénio e de elastina do tecido conjuntivo são mantidos intactos, preservando a matriz que serve de suporte à regeneração do tecido permitindo, deste modo, a recuperação sem formação de cicatriz⁵⁶.

Apesar de o fotossensibilizador ser retido preferencialmente pelas células tumorais e a sua atividade ser despoletada por absorção de luz com um λ específico, o fármaco é, no entanto, distribuído pelo corpo todo. Portanto, a administração do fotossensibilizador pode induzir efeitos secundários nos tecidos expostos à luz tais como a pele e os olhos, provocando fotossensibilidade. Outra desvantagem é o facto de a luz não penetrar mais do que cerca de 1 cm de profundidade no tecido usando os lasers standard⁵³.

Uma das maiores limitações da PDT no tratamento oncológico é o *queching* (extinção) da fluorescência pelos fluidos corporais tais como o sangue e outros tecidos normais que limitam a aquisição de dados e a gravação fotográfica ou radiográfica da fluorescência observada endoscopicamente. Estes inconvenientes podem ser contornados através da marcação dos fotossensibilizadores com radionuclídeos^{57,58}. Vários investigadores têm relatado a síntese de vários fotossensibilizadores com vários tipos de cadeias laterais e marcá-los com radionuclídeos para o desenvolvimento de novos agentes tumorais e terapêuticos⁵⁵.

3 Radiomarcagem de fotossensibilizadores

Os radiofármacos são compostos marcados com um núcleo instável, o qual permite a visualização do comportamento do composto nos sistemas biológicos. Dependendo do modo de decaimento do radionuclídeo, isto é, por emissão de partículas subatômicas ou fótons, o decaimento radioativo pode ser usado para estudar reações bioquímicas *in vitro* e padrões de distribuição *in vivo*. Compostos marcados com radionuclídeos emissores de partículas beta menos (β^-) são particularmente interessantes para estudos *in vitro*. Por outro lado, os radionuclídeos emissores de radiação gama ou de positrões são mais adequados para imagens *in vivo*, utilizando as tecnologias da medicina nuclear, das quais a tomografia por emissão de fóton único (SPECT, do inglês *single photon emission computerized tomography*) e a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*)⁵⁹.

Os radiofármacos são administrados intravenosamente, emitindo radiação que é detetada externamente⁶⁰. A PET utiliza radioisótopos emissores de positrões produzidos em ciclotrão, dos quais o flúor-18 (¹⁸F), o carbono-11 (¹¹C), o cobre-64 (⁶⁴Cu), o iodo-124 (¹²⁴I), o ítrio-86 (⁸⁶Y), o oxigênio-15 (¹⁵O) ou o azoto-13 (¹³N), ou num gerador, incluindo o gálio-68 (⁶⁸Ga), são os mais usados. Na PET detetam-se os raios gama (γ) de 511 keV emitidos pela aniquilação dos positrões com os elétrons do meio. A SPECT deteta os raios γ emitidos por radionuclídeos como o iodo-123 (¹²³I), o índio-111 (¹¹¹In), o tecnécio-99m (^{99m}Tc), o gálio-67 (⁶⁷Ga), ou o tálio-201 (²⁰¹Tl). Estes agentes de imagem estão facilmente disponíveis e quando comparados com os radioisótopos utilizados na PET são mais baratos⁶⁰. A energia dos fótons γ em SPECT tem extrema importância, uma vez que as câmaras-gama estão otimizadas para detetarem energias num intervalo de energia de 100-250 keV. As energias da radiação gama emitidas que possuem valores abaixo deste intervalo sofrem demasiada dispersão, enquanto as energias gamas superiores a 250 keV são difíceis de colimar; em ambos os casos as imagens podem não apresentar grande qualidade. Assim, os radioisótopos mais adequados para marcação serão aqueles que emitem fótons γ de energias dentro daquele intervalo⁶¹.

A PET e a SPECT têm aspetos que se complementam. De uma forma geral, a PET apresenta uma resolução superior à SPECT. Outra vantagem da PET em relação à SPECT, é que a quantificação é superior. No entanto, novos desenvolvimentos na tecnologia da SPECT estão a colmatar essas lacunas. As vantagens da SPECT sobre a PET incluem redução do custo, maior gama de radionuclídeos aprovados pela FDA e apresenta flexibilidade para diferenciar múltiplas emissões de energias em simultâneo. Esta última característica permite à SPECT distinguir radiofármacos co-administrados que diferem nos seus alvos e emissão de energias⁶⁰.

Apesar destas duas técnicas de imagem serem diferentes, as diferenças práticas na interpretação física das imagens são subtis. A maior diferença entre ambas é a química dos radiofármacos, ou seja, o *design* e síntese, o que por sua vez se repercute na escolha dos

radionuclídeos emissores de positrões ou de radiação gama. O radionuclídeo emissor β^+ mais importante é o ^{18}F , pois é mais adequado para ligações covalentes a moléculas orgânicas mais pequenas, tais como metabolitos, aminoácidos, e pode manter a estrutura química da molécula sem alterações significativas da sua estrutura e função. Por sua vez, os radionuclídeos metais são importantes em SPECT, mas a sua utilização é limitada porque requerem a ligação a moléculas quelantes e não podem ser incorporados em moléculas pequenas sem interferirem com a sua funcionalidade. Assim, os metais são mais adequados para moléculas maiores. Os radionuclídeos utilizados em SPECT com tempos de semivida maiores são geralmente mais adequados para a farmacocinética lenta dessas moléculas grandes⁶⁰.

O *design* de um radiofármaco requer uma otimização do balanço entre a seletividade para os tecidos-alvo e a sua depuração pelos tecidos normais, assim como as propriedades do decaimento radioativo físico dos radionuclídeos associados. Vários inconvenientes são encontrados no *design* do radiofármaco selecionado. Alguns dos possíveis problemas estão associados à eficiência da entrega do fármaco, à maximização do tempo de retenção do radiofármaco nos tecidos-alvo, ao catabolismo e metabolismo do composto *in vivo*, e à capacidade do composto marcado ser depurado pelos tecidos normais⁶¹.

Como os fotossensibilizadores exibem uma grande seletividade para os tecidos tumorais, várias tentativas têm sido feitas para os marcar com diferentes radionuclídeos, e avaliar o seu potencial uso como agentes de imagem tumoral. A radiomarcagem de fotossensibilizadores pode ser usada para estudar a sua biodistribuição de uma forma não invasiva, identificar os órgãos-alvo e estudar a sua farmacocinética e as vias de excreção. Esta informação pode ser muito profícua para otimizar os protocolos PDT. Diversos derivados das porfirinas e das ftalocianinas (Pc's), devido às suas características, nomeadamente, a grande retenção pelos tecidos tumorais, têm sido testados para marcação com diferentes radionuclídeos⁵⁹. A marcação de fotossensibilizadores com ^3H e ^{14}C tem a vantagem de não alterar as suas propriedades químicas e farmacológicas. Contudo, compostos marcados com ^3H , em especial os derivados de hematoporfirina e de ftalocianina, revelam-se relativamente instáveis. Várias porfirinas foram marcadas com ^{14}C , incluindo o HpD e o Photofrin[®], assim como metal-ftalocianinas sulfonadas. Foram preparadas diferentes [^{14}C]GaPc pela condensação do ácido [^{14}C]ftalálico com o ácido 4-sulfoftalálico na presença de GaCl_3 . Estudos *in vivo* evidenciaram uma alta captação tumoral da [^{14}C]GaPcS₃ trisulfonada 48 h após a administração⁵⁹.

Métodos de marcação direta com ^{18}F (tempo de semivida de 118 min) ao macrociclo tetrapirrólico não têm sido publicados. Porém, Chi e colaboradores publicaram dois métodos de marcação indireta. O primeiro método envolve a condensação de m-anisalaldeído e 4-[^{18}F]fluorobenzaldeído para formar o derivado ^{18}F -porfirina. O segundo método envolve a

condensação de tetrapirano com 4-[18]fluorobenzaldeído, o qual obteve elevadas eficiências de marcação⁵⁹.

A marcação de Pcs com ^{67}Ga (tempo de semivida de 78 h), em que o ^{67}Ga liga diretamente ao centro do macrociclo de uma Pc sulfonada, produz baixas eficiências de marcação. Numa abordagem experimental, o *diethylenetriaminepentaacetic acid* (DTPA) foi ligado nas cadeias laterais da ZnPc formando a ZnPc(DTPA), exibindo elevadas eficiências de marcação com ^{67}Ga e ^{111}In (tempo de semivida de 67,5 h). Este composto mostrou ter maior captação tumoral do que o ^{67}Ga -DTPA ou até mesmo do que o ^{67}Ga na forma de citrato. Este é utilizado clinicamente como agente de imagem tumoral. De forma similar, vários derivados de porfirinas foram marcadas com ^{67}Ga e ^{111}In utilizando substitutos para o DTPA^{59,62}.

O ^{64}Cu (tempo de semivida é de 12,7 h) é facilmente obtido utilizando um ciclotrão, através do bombardeamento do isótopo estável ^{64}Ni com prótons, e o seu tempo de semivida relativamente longo permite adquirir imagens PET 24 h após a administração. Por sua vez, o ^{61}Cu (tempo de semivida de 3,3 h) está também disponível para potenciais aplicações clínicas com PET. *Wrenn et al.* preparam o composto $^{64}\text{CuTSPc}$, que mostrou grande seletividade para lesões cerebrais em modelos animais com tumores cerebrais^{59,62}.

Por outro lado, a ativação de urânio-235 enriquecido (^{235}U) com nêutrons induz fissão nuclear, fornecendo uma potencial aplicação local para terapia com radiação. A $^{235}\text{UO}_2\text{PcS}$ sulfonada, um composto solúvel em água, não tóxico, apresenta elevadas taxas de retenção em tumores cerebrais em ratos, 50:1 em relação aos tecidos normais adjacentes⁵⁹.

O ^{188}Re (tempo de semivida de 17 h) emite partículas β^- , tornando este isótopo adequado para a radioterapia metabólica. Durante o seu decaimento radioativo, são emitidos 3 níveis distintos de β^- , com energias máximas diferentes que variam entre 1,49 e 2,11 MeV, sendo mais abundante a 2,11 MeV (71,6%)⁶³. Como as partículas β^- têm um pequeno percurso dentro dos tecidos há uma baixa exposição dos tecidos normais adjacentes⁶⁴. Partículas β^- de alta energia são eficientes para o tratamento de tumores com grandes áreas⁶⁵. Para além disso, o ^{188}Re ao decair emite também raios gama de 155 keV, apropriados para aquisição de imagem através de uma câmara gama⁶⁶. Deste modo, a eventual marcação de porfirinas com ^{188}Re irá proporcionar um radiofármaco com um efeito duplo, por um lado, uma parte da molécula será um agente de imagem e ao mesmo tempo pode funcionar como agente terapêutico, e por outro lado, a outra parte terá propriedades fotodinâmicas⁵⁹.

Por sua vez o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é o radioisótopo mais utilizado na medicina nuclear. Encontra-se facilmente disponível e a preços relativamente económicos através de um gerador de molibdénio-99 ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$). O seu tempo de semivida favorável, 6 h, e a sua energia de 140 KeV, ideal para a aquisição de imagens utilizando uma câmara gama^{59,66}. Vários fotossensibilizadores têm sido marcados com este radionuclídeo. A PcS_4 é um desses

exemplos, a qual apresentou alta estabilidade em estudos *in vivo*. O HpD, o Photosan[®], e a bacterioclorina foram também marcados com ^{99m}Tc e confirmaram, em estudos *in vivo*, as suas propriedades de retenção pelos tecidos tumorais⁵⁹. Relativamente ao HpD, várias tentativas foram feitas para conseguir marcá-lo com ⁵⁷Co e ⁶⁴Cu, só que a pouca significativa captação tumoral não permitiu a aquisição de imagens esclarecedoras. Análogos de porfirinas marcados com ⁵⁷Co e ¹⁰⁹Pd, apesar de se acumularem em tumores murinos de ratos, a seletividade tumoral em humanos foi menos evidente. Wong e colegas marcaram o HpD com ^{99m}Tc por síntese *in situ*, demonstrando a sua potencialidade para detetar tumores murinos. Contudo, este método requer uma manipulação cuidada do ^{99m}Tc, caso contrário, a eficiência de marcação é baixa e com presença de ^{99m}Tc reduzido/hidrolisado. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que o HpD marcado com ¹¹¹In se localizava em tumores da mama em ratos. Em comparação ao HpD marcado com ^{99m}Tc, o ¹¹¹In-HpD concentrava-se substancialmente no fígado, no baço e uma quantidade ligeiramente superior nos tecidos tumorais. Lavalley e Fawwaz publicaram também um método de marcação de HpD com ¹¹¹In, mas não conseguiram difundir o seu uso clínico, isto porque este radionuclídeo não está facilmente disponível na maioria dos centros nucleares. O ^{99m}Tc, devido às suas características e à sua acessibilidade, foi considerado muito útil para desenvolver marcações com HpD para possíveis aplicações como agente tumoral⁵⁸.

Várias marcações foram feitas do Photofrin[®] com ^{99m}Tc e com ¹¹¹In. Mas, os procedimentos de marcação eram complexos e demorados. Em trabalhos mais recentes, o processo de marcação do Photofrin[®] com ^{99m}Tc foi otimizado, tornando-se mais simples e eficiente. Este procedimento provou ser estável, reproduzível e seguro para o uso em seres humanos⁵⁷. Outras porfirinas foram marcadas com ^{99m}Tc, nomeadamente, *5,10,15,20-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleoxyl)]chorin* (T3,4BCPC). Esta apresenta-se promissora como bom agente tumoral devido à sua favorável taxa tumor/músculo, por exemplo, para tumores mamários em ratos C₃H/J a taxa é de 9.5⁶⁷.

A radiomarkação de fotossensibilizadores tem demonstrado que a grande maioria dos fotossensibilizadores marcados apresenta elevada captação pelos tecidos tumorais. Assim, a radiomarkação de fotossensibilizadores poderá ser utilizada para detetar e tratar tumores, e ainda monitorizar a progressão ou regressão tumoral antes, durante e após a quimioterapia, radioterapia ou PDT.

Capítulo 2

Objetivos

A terapia fotodinâmica tem vindo a mostrar resultados promissores no combate ao cancro e o sucesso desta terapêutica está, entre outros fatores, na dependência do fotossensibilizador selecionado. Os fotossensibilizadores do grupo das porfirinas têm sido associados a uma seletividade inerente para as células tumorais.

A marcação destes compostos com isótopos radioativos constitui uma técnica para esclarecer a sua biodistribuição, otimizar o tratamento fotodinâmico e avaliar a sua potencial utilização como agentes de imagem tumoral.

Nesta sequência, o objetivo principal deste trabalho consiste na marcação radioativa de uma porfirina, a meso-bis[3,4-bis(carboximetileoni)fenil porfirina] (2CPP), com ^{99m}Tc e desenvolver um sistema de controlo de qualidade da marcação radioativa para avaliar a sua pureza radioquímica, através de sistemas de microcromatografia ascendente em camada fina. Associadamente, pretendeu-se determinar a sua estabilidade *in vitro*.

Após otimização da marcação pretendeu-se avaliar a dinâmica de captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP *in vitro* em células de diferentes linhas celulares. Por outro lado, pretendeu-se *in vivo*, estudar a biodistribuição do complexo, identificar o ou os órgãos-alvo, a sua farmacocinética e as vias de excreção. Posteriormente, induziram-se xenotransplantes com células tumorais das linhas em estudo em ratinhos de modo a avaliar a seletividade do complexo para as células tumorais. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar o potencial fotodinâmico da porfirina através da realização de estudos de citotoxicidade em diferentes linhas celulares.

Capítulo 3

Materiais e métodos

De forma a alcançar os objetivos propostos, começou-se por sintetizar o composto. O mesmo foi sintetizado pelo Grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

1. Estudos de química

A síntese do composto 2CPP (ver figura 15) foi realizada de acordo com os seguintes passos:

a) Formação do 3,4-di-(metoxicarbonilmetoxy)benzaldeído

Dissolveram-se 2,07 g de 3,4 di-hidroxibenzaldeído em acetona num balão de fundo redondo de 1 L. De seguida, adicionou-se à solução 5,52 g de carbonato de potássio (K_2CO_3). Posteriormente, adicionaram-se 3,05 mL de α -bromoacetato de metilo e deixou-se a solução em refluxo durante a noite. Depois filtrou-se o precipitado que se formou e aproveitou-se o filtrado. Em seguida, evaporou-se o solvente (acetona) num evaporador rotativo e obteve-se uma massa sólida (1,90 g).

b) Formação de dipirrilmetano (DP)

Adicionaram-se 300 mg de ácido tricloacético, 20 mL de ácido acético, 20 mL de diclorometano e 20 mL de pirrol num balão de fundo redondo de 100 mL. A reação ficou a reagir durante 1 hora e 30 min com refluxo e sob agitação constante. De seguida, lavou-se a solução com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% para remover o ácido acético e com uma solução de carbonato de sódio. Após várias lavagens conseguiu-se obter um composto esverdeado escuro e para confirmar a presença de dipirrilmetano realizou-se uma cromatografia em camada fina, na qual se utilizou diclorometano como fase móvel e vapores de bromo como revelador; confirmou-se a presença de DP pelo aparecimento de uma mancha vermelha. De seguida, procedeu-se a remoção do diclorometano num evaporador rotativo e, posteriormente, a pressão reduzida, retirou-se o excesso de pirrol. Após este procedimento realizou-se uma cromatografia em sílica do resíduo utilizando como fase móvel uma mistura de diclorometano/hexano de 4/1. O produto (sólido branco) origina uma só mancha de cor vermelha quando revelada com vapores de bromo.

1H RMN (ressonância magnética nuclear protónica)($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 3.88 e 3.96 (s, 2H,), 6.03 (m, 2H, 3,3, pirrol-H), 6.14 (m, 2H, 4,4, pirrol-H), 6.55 (m, 2H, 5,5, pirrol-H), 7,83 (bs, 2H, NH); MS (EI): m/z 146 [100%, M^+].

c) Formação da porfirina protegida

Num balão de 1 L adicionaram-se a 650 mL de diclorometano) aproximadamente 980 mg de DP, 1,89 g do aldeído preparado anteriormente e 10 gotas de ácido trifluoroacético (TFA) foram adicionadas. A solução foi agitada durante a noite, resguardada da luz e, posteriormente, neutralizada com trietilamina. Aproximadamente 2,2 g de 2,3-dicloro-r,6-dicianobenzoquinona (DDQ) foram adicionadas à mistura e após 2 h a solução foi evaporada até obter um resíduo sólido. Após dissolução, o resíduo foi sujeito a uma cromatografia em sílica utilizando diclorometano/acetato de etilo (80/20) como eluente, obtendo-se um sólido violeta (740 mg).

d) Obtenção do 2CPP. Hidrólise da porfirina

Dissolveram-se 120 mg da porfirina sintetizada no passo anterior em tetraidrofurano (THF). A esta solução adicionaram-se 120 mg de hidróxido de potássio (KOH) previamente dissolvidos em 1 gota de água. Em seguida, colocou-se a solução sob atmosfera de azoto durante a noite. Posteriormente neutralizou-se a solução com ácido acético. O precipitado formado foi filtrado. O sólido de (2CPP) obtido (69 mg) foi lavado com MeOH e colocou-se na estufa a secar.

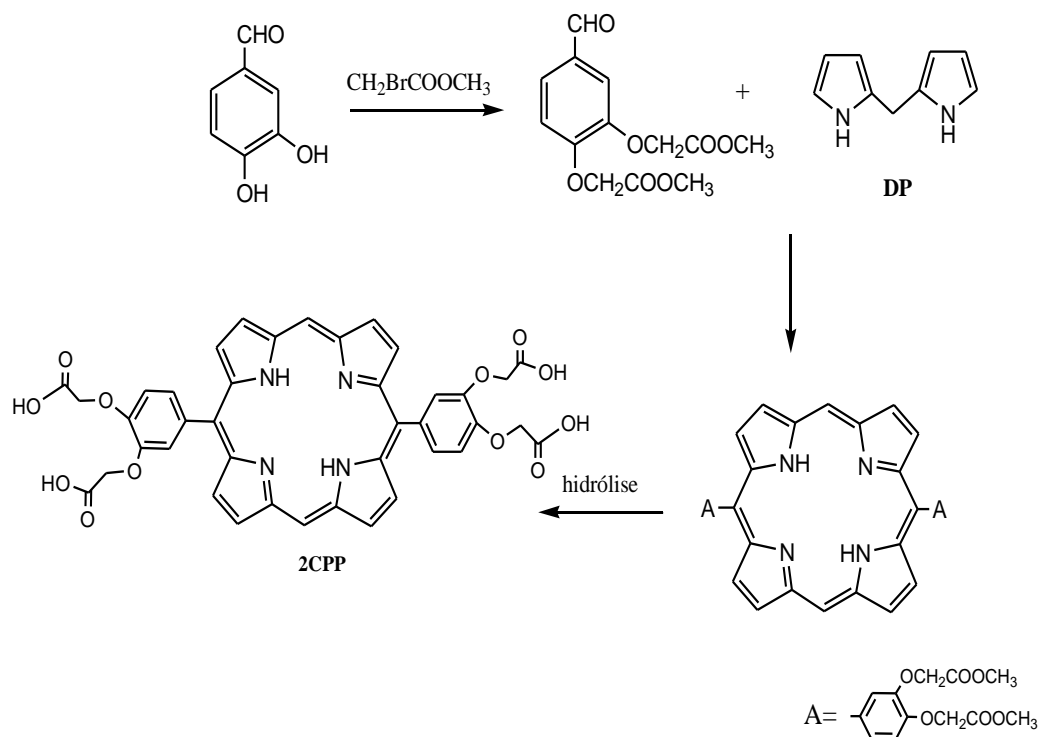


Figura 15. Esquema representativo do procedimento de síntese do 2CPP.

2. Marcação de 2CPP com ^{99m}Tc

Após otimização do procedimento de marcação com ^{99m}Tc estabeleceu-se como protocolo a utilização de 0,4 mg de 2CPP dissolvidos em 0,2 mL de água bidestilada, pH=7, em frasco argonado e selado. Posteriormente, foram adicionados à solução 15 μg de cloreto estanhoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma 208035) dissolvidos em 15 μL de HCl 0,1 N. De seguida, foram adicionados $162,95 \pm 2,828427$ MBq de pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) dissolvidos em 0,5 mL de soro fisiológico (NaCl 0,9%). Após adição do $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$, a solução foi agitada no vórtex durante alguns segundos e foi deixada a incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente (TA) (23 ± 3 °C). A otimização desta marcação radioativa foi conseguida após variação de vários fatores tais como: massa do ligando e do agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), pH, temperatura e atividade do radionuclídeo. As massas de ligando utilizadas variaram de 0,1 a 2 mg, enquanto as massas de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram de 10, 15, 20, 30, 40 e 60 μg . O pH variou de 5-8. As temperaturas testadas foram a TA (23 ± 3), 40, 55, 80 e 100 °C. A atividade variou de 37 a 300 MBq. De modo a avaliar o efeito individual de cada fator na eficiência de marcação, os restantes fatores foram mantidos constantes.

3. Controlo de qualidade

A pureza radioquímica do complexo ^{99m}Tc -2CPP foi avaliada por microcromatografia ascendente em camada fina. Esta técnica consiste num método analítico de separação molecular e físico, em que uma fase móvel (solvente) se move ao longo de uma fase estacionária (adsorvente). A fase estacionária constitui uma camada fina formada por sólido granulado, disposta verticalmente numa câmara. O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na aplicação de volumes muito pequenos, na ordem dos μL , de uma solução da substância radiofarmacêutica a analisar numa tira microcromatográfica. De seguida, a tira é colocada numa câmara de vidro que contém um recipiente com um volume apropriado do solvente, de modo a que a gota da solução não fique submersa no solvente. Após esta preparação, a frente do solvente percorre a tira. As forças eletrostáticas da fase estacionária tendem a retardar os vários compostos, enquanto a fase móvel tende a arrastá-los com ela. Este efeito associado às diferentes solubilidades dos vários componentes da fase móvel origina diferentes velocidades de arrastamento. A polaridade do solvente também afeta a separação cromatográfica dos diferentes constituintes da amostra. Neste processo cromatográfico, cada componente da amostra é caracterizado por um fator de retenção (R_f), o qual é definido como sendo a razão entre a distância percorrida pelo componente e a distância percorrida pela frente do solvente. O R_f varia entre 0 e 1; quando o R_f é igual a 0, significa que o componente permaneceu na origem, e quando R_f igual a 1 o componente migrou com a frente do solvente. A tira é retirada quando a frente do solvente migrou até 2 cm da extremidade superior da tira, figura 16.

Materiais e métodos

Numa formulação radiofarmacêutica marcada com ^{99m}Tc para além do complexo marcado com ^{99m}Tc (^{99m}Tc -2CPP), há a possibilidade de existir dois contaminantes: o tecnécio livre (^{99m}Tc -livre ou $^{99m}\text{TcO}_4^-$) e o tecnécio reduzido/hidrolisado (^{99m}Tc -R/H). Assim, a pureza radioquímica de um complexo de ^{99m}Tc é expressa em percentagem de atividade presente na forma química desejada relativamente à radioatividade total na tira. De modo a discriminar as diferentes espécies de tecnécio, adaptou-se o controlo de qualidade que fora utilizado para o composto *5,10,15,20-tetrakis[3,4-bis(carboxy-methyleneoxy)phenyl]porphyrin* (T3,4BCPC), descrito pelo grupo de S. Murugesan em 2002, no qual, se utilizaram dois sistemas microcromatográficos executados em paralelo. No primeiro sistema utilizaram-se tiras de papel de cromatografia Whatman N° 1 (*Whatman Chromatography Products*) como fase estacionária e soro fisiológico (NaCl 0,9%) como fase móvel. No segundo sistema utilizaram-se tiras de *Instant Thin Layer Chromatography*-Sílica Gel (ITLC-SG, Pall Corporation) como fase estacionária e uma mistura de acetona, etilacetato, água e hidróxido de amónia (7:3:3:0,3, v/v) como fase móvel. Na tabela 1, estão representados os R_f 's das diferentes espécies de tecnécio obtidos com este sistema de controlo de qualidade. O controlo de qualidade anteriormente descrito foi adaptado, alterando-se, somente, as fases móveis. A fase móvel utilizada para o papel Whatman N° 1 foi a acetona e para o ITLC-SG a fase móvel utilizada foi uma solução de acetona, água e amónia (1:20:0,8; v/v). Os R_f 's das diferentes espécies de tecnécio para estes sistemas cromatográficos estão também apresentados na tabela 1.

Tabela 1 Valores dos R_f 's para o $^{99m}\text{TcO}_4^-$, ^{99m}Tc -R/H e ^{99m}Tc -2CPP determinados por microcromatografia de camada fina.

		Valor do R_f		
Fase estacionária	Fase móvel	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	^{99m}Tc -R/H	^{99m}Tc -2CPP
Whatman N° 1	NaCl 0,9%	1,0	0,0	0,0
ITLC-SG	Acetona:etilacetato:água:amónia (7:3:3:0,3, v/v)	1,0	0,0	1,0
Whatman N° 1	Acetona	1,0	0,0	0,0
ITLC-SG	Acetona:água:amónia (1:20:0,8, v/v)	1,0	0,0	1,0

As tiras utilizadas em todos os sistemas microcromatográficos anteriormente descritos foram cortadas com 10 cm de comprimento e 1 cm de largura, sendo delineadas com finos traços feitos a lápis a 1, a 4,5 cm e a 8 cm do início da tira, como se pode observar na figura 16.

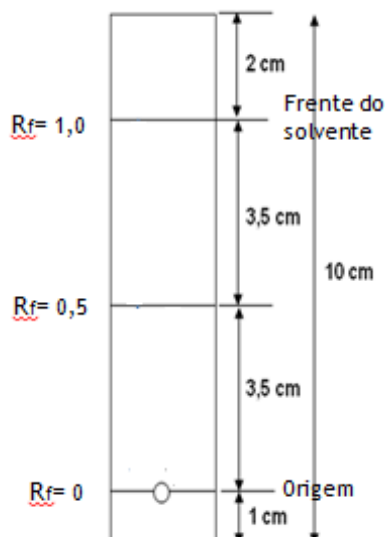


Figura 16 - Representação esquemática de uma tira de microcromatográfica ascendente.

As tiras, após terem sido analisadas por microcromatografia ascendente, foram colocadas sobre o detetor da câmara-gama (GE 400 AC) para aquisição de imagens estáticas das mesmas para um computador GenieAcq que a controla. As imagens foram adquiridas para matrizes 128x128 pixels, zoom 1 com duração de 30 segundos. Posteriormente, as imagens foram transferidas para uma estação de processamento Xeleris, onde foram processadas. O processamento de cada imagem consistiu no desenho de duas regiões de interesse (ROI's, do inglês *regions of interest*) sobre a mesma. Uma consistiu no desenho correspondente à distância percorrida pela frente do solvente, de modo a quantificar toda a atividade contida na tira, designada de "total", figura 17 (A). Enquanto a outra apenas consistiu num desenho correspondente à metade da distância percorrida pela frente do solvente, de modo a quantificar a atividade existente até meio da corrida do solvente, designada de "base", figura 17 (B).

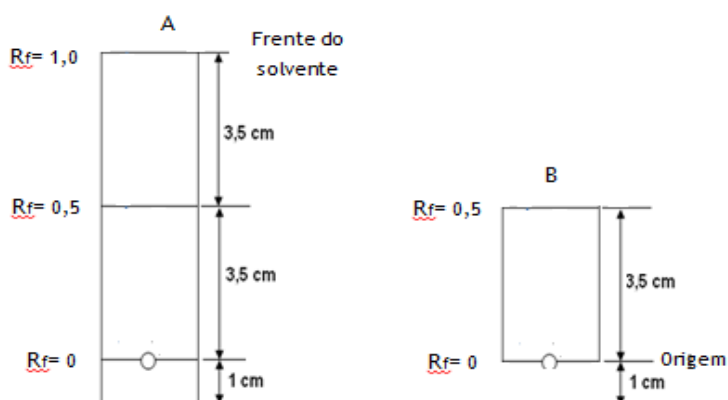


Figura 17 - Esquema representativo das ROI's. A) Total e B) Base.

A percentagem individual de atividade de cada uma das espécies de tecnécio foi determinada de acordo com as seguintes expressões:

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

$${}^{99m}\text{Tc-R/H} = \frac{\text{Atividade}_{\text{Base}}}{\text{Atividade}_{\text{Total}}} \times 100 \quad (2)$$

$${}^{99m}\text{Tc-2CPP} = 100 ({}^{99m}\text{TcO}_4^- + {}^{99m}\text{Tc-R/H}) \quad (3)$$

Assim, a quantificação da pureza radioquímica traduz-se através da expressão 3.

Ambos os controlos de qualidade foram realizados a 20, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min após a preparação do radiofármaco.

4. Estudos *in vitro*

Para avaliar a citotoxicidade do composto 2CPP, assim como avaliar a captação do complexo ${}^{99m}\text{Tc-2CPP}$ pelas células foram realizados estudo *in vitro*. Para a realização dos estudos de citotoxicidade foram utilizadas três linhas celulares tumorais humanas: adenocarcinoma colorretal (WiDr), carcinoma pulmonar de não pequenas células (H1299) e colangiocarcinoma (TFK-1). Para a realização dos estudos de captação foram utilizadas as duas primeiras, ou seja, as linhas celulares WiDr e H1299.

4.1 Culturas Celulares

As linhas celulares WiDr e H1299 foram obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC) e a linha celular TFK-1 foi obtida na *German collection of microorganisms and cell cultures* (DSMZ). Após receção, foram descongeladas e propagadas em cultura aderente de acordo com as instruções dos fornecedores. As linhas celulares foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora HeraCell 150. Para as linhas WiDr e H1299 utilizou-se o meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco 2010-09), 100 µM de piruvato de sódio (Gibco- 11360), e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10µg/mL estreptomicina; Gibco 15140-122). Por outro lado, para a linha TFK-1 utilizou-se o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Sigma R4130) suplementado com 10% soro bovino fetal, 100 µM de piruvato de sódio (Gibco-11360), e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina).

4.2 Estudos de Captação

Os estudos de captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP foram realizados com recurso a um equipamento tecnológico, o *Ligand Tracer*, figura 18. O *LigandTracer* é um instrumento de tecnologia avançada que visa determinar a captação de determinado composto pelas células. Isto é tornado possível através da inclusão de uma área ativa (local onde as células são colocadas) e um na região de referência *situ*, na placa. A placa é colocada sobre um suporte inclinado e a radioatividade é adicionada ao meio de cultura que por ação da gravidade se encontra na parte mais inferior da placa. Em cada rotação as células entram em contato com o meio de cultura onde se encontra o radiofármaco. O detetor encontra-se na parte superior, colimada, para ler apenas a parte da placa que esta livre de líquido e onde se encontram as células, tendo em vista quantificar a captação do radiofármaco pelas células. Para a realização deste estudo foram utilizadas as linhas celulares H1299 e WiDr que foram plaqueadas em placas de Petri, com tempo suficiente para que possam aderir, numa concentração de 2 milhão de células em 1 ml. Aquando do início do estudo foi adicionado ao meio o ^{99m}Tc -2CPP com uma concentração de 25 $\mu\text{Ci/ml}$ decorrendo o estudo sem interrupção durante 120 minutos.



Figura 18 - Equipamento *LigandTracer*, utilizado para a realização de estudos de captação.

O processamento dos dados foi feito recorrendo ao programa *TraceDrawer*. Para a análise dos resultados foi ainda necessário proceder-se a uma calibração, que consistiu em colocar 25 μCi de radiofármaco num algodão e adquirir dados durante 30 minutos. Com os valores dessa calibração pode-se fazer uma normalização dos resultados obtidos com as células o que permitiu obter-se a percentagem de captação.

Com o intuito de comparar a percentagem de captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP com a percentagem de captação ^{99m}Tc -livre, foram realizados estudos de captação de ^{99m}Tc -livre pelas mesmas linhas celulares, mas estes foram realizados manualmente. Deste modo, foi

Materiais e métodos

necessário preparar previamente uma suspensão celular com 2×10^6 células/mL. Para isso, culturas celulares foram incubadas com 3 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante 5 minutos para que ocorresse a separação celular. De seguida, adicionaram-se aproximadamente 9 mL do respetivo meio para inativar a tripsina e centrifugou-se a suspensão celular a 1000 rotações por minutos (rpm) durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio de cultura, de modo a obter uma concentração de 2×10^6 células/mL. De seguida, as células foram deixadas a repousar cerca de 60 minutos, em frascos de 25 cm², à temperatura de 37°C e em atmosfera controlada, com o intuito de recuperar do stresse provocado pela ação enzimática da tripsina.

Posteriormente, foram adicionados, a cada frasco, 2,775 MBq de atividade do complexo ^{99m}Tc-livre. Aos 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos após adição da atividade, foram retirados 200 µL da suspensão celular para tubos de *ependorf* identificados com os diferentes tempos que continham 500 µL de PBS gelado, de modo a diminuir o metabolismo celular. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 5585 g (Costar, EUA) durante 60 segundos, de modo a separar o *pellet* do sobrenadante. Os sobrenadantes foram recolhidos para os tubos identificados com os tempos respetivos e os *pellets* permaneceram nos respetivos tubos de *ependorfs*. Logo de seguida, procedeu-se a uma lavagem do *pellet* com 500 µL de PBS gelado, repetindo o procedimento de separação do sobrenadante de modo a obter a completa rentabilização do sobrenadante. Os sobrenadantes resultantes das centrifugações foram recolhidos para os respetivos tubos e os *pellets* permaneceram nos tubos de *ependorfs*. Após o último tempo, foi determinada a viabilidade das células da suspensão.

Após as incubações das células e a colheita separada dos *pellets* e dos sobrenadantes, foi possível calcular a percentagem de captação do complexo ^{99m}Tc-2CPP pelas células para cada tempo. Para isso foi necessário, no final do procedimento, contabilizar as contagens de ambas as frações, *pellet* e sobrenadante, no contador de poço (DPC Gamma C12) em contagens por minuto (CPM). A percentagem de captação do ^{99m}Tc-2CPP pelas células para cada tempo foi obtida de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Captação} = \frac{\text{CPM}_{\text{pellet}}}{\text{CPM}_{\text{pellet+sobrenadante}}} \times 100 \quad (4)$$

4.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada através do método de exclusão de azul de tripano. Este método é baseado no princípio de que as células viáveis possuem membranas celulares intactas que excluem qualquer corante vital, tal como o azul tripano. Nas células mortas, o corante atravessa a membrana celular, devido ao facto desta se encontrar permeabilizada. Quando observadas ao microscópio, as células mortas podem ser diferenciadas das viáveis pois aparecem coradas de azul, enquanto as células vivas aparentam ter um aspeto brilhante, não coradas de azul. Para determinar a percentagem de viabilidade celular, retiraram-se 10 µl da suspensão incubada com ^{99m}Tc -2CPP ou com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e adicionou-se o mesmo volume de azul tripano (Sigma T0776) num tubo de *ependorf*. De seguida, homogeneizou-se a suspensão celular com o auxílio de uma micropipeta e colocou-se numa câmara de *neubauer*, com posterior contagem das células no microscópio. A contagem das células foi efetuada nos quatro quadrantes da câmara de *neubauer* e a viabilidade celular de cada suspensão celular foi calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{n^\circ \text{ células vivas}}{n^\circ \text{ células vivas} + n^\circ \text{ células mortas}} \times 100 \quad (5)$$

4.4 Estudos de citotoxicidade

De modo a estudar a citotoxicidade do 2CPP nas linhas celulares acima referidas foi realizada a técnica espectrofotométrica UV/Visível, conhecida como ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolim bormide).

4.4.1 Avaliação da Proliferação Celular pelo ensaio do MTT

Para avaliar o efeito do 2CPP na proliferação das células, foi realizado o ensaio do MTT. O MTT é reduzido por células metabolicamente ativas devido à ação das enzimas desidrogenases, principalmente através da ação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a succinato desidrogenase. Deste modo, este método constitui uma forma de avaliar a função mitocondrial. As desidrogenases têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de *formazan* de cor azul escura⁶⁸. Estes cristais podem ser posteriormente solubilizados, e quantificados por meios espectrofotométricos. Assim, a quantidade de cristais formados é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Para a realização deste estudo preparou-se uma suspensão celular com 4×10^4 células/mL em meio de cultura distribuídas por placas de 96 poços (Sarstedt 83.1835), contendo cada poço 200 µL da suspensão. Estas placas foram incubadas *overnight* de modo a permitir a adesão das células às mesmas. Para a aplicação do composto 2CPP foram preparadas 6 soluções com diferentes concentrações: 1 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM, sendo obtidas de modo a permitir a administração do mesmo volume em cada poço, 6 µL. Para todos os ensaios foram realizados dois controlos: culturas não tratadas e culturas onde se adicionaram 6 µL do

Materiais e métodos

solvente com o qual se dissolveram os compostos, água. Após 24 h de incubação, aspirou-se o meio das células e as mesmas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*). Após a lavagem, colocaram-se 100 µL de meio DMEM para as linhas WiDr e H1299, e 100 µL de RPMI para a linha TFK-1 para posterior irradiação. A irradiação das culturas celulares foi realizada recorrendo a uma fonte de luz fluorescente equipada com um filtro vermelho ($\lambda_{\text{cut off}} < 560\text{nm}$), com um fluxo de 7,5 mW/cm² até atingir uma energia total de 10 J. A análise da proliferação celular foi realizada 24, 48 e 72 h após a irradiação. Para avaliar a citotoxicidade do composto 2CPP no “escuro”, ou seja, sem irradiação, foram preparadas culturas celulares de acordo com o procedimento anteriormente descrito, com a exceção do passo da mudança de meio, sendo esta desnecessária já que as células não foram submetidas a irradiação. Neste caso, a análise da proliferação celular foi realizada 24, 48 e 72 h após a administração dos compostos. De modo a avaliar a proliferação celular, o meio das culturas celulares foi retirado, com a posterior adição de 100 µL PBS em cada poço para lavagem. De seguida, adicionaram-se a cada poço 40 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL de PBS, M2128, Sigma), pH 7,4. As placas foram incubadas no escuro a 37°C em atmosfera controlada durante 4 h. Posteriormente, em cada poço, adicionaram-se 40 µL de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol de forma a solubilizar os cristais de *formazan* formados. As placas foram deixadas em agitação até que os cristais se dissolvessem por completo. De seguida, a absorvância foi quantificada a 570 nm com um filtro de referência de 620nm, utilizando o espectrofotómetro ELISA (SLT - Spectra).

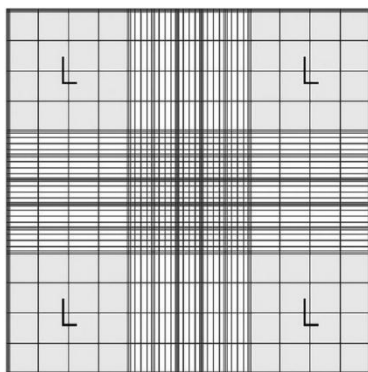


Figura 19 - Esquema representativo dos quatro quadrantes (L) da câmara de *neubauer* utilizados na determinação da viabilidade celular.

5. Estudos in vivo

De modo a estudar o comportamento do ^{99m}Tc -2CPP nos sistemas biológicos, nomeadamente, saber qual a sua biodistribuição, identificar os órgãos-alvo, estudar a sua farmacocinética e as vias de excreção foram realizados estudos *in vivo*. Para tal, utilizaram-se ratinhos Balb/c normais. Com o intuito de saber se o composto ^{99m}Tc -2CPP apresentava seletividade para as células tumorais foram utilizados ratinhos balb/c nu/nu, porque esta estirpe permite o desenvolvimento de xenotransplantes uma vez que são animais atímicos, ou seja, animais deficientes em células T e que por consequência, aceitam células de outra espécie.

5.1 Estudos de biodistribuição em animais normais

Para a realização dos estudos de biodistribuição em animais normais foram utilizados ratinhos Balb/c com um peso variável $22 \pm 2,828427$ g. Os ratinhos foram anestesiados com uma solução de ketamina a 77% (KetalarR, Porke-Davis) e clorpromazina a 23% (LargactilR) administrada por via subcutânea. De seguida, foram injetados na veia dorsal da cauda, com $3,7 \pm 0,74$ MBq de ^{99m}Tc -2CPP com o animal colocado sobre o colimador de uma câmara-gama. Após administração da atividade, os animais foram mortos, por deslocamento cervical, de acordo com a legislação em vigor, aos 30, 120, 240 e 360 minutos depois da administração do ^{99m}Tc -2CPP. Posteriormente, foram retiradas amostras de diferentes fluidos, órgãos e tecidos, dos quais urina, sangue, fígado, baço, pulmão, coração, intestino grosso, intestino delgado, tireoide, cérebro, cerebelo, bexiga, cartilagem, osso, cartilagem, bÍlis, músculo, rins e vesícula biliar. Cada fluido, órgão ou tecido foi pesado (em gramas) e as suas CPM foram medidas num contador de poço (DPC Gamma C12). Com os valores das CPM obtidos, e após conversão para atividade, calculou-se a percentagem de ^{99m}Tc -2CPP administrado por grama de fluido/órgão/tecido (% atividade injetada/grama), de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ dose injetada/g} = \frac{CPM_{\text{totais do órgão/massa órgão}}}{CPM_{\text{atividade total injetada}}} \times 100 \quad (6)$$

5.2 Biodistribuição em ratinhos com xenotransplantes

Para realizar estes estudos de biodistribuição foi necessário transplantar uma suspensão celular de 15×10^6 em ratinhos Balb/c nu/nu na região do cavado axilar. Esta região foi a selecionada porque acarreta algumas vantagens, sendo de realçar o facto de esta região ser contralateral ao coração, ficar distante do fígado, do rim e da bexiga, evitando deste modo a sobreposição com as projeções das áreas cardíaca, hepática, renal ou visceral. Para além disso, permite um rápido desenvolvimento do xenotransplante uma vez que é uma boa área para expansão e bastante vascularizada. O procedimento efetuado para realizar os estudos de biodistribuição foi semelhante ao realizado nos ratinhos balb/c normais. No entanto, para além da amostra dos órgãos/fluidos/tecidos referidos, o tumor também foi excisado, pesado e as contagens do mesmo foram medidas no contador de poço. De modo a avaliar a

seletividade do composto para as células tumorais foi calculada a razão tumor/músculo, que consiste na razão entre a % de atividade injetada/grama do tumor e a % de atividade injetada/grama do músculo.

5.3 Imagiologia

Os estudos de imagiologia nuclear com ^{99m}Tc -2CPP foram realizados antes de os ratinhos serem sacrificados para a realização de estudos de biodistribuição. Para estes estudos utilizaram-se ratinhos *Balb/c nu/nu* após anestesia, segundo o protocolo referido na secção 5.1. Imediatamente após a injeção de $3,7 \pm 0,74$ MBq de ^{99m}Tc -2CPP na veia dorsal da cauda, iniciou-se uma aquisição dinâmica através de uma câmara-gama, colimada com colimador paralelo de alta resolução e baixa energia, para um computador de aquisição GenieAcq, que a controla. Esta aquisição dinâmica foi feita em duas fases sequenciais, a primeira constituída por 60 imagens de duração individual de 1 segundo e a segunda por 18 imagens de 10 segundos cada, para matrizes de 128×128 pixéis, zoom 2. Após esta aquisição, adquiriram-se imagens estáticas para matrizes de 256×256 elementos de resolução de imagem (pixéis), com duração individual de 2 minutos, e igualmente com zoom 2, aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240, 270, 310, 330, e 360 minutos após a administração do ^{99m}Tc -2CPP. As imagens adquiridas foram transferidas para uma estação de processamento Xeleris, onde foram processadas.

6. Estabilidade no soro sanguíneo humano

Para determinar a estabilidade no soro sanguíneo humano foram preparadas amostras 6 com 0,5 mL do mesmo. A cada amostra foi adicionado aproximadamente 1,6 MBq de ^{99m}Tc -2CPP. De seguida, todas as amostras foram incubadas a uma temperatura de 37°C . Alíquotas de 5 μL de cada amostra foram retiradas em diferentes intervalos de tempo 30, 120 e 360 min, e após recolha foram analisadas por microcromatografia de camada ascendente.

7. Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição ($\log P$) do complexo ^{99m}Tc -2CPP foi calculado através da determinação de P (P = a razão entre a atividades da fase orgânica e a atividade da fase aquosa). Uma mistura de 1 mL de 1-octanol (Sigma O-4500) e 1 mL de soro fisiológico (NaCl 0,9%) contendo 16 MBq de ^{99m}Tc -2CPP foi agitada no vórtex durante 1 min e deixada a repousar durante 5 min. De seguida, a mistura foi centrifugada a 1200 g durante 5 minutos, alíquotas iguais de cada fase foram retiradas e as contagens de cada parte foram medidas num contador de poço. A determinação de P foi feita pela média dos valores de 4 a 5 ensaios independentes.

8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software IBM SPSS Statistics v.19*. Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio-padrão) para as variáveis quantitativas. Para a razão tumor/músculo utilizou-se o intervalo de confiança de 95%.

A normalidade da distribuição dos valores foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk, para determinar o tipo de teste a usar: no caso de uma distribuição normal utilizam-se testes paramétricos, caso contrário utilizam-se testes não paramétricos. Para comparar a captação entre as celulares recorreu-se ao teste ANOVA de um fator (teste paramétrico) ou ao teste de Kruskal-Wallis em caso contrário. As comparações múltiplas foram feitas com recurso à correcção de Bonferroni.

Para comparar os dois compostos para o mesmo tempo e para a mesma linha celular foi realizado o teste t-student (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não paramétrico).

Na comparação dos resultados das captações ao longo do tempo usou-se o teste de variância de Friedman.

Na comparação global entre linhas celulares, tendo em conta o fato de haver medidas repetidas ao longo com um fator com três categorias independentes (linha celular) recorreu-se ao General Linear Model com medidas repetidas.

A análise da razão tumor/músculo foi efetuada com recurso ao teste t-student para uma média, comparando os intervalos de confiança obtidos para cada tempo com o valor 1 (que representa igual captação pelo tumor e pelo músculo).

Foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Capítulo 4

Resultados¹

1. Estudos de química

1.1 Síntese do 2CPP

O composto obtido no 1º passo da síntese do 2CPP, o 3,4-di (metoxycarbonilmetoxy) benzaldeído, foi caracterizado por ressonância magnética nuclear protónica (RMN), figura 20.

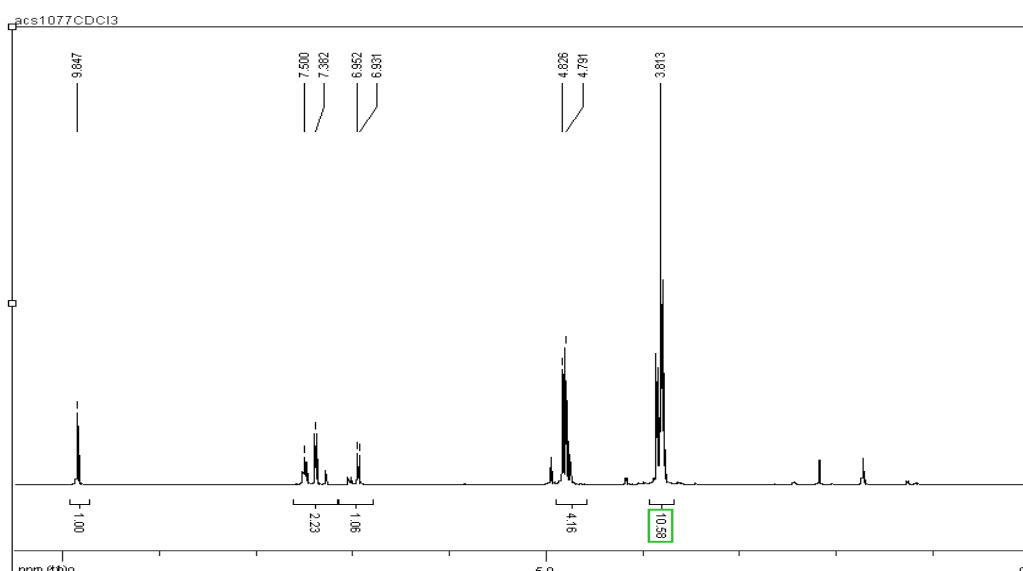


Figura 20 - Espectro do 3,4-di-(metoxycarbonilmetoxy) benzaldeído, obtido por RMN.

¹ Os resultados aqui apresentados foram obtidos em co-autoria com a Mestre Mafalda Sofia Laranjo Cândido

Resultados

De modo a confirmar a presença de formação da porfirina desprotegida (3º passo), o produto obtido foi caracterizado por RMN, figura 21.

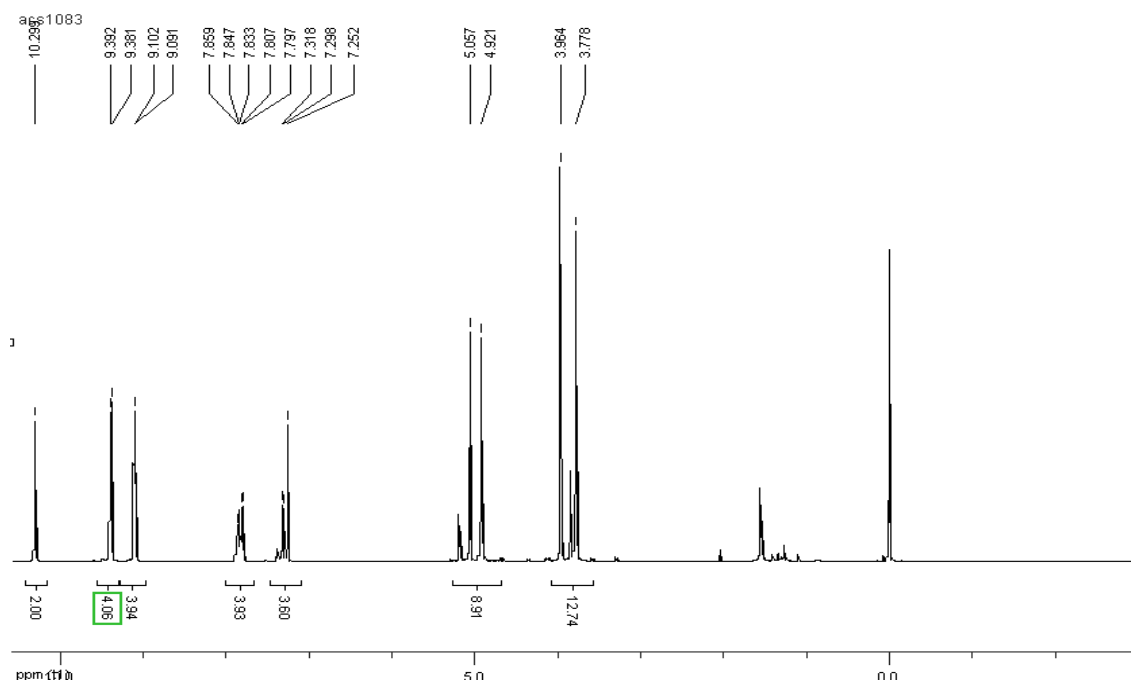


Figura 21 - Espectro da porfirina desprotegida obtido por RMN.

No 4º passo da síntese do 2CPP, o produto foi caracterizado por RMN (DMSO/D2O) e por espectrometria de massa MS (Maldi/TOF): m/z 758 [100%, M^+], resultados na figura 22. O espectro foi obtido com supressão do sinal da água.

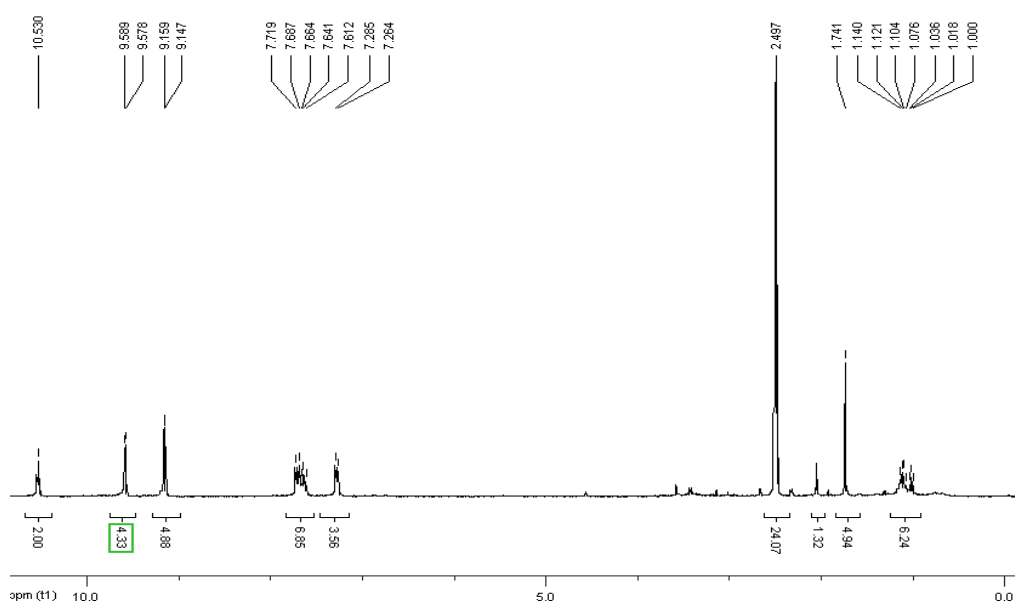


Figura 22 - Espectro do composto 2CPP obtido por RMN e MS.

2. Marcação e controlo de qualidade do ^{99m}Tc -2CPP

Após diversas tentativas para otimizar o procedimento de marcação, o máximo de pureza radioquímica, aproximadamente 92%, foi atingido utilizando 0,4 mg de 2CPP, pH 7, 15 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $162,8 \pm 2,6$ MBq de Tecnécio.

O controlo de qualidade, inicialmente, utilizado consistiu na utilização de dois sistemas cromatográficos. No primeiro sistema utilizaram-se tiras de papel de cromatografia Whatman No 1 (*Whatman Chromatography Products*) como fase estacionária e soro fisiológico (NaCl 0,9%) como fase móvel. No segundo sistema utilizaram-se tiras *Instant Thin Layer Chromatography* Sílica Gel (ITLC-SG, Pall Corporation) como fase estacionária e uma mistura de acetona, etilacetato, água e hidróxido de amónia (7:3:3:0,3;v/v) como fase móvel. Posteriormente, este controlo de qualidade foi adaptado, alterando-se, somente, as fases móveis. A fase móvel utilizada para o papel Whatman No 1 foi a acetona e para o ITLC-SG a fase móvel utilizada foi uma solução de acetona, água e amónia (1:20:0,8; v/v). Apesar das condições avaliadas por esses dois controlos de qualidade serem similares os resultados obtidos foram completamente díspares.

Os resultados que se seguem são os resultados referentes ao primeiro controlo de qualidade utilizado. Após a avaliação de diferentes testes para otimizar a formulação radiofarmacêutica com uma elevada pureza radioquímica, esta não foi conseguida. As condições que foram avaliadas utilizando este controlo de qualidade consistiram em: variar o pH entre 5,5 a 8,0, a quantidade de cloreto estanhoso entre 10-60 μg , a temperatura de incubação entre TA-100 $^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente, também se variou a quantidade do ligando e a atividade do radionuclídeo, resultados não mostrados. Como foi referido no capítulo anterior, de modo a determinar o impacto individual de cada fator na eficiência de marcação, os restantes foram mantidos constantes.

Os resultados do efeito do pH na eficiência de marcação estão apresentados na figura 23. Como se pode observar, a eficiência de marcação aumenta com o aumento do pH até 7 e decresce a partir desse valor. Contudo, há uma grande percentagem de ^{99m}Tc -2CP reduzido e de ^{99m}Tc -livre em todos os valores de pH testados.

Resultados

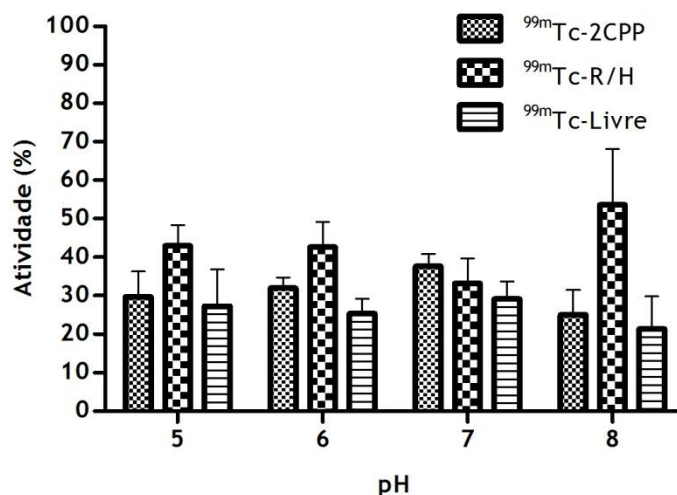


Figura 23 - Efeito do pH na eficiência de marcação do $^{99m}\text{Tc-2CPP}$. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experiências independentes. Controle de qualidade inicial.

Os resultados do efeito da quantidade de cloreto estanhoso na eficiência de marcação são apresentados na figura 24. Para as massas mais baixas de cloreto estanhoso, a porcentagem de $^{99m}\text{Tc-livre}$ é relativamente grande, enquanto para as massas maiores a porcentagem de $^{99m}\text{Tc-R/H}$ aumenta até cerca de 90%. No entanto, independentemente da massa utilizada a eficiência de marcação do composto nunca foi superior a 40%.

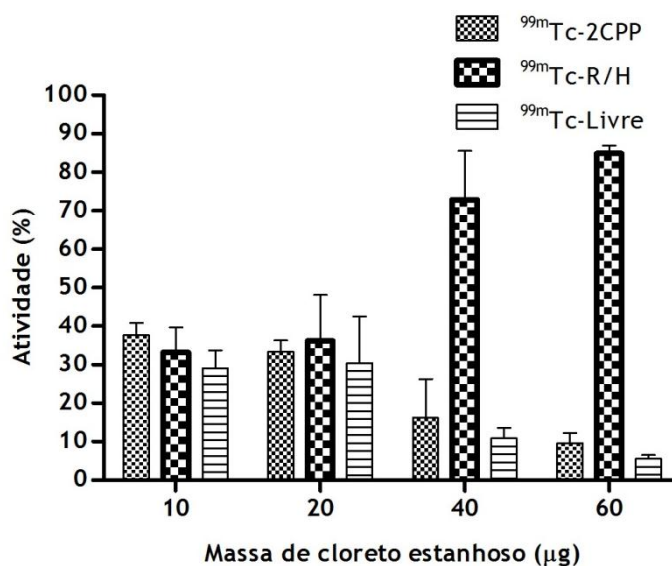


Figura 24 - Efeito da massa de cloreto estanhoso na eficiência de marcação do $^{99m}\text{Tc-2CPP}$. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experiências independentes. Controle de qualidade inicial.

Na figura 25 estão apresentados os resultados do efeito da variação da temperatura de incubação na eficiência de marcação, e pode observar-se que os valores de eficiência de marcação mais elevados são os obtidos à temperatura ambiente, no entanto, os valores atingidos são relativamente baixos, só aproximadamente 37% de ligando marcado. De realçar o facto de existirem grandes quantidades de $^{99m}\text{Tc-R/H}$ com o aumento da temperatura.

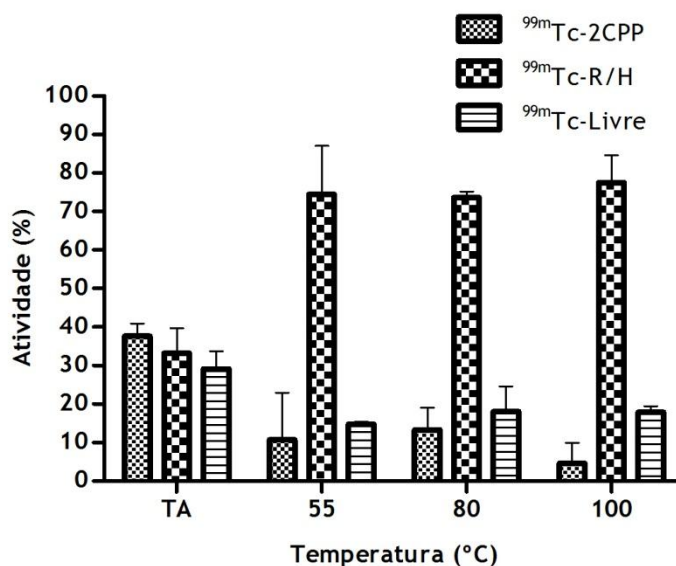


Figura 25 - Efeito da variação da temperatura de incubação na eficiência de marcação do $^{99m}\text{Tc-2CPP}$. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experiências independentes. Controlo de qualidade inicial.

De seguida, são descritos os resultados relativos ao controlo de qualidade adaptado. Com a utilização destes sistemas cromatográficos foi possível otimizar a eficiência de marcação acima descrita. Para otimizar a eficiência de marcação, as condições que foram avaliadas foram muito similares às que foram avaliadas pelo controlo inicial. Deste modo, o pH variou entre 6-7,5, a quantidade de cloreto estanhoso entre 10-60 μg , a temperatura de incubação entre 23-100 °C. Do mesmo modo, quando se variou um parâmetro, os restantes foram mantidos constantes.

A otimização do processo de marcação proporcionou uma eficiência de marcação aproximadamente de 92% para o $^{99m}\text{Tc-2CPP}$, 6,5% para o $^{99m}\text{Tc-R/H}$ e 1,5% para o $^{99m}\text{Tc-livre}$. Na figura 26 pode observar-se o efeito do tempo na eficiência de marcação para o $^{99m}\text{Tc-2CPP}$, em que esta vai diminuindo suavemente ao longo do tempo. Diferenças estatisticamente significativas só se verificam entre o tempo de 20 min quando comparado com os tempos de 300 e 360 min ($p=0,022$). Assim, podemos concluir que o composto marcado apresenta uma estabilidade temporal superior a 240 min.

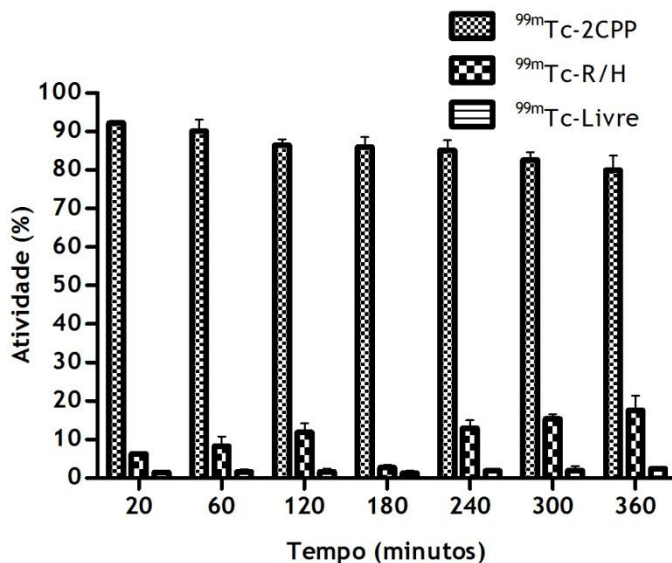


Figura 26 - Efeito do tempo na estabilidade do ^{99m}Tc -2CPP. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. Controle de qualidade adaptado.

A figura 27 apresenta a estabilidade no soro sanguíneo humano, observando-se que a estabilidade é bastante elevada, aproximadamente $86,5 \pm 2,8\%$ e manteve-se constante ao longo do tempo, sem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,846$).

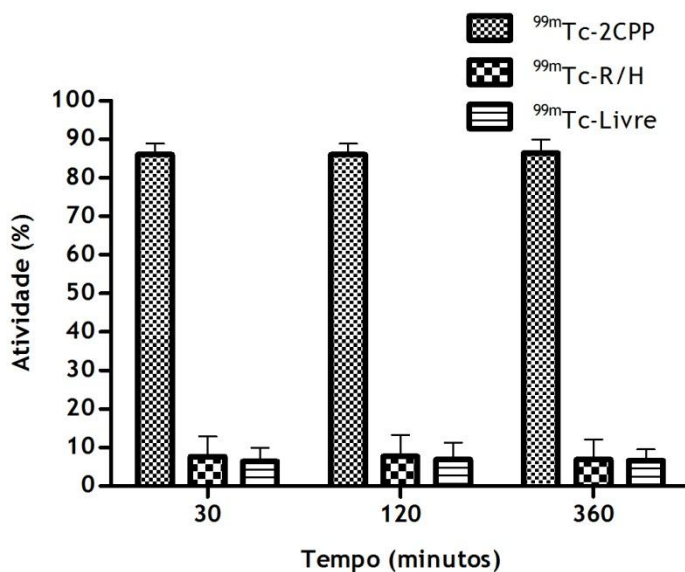


Figura 27- Estabilidade do ^{99m}Tc -2CPP no soro sanguíneo humano.

A figura 28 descreve o efeito do tempo na eficiência de marcação (normal) e a estabilidade no soro humano sanguíneo do ^{99m}Tc -2CCP. Ao comparar as duas condições para os tempos 120 e 360 min, verifica-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre elas ($p>0,05$).

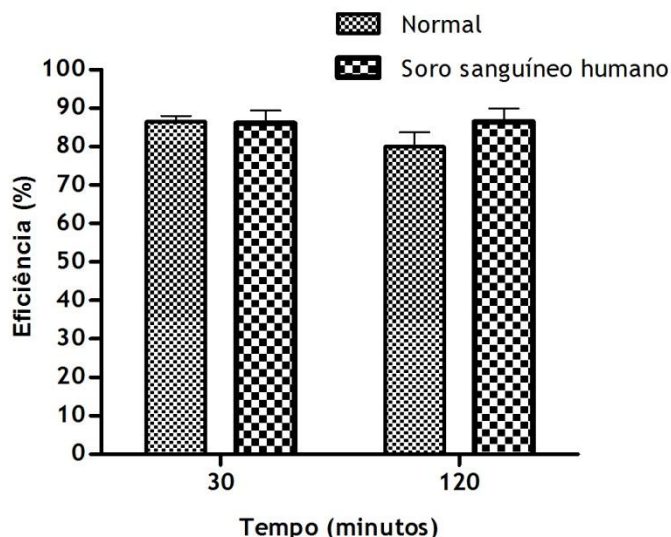


Figura 28- Efeito do tempo na eficiência de marcação (normal) e a estabilidade no soro sanguíneo humano do ^{99m}Tc -2CPP.

O efeito do pH na eficiência de marcação está representado na figura 29. Com base no perfil que está traçado pode inferir-se que a eficiência de marcação aumenta com o aumento do pH até 7, isto deve-se principalmente ao facto de a quantidade de tecnécio livre diminuir consideravelmente. Para valores superiores a 7, a eficiência de marcação diminui uma vez que há um aumento significativo da quantidade de ^{99m}Tc -R/H e de ^{99m}Tc -livre, sendo neste último caso menos acentuado.

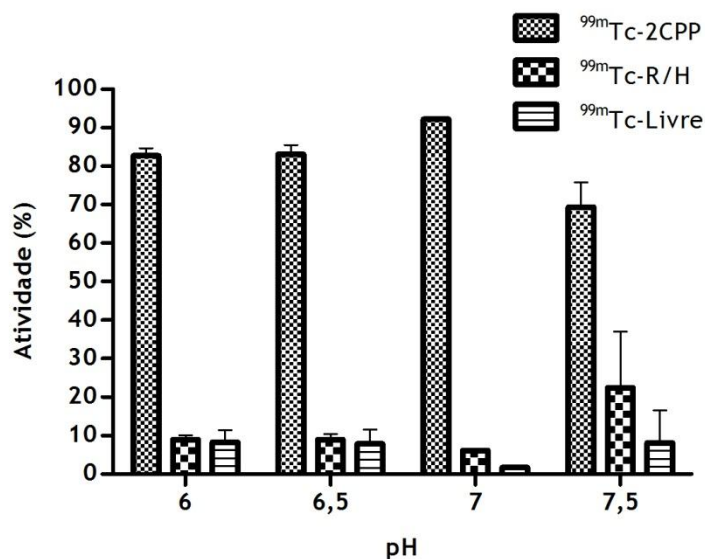


Figura 29 - Efeito do pH na eficiência de marcação do ^{99m}Tc -2CPP. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experiências independentes. Controlo de qualidade adaptado.

Resultados

Como se pode observar na figura 30 há uma ligeira tendência para que a quantidade de ^{99m}Tc -livre diminua com o aumento da massa de cloreto estanhoso, enquanto a quantidade de ^{99m}Tc -R/H aumenta, principalmente, para as massas mais elevadas (40 e 60 μg).

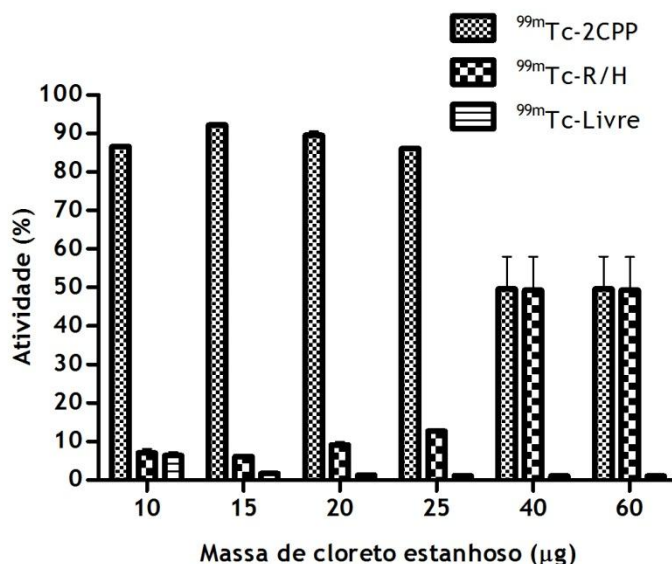


Figura 30 - Efeito da massa de cloreto estanhoso na eficiência de marcação do ^{99m}Tc -2CPP. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experiências independentes. Controle de qualidade adaptado.

A figura 31 mostra o efeito da temperatura de incubação na eficiência de marcação do composto. À medida que a temperatura aumenta a eficiência de marcação diminui, principalmente, pela formação de ^{99m}Tc -R/H. Em relação à quantidade ^{99m}Tc -livre, esta aumenta com a temperatura.

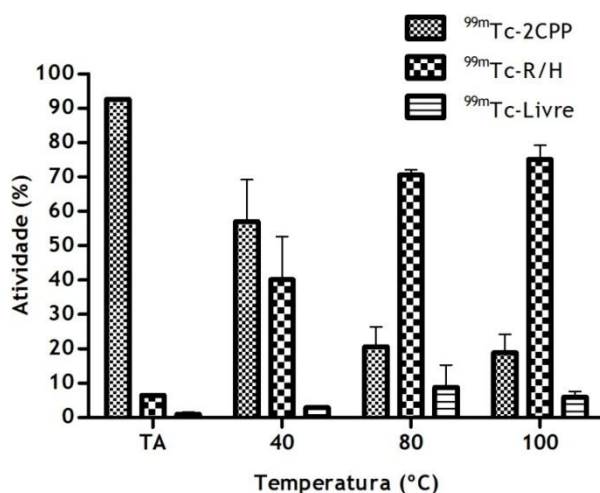


Figura 31 - Efeito da temperatura de incubação na eficiência de marcação de ^{99m}Tc -2CPP. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experiências independentes. Controle de qualidade adaptado.

Após a variação de todos os fatores acima apresentados, a melhor conjugação obtida, a qual permitiu alcançar a eficiência de marcação máxima, foi: pH 7, 15 µg de cloreto estanhoso e incubação à temperatura ambiente.

3. Estudos *in vitro*

3.1 Estudos de captação e determinação da viabilidade celular

A figura 32 apresenta os perfis de captação do ^{99m}Tc -2CCP e do ^{99m}Tc -livre pelas células WiDr. A captação do ^{99m}Tc -2CCP aumenta ao longo do tempo com um $t_{1/2}$ (é o tempo desde t_0 (tempo inicial) até ao tempo em que a captação atinge metade da captação máxima) de 4,23 min e com uma captação máxima de 3,5 %. Por outro lado, a captação do ^{99m}Tc -livre apresenta um $t_{1/2}$ de 3,47 min e com uma captação máxima de 0,48 %. Comparando a captação máxima entre os dois perfis, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

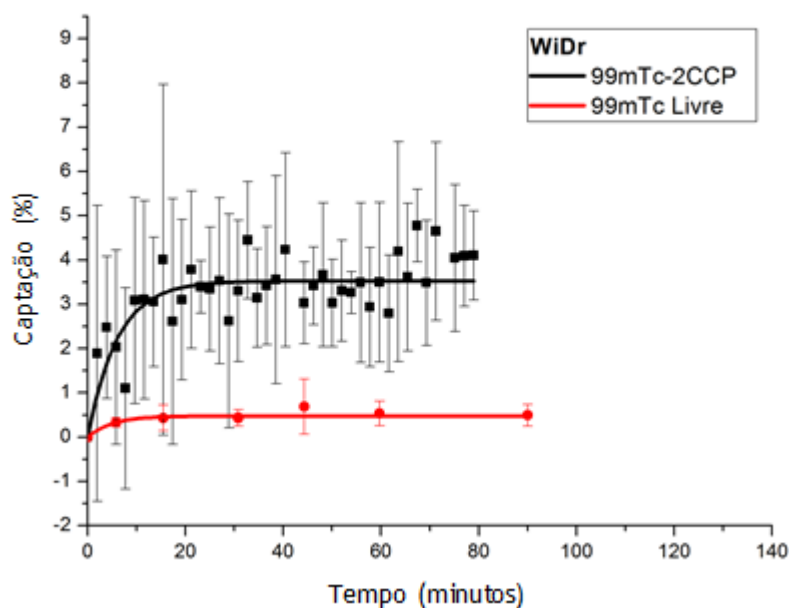


Figura 32 - Perfil de captação do ^{99m}Tc -2CCP pelas células WiDr, efetuado no *Ligand Tracer* e perfil de captação do ^{99m}Tc -livre na Linha WiDr, efetuado manualmente.

Na figura 33 estão representados os perfis de captação do ^{99m}Tc -2CCP e do ^{99m}Tc -livre pelas células H1299. A captação do ^{99m}Tc -2CCP aumenta ao longo do tempo com $t_{1/2}$ de 19,97 min e com uma captação máxima de 3,4 %. Por outro lado, a captação do ^{99m}Tc -livre apresenta $t_{1/2}$ de 1,07 min e com uma captação máxima de 0,69 %. Comparando a captação máxima entre os dois perfis, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

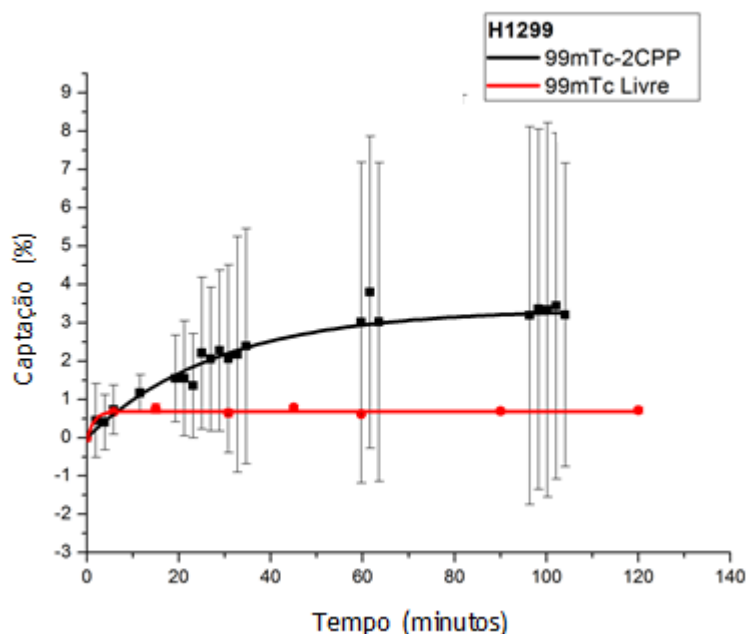


Figura 33 - Perfil de captação do ^{99m}Tc -2CPP pelas células H1299, efetuado no *Ligand Tracer* e perfil de captação do ^{99m}Tc -livre na Linha H1299, efetuado manualmente.

Comparando os perfis de captação do ^{99m}Tc -2CPP pelas células WiDr (figura 32) e pelas células H1299 (figura 33) verifica-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre as captações máximas ($p=0,418$), mas no que diz respeito aos tempos $t_{1/2}$ verifica-se que há diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$).

A viabilidade celular foi avaliada sempre após o término de cada estudo de captação realizado com o ^{99m}Tc -livre. Para tal, recorreu-se ao método de exclusão do azul tripano, os resultados apresentaram uma viabilidade celular sempre superior a 95 %, evidenciando que as células permaneceram viáveis durante os estudos de captação.

3.2 Estudos de citotoxicidade

Para avaliar os efeitos antiproliferativos do composto 2CPP, nas diferentes linhas celulares acima referidas, administraram-se diferentes concentrações de composto (1, 10, 20, 50, 100, 200 μM). Posteriormente, efectuou-se o tratamento fotodinâmico com a utilização de uma iluminação de 10 J, e realizou-se de seguida o ensaio do MTT. A figura 34 representa os diferentes perfis dose-resposta das linhas celulares WiDr, figura 34 (A), H1299, figura 34 (B) e TFK-1, figura 34 (C), ao tratamento fotodinâmico com o 2CPP após 24, 48 e 72 h.

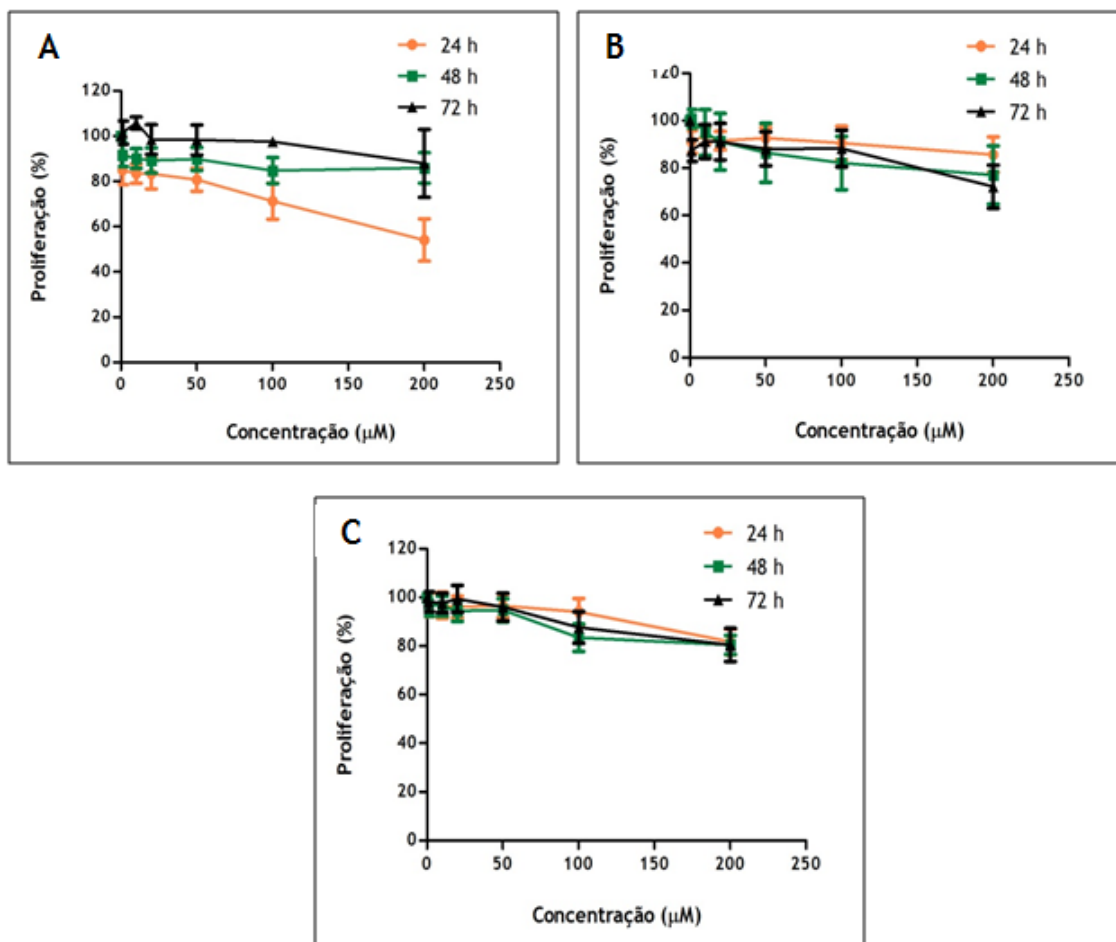


Figura 34 - Perfis dose-resposta das diferentes linhas celulares ao tratamento fotodinâmico com 2CPP para vários tempos. (A) Células WiDr, (B) células H1299, (C) células TFK-1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 6 experiências independentes.

Para estabelecer estes perfis dose-resposta utilizou-se como termo de comparação as culturas celulares controle que foram submetidas apenas à administração do solvente utilizado para solubilizar o composto (água), às quais se atribuiu o valor de 100 %. Apesar de terem sido administradas elevadas concentrações de 2CPP não foi possível determinar a concentração que inibe a proliferação em 50 % (i.e. o IC50) para nenhuma das linhas celulares utilizadas. Para as células WiDr observou-se uma redução da proliferação celular até aos 54%, 87% e 89% às 24, 48 e 72 h, respetivamente. Para as células H1299 verificou-se uma redução da proliferação celular até sensivelmente aos 85%, 77 % e 72 % às 24, 48, e 72 h, respetivamente. Para as células TFK-1, a proliferação celular diminuiu até aos 82%, 80,5% e 80,5% às 24, 48, e 72 h, respetivamente.

Para avaliar o efeito anti-proliferativo do composto 2CPP sem ativação pela luz, administraram-se as mesmas concentrações acima referidas e realizou-se o ensaio do MTT às 24, 48 e 72 h após a administração do composto. A figura 35 representa os perfis de dose-resposta das linhas celulares WiDr, figura 35 (A), H1299, figura 35 (B) e TFK-1 figura 35 (C), ao composto após 24, 48 e 72 h da administração.

Resultados

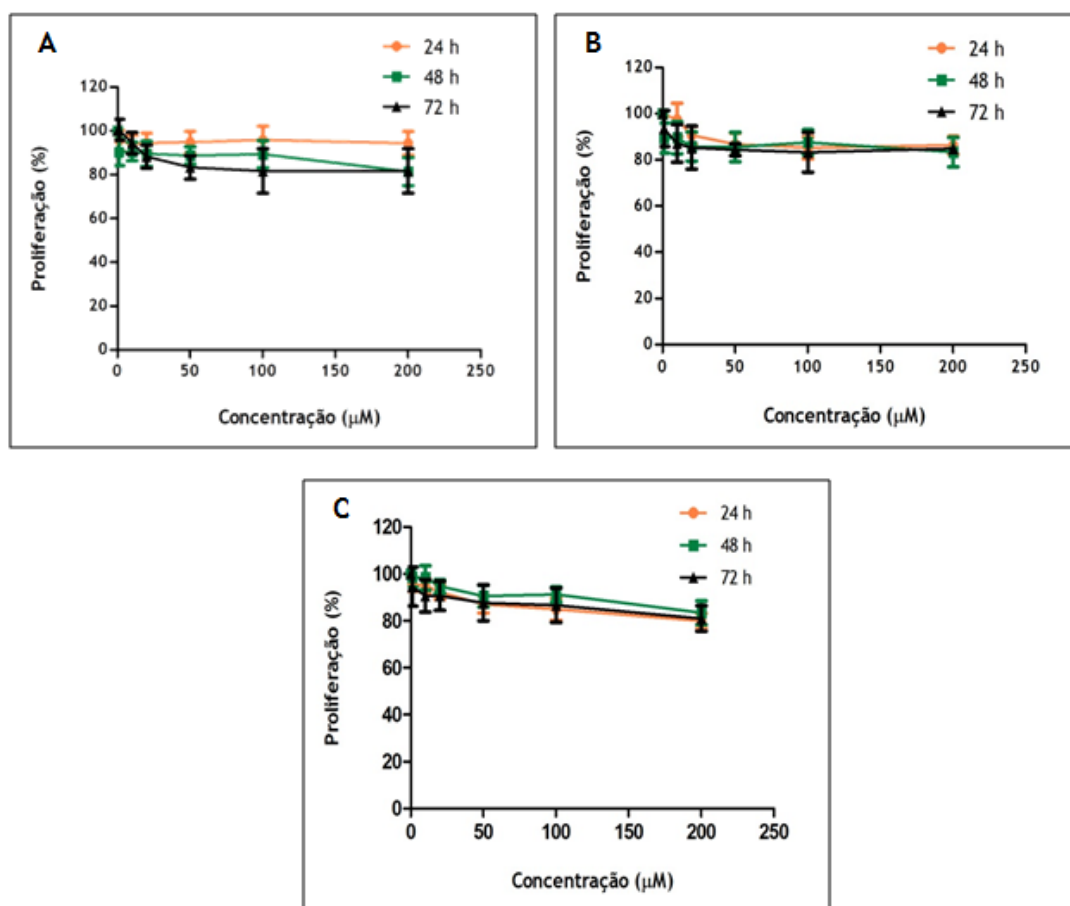


Figura 35 - Perfis dose-resposta das diferentes linhas celulares ao 2CPP sem ativação pela luz para vários tempos (A) Células WiDr, (B) células H1299, e (C) células TFK-1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de pelo menos 6 experiências independentes.

Do mesmo modo, para obter os perfis dose-resposta foi utilizado como termo de comparação as culturas celulares controlo que foram submetidas ao solvente utilizado para dissolver o composto, às quais também se atribuiu o valor de 100%. Como era de esperar, a administração do composto sem ativação pela luz não permitiu determinar nenhum IC50 para as diferentes linhas celulares. Para as células WiDr observou-se uma redução da proliferação celular até aos 94%, 81% e 81% às 24, 48 e 72 h, respetivamente. Para as células H1299 verificou-se uma redução da proliferação celular até sensivelmente aos 86%, 83% e 85% às 24, 48, e 72 h, respetivamente. Para as células TFK-1, a proliferação celular diminuiu até aos 94%, 82% e 82% às 24, 48, e 72 h, respetivamente.

4. Estudos *in vivo*

Com o objectivo de estudar a biodistribuição, isto é, conhecer os órgãos-alvo, a farmacocinética e as vias de excreção do ^{99m}Tc -2CPP foram realizados estudos de biodistribuição em ratinhos balb/c normais. De modo a avaliar a seletividade do complexo ^{99m}Tc -2CPP para as células tumorais, foram desenvolvidos dois modelos de xenotransplantes em ratinhos balb/c nu/nu, um com a linha celular WiDr e outro com a linha celular H1299.

4.1 Estudos de biodistribuição em ratinhos normais

Os resultados da biodistribuição dos ratinhos normais, figura 36, mostram excreção pela via urinária (rim, urina e bexiga) e excreção hepática, via ciclo entero-hepatobiliar (fígado, biliar e vesícula biliar). De realçar o facto de haver uma grande acumulação de atividade no pulmão aos 30 e 120 min, e ainda uma captação significativa no baço. Pode observar-se que aos 360 min não existe praticamente nenhuma acumulação de atividade em nenhum órgão em particular, excepto nos órgãos de excreção.

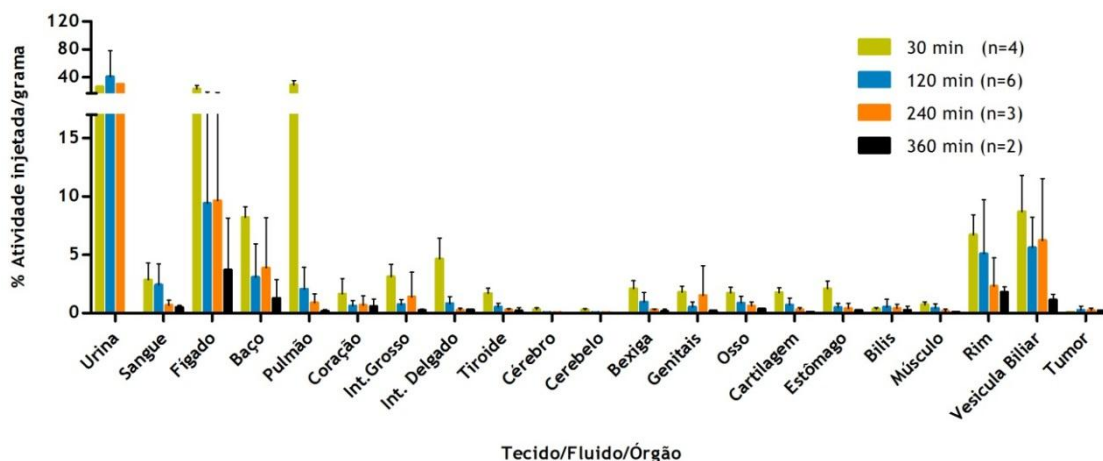


Figura 36 - Biodistribuição em % atividade injetada/grama de tecido/fluido/órgão do complexo ^{99m}Tc -2CPP em ratinhos *Balb/c* normais.

4.2 Estudos de biodistribuição em ratinhos com xenotransplantes

Os resultados apresentados na figura 37 mostram a biodistribuição obtida nos ratinhos com xenotransplantes da linha WiDr, note-se que as vias de excreção coincidem com as dos ratinhos normais. Aos 360 min, a barra da urina não é mostrada pelo simples facto de que os animais no momento da recolha dos órgãos não tinham urina. Também nestes ratinhos, o pulmão apresenta enormes quantidades de atividade acumulada, principalmente, aos 30 min. Observa-se que no baço também existe uma grande quantidade de atividade acumulada principalmente aos 30 min. Aos 360 min, não há atividade acumulada por nenhum órgão/tecido/fluido preferencial, excepto para os órgãos de excreção.

Resultados

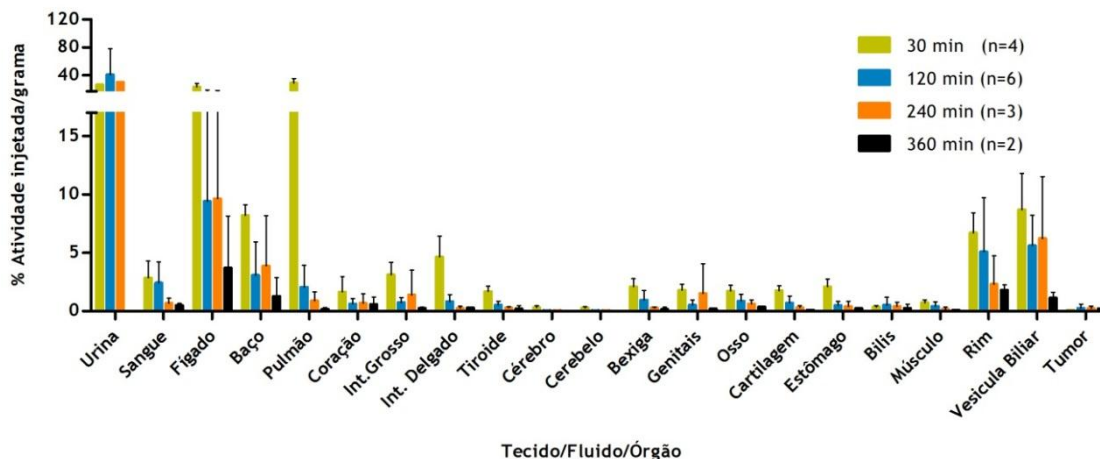


Figura 37 - Biodistribuição em % atividade injetada/grama de tecido/fluido/órgão do complexo ^{99m}Tc -2CPP em ratinhos *Balb/c nu/nu* com xenotransplantes da linha celular WiDr.

Como se pode observar na figura 38, o perfil de biodistribuição dos ratinhos com xenotransplantes da linha H1299 é semelhante aos anteriores, tendo as mesmas vias de excreção. Na mesma figura 38 observa-se que não existe a barra da urina aos 30 min, uma vez que os ratinhos não tinham urina no momento da recolha dos órgãos. Comparando o perfil de biodistribuição destes ratinhos aos 30 min com o perfil dos anteriores aos 30 min, verifica-se que grande parte da atividade encontra-se no sangue. Também nestes ratinhos há uma acumulação de atividade considerável no baço. Como anteriormente descrito para os outros perfis de biodistribuição, também se constata que para estes ratinhos aos 360 min o radiofármaco já praticamente fora eliminado da maior parte dos órgãos.

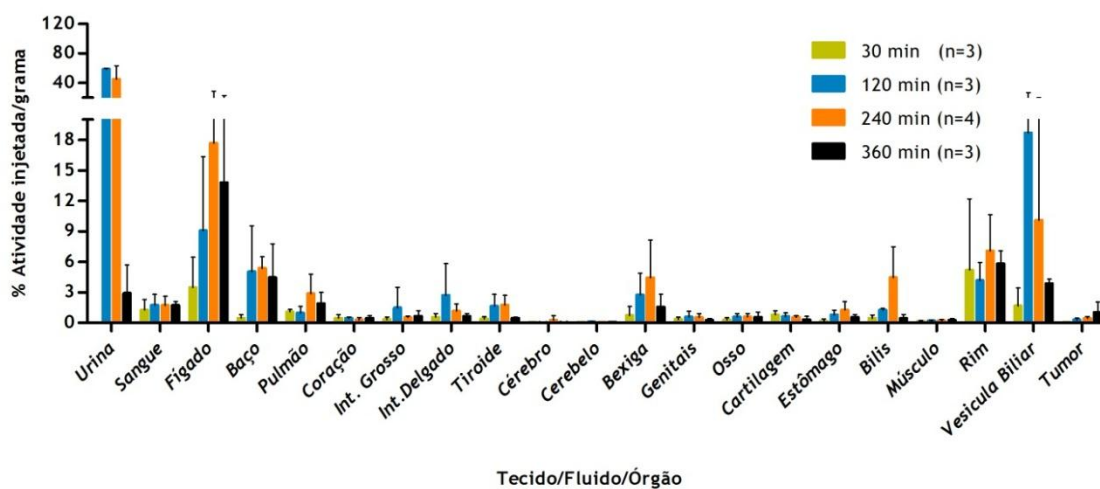


Figura 38 - Biodistribuição em % atividade injetada/grama de tecido/fluido/órgão do complexo ^{99m}Tc -2CPP em ratinhos *Balb/c nu/nu* com xenotransplantes da linha celular H1299.

Para além da percentagem da atividade injectada/peso calculada para os diferentes tecidos/fluidos/órgãos, foi determinada, para cada tempo, a razão tumor/músculo. Como se pode observar na figura 39, a razão tumor/músculo para os dois tipo de modelos de xenotransplantes aumenta ao longo do tempo, atingindo uma média de $3,33 \pm 1,21$ para a linha WiDr e $3,55 \pm 1,29$ para a linha H1299.

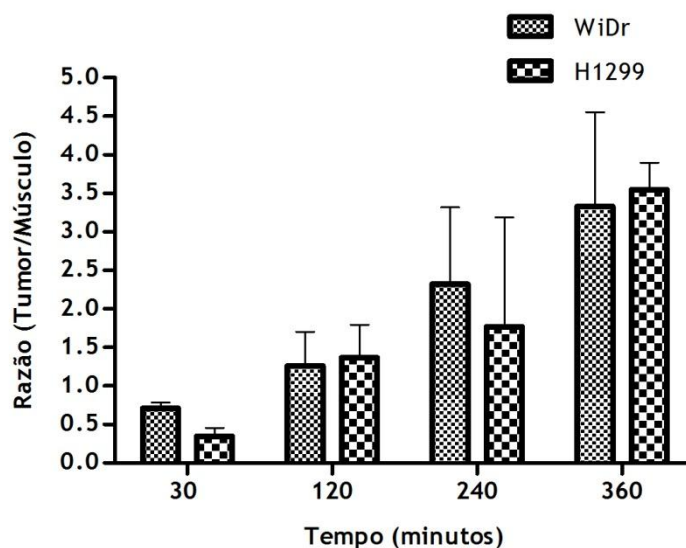


Figura 39 - Razão tumor/músculo. Os resultados expressam a média e o desvio padrão.

No entanto, só existem diferenças estatisticamente significativas para os tempos de 30 min em ambas as linhas celulares ($p < 0,05$) e para o tempo de 240 min para a linha H1299 ($p < 0,05$). Abaixo apresenta-se uma tabela com os intervalos de confiança a 95% da razão tumor/músculo obtidos em ratinhos com xenotransplantes da linha WiDr e H1299 para os diferentes tempos de biodistribuição; para os 30 min (em ambas as linhas celulares) o tumor capta menos que o músculo e para o tempo 240 min (linha celular H1299) ocorre o inverso, ou seja, o tumor capta mais que o músculo.

Tabela 2 - Intervalos de confiança a 95% da razão tumor/músculo obtidos em ratinhos com xenotransplantes da linha WiDr e H1299 para os diferentes tempos de biodistribuição.

Tempo (minutos)	WiDr	H1299
30	[0,44;0,98]	[0,30; 0,49]
120	[1,26;1,99]	[0,42; 1,78]
240	[-0,15; 4,78]	[1,42; 2,12]
360	[-7,64; 14,28]	[3,55;6,76]

4.3 Imagiologia

As imagens adquiridas através da câmara-gama, logo após administração do ^{99m}Tc -2CPP, foram normalizadas, numa estação de processamento, Xeleris, a uma escala de cores linear, figura 40.

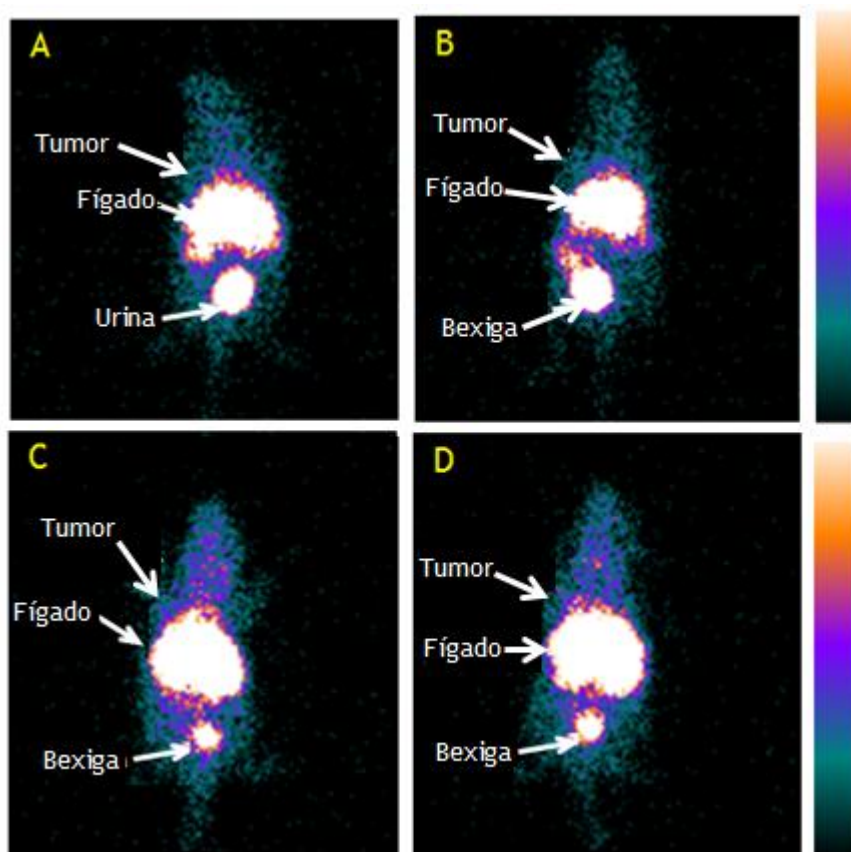


Figura 40 - Imagens estáticas do ^{99m}Tc -2CPP adquiridas com a câmara-gama de em ratinhos com tumor. As imagens A, B, C e D foram obtidas aos 30, 90, 180 e 270 min, respetivamente, após a administração do radiofármaco.

5. Coeficiente de partição octanol/água

Como esperado a partir da estrutura química de 2CPP, o complexo ^{99m}Tc -2CPP apresenta grande hidrofiliçidade devido à natureza iónica do radiofármaco. O coeficiente de partição, P , foi determinado a $\text{pH} = 7$, e o valor de $\log P$ obtido foi -1 .

Capítulo 5

Discussão

A PDT tem vindo a mostrar ao longo do tempo resultados promissores no combate ao cancro. Isto deve-se essencialmente às características selectivas dos fotossensibilizadores para as células tumorais⁶¹. Devido a essas características de emissão de fluorescência, as hematoporfirinas e outros fotossensibilizadores têm sido referidos e estudados também para detecção de fluorescência de tumores. No entanto, a marcação radioativa de porfirinas foi sugerida como uma alternativa melhor para a detecção tumoral⁵⁸. Este tipo de marcação tem sido também utilizada para averiguar qual ou quais as vias de excreção de compostos, bem como identificar possíveis órgãos-alvo, i.e. a sua biodistribuição⁶¹. Para tal, é necessário desenvolver metodologias de marcação de modo a obter complexos com alta pureza radioativa⁶⁹.

Nesta sequência, no presente trabalho o principal objetivo passou por desenvolver um protocolo de marcação radioativa de uma porfirina (2CPP) com ^{99m}Tc . O ^{99m}Tc além de possuir propriedades físicas adequadas à sua aplicação em medicina nuclear, a sua grande vantagem resulta de ser quimicamente muito versátil, com capacidade para formar complexos estáveis com uma grande variedade de ligandos. Como todos os metais de transição, o ^{99m}Tc tem a capacidade de formar complexos através de ligações entre o metal deficiente em eletrões e os átomos susceptíveis de partilhar pares de eletrões, tais como o oxigénio, o enxofre, o azoto, o fósforo, o carbono, halogenetos, etc. Adicionalmente, o ^{99m}Tc apresenta uma enorme gama de estados de oxidação que podem variar entre -1 e +7, o que lhe confere a possibilidade de formar complexos de coordenação com numerosos agentes quelantes. Este metal, obtido a partir de um gerador de (^{99}Mo)/ ^{99m}Tc sob a forma de ião pertecnetato de sódio, apresenta um estado de oxidação +7. Neste estado de oxidação, o ião pertecnetato possui uma reatividade química insignificante que não permite a ligação direta a qualquer ligando. Deste modo, é necessário a adição de um agente redutor para reduzir o ião pertecnetato do estado de oxidação +7 para outros estados de oxidação mais baixos. Existem muitos agentes redutores capazes de reduzir o ião pertecnetato de sódio, sendo o mais utilizado o cloreto estanhoso dihidratado⁶⁹, tendo sido o agente redutor escolhido. No entanto, a sua utilização requer alguns cuidados uma vez que oxida facilmente na presença de oxigénio⁶⁹, sendo necessário argonar e selar todas as amostras de modo a minimizar a presença de oxigénio.

Segundo a literatura, foram realizadas várias tentativas com o objetivo de marcar o T3,4BCPC com ^{99m}Tc para estudos imagiológicos tumorais⁷⁰. O espectro UV-Vis do ^{99m}Tc -T3,4BCPC mostrou

Discussão

a base da porfirina sem qualquer metal de substituição no núcleo⁷¹. Baseado nestas observações, os autores concluíram que o ^{99m}Tc não ocupa o centro do anel macrociclo deste complexo, mas que se liga às cadeias laterais da porfirina, em que cada grupo fenil do grupo do T3,4BCPC pode estar envolvido neste tipo de ligação ao ^{99m}Tc. Assim, como o 2CPP tem a mesma estrutura química, diferindo apenas nos grupos fenis, no qual o T3,4BCPC tem quatro e o 2CPP tem dois, especula-se que a ligação do ^{99m}Tc ao 2CPP ocorra na mesma posição.

Para determinar a pureza radioquímica do complexo e determinar as condições ótimas para a obtenção de uma elevada eficiência de marcação foi utilizada a microcromatografia ascendente em camada fina, um método simples, barato e eficaz. Inicialmente, o controlo de qualidade utilizado neste trabalho, foi o mesmo que o referenciado por S. Murugesan *et al.* (2001) para quantificar a pureza radioquímica do composto o T3,4BCPC. Optou-se por utilizar este controlo de qualidade porque o composto possui uma estrutura química semelhante ao 2CPP e ambos são hidrofílicos, (a hidrofílicidade do 2CPP foi confirmada pelo valor de *P* obtido (-1)). Após várias tentativas para otimizar o processo de marcação, testando diferentes condições, as quais consistiram na variação do pH, da temperatura de incubação, da quantidade de cloreto estanhoso, não se conseguiu alcançar uma elevada pureza radioquímica que permitisse a realização de estudos *in vitro* ou *in vivo*. Em todos os resultados obtidos por este controlo de qualidade verificou-se que existia sempre elevadas quantidades de ^{99m}Tc-R/H independentemente das condições testadas e também de ^{99m}Tc-livre. Nos casos em que a quantidade de ^{99m}Tc-livre diminuiu, quando se utilizaram elevadas massas de cloreto estanhoso, a quantidade de ^{99m}Tc-R/H aumentou drasticamente até aproximadamente 90%. Com base nestes resultados, concluiu-se que controlo de qualidade não era o mais adequado para discriminar o composto marcado das impurezas quantificar.

Um facto muito importante que se verificou no sistema em que se utilizava ITLC-SG como fase estacionária e acetona, etilacetato, água e amónia (7, 3, 3, 0,3; v/v) como fase móvel é que o composto 2CPP deveria migrar com a frente do solvente, mas a maior parte ficava retido na origem, facto observado pela coloração do composto. Assim, foi necessário arranjar um solvente mais adequado que permitisse a migração do ^{99m}Tc-2CPP e do ^{99m}Tc-livre com a frente do solvente ($R_f=1$), e ao mesmo tempo que mantivesse o ^{99m}Tc-R/H na origem ($R_f=0$). Também como se observou quase sempre uma quantidade de ^{99m}Tc-livre superior a 15%, também foi necessário arranjar um solvente que permitisse uma discriminação superior. Neste caso, como o objetivo era que o ^{99m}Tc-2CPP ficasse retido na origem, optou-se pela acetona uma vez que este solvente orgânico é menos polar que a água, logo o ^{99m}Tc-2CPP tem dificuldades em ser arrastado. Zhi-yun Jia *et al* (2007) para quantificar a pureza radioquímica do complexo ¹⁸⁸Re-T3,4BCP utilizaram dois sistemas cromatográficos. No primeiro utilizando acetona como fase móvel e Whatman N°1 como fase estacionária, observaram que ¹⁸⁸ReO₄⁻ apresentou $R_f=0,7-0,9$, enquanto o ¹⁸⁸Re-T3,4BCP e o ¹⁸⁸Re-R/H apresentaram $R_f=0$. No segundo utilizaram NaCl 0,9% como fase móvel e Whatman N°1 como fase estacionária, em

que o $^{188}\text{ReO}_4^-$ e o $^{188}\text{Re-T3,4BCP}$ apresentaram $R_f = -0,9-1,0$, enquanto o $^{188}\text{Re-R/H}$ ficou retido na origem ($R_f = 0$)⁷⁰. Deste modo, a escolha do solvente pareceu adequada. Posteriormente, comparando a acetona com o NaCl 0,9% verificou-se que a quantidade de $^{99m}\text{Tc-2CPP}$ -livre diminuiu drasticamente com a utilização da acetona (dados não mostrados). Deste modo, o objetivo passou por testar diferentes proporções do solvente acetona, etilacetato água e amônia (7, 3, 3, 0,3; v/v) no sentido de aumentar a polaridade para permitir o arrastamento do $^{99m}\text{Tc-2CPP}$. A comparação foi feita recorrendo ao arrastamento da porfirina não marcada (observado pela coloração da porfirina) ao longo da tira e posteriormente utilizou-se a quantificação da atividade através do processamento de ROI's. Ao mesmo tempo que se alterou as proporções das quantidades dos solventes, comparou-se sempre com o solvente (7,3,3,0,3; v/v) e verificou-se que a quantidade de $^{99m}\text{Tc-2CPP}$ era sempre superior no solvente em fase de otimização. Após varias tentativas para encontrar o solvente mais adequado para discriminar o $^{99m}\text{Tc-R/H}$ do $^{99m}\text{Tc-2CPP}$ e do ^{99m}Tc -livre foi encontrada uma mistura de acetona, água e amônia (1, 20, 0,8; v/v). Após alteração do solvente NaCl 0,9% por acetona e do (7, 3, 3, 0,3; v/v) por (1, 20, 0,8; v/v) conseguiu-se obter uma eficiência máxima de aproximadamente 92%. Para tal, foi necessário variar diferentes parâmetros entre os quais o pH, a temperatura de incubação e a massa de cloreto estanhoso.

Relativamente à variação dos valores de pH, a eficiência de marcação aumentou até pH 7, decaindo a partir deste valor. As soluções de estanho (Sn^{2+}) tornam-se insolúveis a partir de pH neutro a alcalino, podendo haver formação de substâncias coloidais^{72,73}. Por outro lado, os grupos carboxílicos tendem a ligar mais facilmente ao ^{99m}Tc quando o pH tende para alcalino uma vez que a esses pH's encontram-se desprotonados. Por isso é necessário determinar um compromisso de modo a que o cloreto não precipite e os grupos carboxílicos liguem ao ^{99m}Tc .

No que diz respeito à temperatura de incubação, verificou-se que a eficiência de marcação é dependente da temperatura, diminuindo com o aumento desta, principalmente pela formação de $^{99m}\text{Tc-R/H}$. Muitos radiofármacos de ^{99m}Tc necessitam de aquecimento para acelerar a cinética das reações químicas, no entanto, um excesso de temperatura pode levar à formação de impurezas radioquímicas⁷³. Com base nos resultados obtidos podemos constatar que o aquecimento leva à formação de $^{99m}\text{Tc-R/H}$, por isso no caso do 2CPP a reação não necessita de aquecimento para se dar, e como se pôde constatar a eficiência máxima foi obtida aos 20 min, sendo uma reação rápida.

Em relação à massa de cloreto estanhoso, esta é empiricamente otimizada individualmente para cada formulação radiofarmacêutica, mantendo o balanço entre dois parâmetros: um excesso de cloreto estanhoso deve ser usado de acordo com a adição da atividade de pertecnetato e a massa de cloreto deve manter-se o mais baixa possível de modo a evitar a redução de pertecnetato⁶⁹. Nesse sentido, após testar diferentes massas de cloreto estanhoso, o equilíbrio entre a quantidade de ^{99m}Tc e a quantidade de $^{99m}\text{Tc-R/H}$ que permitiu

Discussão

atingir maiores eficiências de marcação foi aquando da utilização de 15 µg de cloreto estanhoso. A melhor conjugação destes fatores, permitiu alcançar uma eficiência de marcação de aproximadamente 92%. Assim, os sistemas microcromatográficos utilizados no controlo adaptado mostraram ser um método bastante preciso para distinguir claramente e quantificar as quantidades relativas de cada uma das espécies de ^{99m}Tc . A formulação radiofarmacêutica mostrou ser estável ao longo do tempo até aos 240 min (4 h), apresentando uma elevada estabilidade temporal em soro sanguíneo humano, e a comparação das duas para os mesmos tempos não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Após a otimização do procedimento da formulação radiofarmacêutica, a qual apresentou uma elevada pureza radioquímica, procedeu-se à realização de estudos *in vitro* e estudos *in vivo*. Os estudos *in vitro* realizaram-se com o objetivo de avaliar a dinâmica de captação do complexo ^{99m}Tc -2CPP pelas células tumorais e avaliar o efeito fotodinâmico do 2CPP nas células através de estudos de citotoxicidade. A partir dos resultados obtidos nos estudos de captação, verificou-se que para a linha celular WiDr, a captação máxima do complexo ^{99m}Tc -2CPP é de aproximadamente 7 vezes superior à do ^{99m}Tc -livre, enquanto para a linha celular H1299 a captação máxima do complexo ^{99m}Tc -2CPP é de aproximadamente 5 vezes superior à do ^{99m}Tc -livre. A captação do ^{99m}Tc -2CPP pelas duas linhas celulares não apresenta diferenças estatisticamente significativas.

Através dos resultados de espectroscopia obtidos dos ensaios de MTT não foi possível determinar o IC50 em nenhuma das linhas celulares utilizadas, tanto nas células irradiadas como nas células não irradiadas. Contudo, os resultados obtidos nas células não irradiadas vão de em conta com as características dos fotossensibilizadores uma vez que estes só, deveriam ter efeito terapêutico quando irradiados. Num trabalho realizado com diferentes fotossensibilizadores, nos quais a estrutura química só diferia no número de ácidos carboxílicos das cadeias laterais, verificou-se que o composto que possuía dois ácidos carboxílicos reduziu a proliferação celular praticamente a zero, enquanto o composto que possuía quatro ácidos carboxílicos não afetou a proliferação⁷⁴. Assim, uma possível justificação para o reduzido efeito antiproliferativo do 2CPP possa estar relacionado com o número de ácidos carboxílicos. Ainda no mesmo estudo, os autores compararam compostos com o mesmo número de ácidos carboxílicos, mas com diferentes átomos do núcleo do fotossensibilizador, e constataram que o efeito na proliferação foi muito diferente⁷⁴. Deste modo, o aumento do número de ácidos carboxílicos induz uma diminuição no efeito antiproliferativo, e para além disso os átomos que constituem o núcleo do fotossensibilizador também influenciam a proliferação celular.

Os resultados dos estudos de biodistribuição realizados em ratinhos balb/c mostraram que o 2CPP possui uma excreção relativamente rápida, visto que, 360 minutos após a administração praticamente não se verifica atividade em nenhum órgão preferencial, com exceção dos

locais de excreção. Relativamente à eliminação, esta é feita por via urinária (urina e bexiga, rim) e igualmente por via entero-hepatobiliar (fígado, bÍlis e vesícula biliar), o que é confirmado pelas enormes quantidades de atividade nesses mesmos órgãos. Dos estudos biodistribuição em ratinhos normais verificou-se também uma grande quantidade de atividade no pulmão nos tempos iniciais 30 e 120 minutos. Está descrito na literatura que grandes quantidades de atividade são acumuladas no pulmão nas fases iniciais⁴². Como os fotossensibilizadores são moléculas relativamente grandes, ao passarem pela densa e fina rede de capilar dos pulmões é normal que numa fase inicial se dê uma grande acumulação de atividade. Em alguns estudos de marcação radioativa de porfirinas obtiveram também grandes quantidades de atividade no pulmão^{57,75}. Verificou-se ainda uma acumulação significativa no baço, a qual parece variar largamente com a estrutura do fotossensibilizador⁴². Alguns estudos com porfirinas também apresentaram grandes quantidades de atividade no baço em comparação com outros órgãos⁴. Como o composto 2CPP não tem seletividade para nenhum órgão preferencial, as linhas celulares utilizadas para a indução de xenotransplantes não foram escolhidas com base na acumulação de atividade dos órgãos dos quais pertencem as linhas.

A biodistribuição nestes ratinhos portadores de xenotransplantes mostrou que as vias de excreção coincidem com as vias de excreção dos ratinhos normais, e também se verificou grande acumulação de atividade no pulmão, principalmente, nos ratinhos portadores de xenotransplantes da linha WiDr. Uma possível explicação para que os ratinhos com xenotransplantes da linha celular H1299 aos 30 min tenham apresentado baixas atividades acumuladas em quase todos os órgãos, se deva ao facto de o metabolismo dos ratinhos utilizados ter sido mais lento. Verificou-se que nos ratinhos portadores de xenotransplantes, tal como nos ratinhos normais, existiam grandes quantidades de atividade no baço.

Uma vez que estes ratinhos portadores de xenotransplantes apresentam um perfil de biodistribuição similar aos ratinhos normal, aparentemente não há diferenças na biodistribuição de um animal atímico e de um animal normal.

Através da análise dos estudos de biodistribuição podemos inferir-se a formulação radiofarmacêutica é estável ao longo do tempo. Está descrito na literatura que as impurezas radioquímicas do ^{99m}Tc têm tendência para se acumular em determinados órgãos. O ^{99m}Tc-livre tende a acumular-se na tiroide e no estômago^{71,77}, enquanto o ^{99m}Tc-R/H tende a acumular-se no fígado e medula óssea⁶⁹. Pela análise dos resultados das biodistribuições verifica-se que a quantidade de ^{99m}T-livre é estável porque a atividade na tiroide e no estômago diminui ao longo do tempo. Quanto à quantidade de ^{99m}Tc-R-H através da atividade acumulada no fígado não se pode tirar nenhuma conclusão porque o fígado é um órgão de excreção, mas em relação ao osso verifica-se que, em comparação com a maioria dos órgãos não apresenta atividade significativa. Por isso, verifica-se que o complexo é estável, e a

Discussão

estabilidade *in vivo* pode ser comprovada pela alta estabilidade no soro sanguíneo humano. Segundo a literatura, um composto que permaneça estável em soro sanguíneo humano é sugerido como sendo um radiofármaco efectivo para ser utilizado para fins clínicos^{57,78}.

Apesar da razão tumor/músculo observada não ser muito elevada, esta aumenta ao longo do tempo para os dois tipos de xenotransplantes. Contudo, para a razão tumor/músculo superior a 1 só existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para o tempo 240 min para o xenotransplante da linha celular H1299, sendo a razão tumor/músculo de aproximadamente 1,7. Note-se que para que um composto seja um bom agente de imagem, a razão tumor/músculo deve ser superior a 3^{67,71}. Como a razão tumor/músculo obtida foi inferior a 3, sendo ainda menor que a maioria dos órgãos com base na atividade acumulada, podemos concluir que o 2CPP não é um bom agente de imagem pelo menos para estes xenotransplantes.

Capítulo 6

Conclusão e perspectivas futuras

Com o presente trabalho, cujo objetivo principal foi desenvolver um protocolo de marcação radioativa do composto 2CCP com ^{99m}Tc , bem como de um sistema de controlo de qualidade da marcação para avaliar a sua pureza radioativa, pode concluir-se que:

- Foi possível desenvolver uma formulação radiofarmacêutica reprodutível, com elevado grau de pureza radioquímica (>90%), e apresentando uma alta estabilidade temporal *in vitro*. Os sistemas microcromatográficos utilizados no controlo de qualidade adaptado neste trabalho, mostraram ser um método preciso, permitindo distinguir e quantificar as quantidades de cada uma das espécies obtidas da formulação radiofarmacêutica.
- Os estudos *in vitro* mostraram que a captação máxima do complexo ^{99m}Tc -2CCP é de aproximadamente 7 vezes superior à captação máxima do ^{99m}Tc -livre pela linha celular WiDr e de aproximadamente 5 vezes superior pela linha celular H1299.
- Nos estudos de citotoxicidade, o composto 2CCP não mostrou ter efeitos anti-proliferativos (não se conseguiu calcular o IC50 para nenhuma das linhas celulares mesmo com concentrações muito elevadas).
- Os resultados dos estudos de biodistribuição mostraram que as vias de excreção do complexo ^{99m}Tc -2CCP são a via urinária e a via hepática através do sistema entero-hepatobiliar.
- Verificou-se que razão tumor/músculo aumentou ao longo do tempo, contudo esta não é suficientemente elevada para que o complexo ^{99m}Tc -2CCP seja um bom agente de imagem para o tipo de xenotransplantes utilizados.
- O valor de $P (-1)$ obtido confirmou que o complexo ^{99m}Tc -2CCP é hidrossolúvel.

Com o intuito de melhorar os resultados obtidos, sugere-se:

- ❖ A associação de outros fármacos com o 2CCP numa tentativa de potenciar o seu efeito fototerapêutico.
- ❖ A marcação radioativa de outros fotossensibilizadores, com um efeito fototerapêutico superior, com ^{99m}Tc e posteriormente com ^{188}Re . A marcação ^{99m}Tc -2CCP irá permitir otimizar o processo de marcação e a possibilidade de avaliar o seu potencial como agente de imagem. Como o ^{99m}Tc e o ^{188}Re são ambos metais radioativos com uma química semelhante, o composto também pode ser ligado ao ^{188}Re , com pequenas modificações do processo de radiomarkação. Deste modo, a marcação do fotossensibilizador com ^{188}Re irá

Conclusão e perspectivas futuras

proporcionar um radiofármaco com um efeito duplo, por um lado, uma parte da molécula será um agente de imagem e ao mesmo tempo pode funcionar como agente terapêutico, e por outro lado, a outra parte terá propriedades fotodinâmicas.

Bibliografia

1. Ruddon, R. W. *Cancer Biology*. (Oxford University Press: New York, 2007).
2. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics. **61**, 69-90 (2011).
3. Thompson, J. F. *Basics of Oncology*. (Springer: New York, 2009).
4. Beahrs, O. H. staging of cancer. (1991).
5. Hecker, E. Definitions and terminology in cancer (tumour) etiology. **54**, 1-10 (1976).
6. Hanahan, D. The hallmarks of cancer. *cell* (2000).at <<http://www.citeulike.org/group/1390/article/710800>>
7. Axelson, H., Fredlund, E., Ovenberger, M., Landberg, G. & Pahlman, S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells-a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Seminars in cell & developmental biology* **16**, 554-563 (2005).
8. Yano, S. *et al.* Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **12**, 46-67 (2011).
9. Classen, M., Guido, T. N. J. & Lighdale, C. J. Gastroenterological Endoscopy. (2010).
10. Pervaiz, S. & Olivo, M. Frontiers in Research Review: Cutting-Edge Molecular Approaches to Therapeutics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 551-556 (2006).
11. Josefsen, L. B. & Boyle, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-based drugs* **2008**, 276109 (2008).
12. Reddy, V. N. & Sehwat, S. Photodynamic Therapy. *NAD* 46-50 (2009).
13. Castano, a, Demidova, T. & Hamblin, M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one?photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 279-293 (2004).
14. Kubler, a Photodynamic therapy. *Medical Laser Application* **20**, 37-45 (2005).
15. Kessel, D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 3-7 (2004).
16. Allison, R. R. & Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **7**, 61-75 (2010).
17. Nyman, E. & Hynninen, P. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **73**, 1-28 (2004).
18. Hamblin, M. R. & Mróz, P. Advances in photodynamic therapy: basic, translational, and clinical. 1-10 (2008).

Bibliografia

19. Grossweiner, L. I., Grossweiner, J. B. & Rogers, G. B. H. The science of phototherapy: an introduction. 1-15 (2005).
20. Warren, M. J. & Smith, A. G. Tetrapyrroles: Birth, Life and Death. 128-135 (2009).
21. Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M. & Stewart, F. a Photodynamic therapy in oncology. *The oncologist* **11**, 1034-44 (2006).
22. Buytaert, E., Dewaele, M. & Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1776**, 86-107 (2007).
23. 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 (2009).
24. Hendrickx, N. *Mechanism and Role of Cyclooxygenase-2 Up-Regulation by Photodynamic Therapy*. 1-30 (Leuven University Press: 2006).
25. Cló, E., Snyder, J. W., Ogilby, P. R. & Gothelf, K. V. Control and selectivity of photosensitized singlet oxygen production: challenges in complex biological systems. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **8**, 475-81 (2007).
26. Konan, Y. N., Gurny, R. & Allemann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **66**, 89-106 (2002).
27. Zheng, X. A comparative study of photosensitizers with and without carbohydrate moieties. 1-8 (2006).
28. 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**, 1053-74 (2009).
29. De Rosa, F. S. & Bentley, M. V. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharmaceutical research* **17**, 1447-55 (2000).
30. Holt, J. J. Synthesis, photophysical properties, and biological activity of Tetramethylrosamine Analogs. 1-15 (2008).
31. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. & Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science* **24**, 259-68 (2009).
32. Allison, R. *et al.* Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers—A review of applications and outcomes. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 205-222 (2005).
33. Serra, A. *et al.* A look at clinical applications and developments of photodynamic therapy. *Oncology Reviews* **2**, 235-249 (2008).
34. Jori, G. & Reddi, E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *International Journal of Biochemistry* **25**, 1369-1375 (1993).

35. Allison, B., Pritchard, P. & Levy, J. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *British Journal of Cancer* **69**, 833 (1994).
36. Korbelik, M. & others Low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of Photofrin: how much is it relevant for selective accumulation of the photosensitizer in tumors? *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **12**, 107 (1992).
37. Ortel, B. & Shea, C. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Frontiers in bioscience: a* (2009).at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273342>>
38. Almeida, R. D., Manadas, B. J., Carvalho, A. P. & Duarte, C. B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1704**, 59-86 (2004).
39. Klionsky, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science* **118**, 7 (2005).
40. Section of Dermatology, University of Chicago Medical Center, 5841 South Maryland Avenue, MC-5067, Chicago, IL 60637, Department of Dermatology, University of Brescia, Piazzale Spedale Civile, I-25123 Brescia, Italy,. *BioScience* 4157-4172 (2009).
41. Wang, L., Ph, D., Tagg, R., Barqawi, A. B. & Chen, Y. K. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors - potential and technical challenges. *Cancer Research* **7**, 309-320 (2008).
42. Castano, a, Demidova, T. & Hamblin, M. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 91-106 (2005).
43. Qingming, L., Wang, L. V. & Tuchin, V. Advances in biomedical photonics and imaging. (2007).
44. Korbelik, M. & Dougherty, G. J. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer research* **59**, 1941-6 (1999).
45. Published, A., Link, C. & Terms, D. Photodynamic Therapy for Cancer and Activation of Immune Response. *Library* (2012).doi:10.1117/12.841031
46. Castano, A. P., Mroz, P. & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **6**, 535-545 (2010).
47. Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L. & Kinsella, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica [et al.]* **33**, 869-80 (2000).
48. Allison, R. R., Mota, H. C., Bagnato, V. S. & Sibata, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy--state of the art review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **5**, 19-28 (2008).
49. Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M. & Stewart, F. a Photodynamic therapy in oncology. *The oncologist* **11**, 1034-44 (2006).

Bibliografia

50. Mitton, D. & Ackroyd, R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **5**, 103-11 (2008).
51. Allison, R. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 27-42 (2004).
52. Brown, S. & Brown, E. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology* (2004). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204504015293>>
53. Nyst, H. J., Tan, I. B., Stewart, F. a & Balm, A. J. M. Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **6**, 3-11 (2009).
54. Seshadri, M. Improving the efficacy and selectivity of photodynamic therapy. (2006).
55. Das, T., Chakraborty, S., Sarma, H. D., Banerjee, S. & Venakatesh, M. A novel ¹⁷⁷Lu-labeled porphyrin for possible use in targeted tumor therapy. *Nuclear medicine and biology* **37**, 655-63 (2010).
56. Kuma, C. S. S. R. Nanomaterials for cancer therapy. (2006).
57. Fakhar-e-Alam, M. *et al.* Labelling and optimization of PHOTOFRIN ® with ^{99m}Tc. *Radiochimica Acta* **98**, 813-818 (2010).
58. Babbar, a K., Singh, a K., Goel, H. C., Chauhan, U. P. & Sharma, R. K. Evaluation of (^{99m}Tc)-labeled photosan-3, a hematoporphyrin derivative, as a potential radiopharmaceutical for tumor scintigraphy. *Nuclear medicine and biology* **27**, 587-92 (2000).
59. Kadish, K. M., Smith, K. M. & Roger, G. Handbock of Porphyrin Science: with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering Biology and Medicine. (2010).
60. Joshi, B. P. & Wang, T. D. *Exogenous Molecular Probes for Targeted Imaging in Cancer: Focus on Multi-modal Imaging. Cancers* **2**, 1251-1288 (2010).
61. Pandey, R. . *et al.* Patent application title- Porphyrin-based compounds for tumor imaging and photodynamic therapy. (2010).
62. Ranyuk, E. R. *et al.* PET imaging using ⁶⁴Cu-labeled sulfophthalocyanines: synthesis and biodistribution. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**, 7470-3 (2011).
63. Volkert, W., Goeckeler, W., Ehrhardt, G. & Ketring, A. Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *Journal of Nuclear Medicine;(USA)* **32**, (1991).
64. Wang, S. J. *et al.* Histologic study of effects of radiation synovectomy with Rhenium-188 microsphere. *Nuclear medicine and biology* **28**, 727-732 (2001).
65. Stigbrand, T., Carlsson, J. & Adams, G. P. *Targeted radionuclide tumor therapy: biological aspects.* (Springer Verlag: 2008).at <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=-mTOLthq_54C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Targeted+Radionuclide+Tumor+Therapy:+Biological+Aspects&ots=v7FlnazBRo&sig=JHkjKBxH5vNTb1yN7ef2ATHBQkw>

66. Saha, G. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Springer (1998).
67. Murugesan, S., Shetty, S. J., Srivastava, T. S., Samuel, A. M. & Noronha, O. P. D. P reparation and biological evaluation of the new chlorin photosensitizer T3 , 4BCPC for detection and treatment of tumors. *Animals* **68**, 33-38 (2002).
68. Lodish, H. *et al.* *Molecular Cell Biology*. (2000).
69. Zolle, I. *Technetium-99m Pharmaceuticals*. (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007).doi:10.1007/978-3-540-33990-8
70. Jia, Z., Deng, H., Pu, M. & Luo, S. Rhenium-188 labelled meso-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl] porphyrin for targeted radiotherapy: preliminary biological evaluation in mice. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **35**, 734-42 (2008).
71. M, S., Shetty, S. ., Srivastava, T. ., Noronha, O. P. . & Samuel, A, M. Evaluation studies of technetium-99m-porphyrin (T3,4BCPP) for tumor imaging. *John Wiley & Sons* (2001).
72. Hung, J. C., Ponto, J. A. & Hammes, R. J. *Radiopharmaceutical-Related Pitfalls and Artifacts*. *W.B. Saunders Company* (1996).
73. Vallabhajosula, S., Killeen, R. P. & Osborne, J. R. Altered biodistribution of radiopharmaceuticals: role of radiochemical/pharmaceutical purity, physiological, and pharmacologic factors. *Seminars in Nuclear Medicine* **40**, 220-41 (2010).
74. You, Y. *et al.* Properties , and in Vitro Studies of Photosensitization , Uptake , and Localization with Carboxylic Acid-Substituted Derivatives. 3734-3747 (2003).
75. Fazaeli, Y. *et al.* Development of a ⁶⁸Ga-Fluorinated Porphyrin Complex as a Possible PET Imaging Agent. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **46**, 20-26 (2011).
76. Woodburn, K. W. *et al.* Evaluation of tumour and tissue distribution of porphyrins for use in photodynamic therapy. *British Journal of Cancer* **65**, 321-8 (1992).
77. D, K., P, T., Saatio, K. & Nantwi, K. Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetra- phenylporphine. *Photochem. Photobiol.* (1987).
78. Origitano, T. C., Karesh, S. . & Henkin, R. E. Photodynamic therapy (PDT) for intranial neoplasms: investigations of photosensitizer uptake and distribution using Indium-111- Photofrin II single emission computed tomography scans in humans with intracranial, neoplasms. *Photochem. Photobiol* (1989).