

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Luis Filipe Resende Rodrigues

**AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA APÓS  
TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal,  
orientada pelo Doutora Lígia Catarina Gomes da Silva e  
apresentada ao Departamento de Química da Universidade de  
Coimbra.

Setembro de 2022



Luis Filipe Resende Rodrigues

# **AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal,  
orientada pela Doutora Lígia Catarina Gomes da Silva e  
apresentada ao Departamento de Química da Universidade de  
Coimbra.**

Setembro de 2022

Universidade de Coimbra



## **Agradecimentos**

Chegado ao fim de mais uma etapa, gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu sucesso. Esta foi uma longa jornada que se provou ser uma mais-valia para um desenvolvimento pessoal, intelectual e profissional.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Doutora Lígia Catarina Gomes da Silva por me ter dado a oportunidade de realizar esta tese. Gostaria de agradecer todo o conhecimento transmitido, todo o tempo despendido, todos os conselhos e preocupações e especialmente por toda a paciência.

Ao Doutor Fábio Schaberle, por todo o conhecimento transmitido, ideias, apoio e conselhos.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente, Piotr Gierlich, Claire Donohoe e Harry Sample por todo apoio, motivação e ensinamentos. E especialmente por todos os bons momentos passados no laboratório.

Ao Prof. Luís Arnaut por todas as dicas e conselhos e por ter dado a possibilidade de trabalhar num excelente grupo de investigação.

A todas as pessoas do Departamento de Química da Universidade de Coimbra que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Um obrigado aos meus amigos pelo incentivo e motivação!

Um grande obrigado para a minha família por ter sempre acreditado em mim, pelo apoio incondicional e por estar sempre presente

**Um grande obrigado!**

## Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. A terapia fotodinâmica é um procedimento clinicamente aprovado que tem demonstrado um grande potencial para o tratamento de tumores sólidos. Esta terapia é caracterizada pela administração de um fotossensibilizador que quando irradiado, na presença de oxigénio, vai gerar espécies reativas de oxigénio. Estas moléculas têm a capacidade de criar um stress oxidativo que vai danificar as biomoléculas envolventes e consequentemente, pode causar a morte das células tumorais. A terapia fotodinâmica, para além da ação directa que tem no cancro, apresenta ainda a vantagem de estimular o sistema imunitário a reconhecer e destruir células cancerígenas.

Os lípidos são um dos tipos de biomoléculas que podem sofrer oxidação após tratamentos de terapia fotodinâmica. Os lípidos podem ser oxidados pelas espécies reativas de oxigénio ou diretamente pelo fotossensibilizador no estado tripleto e como resultado, surgem uma série de moléculas, algumas das quais com propriedades citotóxicas. Tipicamente, após a oxidação lipídica é característico observar-se a formação de malonaldeído, 4-hidroxi-2-nonenal, hidroperóxidos lipídicos assim como a diminuição dos tióis. Estas moléculas podem ter diversos efeitos biológicos como por exemplo, a ativação de diversas vias de sinalização associadas a variados mecanismos de morte celular.

Este trabalho teve como objectivo perceber a extensão da oxidação lipídica causada por tratamentos de terapia fotodinâmica usando três fotossensibilizadores com lipofilicidades diferentes: LUZ51b, LUZ11- $\alpha_3\beta$  e LUZ10. Num primeiro conjunto de estudos, optimizaram-se as concentrações e doses de luz necessárias de modo a obter níveis de morte celular semelhantes para os três fotossensibilizadores. Estas condições foram usadas para os estudos posteriores relacionados com a avaliação lipídica. Os resultados obtidos nos nossos estudos exploratórios demonstraram que a terapia fotodinâmica com as três moléculas em estudo resultou na produção de espécies reativas de oxigénio, quer em solução quer no meio intracelular. A avaliação da oxidação lipídica, nomeadamente pela quantificação de hidroperóxidos lipídicos, MDA e grupos tióis demonstra que de facto ocorre a oxidação de lípidos. Contudo, e ao contrário do antecipado, a terapia fotodinâmica com LUZ10 induz maiores níveis de oxidação lipídica.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica; Cancro; Espécies reativas de oxigénio, Malonaldeído (MDA); Oxidação lipídica; Tióis

## Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Photodynamic therapy is a clinically approved procedure that has shown great potential for the treatment of solid tumors. This therapy is characterized by the administration of a photosensitizer that when irradiated, in the presence of oxygen, will generate reactive oxygen species. These molecules can create an oxidative stress that will damage the surrounding biomolecules and consequently can cause the death of tumor cells. Photodynamic therapy, besides its direct action on cancer, also has the advantage of stimulating the immune system to recognize and destroy cancer cells.

Lipids are one of the types of biomolecules that can suffer oxidation after photodynamic therapy treatments. Lipids can be oxidized by reactive oxygen species or directly by the photosensitizer in the triplet state and as a result, several molecules emerge, some of which have cytotoxic properties. Typically, after lipid oxidation it is characteristic to observe the formation of malonaldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, lipid hydroperoxides as well as the decrease of thiols. These molecules can have various biological effects such as the activation of various signaling pathways associated with various cell death mechanisms.

This work aimed to understand the extent of lipid oxidation caused by photodynamic therapy treatments using three photosensitizers with different lipophilicities: LUZ51b, LUZ11- $\alpha_3\beta$  and LUZ10. In a first set of studies, the required light concentrations and doses were optimized to obtain similar levels of cell death for the three photosensitizers. These conditions were used for the subsequent studies related to lipid evaluation. The results obtained in our exploratory studies demonstrated that photodynamic therapy with the three molecules under study resulted in the production of reactive oxygen species, both in solution and in the intracellular medium. The evaluation of lipid oxidation, namely by quantification of lipid hydroperoxides, MDA and thiol groups demonstrates that lipid oxidation does indeed occur. However, and contrary to what was anticipated, photodynamic therapy with LUZ10 induces higher levels of lipid oxidation.

**Keywords:** Photodynamic therapy; Cancer; Reactive oxygen species; Malonaldehyde (MDA); Lipid oxidation; Thiols

# Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	ii
Abstract.....	iii
Índice de figuras.....	vi
Índice de equações .....	vii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Terapia fotodinâmica (PDT) .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Terapia fotodinâmica (PDT) .....	2
1.1.2. Aplicações terapêuticas da PDT .....	6
<b>1.2. Morte celular imunogénica (ICD) .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Morte celular imunogénica induzida PDT.....	11
<b>1.3. Oxidação lipídica mediada pela PDT.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>16</b>
2.1. Linha celular e reagentes.....	16
2.2. Fotossensibilizador .....	16
2.3. Solução stock de cada fotossensibilizador .....	17
2.4. Avaliação da viabilidade celular usando o método do Alamar Blue (resazurina)....	17
2.5. Avaliação da produção de ROS em solução.....	18
2.6. Avaliação da produção de ROS em células por microscopia de fluorescência.....	19
2.7. Avaliação da peroxidação lipídica através do BODIPY™ 581/591 C11 .....	19
2.8. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação do malonaldeído .....	20
2.9. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação dos grupos tióis .....	21
2.10. Avaliação dos grupos carbonilo nas proteínas .....	21
<b>3. Resultados e discussão .....</b>	<b>23</b>
3.1. Viabilidade celular após activação dos fotossensibilizadores presentes no meio intracelular.....	23
3.2. Viabilidade celular após activação dos fotossensibilizadores presentes no meio extracelular .....	24
3.3. Avaliação da produção de ROS em solução.....	25
3.4. Produção de ROS em células avaliada por microscopia de fluorescência.....	26
3.5. Avaliação da peroxidação lipídica através do BODIPY™ 581/591 C11 .....	29
3.6. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação do malonaldeído .....	31
3.7. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação dos grupos tióis .....	32
3.8. Avaliação da oxidação proteica através da quantificação dos grupos carbonilo.....	33
<b>4. Conclusão.....</b>	<b>35</b>



<b>5. Bibliografia</b> .....	36
------------------------------	----

## Índice de figuras

Figura 1. Características do Cancro (retirado de Hanahan et al <sup>4</sup> ).....	1
Figura 2. A) Procedimento clínico geral para a PDT; B) Ilustração esquemática simplificada do mecanismo a PDT. ....	3
Figura 3. A) Janela fototerapêutica (Dąbrowski e Arnaut, 2015); B) Profundidade de penetração da luz nos tecidos (Agostinis et al <sup>11</sup> ) .....	4
Figura 4. Diagrama de Jablonski demonstrando os vários modos de excitação e decaimento eletrónico de uma molécula. Excitação; Fluorescência; Cruzamento inter-sistema; fosforescência; transferência, não radioativo (Adaptado de Schweizer et al <sup>13</sup> ) .....	5
Figura 5. Mecanismos da terapia fotodinâmica (retirado de Donohoe et al <sup>12</sup> ) .....	5
Figura 6. Representação esquemática da indução da ICD. Após diferentes tratamentos as células estão em processo de morte celular. E existe exposição de alguns DAMPS e libertação de outros no meio extracelular para serem reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos. (retirado de J. Zhou et al <sup>35</sup> ).....	8
Figura 7. Principais características da ICD (retirado de Lobo et al <sup>45</sup> ).....	10
Figura 8. Morte celular imunogénico (retirado de Donohoe et al <sup>12</sup> ) .....	12
Figura 9. Mecanismo de oxidação lipídico (adaptado de Barrera et al <sup>57</sup> ).....	13
Figura 10. Fotossensibilizadores LUZ10 (A); LUZ11 (B); LUZ51b (C).....	17
Figura 11 Viabilidade na presença de luz (fototoxicidade), após a incubação com o fotossensibilizador durante 24 h. A) LUZ11- $\alpha_3\beta$ numa gama de concentrações desde 1 até 0.008 $\mu\text{M}$ com uma dose de luz de 1 $\text{J}/\text{cm}^2$ . B) LUZ51b com uma gama de concentrações de 200 nM até 1,56 nM com uma dose de luz de 1 $\text{J}/\text{cm}^2$ . C) LUZ11- $\alpha_3\beta$ numa gama de concentrações desde 10 até 0,08 $\mu\text{M}$ com uma dose de luz de 8 $\text{J}/\text{cm}^2$ . As barras indicam médias + SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método one-way ANOVA da Luz51b vs células sem tratamento; * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , e *** $p < 0,001$ , **** $p < 0,0001$ . .....	23
Figura 12. Viabilidade na presença de luz (fototoxicidade), após a irradiação imediatamente a seguir a adição da luz51b. A LUZ51b foi adicionada numa gama de concentrações desde 80 até 1.25 $\mu\text{M}$ e usou-se uma dose de luz de (A) 1 $\text{J}/\text{cm}^2$ e (B) 1 $\text{J}/\text{cm}^2$ . As barras indicam médias + SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método one-way ANOVA da Luz51b vs células sem tratamento; * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , e *** $p < 0,001$ . .....	24
Figura 13. Produção de ROS em PBS com uma concentração de APF ou DHE de 5 $\mu\text{M}$ . (A) Soluções com APF) ou (B) DHE e uma gama de concentrações de 0,04 a 5 $\mu\text{M}$ para a LUZ11- $\alpha_3\beta$ foram irradiadas de forma cumulativa com doses de luz que vão desde 0 $\text{j}/\text{cm}^2$ até 12 $\text{j}/\text{cm}^2$ (n=2). Soluções com (C) APF ou (D) DHE e uma gama de concentrações de 0,043 até 5 $\mu\text{M}$ para a LUZ51b foram irradiadas de forma cumulativa com doses de luz que vão desde 0 $\text{j}/\text{cm}^2$ até 12 $\text{j}/\text{cm}^2$ (n=2).....	26
Figura 14. Avaliação do stress oxidativo em células 4T1 avaliado indirectamente com a sonda DHE por microscopia de fluorescência. As células foram incubadas durante 24 h com LUZ51b (100, 50 e 25 nM) seguindo-se a adição da sonda DHE (5 $\mu\text{M}$ ). As células foram irradiadas com 1 $\text{j}/\text{cm}^2$ e as imagens de microscopia foram tiradas após (A) 30 min, (B) 3 h e (C) 6 h (C). A coloração vermelha é proveniente do DHE oxidado e o Hoechst, a azul, indica a marcação do núcleo. Escala de 100 $\mu\text{m}$ .....	28
Figura 15. Peroxidação lipídica avaliada por intermédio do BODIPY™ 581/591 C11 usado na concentração de 5 $\mu\text{M}$ após tratamentos de PDT com os fotossensibilizadores (A) LUZ11- $\alpha_3\beta$ na gama de concentrações de 1, 0.5 e 0.25 $\mu\text{M}$ (n=3); (B) LUZ51b nas concentrações de 100, 75, 50 nM (N=2) e, (C) LUZ10 nas concentrações de 20 e 10 $\mu\text{M}$ (n=3). Os resultados obtidos foram normalizados pelo controlo negativo (ctr-) o qual consistiu em células apenas incubadas com o BODIPY™ 581/591 C11). Os fotossensibilizadores foram incubados durante 24 h e o controlo positivo foi o hidroperóxido de cumeno (ctr+). As barras indicam a média +/- SEM de 2 a 3 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método ONE-way ANOVA das células tratadas vs ctr-; * $p < 0,05$ .....	29

Figura 16. Peroxidação lipídica avaliada por intermédio do com BODIPY™ 581/591 C11 usado na concentração de 5 µM e após tratamentos de PDT com a LUZ51b nas concentrações de 80, 60 e 40 µM. O controlo positivo (ctr+) foi o hidroperóxido de cumeno (ctr+) (n=2). As barras indicam as médias +/- SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método ONE-way ANOVA das células tratadas vs ctr-.....	30
Figura 17. Quantificação do malonaldeído. LUZ51b foi incubada durante 24 h e irradiada com 1 J/cm <sup>2</sup> . A quantificação de MDA foi realizada 30 min e 1h30min após a das células. (n=2). As barras indicam as médias +/- SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método two-way ANOVA da Luz51b vs células sem tratamento; .....	31
Figura 18. Concentração de tióis normalizado pelo controlo. LUZ51b nas concentrações de 50, 25,12,5 nM. A quantificação dos tióis foi realizada 30 min(n=1), 3h(n=3) e 6h(n=1) após a irradiação. As barras indicam as médias +/- SEM de 1 (30 min e 6 h) ou 3 (3 h) experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método two-way ANOVA dasda LUZ51b vs células sem tratamento; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 .....	33
Figura 19. Conteúdo de grupos Carbonilo após o tratamento com a LUZ51b nas concentrações de 100, 75 e 50 nM e irradiação com 1J/cm <sup>2</sup> (n=1) .....	34

## Índice de equações

Equação 1. Equação de Lambert – Beer; A) Absorvância; ε) coeficiente de absorção molar; l) comprimento do caminho ótico .....	17
Equação 2. Equação para o cálculo do tempo de irradiação <sup>63</sup> .....	18

## 1. Introdução

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Em 2020 foram descobertos cerca de 19,3 milhões novos casos de cancro e cerca de 10 milhões de mortes. Sendo o cancro da mama o mais comum, seguido pelo cancro do pulmão, colorretal, próstata e estômago.<sup>1</sup>

O cancro é uma doença caracterizada pelo crescimento rápido e descontrolado de células e pela capacidade de aquisição de propriedades metastáticas e consequentemente a capacidade de se expandir para outras partes do corpo. Na maioria dos casos ocorre a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumores e consequentemente o ritmo de crescimento descontrolado com a inibição de mecanismos apoptóticos<sup>2,3</sup>. O cancro tem a capacidade de evitar os mecanismos supressores de crescimento, evitar a deteção/destruição por parte do sistema imunitário e de induzir o aumento da vasculatura na zona tumoral. É característico a instabilidade genómica, a presença de mutações genéticas e a desregulação metabólica (Figura 1)<sup>4</sup>.



**Figura 1.** Características do Cancro (retirado de Hanahan et al<sup>4</sup>)

Actualmente existem vários tratamentos para o cancro. Como a quimioterapia que permite destruir as células tumorais ou diminuir a sua progressão e pode ser combinada com outras terapias. Mas em contrapartida, é um tratamento bastante agressivo, com diversos efeitos secundários bastante debilitantes para os pacientes, como por exemplo fadiga, vômitos ou perda de cabelo. A cirurgia é um tratamento que permite remover diretamente e de imediato as células tumorais. Mas em contrapartida, a cirurgia pode não remover as células tumorais na totalidade, existe sempre um risco de morte associado ao procedimento cirúrgico, assim como não permite o tratamento das metástases. A radioterapia que por si só pode eliminar as células tumorais, mas é mais

eficaz quando combinada com outras terapias. Apresenta alguns efeitos secundários e tem como factor limitante a quantidade de radiação que cada corpo pode receber de forma segura. A imunoterapia é um tratamento que tem tido uma forte expansão recentemente e é uma terapia, que de uma forma geral, usa o sistema imunitário do paciente contra o cancro. É uma terapia sem grandes efeitos secundários.<sup>5</sup>

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, quer ao nível do diagnóstico quer ao nível do tratamento, observa-se um aumento contínuo de novos casos de cancro. Este aumento pode ser explicado pelo aumento da esperança média de vida, mas também por alterações no estilo de vida (e.g. alimentação, sedentarismo, tabagismo, maior exposição a agentes químicos, etc.). A percepção de que o cancro é uma das doenças mais prevalentes e associada a uma elevada mortalidade o que evidencia a necessidade de se continuar a investigar/ desenvolver novas opções terapêuticas.

## **1.1. Terapia fotodinâmica (PDT)**

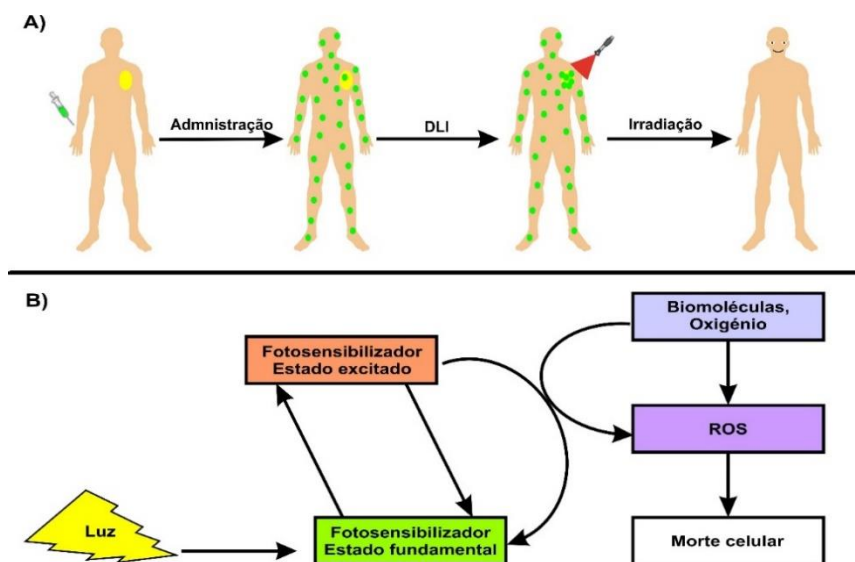
### **1.1.1. Terapia fotodinâmica (PDT)**

O uso da luz para o tratamento de cancro remota há mais de 3 mil anos. As antigas civilizações egípcias, chinesas e romanas usavam a luz para tratar doenças como psoríase, raquitismo, vitiligo e cancro de pele<sup>6,7</sup>.

Há mais de um século atrás cientistas verificaram que a luz combinada com um composto químico podia induzir morte celular. Em 1900, Oscar Raab verificou que alguns comprimentos de onda combinados com acridina provocavam a morte de uma espécie de protozoários. Em 1903, Niels Finsen ganhou o prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina pelo uso de luz vermelha no tratamento de pústulas de varíola e ainda pelo uso de luz ultravioleta no tratamento da tuberculose e morte de bactérias. Em 1960, Richard Lipson e Samuel Schwartz criaram um composto que era uma mistura de derivados de hematoporfirina para detecção e diagnóstico de tumores, mais tarde descobriram que quando irradiado iria matar células tumorais. Von Tappeiner e Jesionek criaram o termo “*photodynamic action*” para descrever o tratamento do carcinoma basocelular com eosina e luz branca. Anos mais tarde Dougherty, seleccionou e purificou um dos derivados hematoporfirina e lançou o primeiro composto disponível para uso clínico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA). Este composto foi chamado de Photofrin® e usado no tratamento do cancro do esófago em estado avançado.<sup>6-8</sup>

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) é um procedimento terapêutico pouco invasivo e que apresenta resultados promissores no tratamento do cancro. Em termos práticos, a PDT consiste na administração de um composto químico chamado de fotossensibilizador que por si só é inerte. Após um tempo definido, denominado como *drug-to-light interval* (DLI), que corresponde ao tempo desde a

inoculação do composto até a sua irradiação, o fotossensibilizador é activado por incidência de uma luz a um comprimento de onda específico. Na presença de oxigénio, vai ocorrer a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês reactive oxygen species). Os ROS tais como oxigénio singleto ( $^1O_2$ ), radicais hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), são tóxicos para as células envolventes através da oxidação das moléculas envolventes (Figura 2).<sup>9-12</sup>



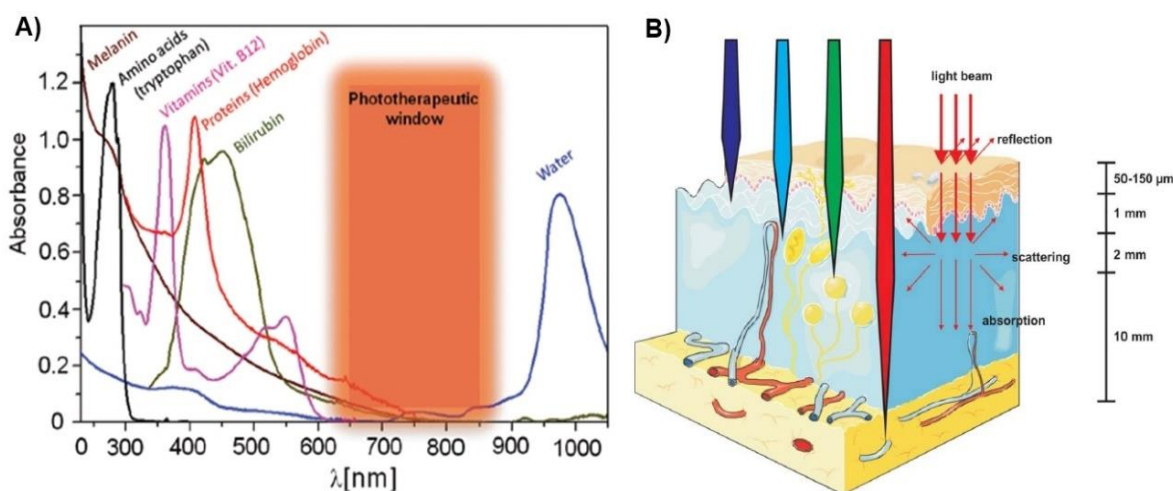
**Figura 2.** A) Procedimento clínico geral para a PDT; B) Ilustração esquemática simplificada do mecanismo a PDT.

O DLI usado tem um impacto muito importante nos alvos da PDT. Elevado DLI (e.g. DLI > 24 h) facilita uma melhor internalização e distribuição pelos organelos celulares, causando um maior stress oxidativo e proporcionando uma morte direta das células tumorais (PDT celular). Um reduzido DLI (e.g. < 30min) não proporciona tempo suficiente para ocorrer uma internalização significativa, o fotossensibilizador está localizado maioritariamente na vasculatura tumoral, quando irradiado vai provocar a destruição da vasculatura que vai cortar o fornecimento de oxigénio e nutriente às células tumorais levando a hipóxia e por última à morte celular (PDT Vascular). Quer a PDT celular, quer a PDT vascular, podem activar uma resposta do sistema imunitário que contribui para a detecção e destruição de células cancerígenas em qualquer parte do organismo. Por esta razão, a PDT não tem efeitos apenas locais, ao nível do tumor irradiado, podendo também contribuir de forma significativa para a redução de metástases distantes e não submetidas a irradiação.<sup>9-11</sup>

### 1.1.1.1. Luz e oxigénio

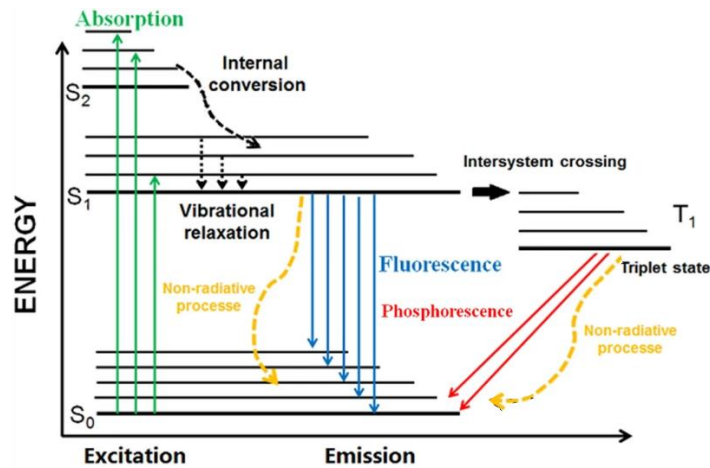
O uso de luz na PDT evoluiu desde o uso de luz solar até ferramentas de iluminação mais sofisticadas como o recurso a um díodo emissor de luz (LED, em inglês: *light-emitting diode*) e laser (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação). Atualmente, é possível dar uma dose de luz adequada e precisa, a uma grande parte do corpo humano,

usando LEDs ou lasers acoplados a fibras óticas que são inseridas nos tecidos. Cada tratamento deve usar sistemas de irradiação apropriados para a especificidade da cada doente/tumor. A escolha do comprimento de onda da luz utilizada para a ativação do fotossensibilizador é um parâmetro de grande importância. Tipicamente, é usada uma fonte de luz cujo comprimento de onda corresponde ao pico de máxima absorção do fotossensibilizador. O comprimento de onda ideal deve permitir uma boa penetração da luz nos tecidos, evitar absorção por vários constituintes do corpo humano, como por exemplo a água, hemoglobina, vitaminas ou aminoácidos, e ainda ter energia suficiente para a ativação do fotossensibilizador (Figura 3 A). Para o efeito, deve-se utilizar um comprimento de onda compreendido entre 650 e 850 nm. Esta gama de comprimentos de onda é denominada de janela fototerapêutica (Figura 3 B) <sup>9,11</sup>



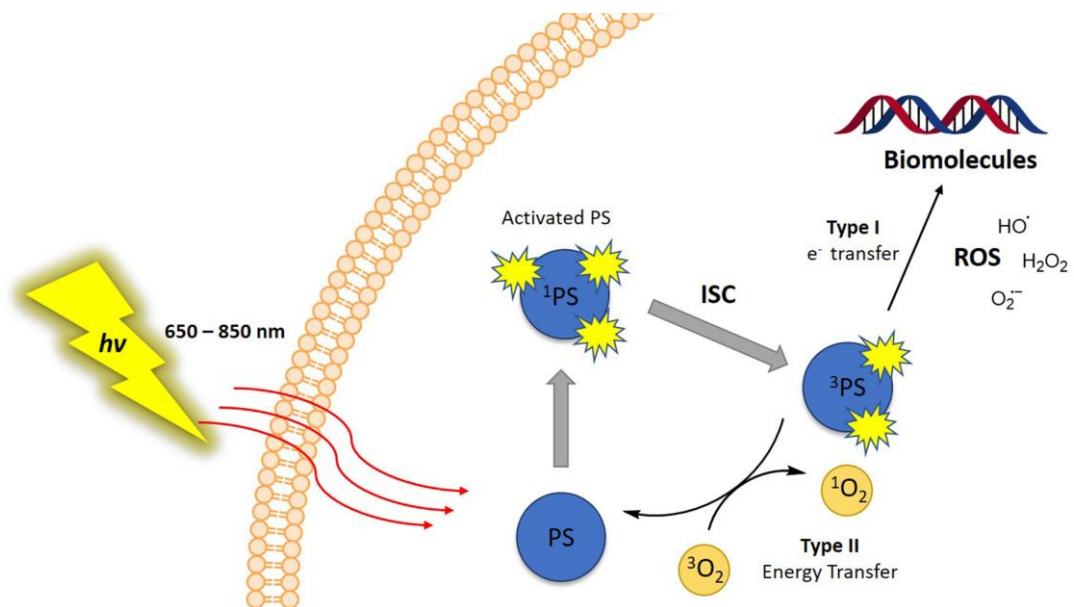
**Figura 3. A)** Janela fototerapêutica (Dąbrowski e Arnaut, 2015); **B)** Profundidade de penetração da luz nos tecidos (Agostinis et al<sup>11</sup>)

O oxigênio é uma das peças mais importantes da PDT, servindo como ponto de partida para o surgimento de ROS. A quantidade de oxigênio presente nas células e tecidos tumorais pode ditar uma maior ou menor eficácia da PDT. Para a formação de ROS, começamos pela administração de um fotossensibilizador que irá ser excitado, ou seja iremos fornecer energia ao fotossensibilizador. Este que está no seu estado fundamental vai passar para o seu estado excitado. A partir do seu estado excitado ocorre um cruzamento inter-sistema convertendo o fotossensibilizador para o seu estado tripleto. Partindo do estado tripleto, o fotossensibilizador vai transferir energia, elétrons para a formação de ROS como por exemplo o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ). Quando o fotossensibilizador está num estado excitado pode haver decaimento de energia por fluorescência, por decaimento não radioativo ou por cruzamento inter-sistema (Figura 4). Quando o fotossensibilizador está no seu estado tripleto, pode haver decaimento não radiativo, fosforescência ou pela transferência de energia e elétrons. <sup>8,9,11</sup>



**Figura 4.** Diagrama de Jablonski demonstrando os vários modos de excitação e decaimento eletrônico de uma molécula. Excitação; Fluorescência; Cruzamento inter-sistema; fosforescência; transferência, não radioativa (Adaptado de Schweizer et al<sup>13</sup>)

Existem 2 mecanismos de transferência de energia do estado tripleto da molécula de fotossensibilizador para outras moléculas para a formação de ROS. No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado tripleto transfere um electrão para oxigénio ou para biomoléculas resultando na formação de radicais como o hidroxilo (OH), radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). No mecanismo de tipo II, o fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia para uma molécula de oxigénio molecular ( $^3O_2$ ). O oxigénio molecular no seu estado fundamental apresenta-se como uma molécula no estado tripleto e que quando recebe um electrão esta passa para um estado singlete ( $^1O_2$ ) que é um importante e reativo ROS (Figura 5).<sup>8,9,11,14</sup>



**Figura 5.** Mecanismos da terapia fotodinâmica (retirado de Donohoe et al<sup>12</sup>)



### **1.1.1.2. Fotossensibilizadores**

A escolha ou desenvolvimento de um fotossensibilizador deverá ser feita tendo em conta uma série de propriedades que são desejáveis para a obtenção de bons efeitos terapêuticos. O fotossensibilizador deverá ter uma elevada absorção dentro da janela fototerapêutica de modo a ter uma boa penetração nos tecidos. Composto como bacterioclorinas, clorinas ou ftalocianinas apresentam, por norma, uma boa absorção dentro da janela fototerapêutica.<sup>11,15</sup> Idealmente, um fotossensibilizador deverá ter uma longa vida do estado tripleto e também uma boa capacidade para transferir essa energia/electrões para outras moléculas capazes de formar ROS, ou seja, deverá possuir um alto rendimento quântico de ROS. No estado fundamental, ou seja, sem ser irradiado, o fotossensibilizador deverá apresentar uma toxicidade reduzida ou nula para as células. Deverá ser um composto estável quimicamente e fotoquimicamente assim como ser de fácil produção e ter custos de produção baixos. Uma boa solubilidade em meio aquoso é valorizada, tal como um elevado grau de pureza. Para protocolos de PDT celular, é importante que o fotossensibilizador exiba uma boa internalização, nomeadamente nas células tumorais, mas não nas células saudáveis. O tempo de eliminação do fotossensibilizador do organismo é outro parâmetro importante. Fotossensibilizadores que residem por muito tempo no organismo aumentam o risco de efeitos secundários, nomeadamente fotossensibilidade da pele.<sup>9,15,16</sup>

O primeiro fotossensibilizador a receber aprovação para o tratamento do cancro foi o Photofrin® (Porfímero sódico), composto este que apresentava algumas desvantagens tais como uma baixa absorção na janela fototerapêutica, baixa penetração nos tecidos e fotossensibilidade bastante prolongada.<sup>10,17</sup> Desde então surgiu a segunda geração de fotossensibilizadores, como temoporfina (Foscan®), talaporfina (LS11®) ou verteporfina (Visudyne®), os quais apresentaram algumas melhorias em relação a primeira geração. Conseguiu-se melhorar a absorção dentro da janela fototerapêutica e diminuir o período de fotossensibilidade.<sup>9,10,17</sup> Na última geração de fotossensibilizadores surgiram as bacterioclorinas, como a padeliporfina e redaporfina (LUZ11- $\alpha_3\beta$ ) ainda na fase de ensaios clínicos. A vantagem destas bacterioclorinas incluem uma elevada absorção entre 740-760 nm e um alto rendimento quântico de ROS. Além disso, possuem um tempo relativamente baixo de fotossensibilidade.<sup>9,10</sup>

### **1.1.2. Aplicações terapêuticas da PDT**

A PDT é uma terapia com grande potencial e o seu número de aplicações tem vindo a aumentar a um bom ritmo. Actualmente a PDT está a ser investigada para a destruição de biofilmes<sup>18</sup>, a inativação de bactérias gram positivas e também negativas<sup>19</sup> mas também para a inativação de fungos e vírus<sup>20,21</sup>. A PDT tem sido bastante usada para o tratamento de doenças da pele como a queratose actínica<sup>22</sup>. Contudo, uma das mais importantes aplicações é no tratamento do cancro.<sup>9,10,12,23</sup>

O cancro é uma patologia de difícil tratamento e de enorme variedade. Existem diferentes tipos e subtipos de cancro com especificidades diferentes e as suas diferentes localizações tornam os tratamentos mais difíceis. Para alguns tipos de cancro existem poucas opções terapêuticas, ou mesmo nenhuma. Nestes casos, a PDT poderá ser uma mais-valia. Atualmente existem vários fotossensibilizadores aprovados para uso clínico da qual podemos destacar o Photofrin® para o tratamento de cancro esofágico e do pulmão, o Foscan® para o tratamento do cancro do pulmão e pele, a bacterioclorina WST11® para o tratamento do cancro da próstata. Existem também outros em fases finais dos ensaios clínicos como é o caso da Redaporfina (LUZ11- $\alpha_3\beta$ ) que esta em ensaios para o tratamento de cancro do pescoço e cabeça.<sup>9,12</sup>

### **1.1.2.1. Protocolos de PDT: celular vs vascular**

Como mencionado anteriormente, a PDT pode ser executada com base em dois protocolos que actuam sobre alvos terapêuticos diferentes. A PDT vascular e a PDT celular diferem inicialmente no DLI. A PDT vascular apresenta um DLI < 15/30min, ou seja, um período entre a administração do fotossensibilizador e a irradiação do tumor, muito reduzido. O facto de termos um DLI reduzido tem consequências, a principal é a distribuição do fotossensibilizador. Este no momento da irradiação encontra-se sobretudo na vasculatura tumoral e periferia. Quando irradiado, os ROS vão atuar sobretudo nos vasos sanguíneos, provocando o colapso dos mesmos. Quando a vasculatura é destruída, não há transporte de substâncias nocivas para fora do tumor, de nutrientes e O<sub>2</sub> para as células tumorais, o que leva a hipóxia. Neste protocolo de PDT não há morte direta das células tumorais, mas sim uma destruição da vasculatura que conseqüentemente leva à morte celular essencialmente por necrose accidental.<sup>24-27</sup>

A PDT celular apresenta um DLI tipicamente superior a 24 horas e como consequência a distribuição do composto será diferente da PDT vascular. Após 24 horas, espera-se que o fotossensibilizador tenha sido internalizado pelas células. Assim, no momento da irradiação, os ROS serão gerados dentro das células., indo atacar os constituintes celulares na sua proximidade. O stress oxidativo gerado dentro das células desencadeia mecanismos de morte regulada, como é o caso da apoptose, mas também formas não reguladas como a necrose.<sup>12,14,28</sup> Assim, pode-se afirmar que neste tipo de protocolo, a morte das células tumorais ocorre por acção directa da PDT nas células alvo.

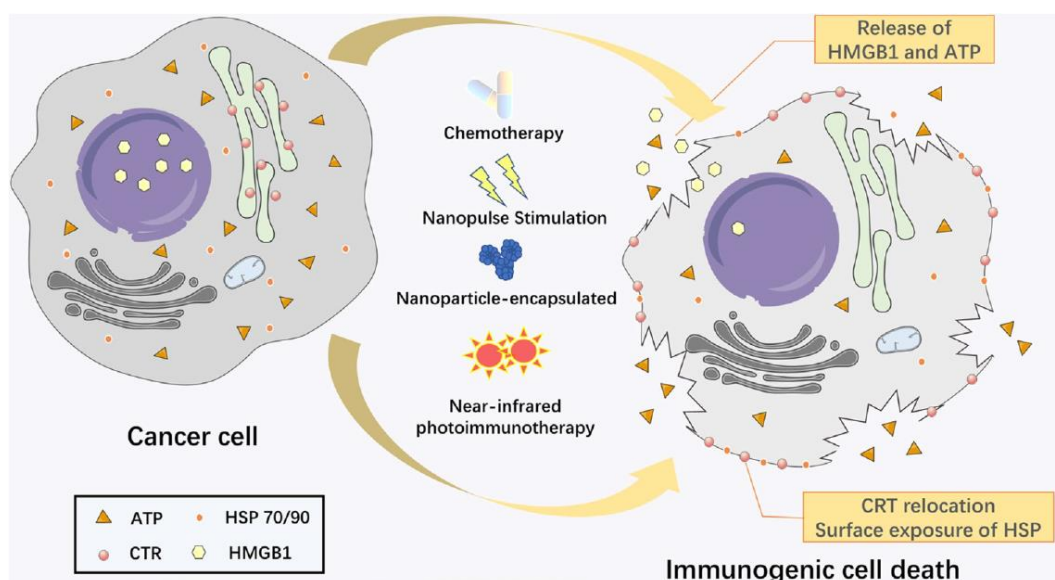
Ambos os protocolos têm vindo a ser associados à activação do sistema imunitário. A actuação do sistema imunitário é fundamental para a obtenção de bons resultados terapêuticos. Por exemplo, vários estudos demonstram de forma inequívoca que a eficiência da PDT é muito menor em animais imunodeprimidos. Actualmente sabe-se que a activação do sistema imunitário depende dos mecanismos de morte celular que são desencadeados. Este tipo de morte celular capaz de gerar imunidade anti-tumoral é genericamente conhecida como morte celular imunogénica (ICD, do inglês *immunogenic*

*cell death*). Neste tipo de morte celular, ocorre a libertação de padrões moleculares associados a perigo/dano (DAMPs, do inglês *danger associated molecular patterns*), os quais são reconhecidos por vários receptores das células do sistema imunitário. <sup>12,26</sup>

## 1.2. Morte celular imunogénica (ICD)

O comité de Nomenclatura em morte celular<sup>29</sup> definiu a ICD como “uma forma de morte celular regulada que é suficiente para ativar uma resposta imunológica adaptativa num hospedeiro imunocompetente”. A ICD pode ser induzido por diferentes agentes patogénicos, fármacos usados na quimioterapia, radioterapia, ervas medicinais chinesas, capsaicina ou radiações ionizantes. <sup>29–32</sup>. Também a PDT pode desencadear ICD, sendo um facto que tem sido cada vez relatado e tem vindo a ganhar cada vez mais atenção da comunidade científica. <sup>8,9,12,26,29–33</sup>

Durante a ICD, ocorre a libertação de uma série de moléculas com capacidades de estimular o sistema imunitário, estas moléculas são chamadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Estas moléculas estão normalmente retidas dentro das células e integram o normal funcionamento das células. Quando as células recebem certos estímulos agressores, há um conjunto de alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem. Durante este processo, ocorre a exposição na superfície das células e/ ou a libertação de certos DAMPs para o meio extracelular (Figura 6). Estes DAMPs vão ser reconhecidos pelas células do sistema imunitários, nomeadamente por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como os receptores “Toll-like”(TLRs) ou os receptores “NOD-like”. <sup>29–31,34</sup>



**Figura 6.** Representação esquemática da indução da ICD. Após diferentes tratamentos as células estão em processo de morte celular. E existe exposição de alguns DAMPs e libertação de outros no meio extracelular para serem reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos. (retirado de J. Zhou et al<sup>35</sup>)

Existe uma série de marcadores característicos da ICD (Figura 7). A Calreticulina (CARL) está localizada sobretudo no lúmen do retículo endoplasmático (ER, do inglês

*endoplasmic reticulum*), é uma proteína responsável pela regulação da homeostase do  $Ca^{2+}$  e também por auxiliar no enrolamento de proteínas. Quando a ICD é desencadeada, a CALR é transportada do ER para a superfície das células, juntamente com a proteína ERp57, onde vai funcionar como um sinal “*eat me*”. O transporte da CALR é activado pelo mecanismo de stress do retículo endoplasmático que envolve a fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2 (eIF2 $\alpha$ ) normalmente pela quinase eIF2 $\alpha$  3 (EIF2AK3; mais conhecida por PERK). A CALR na superfície das células vai funcionar como um sinal “*eat me*” que vai ser reconhecido pelo receptor CD91 expresso em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen presenting cells*), tais como as células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*). Este reconhecimento vai estimular a fagocitose das células em processo de morte celular e debrís, assim como a apresentação cruzada de antígeno.<sup>12,32,34,36,37</sup>

As “*heat shock proteins*” (HSP) são uma família de chaperonas, tem um papel importante no enrolamento de novas proteínas. Em casos de stress celular, as HSP vão rearranjar as proteínas desnaturadas. Estas proteínas estão normalmente distribuídas intracelularmente e só se deslocam para a membrana celular após um estímulo agressor. Uma vez expostas na membrana celular, as HSP70 E HSP90 vão actuar como um sinal “*eat me*” que vai ser reconhecido pelos receptores CD91, LOX1, E CD40 das APC. Estas células vão mediar a fagocitose das células que estão em processo de morte celular, assim como possibilitar a apresentação cruzada de antígeno a linfócitos T. A HSP70 pode ter uma ação inibitória sobre a apoptose, para além disso a HSP70 pode ser reconhecida pelos receptores CD94 dos linfócitos “*natural killer*” (NK). Estes linfócitos depois de ativos podem atacar diretamente as células tumorais.<sup>12,36,38,39</sup>

A adenosina trifosfato (ATP) pode ser encontrada em todas as células e é a principal fonte de energia das células. Após um estímulo que provoque a morte das células, o ATP é libertado para o meio extracelular, de uma forma dependente da autofagia, e por norma associada à perda da integridade da membrana celular. Uma vez no meio extracelular, as moléculas de ATP vão ser reconhecidas pelos receptores purinérgico P2Y2 E P2X7 que se encontram na superfície das células dendríticas. O ATP é também responsável por estimular a produção de interleucina 1 beta e 18, a produção de linfócitos T e estimulação do sistema imunitário adaptativo.<sup>12,32,37,39,40</sup>

A “*High Mobility Group Box 1*” (HMG $\beta$ 1) é uma proteína não-histona muito abundante no núcleo. Esta proteína liga-se à cromatina e ajuda na organização do DNA, nomeadamente na regulação da transcrição. A HMG $\beta$ 1 é libertada nas últimas etapas da morte celular na ICD, quando a integridade das membranas nucleares são comprometidas. Com a libertação da HMG $\beta$ 1 para o meio extracelular há uma forte ação inflamatória uma vez que é reconhecida por receptores PRR, sobretudo TLR4.<sup>12,32,36,37,41</sup>

A anexina A1 (ANXA1) é conhecida pelas suas funções imunossupressoras. Esta proteína quando é libertada para o meio extracelular liga-se aos receptores de peptídeo formil 1 (FPR1) que são expressos sobretudo em células dendríticas.<sup>12,32,41</sup>

Durante a ICD, ocorre também libertação de interferão gama (IFN- $\gamma$ ), o qual se liga a receptores PRR TLR3 ativando a produção de mais interferão tipo 1 nas células tumorais, e estimulando a produção de CXCL10 que é responsável por atrair linfócitos T.<sup>32,37,41</sup> A presença dos diferentes marcadores bioquímicos da ICD pode variar entre diferentes linhas de cancro e com o tipo de tratamentos aplicado.

Durante a fagocitose de células em processo de morte celular, as células dendríticas vão atingir completa maturação e libertar citocinas (IL)(IL-6, IL-2...). Estas, por sua vez, vão promover a atração, diferenciação e proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+<sup>42,43</sup>. Os linfócitos CD8+ têm um papel muito importante na imunidade anti-tumoral uma vez que conseguem detectar e destruir células tumorais em qualquer parte do organismo. Na literatura tem sido bastante descrito que a ICD desencadeia um efeito vacina (memória imunológica) contra as células tumorais e consequentes metástases.<sup>26,30,37,44</sup>

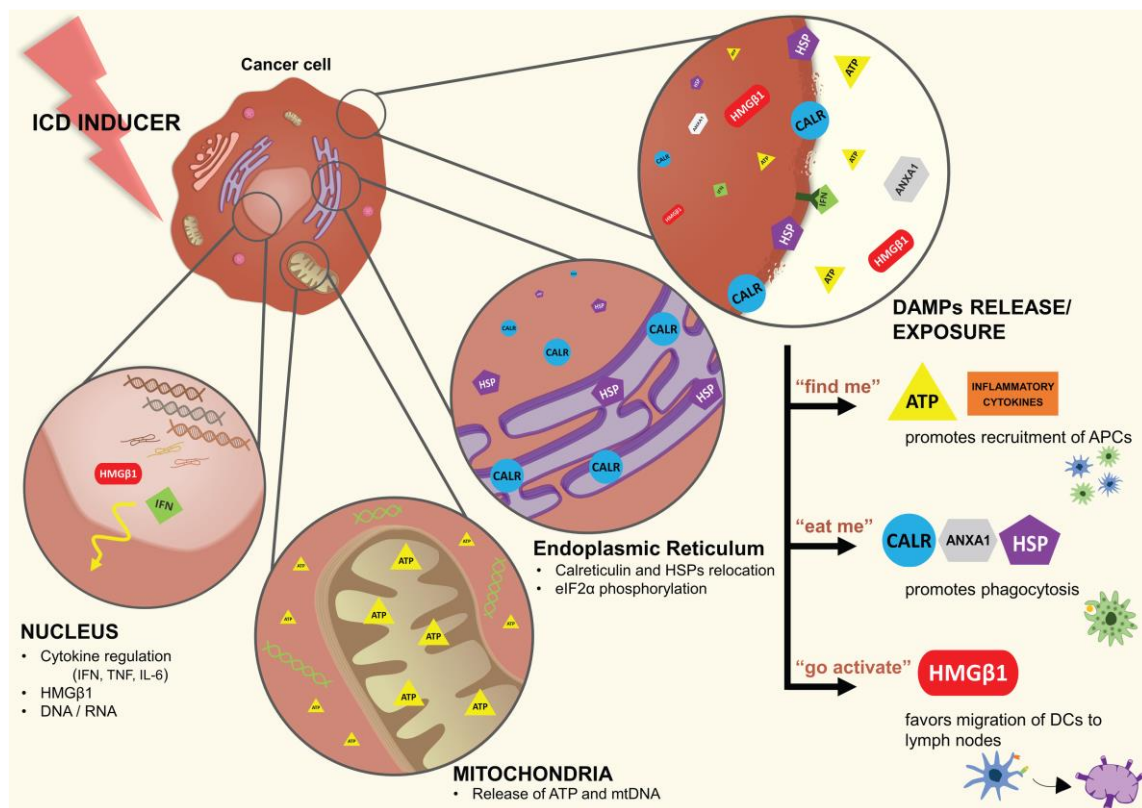


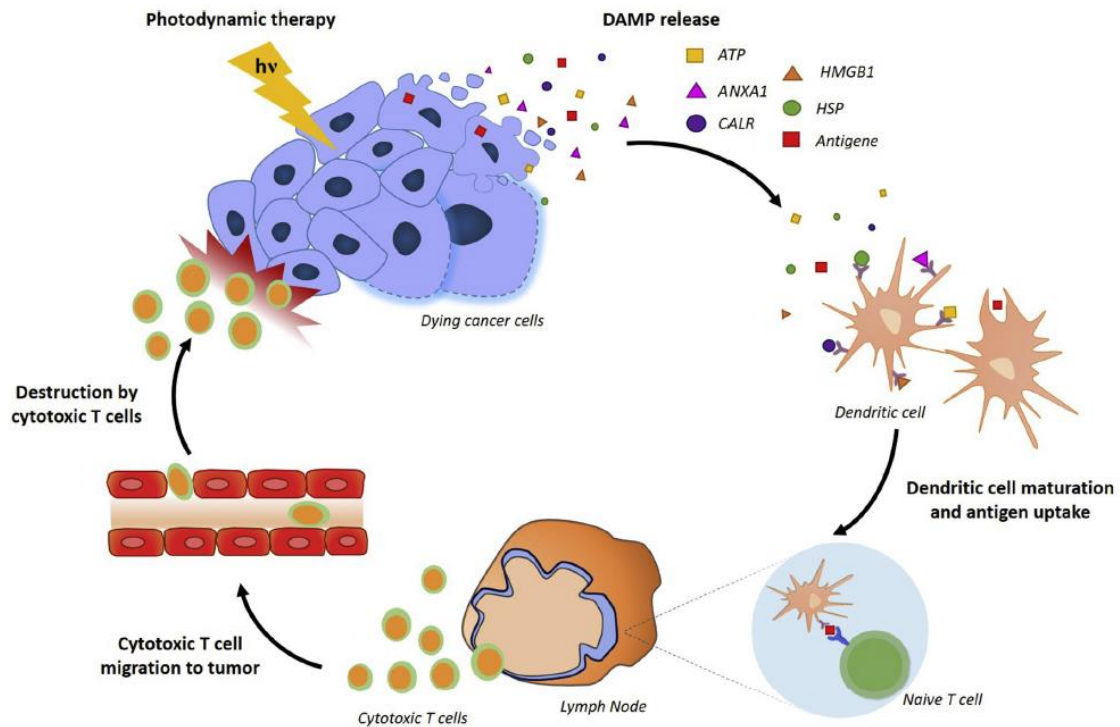
Figura 7. Principais características da ICD (retirado de Lobo et al<sup>45</sup>)

### 1.2.1. Morte celular imunogénica induzida PDT

A ICD foi inicialmente descoberta com alguns fármacos citostáticos, como por exemplo o mitoxantrone e a doxorrubicina <sup>46</sup>. A observação de que a morte celular imunogénica pode ser induzida pela PDT é relativamente mais recente e teve como um dos grandes impulsionadores o trabalho realizado pelo grupo de Agostinis, com o fotossensibilizador hipericina<sup>33</sup>. A PDT com hipericina induz ICD com várias das características clássicas como: libertação e exposição de CARL na superfície das células, fosforilação da eIF2 $\alpha$  pela PERK e libertação de ATP. Contudo, a forma como estes mecanismos se desencadeiam são diferentes da ICD clássica, induzida por alguns fármacos citostáticos. Por exemplo, na PDT com hipericina, a CARL é exposta de forma independente da fosforilação da eIF2 $\alpha$  ou da ativação da caspase 8 e o ATP é libertado de forma independente da autofagia.<sup>33</sup>

PDT com diferentes fotossensibilizadores podem desencadear vários a exposição/libertação de vários marcadores bioquímicos da ICD. No caso do tratamento com a redaporfina, um fotossensibilizador que tende a acumular no ER e no complexo de Golgi (GA), observou-se a exposição de CALR, ATP, HGMB1 e fosforilação da eIF2 $\alpha$ . Contudo, a fosforilação da eIF2 $\alpha$  ocorre por meio do fator de iniciação da tradução eucariótica 2-alfa-cinase 1 (EIF2AK1, conhecida como HRI) e não pela PERK. <sup>10,47</sup>

Desde cedo foi associado que fotossensibilizadores que se situam no ER são melhores a induzir ICD por causa da sua capacidade em causar stress no ER.<sup>33,39,48</sup>. Contudo, fotossensibilizadores como Photofrin, que se acumula nos lisossomas, e a Verteporfin, que localiza-se na mitocôndria, também mostraram ser capazes de iniciar ICD e de obter uma boa irradiação do tumor.<sup>48-50</sup> Para além disto, verifica-se que mesmo protocolos de PDT vascular também induzem ICD. <sup>26,44,51,52</sup>. Assim, é possível que os mecanismos de ICD induzidos pela PDT não sejam completamente iguais aos mecanismos clássicos de ICD que têm vindo a ser descritos para fármacos citostáticos.



**Figura 8.** Morte celular imunogénica (retirado de Donohoe et al<sup>12</sup>)

### 1.3. Oxidação lipídica mediada pela PDT

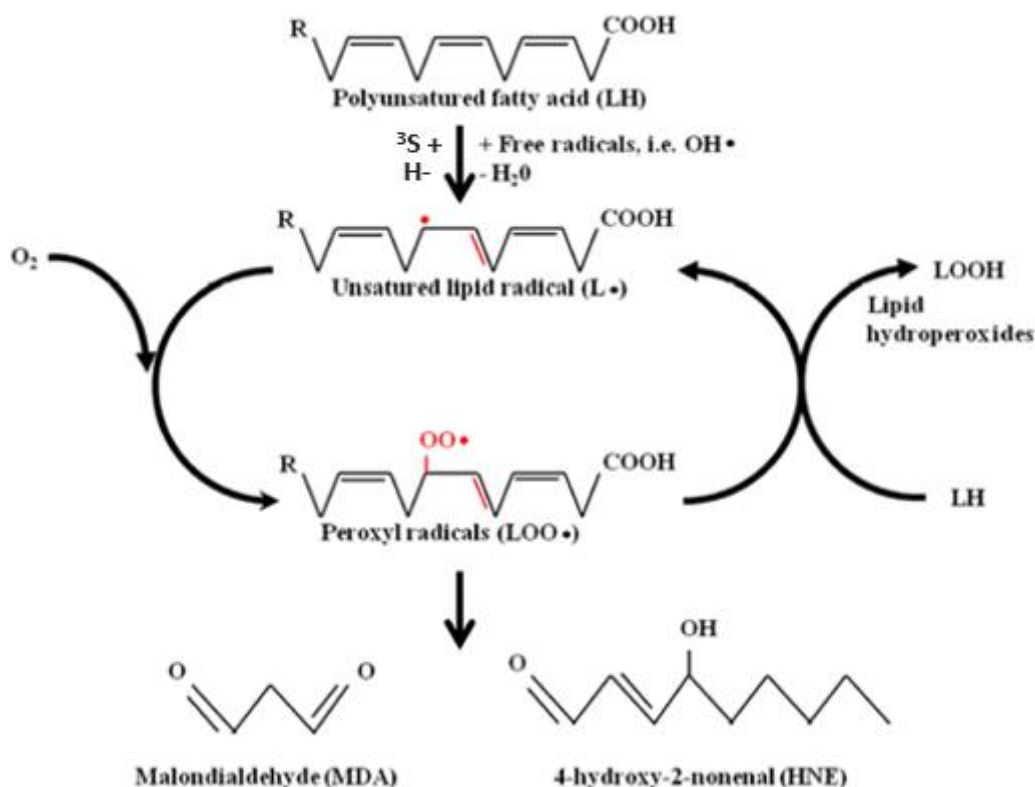
A oxidação lipídica ocorre quando os ROS, reagem com lípidos contendo duplas ligações carbono-carbono. Especialmente ácidos gordos polinsaturados (PUFA) encontrados em fosfolípidos das membranas, lipoproteínas, glicoproteínas e outros tipos de lípidos. A PDT é um método que gera ROS e estes vão reagir com os PUFA. Mas o fotossensibilizador (<sup>3</sup>S) no estado excitado também pode oxidar diretamente os lípidos<sup>53,54</sup>. Quando estes reagem com os lípidos vão produzir uma série de compostos intermédios dos quais se destaca o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), sendo estes dois compostos usados com biomarcadores para a oxidação lipídica<sup>53-55</sup> (Figura 9).

A oxidação dos lípidos ocorre em 3 etapas: a iniciação, propagação e terminação. Na iniciação ocorre a reação entre os PUFA e os ROS/<sup>3</sup>S, dos quais destaca-se o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e o hidroxilo (•OH). Estes ROS vão remover um hidrogénio de um dos carbonos adjacentes às duplas ligações formando um radical lipídico (L.). No caso do <sup>3</sup>S existe a transferência de um electrão para um dos carbonos adjacentes às duplas ligações fazendo com que exista libertação de um hidrogénio radicalar, formando o radical lípido insaturado.<sup>53-55</sup>

Na segunda etapa, designada por propagação, o radical lipídico reage rapidamente com o oxigénio molecular (O<sub>2</sub>) para formar o radical peroxil lipídico (LOO.). O radical peroxil lipídico tem a capacidade de remover um hidrogénio de outra molécula PUFA formando



de um lado outro radical lipídico (L.), e do lado oposto, hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Assim, desencadeia-se uma reação em cadeia que propaga a oxidação lipídica<sup>53-56</sup>.



**Figura 9.** Mecanismo de oxidação lipídica (adaptado de Barrera et al<sup>57</sup>)

A última etapa da oxidação lipídica, é designada de terminação. Nesta fase, todas as espécies químicas chegam a formas mais estáveis e menos reativas. Os hidroperóxidos lipídicos são pouco ou moderadamente reativos quando comparados aos radicais, em condições de baixa temperatura e na ausência de íons metálicos. Devido a estas características, estas moléculas podem ser alvo de diferentes reações, sendo elas a inibição ou indução. A inibição é catalisada com recurso sobretudo a enzimas e são responsáveis por uma redução de 2 electrões. As principais enzimas são a glutathione peroxidase, selenoproteína P e glutathione peroxidase de hidroperóxido fosfolipídico. As reacções mediadas por estas enzimas têm como objectivo final a neutralização dos sítios ativos/citotóxicos dos hidroperóxidos lipídicos, funcionando, de certa forma, como um mecanismo antioxidante. A indução consiste numa redução de 1 electrão mediada por íons metálico e resulta na regeneração da forma radicalar. Esta forma radicalar poderá voltar a reagir com outros PUFA ajudando a propagar ainda mais a oxidação lipídica<sup>55,58</sup>.

O MDA é uma molécula formada durante a oxidação lipídica e é uma molécula estável. Esta molécula pode ser produzida por via enzimática e não enzimática. Na via enzimática, esta molécula é formada como produto secundário na biossíntese do tromboxano A<sub>2</sub> pela ação do tromboxano A<sub>2</sub> sintase sobre endoperóxido lipídico. Este



último, é formado por ação das cicloxigenases nos PUFA. Os endoperóxidos lipídicos também podem ser formados por via não enzimática. Neste caso, partindo do radical peroxil lipídico é possível ocorrer uma ciclização por adição de radical intramolecular à dupla ligação e a formação de um novo radical. Os radicais peroxil lipídicos livres intermediários formados após a ciclização podem ciclizar novamente para formar endoperóxidos lipídicos bi-cíclicos, os quais podem sofrer clivagem para produzir MDA<sup>55,58</sup>.

O 4-Hidroxinonenal (4-HNE) é gerado pela decomposição de ácido araquidónico e PUFA de grandes dimensões através de processos enzimáticos ou não enzimáticos. No processo enzimático, o 4-HNE é o produto final da degradação do ómega-6 PUFA por meio da acção da 15-lipoxigenase. Por processo não enzimáticos, a primeira parte envolve a formação do radical peroxil lipídico e numa segunda parte, este radical sofre várias reacções como ciclização e fragmentação, que resultam no 4-HNE<sup>55,58</sup>.

A oxidação lipídica causada pela PDT, e os produtos que daí resultam, podem ter várias consequências biológicas. Numa primeira fase, quando o tratamento não é demasiado agressivo, as células vão estimular a produção de antioxidantes num sentido de eliminar os ROS e os radicais lipídicos.<sup>53,54,59,60</sup> Um dos mecanismos antioxidantes mais importantes é por via fator nuclear E2 relacionado ao fator 2 (NRF2), esta molécula é responsável pelo controlo de genes associados a eliminação de ROS e biomoléculas oxidadas. Em situações normais a proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1) tem a capacidade de manter a NRF2 no citosol, ou seja, fora do núcleo. Mas quando esta molécula é oxidada pelos ROS está inativa e a NRF2 está livre de migrar para o núcleo. Quando esta chega ao núcleo liga-se às sequências de elementos de resposta antioxidante (ARE) e activa a expressão de vários genes. Genes estes que são responsáveis pela síntese de vários antioxidantes como por exemplo Quinone oxidoreductase-1, glutathione, glutathione S-transferases, heme-oxigenase-1, superóxido dismutase, catalase entre outras. Estas moléculas constituem a linha de defesa das células contra os ROS<sup>12</sup>.

Mas estes mecanismos antioxidantes podem não ser suficientes para evitar danos nas células. A oxidação lipídica pode alterar a permeabilidade da membrana. E pode mesmo induzir as células em apoptose e isto pode ocorrer por 2 mecanismos. O primeiro deve-se à interação da 4-HNE com o receptor de morte FAS(CD95/APO-1) fazendo aumentar a sua actividade e expressão, resultando na ativação de uma série de cinases a jusante (cinase reguladora de sinal de apoptose 1) o que leva à ativação da caspase-3 e terminando em apoptose. O segundo mecanismo vem da interação do 4-HNE com a proteína tumoral 53 (p53), nesta interação a p53 é fosforilada e transportada para o núcleo. No núcleo, vai inibir a transcrição de genes anti-apoptóticos (Bcl2) e promove a transcrição de genes pró-apoptóticos (BAX) levando à activação da caspase-3 e consequentemente morte<sup>55</sup>. Pode também existir morte por necrose e esta deve-se

sobretudo à destruição dos lipídios da membrana celular, que conseqüentemente leva a uma perda de integridade da membrana.<sup>53,54,59,60</sup>

Os fosfolípidos oxidados (OxPL) são consideradas moléculas pró-inflamatórias que contribuem para o processo inflamatório associado a várias doenças. O papel dos lípidos oxidados na fisiopatologia da aterosclerose tem sido muito estudado<sup>55,61</sup>. Os OxPL são detetados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) do sistema imunitário inato, como por exemplo, os receptores CD36 E SR-A dos macrófagos. Outros receptores com capacidade de reconhecer os OxPL são os TLR4, os quais estão tipicamente associados ao reconhecimento de DAMPs. Células que estão em processo de apoptose contém um nível aumentado de OxPL e foi demonstrado que a fagocitose das células apoptóticas pelos macrófagos poderia ser inibida com um anticorpo que bloqueasse os OxPL<sup>62</sup>. Pelos exemplos ilustrados, é possível verificar que os lípidos oxidados podem activar diversas vias de sinalização e mecanismos bioquímicos com conseqüências nos mecanismos de sobrevivência, morte celular e inflamação. Considerando que a PDT é, por excelência, um mecanismo altamente oxidante, neste trabalho pretendeu-se avaliar o stress oxidativo, com especial foco na oxidação lipídica, utilizando três fotossensibilizadores diferentes.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Linha celular e reagentes

Foi utilizada a linha celular de cancro da mama de origem de ratinho, 4T1, a qual foi adquirida à AATC. As células foram mantidas em meio de cultura “*Dulbescco’s Modified Eagle’s Medium*, DMEM” (Sigma) com 10% soro bovino fetal inativado (Thermofisher) e 1% da mistura penicilina/estreptomicina (Sigma). As células foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>. Os fotossensibilizadores usados neste trabalho pertencem à classe das bacterioclorinas, LUZ51b, LUZ10 e o atropoisómero  $\alpha_3\beta$  da redaporfin, e foram gentilmente oferecidos pela Luzitin SA (Coimbra, Portugal). O “Alamar blue”, bem como o kit para a quantificação do malonaldeído (MDA) (número de catálogo MAK085), o kit para a quantificação dos grupos tióis (número de catálogo MAK151) e o kit para a quantificação dos grupos carbonilo nas proteínas oxidadas *kit Protein Carbonyl Content Assay Kit* (número de catálogo MAK094) foram adquiridos à Sigma. O kit para a quantificação da peroxidação lipídica, (*Image-iT® Lipid Peroxidation*, número de catálogo C10445) foi adquirido a Thermofisher. O Dimetilsulfóxido (DMSO) e tripsina-EDTA foram adquiridos à Sigma. O dihidroetídio (DHE) e aminofenil fluoresceína (APF) adquiridos à Thermofisher.

### 2.2. Fotossensibilizador

Neste trabalho estudaram-se três bacterioclorinas a LUZ10, LUZ11 (nomeadamente o atropoisómero  $\alpha_3\beta$ ) (Figura 10) e a LUZ51b. A LUZ10 é um composto que tem coeficiente de absorção molar de 68800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> em tampão fosfato (PBS do inglês *Phosphate buffer saline*), é solúvel em meio aquoso, tem um Coeficiente de partição (logP) de -1,4, e um peso molecular de 1082,94 g/mol. A LUZ11- $\alpha_3\beta$  é um composto que tem coeficiente de absorção molar de 101267 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> em dimetilsulfóxido (DMSO), não é solúvel em meio aquoso, tem um Coeficiente de partição (logP) de 3.3, e um peso molecular de 1135.11 g/mol. A LUZ51b é um composto que tem coeficiente de absorção molar de 61000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> em dimetilsulfóxido (DMSO), não é solúvel em meio aquoso, tem um Coeficiente de partição (logP) de 2,9, e um peso molecular de 595.96 g/mol.

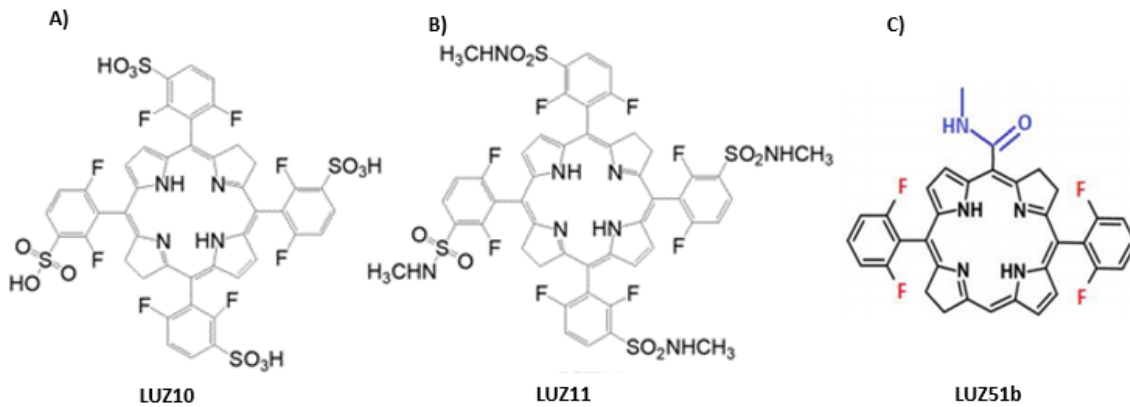


Figura 10. Fotossensibilizadores LUZ10 (A); LUZ11 (B); LUZ51b (C)

### 2.3. Solução stock de cada fotossensibilizador

Para preparar os stocks de LUZ51b, LUZ11- $\alpha_3\beta$  e LUZ10 foi pesada uma pequena quantidade de cada composto para um tubo de 1,5 ml. Os compostos LUZ51b e LUZ11- $\alpha_3\beta$  foram dissolvidos em DMSO enquanto a LUZ10 foi dissolvida em PBS. Considerando que estes compostos apresentam algumas impurezas, a concentração real foi confirmada pela absorção (espectrofotômetro PekinElmer Lambda 25) de uma amostra diluída 1000 x e usando a equação de Lambert-Beer e os coeficientes de absorção molar:  $61000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em DMSO para a LUZ51b;  $68800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em PBS para a LUZ10 e  $101267 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em DMSO para a LUZ11, atropoisômero  $\alpha_3\beta$ ).

$$A = \epsilon cl$$

Equação 1. Equação de Lambert – Beer; A) Absorvância;  $\epsilon$ ) coeficiente de absorção molar; l) comprimento do caminho ótico

### 2.4. Avaliação da viabilidade celular usando o método do Alamar Blue (resazurina)

Para avaliar a viabilidade celular, foram adicionadas 7.000 células 4T1 a cada poço de uma placa de 96 poços, num volume final de 200  $\mu\text{L}$  de DMEM. Para o efeito, as células mantidas em cultura em frascos de 75  $\text{cm}^2$  foram destacadas com tripsina-EDTA e posteriormente centrifugadas (1200 rpm durante 5 min). O *pellet* celular obtido foi posteriormente ressuspendido em meio de cultura e a concentração celular foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer. O número de células e volume de DMEM necessários para toda a experiência foram calculados tendo em conta a densidade celular pretendida, 7000 células/ poço num volume final de 200  $\mu\text{L}$ .

Após 24 h, foram adicionados às células os vários fotossensibilizadores em estudo. A gama de concentrações utilizadas variou entre 0,008 e 1  $\mu\text{M}$  para a LUZ11- $\alpha_3\beta$ , 1,56 e

200 nM para a LUZ51b, por último, 0.08 e 10 µM para a LUZ10. Todas as concentrações foram testadas em triplicados. Após um período de incubação de 24 h, as células foram lavadas 3x com 200 µl de PBS de forma a remover o composto que não foi internalizado. As células foram irradiadas a 740 nm com recurso a um LED BioLambda BLACKBOX SMART (740 nm). As doses de luz testadas foram 1 J/cm<sup>2</sup> para a LUZ51b e LUZ11-α<sub>3</sub>β e 8 J/cm<sup>2</sup> para a LUZ10.

Em paralelo, realizou-se um conjunto de experiências que visavam a avaliação da fototoxicidade da LUZ51b após activação apenas no meio extracelular. Para o efeito, adicionou-se às células LUZ51b numa gama de concentrações entre 1.25 e 80 µM. As células foram irradiadas de imediato a 740 nm usando uma dose de luz de 1 e 2 J/cm<sup>2</sup>.

Os tempos de irradiação foram determinados tendo em conta a Equação 2 e os factores de correção de 0,43 para a LUZ11-α<sub>3</sub>β, 0,57 para LUZ51b e de 0,54 para a LUZ10<sup>63</sup>.

$$\text{Fluência da fonte de luz } \left( \frac{W}{cm^2} \right) = \frac{\text{Dose de luz } \left( \frac{J}{cm^2} \right)}{\text{Tempo (s)}}$$

**Equação 2.** Equação para o cálculo do tempo de irradiação <sup>63</sup>

Em ambos os protocolos de PDT testados, a viabilidade celular foi avaliada 24 h após a irradiação celular usando o método de resazurina, mais conhecido como Alamar blue. Este método consiste na avaliação da fluorescência da resofurina (composto rosa e fluorescente) que resulta da metabolização da resazurina (composto azul e pouco fluorescente) pelas células viáveis.

Para o efeito, as células foram incubadas com 150 µL de resazurina (0.01 mg/ mL) durante aproximadamente 1,5 h. A fluorescência da resofurina foi determinada recorrendo a um leitor de placas Synergy HT Multi-mode microplate reader (Biotek) após excitação a 528 nm e recolha da emissão de fluorescência a 590 nm. A média de cada triplicado foi normalizada em função das células não tratadas, às quais se assumiu uma metabolização de 100% da resazurina.

## **2.5. Avaliação da produção de ROS em solução**

Para avaliar a produção de ROS, usou-se duas sondas, (DHE) e (APF), nas concentrações de 5 µM. Numa placa branca de 96 poços, adicionou-se cada um dos três fotossensibilizadores em estudo, numa gama de concentrações de 0.04 µM a 5 µM. Após a adição de 5 µM da respectiva sonda, as placas foram irradiadas a 740 nm (LED BioLambda BLACKBOX SMART) com doses de luz crescentes, de 1 J/cm<sup>2</sup> até 12 J/cm<sup>2</sup>. A fluorescência associada a cada uma das sondas foi determinada recorrendo a um leitor de placas Synergy HT Multi-mode microplate reader (Biotek).

Para o DHE, a excitação foi realizada a 485 nm e recolha da emissão de fluorescência a 590 nm. No caso do APF, excitação foi a 485 nm e recolha da emissão de fluorescência a 530 nm. O sinal obtido com o solvente PBS foi subtraído a todas as amostras.

## **2.6. Avaliação da produção de ROS em células por microscopia de fluorescência**

Foram adicionadas 30 000 células 4T1 por cada poço de uma placa de 24 poços num volume final de 500  $\mu$ L. Depois de 24 h, adicionou-se LUZ51b nas concentrações finais de 100, 50 e 25 nM. Após 24 h de incubação, adicionou-se o DHE com uma concentração final de 5  $\mu$ M seguindo-se a irradiação das células a 740 nm (LED BioLambda BLACKBOX SMART) com 1 J/cm<sup>2</sup>. Os tempos de irradiação foram calculados usando a Equação 2. As células foram analisadas 0,5, 3 e 6 h após a irradiação das células com recurso a um microscópio de fluorescência Olympus U-RLT50 usando a objectiva de 20 x. A cada tempo de avaliação, as células foram incubadas com o Hoechst 33342 (Life Technologies) na proporção de 1:5000, de forma a garantir a marcação do núcleo.

## **2.7. Avaliação da peroxidação lipídica através do BODIPY™ 581/591 C11**

Para avaliar a peroxidação lipídica, usou-se o kit *Image-iT® Lipid Peroxidation* (número de catálogo C10445, Thermofisher). Este kit permite a deteção da peroxidação lipídica em células vivas através da oxidação do reagente BODIPY™ 581/591 C11. Este reagente vai ser oxidado por hidroperóxidos lipídicos, apresentando uma mudança do pico de fluorescência de 590 nm (gama do vermelho) para 510 nm (gama do verde).

Para o efeito, foram adicionadas 30 000 mil células 4T1 por poço em placas de 24 poços. Após 24 h, foi adicionado as concentrações de 100, 75, 50 nM de LUZ51b; 20, 10  $\mu$ M de LUZ10; e 1, 0,5, 0,25  $\mu$ M de LUZ11- $\alpha_3\beta$ . Passadas 24 h, removeu-se o meio de cultura, lavou-se as células com PBS e adicionou-se 500  $\mu$ L da sonda *Lipid Peroxidation Sensor* com uma concentração de 5  $\mu$ M. As células foram incubadas durante 30 min seguindo-se a irradiação a 740 nm (LED BioLambda BLACKBOX SMART) com 1 J/cm<sup>2</sup>. No final substituiu-se o meio de cultura e aguardou-se 30 minutos. Para a etapa final, as células foram lavadas com PBS, destacadas com tripsina-EDTA, ressuspendidas em PBS e analisadas num citómetro de fluxo Novocyte 3000(ACEA) usando o laser a 488 nm para a excitação e o filtro 530/30 nm para a recolha do sinal de fluorescência associado ao Bodipy oxidado.

Paralelamente, executou-se uma experiência de oxidação lipídica com o fotossensibilizador activado extra-celularmente. Para esta experiência, foram incubadas 60 000 células 4T1 por poço em placas de 24 poços. Depois de 24 h, adicionou-se 250  $\mu$ L *Lipid Peroxidation Sensor* com uma concentração de 10  $\mu$ M. Trinta min depois, e sem remover a sonda *Lipid Peroxidation*, adicionou-se LUZ51b nas concentrações de 80, 60

e 40  $\mu\text{M}$ . As células foram imediatamente irradiadas com uma dose de luz de 2  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Em todas as experiências realizadas, o hidroperóxido de cumeno na concentração de 40  $\mu\text{M}$  foi utilizado como controlo positivo. Este foi incubado com as células durante 1h e 30 min seguindo-se a adição de 250  $\mu\text{L}$  *Lipid Peroxidation Sensor* com uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  por mais 30 min. Estas células foram avaliadas por citometria de fluxo como descrito anteriormente.

## **2.8. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação do malonaldeído**

Para avaliarmos a quantidade de MDA presente nas amostras usou-se um kit de ensaio de peroxidação lipídica (MDA, malonaldeído) (número de catálogo MAK085, Sigma-Aldrich). O kit faz reagir o MDA com ácido tiobarbitúrico (TBAR) para a formação de um produto que absorve a 532 nm (ensaio colorimétrico em  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ).

Adicionou-se 260 000 células/poço, com um volume final de 3 mL, numa placa de 6 poços. Após uma incubação de 24 h, adicionou-se LUZ51b nas concentrações de 70, 50 e 25 nM. Depois de 24 h, as células foram lavadas com PBS e irradiou-se as células a 740 nm (LED BioLambda BLACKBOX SMART) com uma dose de luz de 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Trinta min ou 1 h 30 min após a irradiação, as células foram lisadas com 300  $\mu\text{L}$  do tampão de lise fornecido pelo kit (*MDA Lysis Buffer*) (sobre o gelo), o qual continha 3  $\mu\text{L}$  de Butil hidroxitolueno (BHT)(100X). Posteriormente, as células foram centrifugadas a 13 000 G durante 10 min para remover o material insolúvel. Do sobrenadante obtido, para cada amostra foram recolhidos 200  $\mu\text{L}$  para análise posterior.

Para a preparação da recta de calibração de MDA usou-se o stock de MDA a 4,17 M disponibilizado com o kit. De acordo com as instruções do kit, este foi diluído duas vezes de modo a obter uma solução padrão de concentração de 2 mM. Desta solução, usou-se 0, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{L}$ , os quais foram diluídos para um volume final de 200  $\mu\text{L}$  obtendo-se standards de 0 (em branco), 4, 8, 12, 16 e 20 nmol.

Seguidamente, para a formação do aducto MDA-TBA, adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de uma solução de TBA a todos os tubos, contendo os padrões ou amostras, os quais foram submetidos a uma incubação a 95°C por 60 min. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, transferiu-se 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra e padrão para uma placa de 96 poços. A absorbância do aducto de MDA-TBA foi medida a 532 nm num leitor de placas Synergy HT Multi-mode microplate reader (Biotek).

## **2.9. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação dos grupos tióis**

Os grupos tióis da GSH foram quantificados usando o Kit fluorométrico (número de catálogo MAK151) adquirido à Sigma-Aldrich. Para a execução do kit, incubou-se 30 000 células 4T1 por poço em placas de 24 poços. Passadas 24 h, adicionou-se LUZ51b nas concentrações de 50, 25 e 12.5 nM e incubou-se durante 24 h. As células foram irradiadas a 740 nm (LED BioLambda BLACKBOX SMART) com uma dose de luz de 1 J/cm<sup>2</sup>. A quantificação dos tióis foi realizada 30 min, 3 h ou 6 h após a irradiação das células. Para o efeito, começou-se pela lise celular usando 175 µL de Triton 1% diluído no *assay buffer* disponibilizado com o kit. De seguida, centrifugou-se as várias amostras e transferiu-se 50 µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços.

Para a preparação da recta de calibração usou-se uma solução de glutathiona (GSH) a 1 mM disponibilizada pelo kit. Esta solução foi diluída para 10 µM sendo posteriormente sujeita a várias diluições sucessivas de 1/3 originando standards de 0 (Controlo), 0.014, 0.04, 0.12, 0.37, 1.1, 3.3 e 10 µM.

No próximo passo, transferiu-se 25 µL das amostras e dos padrões para uma placa opaca de 96 poços. Posteriormente, adicionou-se 25 µL *Master Reaction Mix*, a qual qual continha o *Thiol Detection Reagent*. Por último, mediu-se a fluorescência do aduto obtido num leitor de placas Synergy HT Multi-mode microplate reader (Biotek). A excitação foi realizada com recurso ao filtro a 485/20 nm e emissão foi recolhida com o filtro a 530/25 nm.

## **2.10. Avaliação dos grupos carbonilo nas proteínas**

Um dos pontos fundamentais da PDT é a geração de ROS, estes vão induzir danos no DNA, lípidos e proteínas. As cadeias laterais das proteínas vão ser oxidadas pelos ROS, levando à formação grupos carbonilo. A formação dos grupos carbonilo também pode-se dever a reação com alguns produtos da peroxidação lipídica tais como: MDA, 4-HNE<sup>64</sup>.

A quantificação dos grupos carbonilo foi feita com recurso ao kit Protein Carbonyl Content Assay Kit. Este kit faz reagir os grupos carbonilo com uma molécula de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) tendo como consequência a formação de aducto de dinitrofenil hidrazona que pode ser detectado por absorção a 375nm.

Para esta experiência adicionou-se 3 350 000 celular por frasco de 25 Cm<sup>3</sup> e aguardou-se 24 h. Adicionou-se a LUZ51b nas concentrações de 100, 75 e 50 nM e incubou-se durante 24h. As células foram irradiadas a 740 nm (led BioLambda BLACKBOX SMART) com uma dose de luz de 1 J/cm<sup>2</sup>. Depois de 3 h, adicionou-se 1mL de RIPA Buffer (por frasco e aguardou-se 5 min em gelo. Após isto removeu-se o lisado e centrifugou-se a 14,000 × g por 15 min. Descartou-se o *pellet*.



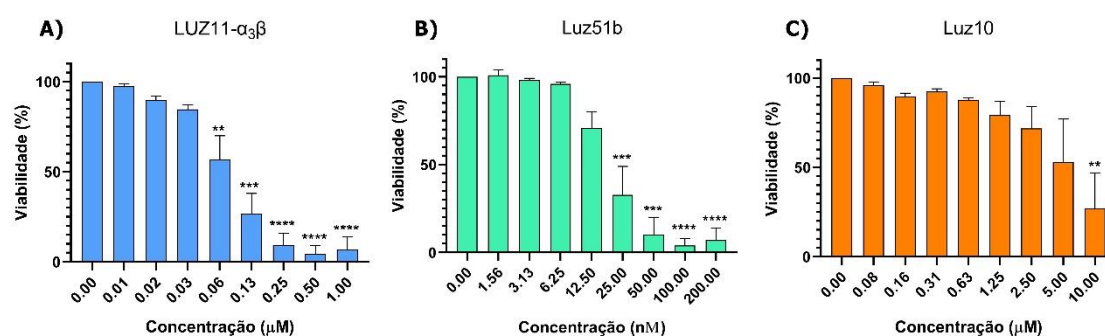
De seguida fizemos a quantificação da proteína através do kit *Pierce™ BCA Protein Assay*. Para isso retirou 25µL de cada amostra para um poço (fazer duplicados por amostra) e adicionou-se 200µL de *working reagent* (50:1, Reagente A:B). Preparou-se também a reta de calibração fornecida pelo kit. De seguida, incubou-se a 37°C durante 30 min. Passado esse tempo, leu-se a absorbância a 562 nm.

Na etapa seguinte executou-se o Protein Carbonyl Content Assay. Adicionou-se 10 µL de 10% *Streptozocin* por cada 100 µl de amostra. Incubou-se durante 15 min e centrifugou-se a 13,000 × g por 5 min, transferindo o sobrenadante para um novo tubo. De seguida adicionou-se 100 µL de DNPH a 100 µL de amostra e incubou-se durante 10 min. Na próxima etapa, adicionou-se 30 mL de 100% TCA por 5 minutos (em gelo) e centrifugou-se a 13,000 × g por 2 min. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de acetona e levou-se a incubar a -20°C durante 5 min. Centrifugou-se a 13,000 × g por 2 min, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µl de 6 M guanidina. Transferiu-se 100 µl de cada amostra para uma placa de 96 e leu-se a absorbância a 375 nm.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Viabilidade celular após ativação dos fotossensibilizadores presentes no meio intracelular

O estudo de viabilidade na presença de luz permite-nos saber se os compostos apresentam citotoxicidade quando irradiados por uma fonte de luz de comprimento de onda apropriado. No âmbito deste trabalho, pretendia-se estudar o stress oxidativo causado pelo tratamento com fotossensibilizadores com forte absorção na zona do infra-vermelho mas com diferentes lipofilicidades. A primeira tarefa consistiu na otimização das concentrações de fotossensibilizador e da dose de luz de forma a induzir níveis de morte celular semelhantes para os três fotossensibilizadores. Este parâmetro é bastante importante pois pretendemos comparar os fotossensibilizadores em termos de oxidação lipídica e proteica causado pelo stress oxidativo da PDT. Assim, e com base em alguns estudos anteriores, foram testadas diferentes gamas de concentrações para cada fotossensibilizador.



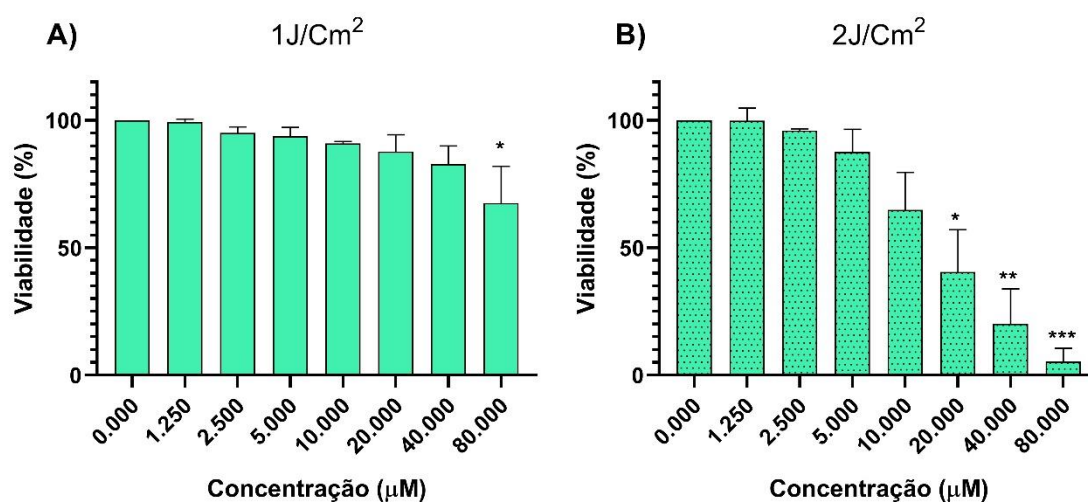
**Figura 11** Viabilidade na presença de luz (fototoxicidade), após a incubação com o fotossensibilizador durante 24 h. **A)** LUZ11- $\alpha_3\beta$  numa gama de concentrações desde 1 até 0,008  $\mu\text{M}$  com uma dose de luz de 1 J/Cm<sup>2</sup>. **B)** LUZ51b com uma gama de concentrações de 200 nM até 1,56 nM com uma dose de luz de 1 J/Cm<sup>2</sup>. **C)** LUZ11- $\alpha_3\beta$  numa gama de concentrações desde 10 até 0,08  $\mu\text{M}$  com uma dose de luz de 8 J/Cm<sup>2</sup>. As barras indicam médias + SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método one-way ANOVA da Luz51b vs células sem tratamento; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , e \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

O que observamos na Figura 11, e como esperado, é que estes compostos apresentam citotoxicidade quando irradiados, a qual é dependente da concentração do fotossensibilizador. É possível observar que a LUZ51b é a molécula com maior fototoxicidade apresentando fototoxicidade com concentrações na gama dos nM. Por outro lado, a LUZ10 é o fotossensibilizador com menor eficácia. Apesar do perfil de fototoxicidade destas moléculas ser muito diferente, observamos que foi possível encontrar condições que induziram níveis de morte celular semelhantes. Podemos constatar que para induzir aproximadamente a mesma percentagem de morte celular, foi preciso usar diferentes condições para cada fotossensibilizador: para a LUZ11- $\alpha_3\beta$  entre 0,25 e 0,625  $\mu\text{M}$ , LUZ51b entre 0,005 e 0,0125  $\mu\text{M}$  e LUZ10 entre 10 e 5  $\mu\text{M}$ .

Considerando que os três fotossensibilizadores em estudo têm rendimentos de produção de oxigénio singuleto muito similares, as diferenças observadas ao nível da fototoxicidade pode dever-se aos facto destes compostos terem diferentes capacidades de internalização. A LUZ51b é o composto de menor dimensão e de maior internalização, enquanto a LUZ10 é o composto com pior capacidade de internalização. A LUZ51b e a LUZ11- $\alpha_3\beta$  são compostos que se tendem a acumular no ER e GA, enquanto que a LUZ10 acumulam-se nos endossomas<sup>10,65</sup>. Sendo os fotossensibilizadores com acumulação no ER/mitocôndria normalmente associados a um maior efeito citotóxico do que aqueles que acumulam nos endossomas/lisossomas<sup>9</sup>.

### 3.2. Viabilidade celular após activação dos fotossensibilizadores presentes no meio extracelular

A viabilidade celular na presença de luz foi avaliada com a LUZ51b num segundo protocolo de PDT em que o composto apenas se encontrava no meio extracelular. Para o efeito, a irradiação foi realizada imediatamente após a adição do fotossensibilizador às células. Uma vez que com este tipo de protocolo espera-se uma menor eficiência da PDT, optou-se por apenas utilizar a LUZ51b que corresponde ao fotossensibilizador de maior eficácia. Com este estudo pretendeu-se seleccionar/ otimizar as condições de tratamento que permitiam obter níveis de morte celular semelhantes ao protocolo anteriormente descrito. Isto para a posterior realização de ensaios que permitam comparar os níveis de stress oxidativo entre os diferentes fotossensibilizadores e diferentes protocolos.



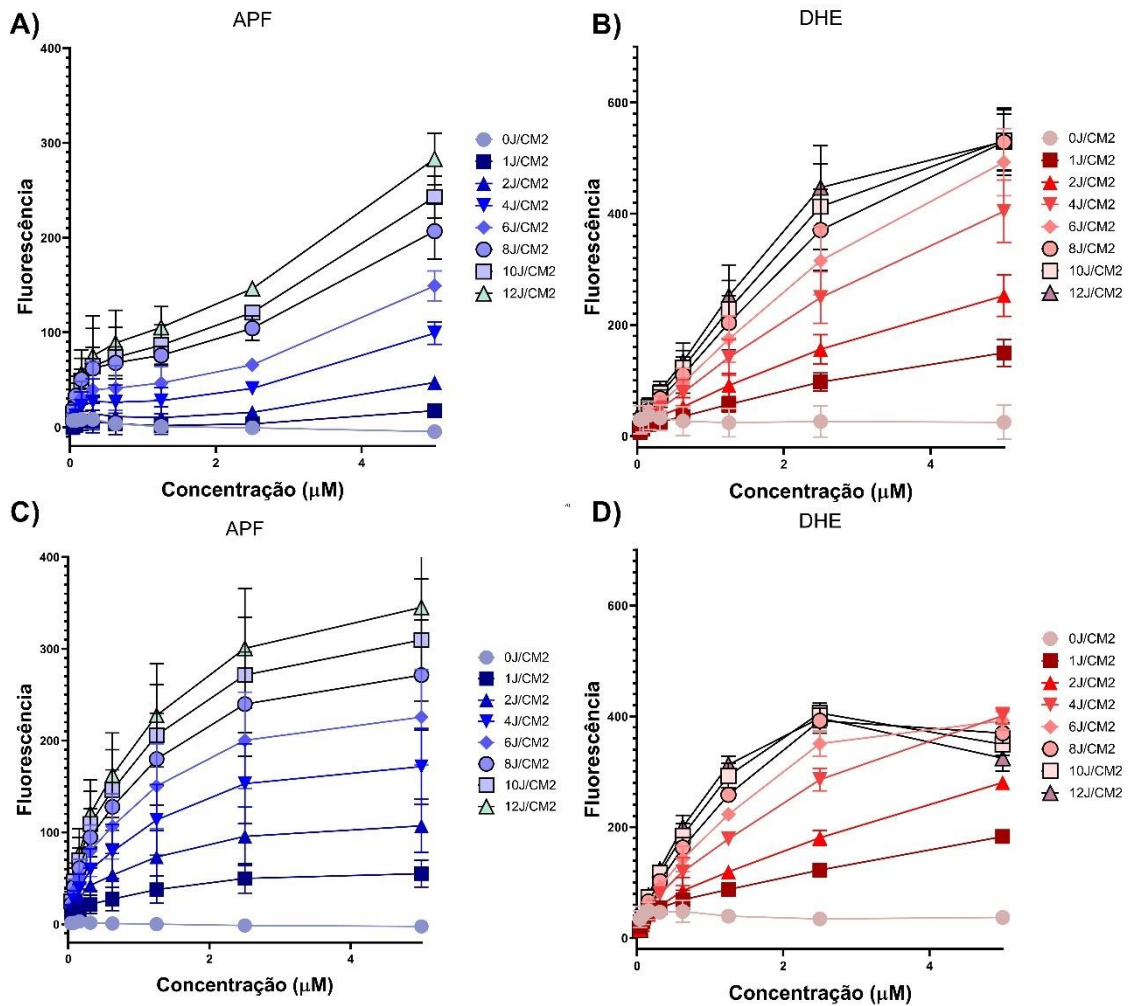
**Figura 12.** Viabilidade na presença de luz (fototoxicidade), após a irradiação imediatamente a seguir a adição da luz51b. A LUZ51b foi adicionada numa gama de concentrações desde 80 até 1.25 µM e usou-se uma dose de luz de (A) 1 J/cm<sup>2</sup> e (B) 2 J/cm<sup>2</sup>. As barras indicam médias + SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método one-way ANOVA da Luz51b vs células sem tratamento; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , e \*\*\*  $p < 0,001$ .

O que observa na Figura 12 A é que com a dose de luz de 1 J/cm<sup>2</sup> só começamos a ter morte celular significativa a partir de 80 µM mas não é equiparável aos resultados obtidos com o protocolo em que as células foram incubadas com os fotossensibilizadores durante 24 h. Então, optou-se por aumentar a dose de luz para 2 J/cm<sup>2</sup> (Figura 12 B). Neste caso, verificou-se uma viabilidade muito próxima de zero com 80 µM e de 40 a 20 µM, temos viabilidade celular inferior a 50%, ou seja, uma percentagem de morte celular equiparável ao obtido com o protocolo anterior (Figura 11). É de salientar que as concentrações de LUZ51b usadas neste protocolo são muito elevadas. Contudo, a opção de usar concentrações de LUZ51b mais baixas e aumentar a dose de luz não é uma opção viável. A LUZ51b é um composto de rápida internalização e aumentar a dose de luz faria aumentar o tempo de irradiação, o que teria como consequência a entrada do composto nas células. Sendo assim, não é possível aumentar a dose de luz para trabalhar com concentrações mais baixas de LUZ51b.

### **3.3. Avaliação da produção de ROS em solução**

Para avaliar a capacidade que cada fotossensibilizador tem em gerar ROS foram usadas 2 sondas, o DHE é oxidação por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intracelular forma 2-hidroxietídio que emite uma fluorescência com excitação a 510 nm<sup>66</sup>. E o APF que reage especialmente com radicais hidroxilo (\*OH). Quando esta reação se dá obtemos um produto que emite a 490/515nm. Ambas as sondas não emitem fluorescência na forma reduzida mas após oxidação, produzem um composto que emite fluorescência<sup>67</sup>.

Na Figura 13 o que podemos constatar é que a intensidade da fluorescência aumenta em função do aumento da concentração do fotossensibilizador. Verificamos, que a intensidade da fluorescência também aumenta com o aumento da dose de luz. A LUZ11-α<sub>3</sub>β tem quase o dobro da concentração do que a LUZ51b e o que observamos é que as fluorescências são semelhantes entre compostos, o que nos pode indicar que a LUZ51b tem uma maior capacidade em gerar ROS<sup>68-71</sup>. Esta experiência não pode ser realizada com a LUZ10 uma vez que o stock usado estava contaminado com clorina. O espectro de fluorescência da clorina sobrepõe-se ao espectro de emissão das duas sondas usadas, pelo que não foi possível realizar estes estudos de forma fiável com a LUZ10. Estes resultados reforçam que as diferenças observadas na fototoxicidade da LUZ11-α<sub>3</sub>β e LUZ51b deverão estar relacionadas com variações ao nível da internalização celular e não com diferenças relativas ao rendimento de produção de diferentes tipos de ROS.



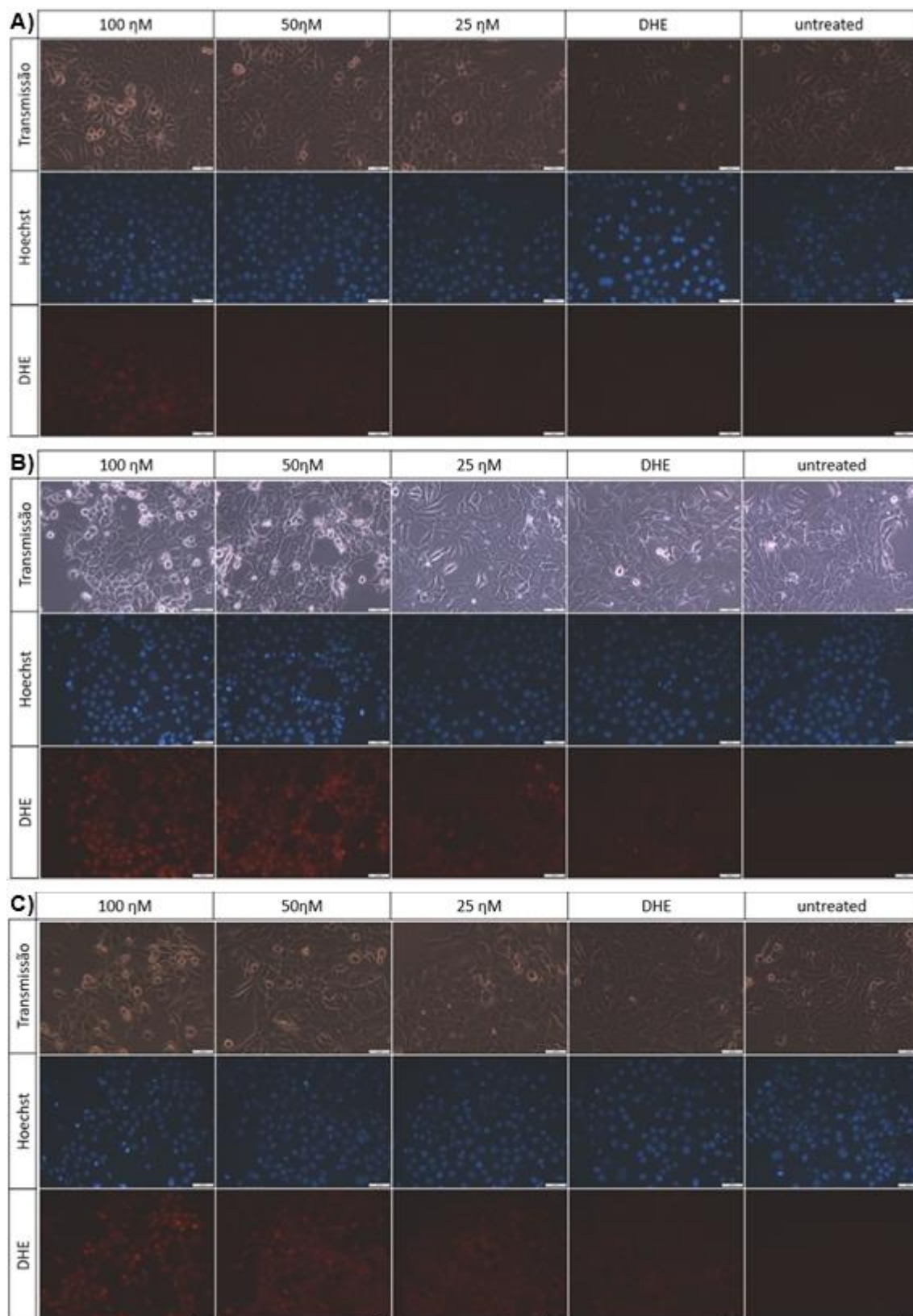
**Figura 13.** Produção de ROS em PBS com uma concentração de APF ou DHE de 5 μM. **(A)** Soluções com APF) ou **(B)** DHE e uma gama de concentrações de 0,04 a 5 μM para a LUZ11-α<sub>3</sub>β foram irradiadas de forma cumulativa com doses de luz que vão desde 0 j/cm<sup>2</sup> até 12 j/cm<sup>2</sup> (n=2). Soluções com **(C)** APF ou **(D)** DHE e uma gama de concentrações de 0,043 até 5 μM para a LUZ51b foram irradiadas de forma cumulativa com doses de luz que vão desde 0 j/cm<sup>2</sup> até 12 j/cm<sup>2</sup> (n=2).

### 3.4. Produção de ROS em células avaliada por microscopia de fluorescência

De seguida, procedeu-se à avaliação da produção de ROS, e consequentemente do stress oxidativo, em células 4T1 com recurso à sonda DHE. Esta sonda exibe fluorescência no azul quando no citosol e quando oxidada intercala com o DNA nuclear e emite luz no vermelho esta experiência foi feita com o intuito de verificar se os compostos tinham a capacidade de gerar ROS dentro das células e também avaliar a fluorescência da sonda oxidada em função do tempo.

Podemos observar na Figura 14 A) a morfologia das células através da transmissão de luz e verifica-se que as células se apresentam saudáveis, 30 min após a irradiação. É possível observar uma ligeira coloração vermelha (DHE oxidado) nas células submetidas à PDT com LUZ51b. Em todos os tempos de avaliação, verificou-se que a intensidade do

sinal associado ao DHE oxidado aumenta para a maior concentração de LUZ51b e vai diminuindo à medida que diminuimos a concentração deste (Figura 14). Nas Figura 14 B) e C), 3 e 6 h após a irradiação, conseguimos verificar, através das alterações morfológicas, que já existem várias células mortas. Conseguimos distinguir as células vivas das células mortas (apoptose), pelo facto de as células mortas por apoptose encolherem, ficarem com uma morfologia mais arredondada, apresentarem uma intensidade de brilho superior e também por se apresentarem num plano de imagem superior as células vivas (isto se estiverem destacadas). Já as células mortas por necrose apresentam-se com um volume superior ao normal, com e possivelmente com os organelos mais visíveis. Com a Figura 14 C) verificamos que já existe bastante morte celular o que pode explicar a menor intensidade do DHE. Em suma, verificamos que a LUZ51b é capaz de gerar ROS em meio celular e que o melhor tempo entre a irradiação e a análise são 3h, pois conseguimos ter um equilíbrio entre intensidade do sinal e a morte celular.



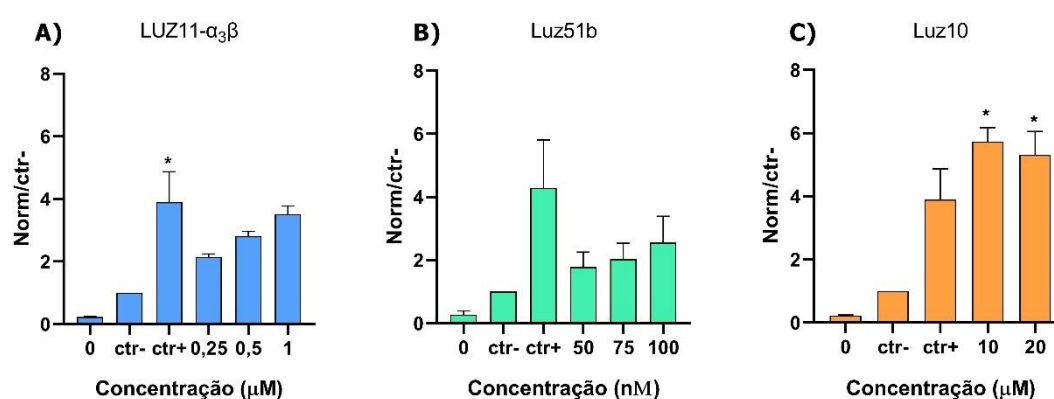
**Figura 14.** Avaliação do stress oxidativo em células 4T1 avaliado indirectamente com a sonda DHE por microscopia de fluorescência. As células foram incubadas durante 24 h com LUZ51b (100, 50 e 25 nM) seguindo-se a adição da sonda DHE (5  $\mu$ m). As células foram irradiadas com 1 j/cm<sup>2</sup> e as imagens de microscopia foram tiradas após **(A)** 30 min, **(B)** 3 h e **(C)** 6 h (C). A coloração vermelha é proveniente do DHE oxidado e o Hoechst, a azul, indica a marcação do núcleo. Escala de 100  $\mu$ m



### 3.5. Avaliação da peroxidação lipídica através do BODIPY™ 581/591 C11

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica em células submetidas a tratamentos de PDT recorreu-se ao reagente comercial BODIPY™ 581/591 C11. Este reagente é oxidado por hidroperóxidos lipídicos que são produtos resultantes da oxidação lipídica<sup>58,72</sup>. O resultado da oxidação do BODIPY pelos hidroperóxidos lipídicos é a deslocalização do pico de fluorescência a 590 nm (gama do vermelho) para 510 nm (gama do verde).

Os fosfolipídios insaturados, glicolipídios e colesterol que estão na membrana celular e em diversos organelos são suscetíveis a ataques das ROS. Espera-se que as ROS geradas pelo tratamento da PDT reajam com fosfolipídios insaturados, glicolipídios e colesterol originando hidroperóxidos lipídicos,<sup>58,72</sup> os quais poderão mediar a oxidação do BODIPY.



**Figura 15.** Peroxidação lipídica avaliada por intermédio do BODIPY™ 581/591 C11 usado na concentração de 5  $\mu$ M após tratamentos de PDT com os fotossensibilizadores (A) LUZ11- $\alpha_3\beta$  na gama de concentrações de 1, 0,5 e 0,25  $\mu$ M ( $n=3$ ); (B) LUZ51b nas concentrações de 100, 75, 50 nM ( $N=2$ ) e, (C) LUZ10 nas concentrações de 20 e 10  $\mu$ M ( $n=3$ ). Os resultados obtidos foram normalizados pelo controlo negativo (ctr-) o qual consistiu em células apenas incubadas com o BODIPY™ 581/591 C11). Os fotossensibilizadores foram incubados durante 24 h e o controlo positivo foi o hidroperóxido de cumeno (ctr+). As barras indicam a média  $\pm$  SEM de 2 a 3 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método ONE-way ANOVA das células tratadas vs ctr-; \*  $p < 0,05$

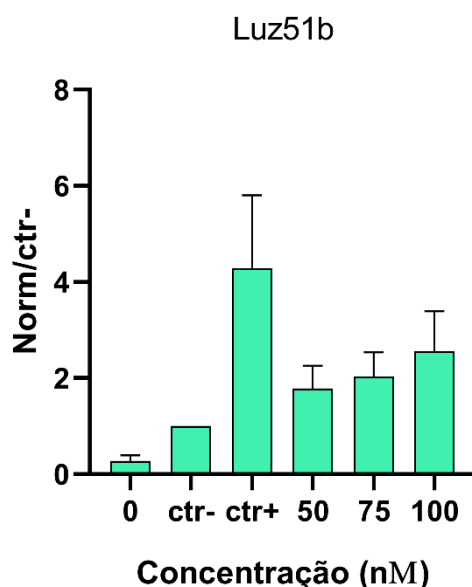
Constatamos pelos resultados apresentados na Figura 15 que de facto existe peroxidação lipídica após os tratamentos de PDT com as três bacterioclorinas em estudo. Os níveis mais elevados de peroxidação lipídica foram obtidos para a LUZ10 seguindo a LUZ11- $\alpha_3\beta$  e a LUZ51b com valores aproximados. Estes resultados foram contrários ao que foi inicialmente antecipado. PDT com LUZ10 foi o tratamento que apresentou maior peroxidação lipídica embora seria de esperar que este tivesse os resultados mais baixos uma vez que a LUZ10 é caracterizada por baixa lipofilicidade e elevada solubilidade em meio aquoso. Por esta razão, este composto tende a localizar-se nos endossomas/ lisossomas, não próximo da membrana celular, e nem em outros organelos ricos em lípidos<sup>73</sup>. A LUZ51b e a LUZ11- $\alpha_3\beta$  apresentam valores muito semelhantes com um padrão de crescimento em função da concentração. Estes valores são mais baixos que os da LUZ10 o que não seria de esperar uma vez que estes apresentam uma maior afinidade para o ER/ GA que são organelos ricos em membranas lipídicas. Seria expectável que a proximidade da LUZ11- $\alpha_3\beta$  e LUZ51b com as membranas



lipídicas iria fazer com que os ROS produzidos pelos fotossensibilizadores reagissem mais facilmente com os lípidos e assim, aumentasse a peroxidação lipídica. Estes resultados poderão ser explicados pelo facto de que a LUZ10 é adicionada em concentrações muito superiores aos outros fotossensibilizadores em estudo. No futuro talvez seja vantajoso equiparar os fotossensibilizadores pela quantidade de composto internalizada

Dos Santos *et al*<sup>74</sup>, usou o azul metileno como fotossensibilizador para avaliar a oxidação lipídica com o BODIPY™ 581/591 C11, em células de cancro de glândula mamária humana. Com recurso a um microscópio de fluorescência calculou o rácio entre a forma reduzida/oxidada e o que se verificou é que de facto existe oxidação lipídica após o tratamento da PDT. Usando um método de quantificação semelhante Sakharov *et al*<sup>75</sup> testou o fotossensibilizador ftalocianina (Cp4) em fibroblastos Rat-1 e voltou a verificar que existe de facto oxidação lipídica. Shui *et al*<sup>76</sup> usou BODIPY™ 581/591 C11 em células epiteliais de carcinoma de pulmão (A549) tratadas com o fotossensibilizador Hipericina (2 µM) para avaliar a oxidação lipídica. As células foram analisadas com recurso a citometria de fluxo e novamente se confirmou a que existia oxidação lipídica.

Realizou-se uma segunda experiência de peroxidação lipídica, mas desta vez com a LUZ51b activada no meio extracelular. Na Figura 16 verificamos que existe peroxidação lipídica, mas esta não é tão expressiva como na Figura 15 B. Verifica-se ainda que não existe uma tendência de aumento da peroxidação lipídica em função da concentração. Este resultado pode ser explicado por uma pequena proximidade e/ ou acumulação da LUZ51b com os lípidos da membrana celular. Em contraste, no protocolo usado na Figura 15 B), é expectável uma grande acumulação da LUZ51b no ER/GA, os quais contém cerca de 50% dos lípidos das células.



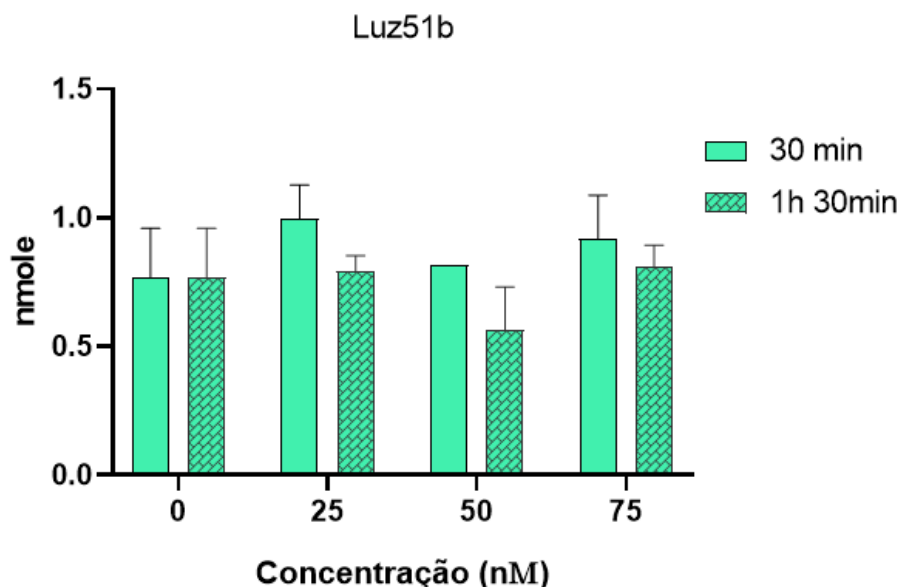
**Figura 16.** Peroxidação lipídica avaliada por intermédio do com BODIPY™ 581/591 C11 usado na concentração de 5 µM e após tratamentos de PDT com a LUZ51b nas concentrações de 80, 60 e 40 µM. O controlo positivo (ctr+) foi o

hidroperóxido de cumeno (ctr+) (n=2). As barras indicam as médias +/- SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método ONE-way ANOVA das células tratadas vs ctr-

### 3.6. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação do malonaldeído

Os lípidos existentes nas células são suscetíveis a ataques de ROS, sobretudo os ácidos gordos polinsaturados (PUFA). Quando os ROS reagem por exemplo com os PUFA tem-se como resultado vários produtos primários tais como os hidroperóxidos lipídicos. Estes vai sofrer nova reação o que leva à formação de vários produtos secundários, como por exemplo o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE)<sup>55,77</sup>. Para avaliarmos a quantidade de MDA presente nas amostras usamos um kit comercial cuja método se baseia na reacção do MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA). Desta reacção resulta na formação de TBARS (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*) que absorve a 532 nm.

Constatamos na Figura 17, que existe um ligeiro aumento da quantidade de MDA nomeadamente 30 min após o tratamento de PDT com LUZ51b. Verificamos que os valores para 25 e 75 nM são bastante semelhantes para a concentração de 50 nM é ligeiramente inferior. Para o ensaio dos 1h30 min observamos que os valores para as concentrações de 75 e 25 nM estão todas muito próximas do controlo. Os valores da concentração de 50 nM não são concordantes com as restantes e umas das possíveis causas e algum tipo de erro experimental.



**Figura 17.** Quantificação do malonaldeído. LUZ51b foi incubada durante 24 h e irradiada com 1 J/cm<sup>2</sup>. A quantificação de MDA foi realizada 30 min e 1h30min após a das células. (n=2). As barras indicam as médias +/- SEM de 2 experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método two-way ANOVA da Luz51b vs células sem tratamento;

A menor quantidade de MDA após 1h30 min poderá ter várias explicações. As células vivas têm mecanismos para eliminar/ remover as moléculas oxidadas, assim como o

MDA é capaz de reagir com outras moléculas, por exemplo que contenham grupos tióis<sup>55,78</sup>. Observamos que a variação entre concentrações de 25 nM e 75 nM não é muito significativa. Saczko *et al*<sup>79</sup> avaliou a quantidade de MDA através da reação com TBA. Para isto tratou as células com o fotossensibilizador Photofrin II incubado durante 4 h nas concentrações de 15 e 30 µg/ml (irradiado a 6 J/cm<sup>2</sup>). Depois de 5 min após a irradiação analisou-se as células e o que verificou foi que para a concentração de 15 µg/ml a quantidade de MDA triplicou em relação ao controlo e quando passamos para a concentração de 30 µg/ml essa mesma quantidade é 5 vezes superior ao controlo<sup>79</sup>.

Zheng *et al*<sup>80</sup> relata situações semelhantes usando como fotossensibilizador DTTP( 5-5-(4-N, N-diacetoxyphenyl) -10, 15, 20 -tetraphenylporphyrin) nas concentrações de 2.5, 5 E 10.0 µg/mL (2,4 J/cm<sup>2</sup>) com uma incubação de 24 h. Uma hora após a irradiação as células foram analisadas e o que se vê é que existe um grande aumento da quantidade de MDA especialmente na concentração de 10.0 µg/mL onde existe um aumento de aproximadamente 5 vezes.<sup>80</sup> As diferenças entre os resultados obtidos pela LUZ51b e os autores anteriores poderão ser explicados pelo uso de diferentes linhas celulares, diferentes fotossensibilizadores ou ainda por condições experimentais diferentes.

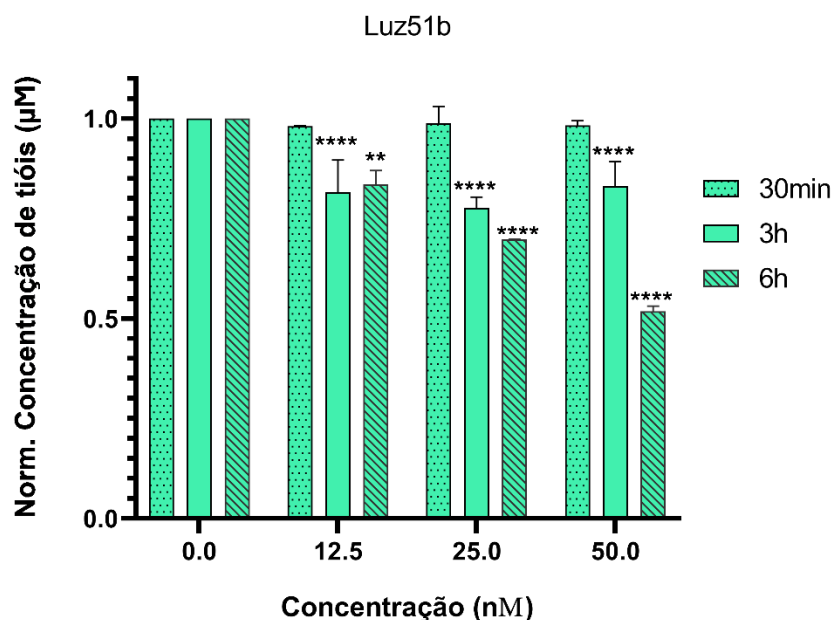
### **3.7. Avaliação da peroxidação lipídica através da quantificação dos grupos tióis**

Os tióis são uma classe de compostos caracterizada por terem um grupo -SH, que por sua vez está ligado a um carbono. Os tióis presentes nas células encontram-se essencialmente em proteínas ou outras moléculas como a glutathiona (GSH). Os tióis tem um papel bastante importante na defesa antioxidante e tem bastante afinidade para os produtos da peroxidação lipídica tais como, o malonaldeído, 4-hidroxi-2-nonenal e acroleína. Quando estes reagem com a glutathiona formam a Glutathiona dissulfeto (GSSG). Isto faz com que a quantidade de GSH na forma reduzida disponível diminua.<sup>81</sup>

Na Figura 18 observamos que 30 min após a irradiação não existem alterações no nível dos tióis. Três horas depois da irradiação verificamos que os tióis diminuíram e essa diferença aumenta conforme a concentração de LUZ51b aumenta. O mesmo acontece para as 6h, sendo neste caso, a diferença mais significativa.

Observamos na Figura 18 que existe uma diminuição da quantidade de tióis e isto deve-se ao facto de os tióis reagirem com os produtos da peroxidação lipídica e passarem à sua forma oxidada. Consequentemente a forma reduzida dos tióis que reage com a sonda vai diminuir nas células. Saczko *et al*<sup>79</sup> avaliou a quantidade de tióis após o tratamento das células A549 com o fotossensibilizador Photofrin II na concentração de 30 µg/ml. As células foram irradiadas a 6 J/cm<sup>2</sup> e após 6h o resultado que existia uma diminuição bastante significativa dos tióis. Tal como acontece com a LUZ51b as 6h. Kessel *et al*<sup>82</sup> relata uma situação muito semelhante usando o fotossensibilizador SnET2

(ethyl etiopurpurin) 30 µg/ml em células L1210( *Murine leukemia cells*), aponta uma redução ainda mais significativa para o numero de tióis.



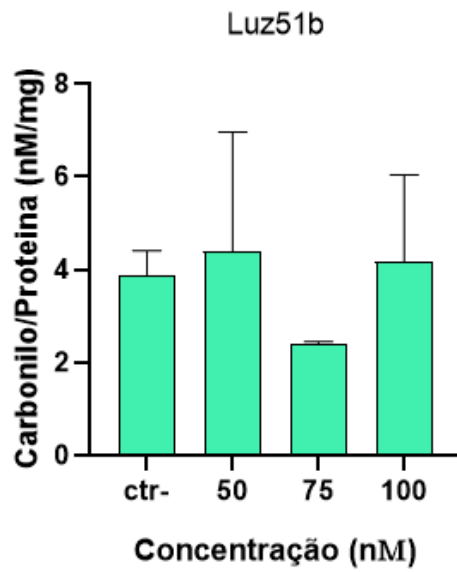
**Figura 18.** Concentração de tióis normalizado pelo controlo. LUZ51b nas concentrações de 50, 25,12,5 nM. A quantificação dos tióis foi realizada 30 min(n=1), 3h(n=3) e 6h(n=1) após a irradiação. As barras indicam as médias +/- SEM de 1 (30 min e 6 h) ou 3 (3 h) experimentos independentes. O tratamento estatístico foi avaliado usando o método two-way ANOVA dasda LUZ51b vs células sem tratamento; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### 3.8. Avaliação da oxidação proteica através da quantificação dos grupos carbonilo

Um dos pontos fundamentais da PDT é a geração de ROS, estes vão induzir danos no DNA, lípidos e proteínas. As cadeias laterais das proteínas vão ser oxidadas pelos ROS, levando à formação grupos carbonilo. A formação dos grupos carbonilo também pode-se dever a reação com alguns produtos da peroxidação lipídica tais como: MDA, 4-HNE<sup>64</sup>.

Na Figura 19, os resultados não conclusivos, verificamos que temos um grande desvio padrão. Este resultado pode ser devido a erros experimentais. Ao facto de a quantidade aconselhável de proteína para a realização da experiência ser 10 mg por amostra e de nos estarmos a trabalhar com uma quantidade de proteína significativamente inferior a recomendável. Grimm *et al*<sup>83</sup> usando o fotossensibilizador Ácido Aminolevulínico (5-ALA) relata que existe de facto um aumento da quantidade de grupos carbonilo. Os trabalhos de Doina *et al*<sup>84</sup> e Tsaytler *et al*<sup>85</sup> com diferentes fotossensibilizadores relatam um aumento da quantidades dos grupos carbonilo nas células quando tratadas com PDT. Vários autores que usaram vários fotossensibilizadores, afirmam que de facto existe um

aumento dos grupos carbonilo devido a PDT, então será expectável que a LUZ51b também resultados concordantes.



**Figura 19.** Conteúdo de grupos Carbonilo após o tratamento com a LUZ51b nas concentrações de 100, 75 e 50 nM e irradiação com 1J/cm<sup>2</sup>(n=1)

#### 4. Conclusão

No presente trabalho, realizou-se uma optimização das concentrações e dose de luz para alcançar o mesmo nível de morte celular com os três fotossensibilizadores em estudo. Observou-se que a LUZ51b é a molécula que apresenta maior fototoxicidade, seguindo-se a LUZ11- $\alpha_3\beta$  e por último, a LUZ10. Na avaliação de ROS em solução, verificou-se que a LUZ51b tem melhor capacidade de geração de ROS do que a LUZ11. Confirmou-se que a LUZ51b tem capacidade de gerar ROS, e conseqüentemente stress oxidativo, em meio intracelular.

A avaliação da oxidação lipídica foi realizada através da quantificação da oxidação do BODIPY™ 581/591 C11 por hidroperóxidos, bem como pela quantificação do produto intermediário de oxidação lipídica, MDA, e pela quantificação dos grupos tióis. Os resultados obtidos mostram que a maior oxidação do BODIPY™ 581/591 C11 foi mediada pela PDT com LUZ10, obtendo-se valores muito semelhantes para a LUZ51b e LUZ11- $\alpha_3\beta$ . A oxidação do BODIPY™ 581/591 C11 foi muito menor quando a LUZ51b foi fotoactivada extra-celularmente. A quantificação do malonaldeído revelou um ligeiro aumento, que foi semelhante para todas as concentrações de LUZ51b que foram testadas. Após a PDT com LUZ51b, verificou-se ainda uma diminuição dos grupos tiol, o que indicativo de que estão a reagir com produtos a oxidação lipídica. A diminuição dos grupos tióis foi muito mais expressiva do que os resultados obtidos com a quantificação do MDA.

Infelizmente não foi possível avaliar os níveis de MDA e tiol após os tratamentos de PDT com LUZ11- $\alpha_3\beta$  e LUZ10. Estes estudos seriam de grande relevância para que se pudesse realizar uma comparação mais aprofundada do perfil de oxidação lipídica desencadeado por estas moléculas após a irradiação das células. Seria igualmente importante avaliar os lípidos oxidados por espectrometria de massa, que é o método mais consensual. Isto permitiria ver que lípidos são oxidados e os seus produtos.

## 5. Bibliografia

- (1) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (2) Sarkar, S.; Horn, G.; Moulton, K.; Oza, A.; Byler, S.; Kokolus, S.; Longacre, M. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (10), 21087–21113. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>.
- (3) What Is Cancer? - NCI <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition> (accessed May 31, 2022).
- (4) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12* (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- (5) Immunotherapy for Cancer - NCI <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy> (accessed Sep 10, 2022).
- (6) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- (7) Abdel-kader, M. H. CHAPTER 1 The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present. In *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*; The Royal Society of Chemistry, 2016; pp 1–21. <https://doi.org/10.1039/9781782626824-00001>.
- (8) MACDONALD, I. A. N. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic Principles of Photodynamic Therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2001**, *05* (02), 105–129. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>.
- (9) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From Local to Systemic Treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (10), 1765–1780. <https://doi.org/10.1039/c5pp00132c>.
- (10) Gomes-da-Silva, L. C.; Zhao, L.; Bezu, L.; Zhou, H.; Sauvat, A.; Liu, P.; Durand, S.; Leduc, M.; Souquere, S.; Loos, F.; Mondragón, L.; Sveinbjørnsson, B.; Rekdal, Ø.; Boncompain, G.; Perez, F.; Arnaut, L. G.; Kepp, O.; Kroemer, G. Photodynamic Therapy with Redaporfin Targets the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *EMBO J.* **2018**, *37* (13), e98354. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/embj.201798354>.
- (11) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (12) Donohoe, C.; Senge, M. O.; Arnaut, L. G.; Gomes-da-Silva, L. C. Cell Death in Photodynamic Therapy: From Oxidative Stress to Anti-Tumor Immunity. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, **2019**, *1872* (2), 188308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>.
- (13) Schweizer, T.; Kubach, H.; Koch, T. Investigations to Characterize the Interactions of Light Radiation, Engine Operating Media and Fluorescence Tracers for the Use of Qualitative Light-Induced Fluorescence in Engine Systems. *Automot. Engine Technol.* **2021**, *6* (3), 275–287. <https://doi.org/10.1007/s41104-021-00092-3>.
- (14) Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24* (2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>.
- (15) McKenzie, L. K.; Bryant, H. E.; Weinstein, J. A. Transition Metal Complexes as Photosensitisers in One- and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *379*, 2–29.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.020>.

- (16) Agazzi, M. L.; Ballatore, M. B.; Durantini, A. M.; Durantini, E. N.; Tomé, A. C. BODIPYs in Antitumoral and Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Integrating Review. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2019**, *40*, 21–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.04.001>.
- (17) Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers: A Clinical Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, *7* (2), 61–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.
- (18) Songca, S. P.; Adjei, Y. Applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy against Bacterial Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* . 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23063209>.
- (19) Xuan, W.; He, Y.; Huang, L.; Huang, Y.-Y.; Bhayana, B.; Xi, L.; Gelfand, J. A.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Tetracyclines in Vitro and in Vivo: Photochemical Mechanisms and Potentiation by Potassium Iodide. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 17130. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35594-y>.
- (20) Almeida, A. Photodynamic Therapy in the Inactivation of Microorganisms. *Antibiotics* . 2020. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040138>.
- (21) Aroso, R. T.; Schaberle, F. A.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M. Photodynamic Disinfection and Its Role in Controlling Infectious Diseases. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2021**, *20* (11), 1497–1545. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00102-1>.
- (22) Ericson, M. B.; Wennberg, A.-M.; Larkö, O. Review of Photodynamic Therapy in Actinic Keratosis and Basal Cell Carcinoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4* (1), 1–9.
- (23) Girotti, A. W.; Fahey, J. M.; Korbek, M. Photodynamic Therapy as an Oxidative Anti-Tumor Modality: Negative Effects of Nitric Oxide on Treatment Efficacy. *Pharmaceutics* . 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050593>.
- (24) Abels, C. Targeting of the Vascular System of Solid Tumours by Photodynamic Therapy (PDT). *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (8), 765–771. <https://doi.org/10.1039/b314241h>.
- (25) Mashayekhi, V.; Op ?t Hoog, C.; Oliveira, S. Vascular Targeted Photodynamic Therapy: A Review of the Efforts towards Molecular Targeting of Tumor Vasculature. In *Porphyrin Science by Women*; WORLD SCIENTIFIC, 2020; pp 175–186. [https://doi.org/doi:10.1142/9789811223556\\_0011](https://doi.org/doi:10.1142/9789811223556_0011).
- (26) S. Lobo, A. C.; Gomes-da-Silva, L. C.; Rodrigues-Santos, P.; Cabrita, A.; Santos-Rosa, M.; Arnaut, L. G. Immune Responses after Vascular Photodynamic Therapy with Redaporfin. *Journal of Clinical Medicine* . **2020**. <https://doi.org/10.3390/jcm9010104>.
- (27) Olivo, M.; Bhuvaneswari, R.; Lucky, S. S.; Dendukuri, N.; Soo-Ping Thong, P. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy in Combination with Multi-Faceted Anti-Tumor Modalities. *Pharmaceutics* . 2010, pp 1507–1529. <https://doi.org/10.3390/ph3051507>.
- (28) Robertson, C. A.; Evans, D. H.; Abrahamse, H. Photodynamic Therapy (PDT): A Short Review on Cellular Mechanisms and Cancer Research Applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, *96* (1), 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>.
- (29) Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E. S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D. W.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Antonov, A. V.; Arama, E.; Baehrecke, E. H.; Barlev, N. A.; Bazan, N. G.; Bernassola, F.; Bertrand, M. J. M.; Bianchi, K.; Blagosklonny, M. V.; Blomgren, K.; Borner, C.; Boya, P.; Brenner, C.; Campanella, M.; Candi, E.; Carmona-Gutierrez, D.; Cecconi, F.; Chan, F. K.-M.; Chandel, N. S.; Cheng, E. H.; Chipuk, J. E.; Cidlowski, J. A.; Ciechanover, A.; Cohen, G. M.; Conrad, M.; Cubillos-Ruiz, J. R.; Czabotar, P. E.; D’Angiolella, V.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; De Laurenzi, V.; De Maria, R.; Debatin, K.-M.; DeBerardinis, R. J.; Deshmukh, M.; Di Daniele, N.; Di Virgilio, F.; Dixit, V. M.; Dixon, S. J.; Duckett, C. S.; Dynlacht, B. D.; El-Deiry, W. S.; Elrod, J. W.; Fimia, G. M.; Fulda, S.; García-Sáez, A. J.; Garg, A. D.; Garrido, C.;



- Gavathiotis, E.; Golstein, P.; Gottlieb, E.; Green, D. R.; Greene, L. A.; Gronemeyer, H.; Gross, A.; Hajnoczky, G.; Hardwick, J. M.; Harris, I. S.; Hengartner, M. O.; Hetz, C.; Ichijo, H.; Jäättelä, M.; Joseph, B.; Jost, P. J.; Juin, P. P.; Kaiser, W. J.; Karin, M.; Kaufmann, T.; Kepp, O.; Kimchi, A.; Kitsis, R. N.; Klionsky, D. J.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lee, S. W.; Lemasters, J. J.; Levine, B.; Linkermann, A.; Lipton, S. A.; Lockshin, R. A.; López-Otín, C.; Lowe, S. W.; Luedde, T.; Lugli, E.; MacFarlane, M.; Madeo, F.; Malewicz, M.; Malorni, W.; Manic, G.; Marine, J.-C.; Martin, S. J.; Martinou, J.-C.; Medema, J. P.; Mehlen, P.; Meier, P.; Melino, S.; Miao, E. A.; Molkentin, J. D.; Moll, U. M.; Muñoz-Pinedo, C.; Nagata, S.; Nuñez, G.; Oberst, A.; Oren, M.; Overholtzer, M.; Pagano, M.; Panaretakis, T.; Pasparakis, M.; Penninger, J. M.; Pereira, D. M.; Pervaiz, S.; Peter, M. E.; Piacentini, M.; Pinton, P.; Prehn, J. H. M.; Puthalakath, H.; Rabinovich, G. A.; Rehm, M.; Rizzuto, R.; Rodrigues, C. M. P.; Rubinsztein, D. C.; Rudel, T.; Ryan, K. M.; Sayan, E.; Scorrano, L.; Shao, F.; Shi, Y.; Silke, J.; Simon, H.-U.; Sistigu, A.; Stockwell, B. R.; Strasser, A.; Szabadkai, G.; Tait, S. W. G.; Tang, D.; Tavernarakis, N.; Thorburn, A.; Tsujimoto, Y.; Turk, B.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P.; Vander Heiden, M. G.; Villunger, A.; Virgin, H. W.; Vousden, K. H.; Vucic, D.; Wagner, E. F.; Walczak, H.; Wallach, D.; Wang, Y.; Wells, J. A.; Wood, W.; Yuan, J.; Zakeri, Z.; Zhivotovsky, B.; Zitvogel, L.; Melino, G.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25* (3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- (30) Galluzzi, L.; Vitale, I.; Warren, S.; Adjemian, S.; Agostinis, P.; Martinez, A. B.; Chan, T. A.; Coukos, G.; Demaria, S.; Deutsch, E.; Draganov, D.; Edelson, R. L.; Formenti, S. C.; Fucikova, J.; Gabriele, L.; Gaip, U. S.; Gameiro, S. R.; Garg, A. D.; Golden, E.; Han, J.; Harrington, K. J.; Hemminki, A.; Hodge, J. W.; Hossain, D. M. S.; Illidge, T.; Karin, M.; Kaufman, H. L.; Kepp, O.; Kroemer, G.; Lasarte, J. J.; Loi, S.; Lotze, M. T.; Manic, G.; Merghoub, T.; Melcher, A. A.; Mossman, K. L.; Prosper, F.; Rekdal, Ø.; Rescigno, M.; Riganti, C.; Sistigu, A.; Smyth, M. J.; Spisek, R.; Stagg, J.; Strauss, B. E.; Tang, D.; Tatsuno, K.; van Gool, S. W.; Vandenabeele, P.; Yamazaki, T.; Zamarin, D.; Zitvogel, L.; Cesano, A.; Marincola, F. M. Consensus Guidelines for the Definition, Detection and Interpretation of Immunogenic Cell Death. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8* (1), e000337. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000337>.
- (31) Bezu, L.; Gomes-da-Silva, L. C.; Dewitte, H.; Breckpot, K.; Fucikova, J.; Spisek, R.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Kroemer, G. Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death. *Frontiers in Immunology*. 2015.
- (32) Fucikova, J.; Kepp, O.; Kasikova, L.; Petroni, G.; Yamazaki, T.; Liu, P.; Zhao, L.; Spisek, R.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Detection of Immunogenic Cell Death and Its Relevance for Cancer Therapy. *Cell Death Dis.* **2020**, *11* (11), 1013. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03221-2>.
- (33) Garg, A. D.; Krysko, D. V.; Verfaillie, T.; Kaczmarek, A.; Ferreira, G. B.; Marysael, T.; Rubio, N.; Firczuk, M.; Mathieu, C.; Roebroek, A. J. M.; Annaert, W.; Golab, J.; de Witte, P.; Vandenabeele, P.; Agostinis, P. A Novel Pathway Combining Calreticulin Exposure and ATP Secretion in Immunogenic Cancer Cell Death. *EMBO J.* **2012**, *31* (5), 1062–1079. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/emboj.2011.497>.
- (34) Kepp, O.; Menger, L.; Vacchelli, E.; Locher, C.; Adjemian, S.; Yamazaki, T.; Martins, I.; Sukkurwala, A. Q.; Michaud, M.; Senovilla, L.; Galluzzi, L.; Kroemer, G.; Zitvogel, L. Crosstalk between ER Stress and Immunogenic Cell Death. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2013**, *24* (4), 311–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.05.001>.
- (35) Zhou, J.; Wang, G.; Chen, Y.; Wang, H.; Hua, Y.; Cai, Z. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy: Present and Emerging Inducers. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23* (8), 4854–4865. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14356>.
- (36) Tesniere, A.; Panaretakis, T.; Kepp, O.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Molecular Characteristics of Immunogenic Cancer Cell Death. *Cell Death Differ.* **2008**, *15* (1), 3–12. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269>.
- (37) Fabian, K. P.; Wolfson, B.; Hodge, J. W. From Immunogenic Cell Death to Immunogenic Modulation: Select Chemotherapy Regimens Induce a Spectrum of Immune-Enhancing Activities in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*. 2021.

- (38) Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Zitvogel, L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31* (1), 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.
- (39) Garg, A. D.; Nowis, D.; Golab, J.; Vandenabeele, P.; Krysko, D. V.; Agostinis, P. Immunogenic Cell Death, DAMPs and Anticancer Therapeutics: An Emerging Amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2010**, *1805* (1), 53–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.08.003>.
- (40) Michaud, M.; Martins, I.; Sukkurwala, A. Q.; Adjemian, S.; Ma, Y.; Pellegatti, P.; Shen, S.; Kepp, O.; Scoazec, M.; Mignot, G.; Rello-Varona, S.; Tailler, M.; Menger, L.; Vacchelli, E.; Galluzzi, L.; Ghiringhelli, F.; di Virgilio, F.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science (80-. )*. **2011**, *334* (6062), 1573–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1208347>.
- (41) Cruickshank, B.; Giacomantonio, M.; Marcato, P.; McFarland, S.; Pol, J.; Gujar, S. Dying to Be Noticed: Epigenetic Regulation of Immunogenic Cell Death for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2018.
- (42) Decraene, B.; Yang, Y.; De Smet, F.; Garg, A. D.; Agostinis, P.; De Vleeschouwer, S. Immunogenic Cell Death and Its Therapeutic or Prognostic Potential in High-Grade Glioma. *Genes Immun.* **2022**, *23* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00161-5>.
- (43) Fucikova, J.; Becht, E.; Iribarren, K.; Goc, J.; Remark, R.; Damotte, D.; Alifano, M.; Devi, P.; Biton, J.; Germain, C.; Lupo, A.; Fridman, W. H.; Dieu-Nosjean, M.-C.; Kroemer, G.; Sautès-Fridman, C.; Cremer, I. Calreticulin Expression in Human Non–Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer Res.* **2016**, *76* (7), 1746–1756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1142>.
- (44) Rocha, L. B.; Gomes-da-Silva, L. C.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Elimination of Primary Tumours and Control of Metastasis with Rationally Designed Bacteriochlorin Photodynamic Therapy Regimens. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51* (13), 1822–1830. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.06.002>.
- (45) Lobo, C. S.; Gomes-da-Silva, L. C.; Arnaut, L. G. Potentiation of Systemic Anti-Tumor Immunity with Photodynamic Therapy Using Porphyrin Derivatives. In *Handbook of Porphyrin Science; Handbook of Porphyrin Science; WORLD SCIENTIFIC, 2021; Vol. Volume 46, pp 279–344*. [https://doi.org/doi:10.1142/9789811246760\\_0222](https://doi.org/doi:10.1142/9789811246760_0222).
- (46) Obeid, M.; Tesniere, A.; Ghiringhelli, F.; Fimia, G. M.; Apetoh, L.; Perfettini, J.-L.; Castedo, M.; Mignot, G.; Panaretakis, T.; Casares, N.; Métivier, D.; Larochette, N.; van Ender, P.; Ciccocanti, F.; Piacentini, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Calreticulin Exposure Dictates the Immunogenicity of Cancer Cell Death. *Nat. Med.* **2007**, *13* (1), 54–61. <https://doi.org/10.1038/nm1523>.
- (47) Gomes-da-Silva, L. C.; Zhao, L.; Arnaut, L. G.; Kroemer, G.; Kepp, O. Redaporfin Induces Immunogenic Cell Death by Selective Destruction of the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Apparatus. *Oncotarget*. July 2018, pp 31169–31170. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25798>.
- (48) Alzeibak, R.; Mishchenko, T. A.; Shilyagina, N. Y.; Balalaeva, I. V.; Vedunova, M. V.; Krysko, D. V. Targeting Immunogenic Cancer Cell Death by Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *J. Immunother. Cancer* **2021**, *9* (1), e001926. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001926>.
- (49) Cincotta, L.; Szeto, D.; Lampros, E.; Hasan, T.; Cincotta, A. H. Benzophenothiazine and Benzoporphyrin Derivative Combination Phototherapy Effectively Eradicates Large Murine Sarcomas. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63* (2), 229–237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03019.x>.
- (50) Kessel, D.; Evans, C. L. Promotion of Proapoptotic Signals by Lysosomal Photodamage: Mechanistic Aspects and Influence of Autophagy. *Photochem. Photobiol.* **2016**, *92* (4), 620–623. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/php.12592>.
- (51) Pucelik, B.; Arnaut, L. G.; Stochel, G.; Dąbrowski, J. M. Design of Pluronic-Based Formulation for Enhanced Redaporfin-Photodynamic Therapy against Pigmented Melanoma. *ACS Appl. Mater.*

*Interfaces* **2016**, 8 (34), 22039–22055. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07031>.

- (52) Karwicka, M.; Pucelik, B.; Gonet, M.; Elas, M.; Dąbrowski, J. M. Effects of Photodynamic Therapy with Redaporfin on Tumor Oxygenation and Blood Flow in a Lung Cancer Mouse Model. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 12655. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49064-6>.
- (53) Bacellar, I. O. L.; Baptista, M. S. Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization. *ACS Omega* **2019**, 4 (26), 21636–21646. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03244>.
- (54) Girotti, A. W. Photosensitized Oxidation of Membrane Lipids: Reaction Pathways, Cytotoxic Effects, and Cytoprotective Mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2001**, 63 (1), 103–113. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00207-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00207-X).
- (55) Ayala, A.; Muñoz, M. F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- (56) Girotti, A. W. Mechanisms of Lipid Peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1985**, 1 (2), 87–95. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90011-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90011-X).
- (57) Barrera StefaniaAU - Daga, MartinaAU - Dianzani, ChiaraAU - Arcaro, AlessiaAU - Cetrangolo, Giovanni P.AU - Giordano, GiulioAU - Cucci, Marie A.AU - Graf, MariaAU - Gentile, FabrizioTI - Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and, G.-P. No Title. *Antioxidants*. 2018. <https://doi.org/10.3390/antiox7080102>.
- (58) Girotti, A. W. Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems. *J. Lipid Res.* **1998**, 39 (8), 1529–1542.
- (59) Esterbauer, H. Estimation of Peroxidative Damage. A Critical Review. *Pathol. Biol. (Paris)*. **1996**, 44 (1), 25–28.
- (60) Repetto, M. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination; Semprine, J., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2012; p Ch. 1. <https://doi.org/10.5772/45943>.
- (61) Que, X.; Hung, M.-Y.; Yeang, C.; Gonen, A.; Prohaska, T. A.; Sun, X.; Diehl, C.; Määttä, A.; Gaddis, D. E.; Bowden, K.; Pattison, J.; MacDonald, J. G.; Ylä-Herttuala, S.; Mellon, P. L.; Hedrick, C. C.; Ley, K.; Miller, Y. I.; Glass, C. K.; Peterson, K. L.; Binder, C. J.; Tsimikas, S.; Witztum, J. L. Oxidized Phospholipids Are Proinflammatory and Proatherogenic in Hypercholesterolaemic Mice. *Nature* **2018**, 558 (7709), 301–306. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0198-8>.
- (62) Miller, Y. I.; Choi, S.-H.; Wiesner, P.; Fang, L.; Harkewicz, R.; Hartvigsen, K.; Boullier, A.; Gonen, A.; Diehl, C. J.; Que, X.; Montano, E.; Shaw, P. X.; Tsimikas, S.; Binder, C. J.; Witztum, J. L. Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. *Circ. Res.* **2011**, 108 (2), 235–248. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223875>.
- (63) Schaberle, F. A. Assessment of the Actual Light Dose in Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2018**, 23, 75–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.009>.
- (64) Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R. Protein Carbonyl Groups as Biomarkers of Oxidative Stress. *Clin. Chim. Acta* **2003**, 329 (1), 23–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2).
- (65) PEREIRA NASCIMENTO COSTA, G.; FERREIRA GONCALVES, N. P.; PEREIRA MONTEIRO, C. J.; REIS DE ABREU, A. C.; FERRAZ CARDOSO SOARES, H. T.; BORGES ROCHA, L. G.; SCHABERLE, F. A.; MIGUENS PEREIRA, M.; MOREIRA, D. S. A.; Guilherme, L. LOW MOLECULAR WEIGHT DERIVATIVES OF CARBOXAMIDE HALOGENATED PORPHYRINS, NAMELY CHLORINS AND BACTERIOCHLORINS, AND THEIR APPLICATIONS THEREOF. WO 2016/178191 A1.
- (66) Balbin Villaverde, A. I.; Netherton, J.; Baker. From Past to Present: The Link Between Reactive

- Oxygen Species in Sperm and Male Infertility. *Antioxidants* **2019**, *8*, 616. <https://doi.org/10.3390/antiox8120616>.
- (67) Li, J.; Zhuang, Z.; Zhao, Z.; Tang, B. Z. Type I AIE Photosensitizers: Mechanism and Application. *VIEW* **2022**, *3* (2), 20200121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/VIW.20200121>.
- (68) Pucelik Luis G.AU - Dąbrowski, Janusz M.TI - Lipophilicity of Bacteriochlorin-Based Photosensitizers as a Determinant for PDT Optimization through the Modulation of the Inflammatory Mediators, B.-A. No Title. *Journal of Clinical Medicine*. 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm9010008>.
- (69) Pucelik, B.; Paczyński, R.; Dubin, G.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Dąbrowski, J. M. Properties of Halogenated and Sulfonated Porphyrins Relevant for the Selection of Photosensitizers in Anticancer and Antimicrobial Therapies. *PLoS One* **2017**, *12* (10), e0185984.
- (70) Pucelik, B.; Sułek, A.; Drozd, A.; Stochel, G.; Pereira, M. M.; Pinto, S. M. A.; Arnaut, L. G.; Dąbrowski, J. M. Enhanced Cellular Uptake and Photodynamic Effect with Amphiphilic Fluorinated Porphyrins: The Role of Sulfoester Groups and the Nature of Reactive Oxygen Species. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082786>.
- (71) Sułek BarbaraAU - Kobieliusz, MarcinAU - Barzowska, AgataAU - Dąbrowski, Janusz M.TI - Photodynamic Inactivation of Bacteria with Porphyrin Derivatives: Effect of Charge, Lipophilicity, ROS Generation, and Cellular Uptake on Their Biological Activity, A.-P. No Title. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21228716>.
- (72) Miyazawa, T. Lipid Hydroperoxides in Nutrition, Health, and Diseases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2021**, *97* (4), 161–196. <https://doi.org/10.2183/pjab.97.010>.
- (73) Luz, A. F. S.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Translating Phototherapeutic Indices from in Vitro to in Vivo Photodynamic Therapy with Bacteriochlorins. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50* (5), 451–459. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/lsm.22931>.
- (74) Dos Santos, A. F.; Inague, A.; Arini, G. S.; Terra, L. F.; Wailemann, R. A. M.; Pimentel, A. C.; Yoshinaga, M. Y.; Silva, R. R.; Severino, D.; de Almeida, D. R. Q.; Gomes, V. M.; Bruni-Cardoso, A.; Terra, W. R.; Miyamoto, S.; Baptista, M. S.; Labriola, L. Distinct Photo-Oxidation-Induced Cell Death Pathways Lead to Selective Killing of Human Breast Cancer Cells. *Cell Death Dis.* **2020**, *11* (12), 1070. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03275-2>.
- (75) Sakharov, D. V.; Elstak, E. D. R.; Chernyak, B.; Wirtz, K. W. A. Prolonged Lipid Oxidation after Photodynamic Treatment. Study with Oxidation-Sensitive Probe C11-BODIPY 581/591. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (5), 1255–1260. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.024>.
- (76) Shui, S.; Zhao, Z.; Wang, H.; Conrad, M.; Liu, G. Non-Enzymatic Lipid Peroxidation Initiated by Photodynamic Therapy Drives a Distinct Ferroptosis-like Cell Death Pathway. *Redox Biol.* **2021**, *45*, 102056. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102056>.
- (77) Tsikas, D. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples: Analytical and Biological Challenges. *Anal. Biochem.* **2017**, *524*, 13–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>.
- (78) Kükürt, A. Thiols: Role in Oxidative Stress-Related Disorders; Gelen, V., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2021; p Ch. 3. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96682>.
- (79) Saczko, J.; Kulbacka, J.; Chwiłkowska, A.; Lugowski, M.; Banaś, T. Levels of Lipid Peroxidation in A549 Cells after PDT in Vitro. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* **2004**, *49 Suppl 1*, 82–84.
- (80) Zheng, L.; Li, Z.; Wang, Z.; Shen, L.; Liu, J. The Oxidative Stress, Mitochondrial Pathway Apoptosis, and the Antagonistic Effects of Chrysophanol in SH-SY5Y Cells via DTPP-Induced Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2022**, 103062. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103062>.
- (81) Baba, S. P.; Bhatnagar, A. ROLE OF THIOLS IN OXIDATIVE STRESS. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 133–

139. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.005>.

- (82) Kessel, D.; Jeffers, R.; Fowlkes, J. B.; Cain, C. Effects of Sonodynamic and Photodynamic Treatment on Cellular Thiol Levels. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1996**, *32* (1), 103–106. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1011-1344\(95\)07196-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07196-2).
- (83) Grimm, S.; Mvondo, D.; Grune, T.; Breusing, N. The Outcome of 5-ALA-Mediated Photodynamic Treatment in Melanoma Cells Is Influenced by Vitamin C and Heme Oxygenase-1. *BioFactors* **2011**, *37* (1), 17–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biof.129>.
- (84) Doina, D.; Filip, A.; Ion, R.-M.; Clichici, S.; Decea, N.; Muresan, A. Oxidative Photodamage Induced by Photodynamic Therapy with Methoxyphenyl Porphyrin Derivatives in Tumour-Bearing Rats. *Folia Biol. (Praha)*. **2011**, *57*, 12–19.
- (85) Tsaytler, P. A.; C. O’Flaherty, M.; Sakharov, D. V; Krijgsveld, J.; Egmond, M. R. Immediate Protein Targets of Photodynamic Treatment in Carcinoma Cells. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (9), 3868–3878. <https://doi.org/10.1021/pr800189q>.