

Gonçalo Sousa Brites

TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM A  
QUIMIOTERAPIA:  
uma opção no osteossarcoma

Setembro de 2016





Capa: Imagem da linha celular humana de osteossarcoma (MNNG-HOS) após tratamento com doxorubicina e coloração com a técnica de May-Grünwald Giemsa, com uma ampliação de 400x



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

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



# AGRADECIMENTOS

O trabalho experimental de investigação que conduziu a esta tese resulta do empenho de uma equipa multidisciplinar, com contributos fundamentais que não podem deixar de ser destacados. Por essa razão muitas foram as pessoas que, das mais variadas formas inspiraram, colaboraram, apoiaram, ensinaram e contribuíram direta e indiretamente para este trabalho. Assim gostaria de expressar os meus sinceros e especiais agradecimentos a algumas delas.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Instituto de Biofísica, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, devo a orientação desta Tese, o apoio, o incentivo na procura de colaborações, a disponibilidade, a dedicação e o empenho diários. Agradeço pelas críticas e pelos conselhos na revisão do manuscrito e, em especial, pelo apoio incondicional, pela partilha de conhecimento e de experiência científica, pelos ensinamentos, pela amizade, pela confiança e pelo exemplo sólido de rigor, exigência e conhecimento. Obrigado por me ter aceite na Unidade de Biofísica e por me estimular para a investigação.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, devo a orientação desta Tese, o apoio, e agradeço disponibilidade para ter acedido a ser o meu Orientador Interno, pelo empenho e incentivo pela área de investigação.

À Doutora Mafalda Laranjo, pelo seu apoio, incentivo e disponibilidade permanentes muitas em vezes em detrimento próprio, pelas críticas, correções, ensinamentos, pela amizade, rigor, pela partilha de conhecimento científico, pelos sermões, pela força e pela confiança em mim depositada desde o primeiro dia de trabalho na Unidade de Biofísica. Espero poder continuar a trabalhar com ela.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar de Biofísica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço pela disponibilidade e empenho que colocou neste trabalho. Agradeço a partilha de conhecimentos. Pela sua frontalidade, franqueza, estima e apoio.

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

À Doutora Ana Cristina Gonçalves agradeço a sua disponibilidade nos estudos de citometria de fluxo e pela análise de citomorfologia e na interpretação dos mesmos.

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

À Doutora Maria João Carvalho pela amizade e pela disponibilidade na revisão e leitura de partes do manuscrito.

Ao Doutor Fernando Mendes pela constante boa disposição e descontração para alegrar toda a gente e os seus conselhos ao nível científico, profissional e pessoal

À Doutora Ana Brito aos Mestres Salomé Pires, Ana Catarina Mamede, Cátia Domingues, Ricardo Teixeira, João Encarnação, Telmo Gonçalves, Tiago Sales, Tânia Costa, e Sara pelo exemplo de alegria e de sucesso no trabalho laboratorial.

A todos os colegas de mestrado e licenciatura do Instituto de Biofísica, que ao longo destes anos têm passado pelo instituto, exemplos de alegria e descontração no trabalho, que de alguma forma contribuíram para a concretização desta obra, muito em especial à Beatriz, Inês, Nuno, Rafael, Rita, Pedro, João pelo companheirismo do dia a dia no laboratório, pelas suas ajudas nas experiências e partilha de conhecimentos laboratoriais.

A todos os que de algum modo contribuíram para a presente dissertação e que não foram especificamente designados, mas que nem por isso foram esquecidos.

Por último, aos meus pais, irmão, avós, tios e primos por todos os valores que me transmitiram, o amor e carinho que me deram apesar de estar muitas vezes ausente. Um obrigado por todo esforço que fazem para que eu possa ter um bom futuro. Uma atenção especial à minha avó que apesar de não estar presente me incentiva a investigar esta terrível doença.

À minha namorada Raquel pelo apoio incondicional, pela dedicação, pelo estímulo e pela sensatez com que sempre me ajudou, por todo amor. E que apesar de eu não estar sempre presente, o companheirismo e o encorajamento foram constantes, por ser uma pessoa fantástica e espero que possa passar muitos e bons momentos com ela.



# **TRABALHOS APRESENTADOS NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO**

## **Trabalhos apresentados na forma de Comunicação Oral**

### **1. "Avaliação da resposta citotóxica da combinação da terapia fotodinâmica com doxorubicina, cisplatina e metotrexato em osteossarcoma"**

Brites G., Serambeque B., Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Serra A C., Pineiro M., Abrantes M., Casalta-Lopes J., Tralhão J.G., Rocha-Gonçalves A.M., Priolli D.G., Botelho M.F, Castro-Sousa, F.

XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia

3 a 5 de Março de 2016, Hotel Eurostars Oasis Plaza – Figueira da Foz

Autor apresentador: Brites G.

### **2. "Evaluation of the cytotoxic response of photodynamic therapy in combination with doxorubicin and methotrexate in osteosarcoma"**

Serambeque B, Brites G, Laranjo M, Chohfi de Miguel G, Serra A, Pineiro M, Abrantes M, Casalta-Lopes J, Rocha-Gonçalves AM, AC Gonçalves, AB Sarmento-Ribeiro, Priolli DG, Botelho MF

5º Congresso do CIMAGO

27 e 28 de Janeiro de 2016, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – Coimbra

### **3. "Evaluation of the cytotoxic response of photodynamic therapy in combination with doxorubicin, cisplatin, methotrexate and ifosfamide in osteosarcoma cell line"**

Brites G., Laranjo M., Serambeque B., Chohfi de Miguel G., Serra A. C., Piñeiro M., Abrantes M., Casalta-Lopes J., Rocha-Gonçalves A.M., Priolli D.G, Botelho M.F.

Tenth YES (Young European Scientist) Meeting

18 a 20 de Setembro de 2015, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Porto

Autor apresentador: Brites G.

## **Trabalhos apresentados em painel**

### **1. “Synergistic effect of photodynamic therapy in combination with Chemotherapy: an option in osteosarcoma”**

Brites G., Serambeque B., Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Almeida, N., Caetano Oliveira R., Serra A. C., Pineiro M., Abrantes A. M., Casalta-Lopes J., Rocha-Gonçalves A.M., AC Gonçalves, AB Sarmiento-Ribeiro, Priolli D.G, Botelho M.F.

Eleventh YES – Young European Scientist - Meeting

15 a 18 de Setembro de 2016, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Porto

Autor apresentador: Brites G. (Trabalho aceite para apresentação)

### **2. “Combination of photodynamic therapy with doxorubicin in osteosarcoma: cell death and the role of oxidative stress”**

Serambeque B., Brites G, Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Serra A. C., Pineiro M., Abrantes M.,Casalta-Lopes J., Rocha-Gonçalves A.M., AC Gonçalves, AB SarmientoRibeiro, Priolli D.G., Botelho M.F.

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

9 a 12 de Julho de 2016, Manchester, Inglaterra

### **3. “Photodynamic therapy in combination with doxorubicin and methotrexate as an option in osteosarcoma”**

Brites G, Serambeque B., Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Serra A. C., Pineiro M., Abrantes M.,Casalta-Lopes J., Rocha-Gonçalves A.M., Priolli D.G., Botelho M.F.

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

9 a 12 de Julho de 2016, Manchester, Inglaterra

### **4. "Synergistic effect of photodynamic therapy in combination with doxorubicin in osteosarcoma”**

Serambeque B., Brites G., Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Serra A. C., Pineiro M., Abrantes A. M., Casalta-Lopes J., Rocha-Gonçalves A.M., AC Gonçalves, AB Sarmiento-Ribeiro, Priolli D.G., Botelho M.F,

2nd International ASPIC Congress

28 e 29 de Abril de 2016, IPO Porto – Porto

**5. "Photodynamic therapy in combination with doxorubicin in osteosarcoma: Preliminary in vivo studies"**

Brites, G., Laranjo, M., Serambeque, B., Chohfi de Miguel, G., Serra, A., Pineiro, M., Abrantes, M., Rocha-Gonçalves, A., Priolli, D., Botelho M.F,

2nd International ASPIC Congress

28 e 29 de Abril de 2016, IPO Porto – Porto

Autor apresentador: Brites G.

**Artigos publicados sob a forma de resumo em revistas com arbitragem científica**

**1. "Combination of photodynamic therapy with doxorubicin in osteosarcoma: cell death and the role of oxidative stress"**

Serambeque B., Brites G, Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Serra A. C., Pineiro M., Abrantes M., Casalta-Lopes J., Rocha-Gonçalves A.M., AC Gonçalves, AB SarmentoRibeiro, Priolli D.G., Botelho M.F.

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

**2. "Photodynamic therapy in combination with doxorubicin and methotrexate as an option in osteosarcoma"**

Brites G, Serambeque B., Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Serra A. C., Pineiro M., Abrantes M., Casalta-Lopes J., Rocha-Gonçalves A.M., Priolli D.G., Botelho M.F.

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

**3. "Avaliação da resposta citotóxica da combinação da terapia fotodinâmica com doxorubicina, cisplatina e metotrexato em osteossarcoma"**

Brites G., Serambeque B., Laranjo M., Chohfi de Miguel G., Serra A C., Pineiro M., Abrantes M., Casalta-Lopes J., Tralhão J.G., Rocha-Gonçalves A.M., Priolli D.G., Botelho M.F, Castro-Sousa, F.

Revista Portuguesa de Cirurgia, Suplemento Março 2016, página 125.

#### **4. “Evaluation of the cytotoxic response of photodynamic therapy in combination with doxorubicin and methotrexate in osteosarcoma”**

Serambeque B, Brites G, Laranjo M, Chohfi de Miguel G, Serra A, Pineiro M, Abrantes M, Casalta-Lopes J, Rocha-Gonçalves AM, AC Gonçalves, AB Sarmiento-Ribeiro, Priolli DG, Botelho MF

Revista Portuguesa de Pneumologia, Março 2016, Volume 22, especial congresso 2, página 2.

### **Prémios**

**Bolsa Liga Portuguesa Contra o Cancro/ANA 2015- LPCC/ANA 2015-** para cancros pediátricos com o título: “Terapia Fotodinâmica associada à quimioterapia como uma opção no osteossarcoma “

# RESUMO

O osteossarcoma é o tipo de sarcoma mais comum e corresponde acerca de 45% de todos os cancros ósseos. A toxicidade dos fármacos antineoplásicos convencionalmente utilizados no seu tratamento é muitas vezes limitante da dose aplicada ou até mesmo a razão para a interrupção da quimioterapia, sendo por isso emergente a necessidade de novas terapias e estratégias para o combate do osteossarcoma, particularmente os casos de doença irressecável.

Este projeto surge no sentido de responder a esta necessidade, já abordada em trabalhos prévios a esta dissertação, de ampliar a utilização da terapia fotodinâmica em oncologia com a combinação com outras estratégias terapêuticas como a quimioterapia. Neste trabalho, pretendeu-se estudar a terapia fotodinâmica com base no fotossensibilizador BBr2HPP, tendo em conta os conhecimentos já adquiridos por este grupo de investigação nesta área.

Relativamente aos estudos *in vitro*, o ensaio MTT permitiu verificar o efeito citotóxico que três dos fármacos mais usados de quimioterapia têm na inibição da proliferação celular tendo-se verificado que são dependentes da concentração em que estão presentes. A linha tumoral MNNG-HOS, demonstrou ser sensível ao efeito dos três fármacos quimioterapêuticos estudados. Sabendo que determinados fotossensibilizadores exibem uma elevada seletividade para as células tumorais, estudou-se também o efeito da terapia de combinação numa linha não tumoral, a linha humana de fibroblastos HFF1, não se verificando diferenças estatisticamente significativas.

A associação da terapia fotodinâmica com a quimioterapia diminuiu significativamente a atividade metabólica das células tumorais, bem como a viabilidade celular, de forma dependente da concentração de fotossensibilizador e da concentração e do tempo de administração, levando a um efeito sinérgico em combinação com a doxorrubicina e a cisplatina.

Demonstrou-se que o decréscimo da atividade metabólica, nas células submetidas à combinação entre a PDT e a doxorrubicina, está relacionado com os mecanismos de morte celular, a apoptose e a necrose, associados a disfunção mitocondrial, a produção intracelular de espécies reativas de oxigénio, e a danos no DNA.

Paralelamente, nos estudos *in vivo* verificou-se que a taxa de crescimento tumoral foi inferior quando os ratinhos foram submetidos à combinação entre a PDT e a doxorubicina. Foi possível também verificar o sucesso da terapia de combinação sem a penalização do bem-estar dos ratinhos, reforçando mais uma vez o potencial terapêutico. Os estudos de histologia vieram confirmar os resultados promissores obtidos *in vitro.*, os quais mostraram haver uma percentagem necrose superior na terapia fotodinâmica e na terapia combinada do que na terapia apenas com doxorubicina.

Assim, foi possível com este projeto verificar que a terapia fotodinâmica em combinação com a quimioterapia constitui uma modalidade terapêutica com efeito sinérgico que poderá fazer diferença no tratamento do osteossarcoma.

**Palavras Chave:** Osteossarcoma, Quimioterapia, Terapia fotodinâmica, Terapia de combinação, Sinergia

# ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common type of sarcoma and corresponds to about 45% of all bone cancers. The toxicity of antineoplastic drugs conventionally used in their treatment is often limiting or even reason for the interruption of chemotherapy, therefore there is need for new therapies and strategies to fight osteosarcoma, particularly cases of unresectable disease.

This project arises in order to respond to this need, already addressed in studies previous to this dissertation, to expand the use of photodynamic therapy in oncology and to combine it with other therapeutic approaches, such as chemotherapy. In this work, we intended to study photodynamic therapy based on BBr2HPP photosensitizer, also taking into account the knowledge already acquired in this area by the research group.

Regarding *in vitro* studies, the MTT assay has shown the cytotoxicity of three of the most commonly used chemotherapy drugs verifying that inhibition of metabolic activity is dependent on the concentration. The tumor cell line MNNG-HOS, was sensitive to the effect of the three chemotherapeutic drugs studied. Knowing that certain photosensitisers exhibit high selectivity for tumor cells, it was also studied whether the combination therapy would affect non-tumor cells, the HFF1 human fibroblasts, and there were no statistically significant differences.

The association of photodynamic therapy to chemotherapy significantly decreased the metabolic activity of the tumor cells as well as cell viability, dependently on the concentration of photosensitizer and the concentration and time of administration of the chemotherapy drug, leading to a synergic effect in combination with doxorubicin and cisplatin.

It has been shown that the decrease in metabolic activity in cells subjected to the combination of PDT and doxorubicin, is related to the mechanisms of cell death, apoptosis and necrosis associated with mitochondrial dysfunction, intracellular production of reactive oxygen species, and DNA damage.

Similarly, *in vivo* studies showed that tumor growth was lower when mice were subjected to the combination of PDT and doxorubicin. It was also possible to verify the success of the combination therapy without compromising mice wellbeing, reinforcing the therapeutic potential. The histology studies have confirmed the promising results obtained *in vitro*, having a percentage of higher necrosis in photodynamic therapy and combination therapy than in therapy only with doxorubicin.

With this project it was possible to verify that photodynamic therapy in combination with chemotherapy is a treatment modality with synergistic effect that may make a difference in the treatment of osteosarcoma.

**Keywords:** osteosarcoma, chemotherapy, photodynamic therapy, combination therapy, Sinergy



# ÍNDICE

Agradecimentos.....	VII
Trabalhos apresentados no âmbito desta dissertação.....	IX
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XV
Índice.....	XVII
Introdução .....	21
osteossarcoma .....	23
Opções Terapêuticas no Osteossarcoma .....	28
Terapia Fotodinâmica (PDT).....	34
As moléculas fotossensibilizadoras .....	36
Importância das fontes de iluminação .....	38
Importância da presença de oxigénio.....	38
Mecanismos de citotoxicidade da PDT.....	39
Efeito da PDT nos vasos sanguíneos .....	41
Inflamação e Imunidade .....	41
PDT como opção no osteossarcoma .....	42
Combinação da PDT com outras estratégias terapêuticas.....	46
Objetivos.....	49
Materiais e Métodos.....	53
Estudos <i>in vitro</i> .....	55
Culturas celulares .....	55
Estudos de citotoxicidade .....	57
Quimioterapia.....	58
Terapia combinada: quimioterapia associada à terapia fotodinâmica.....	58

Determinação da atividade metabólica pelo ensaio MTT .....	60
Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB.....	61
Citometria de fluxo .....	62
Avaliação dos tipos de morte celular .....	63
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial .....	64
Avaliação do ciclo celular .....	65
Avaliação da produção intracelular de peróxidos .....	66
Avaliação do glutatião reduzido.....	66
Avaliação do anião superóxido .....	67
Microscopia ótica e morfologia celular .....	67
Avaliação da atividade da superóxido dismutase .....	68
Ensaio de Cometas .....	69
Estudos <i>in vivo</i> .....	70
Tratamentos.....	72
Análise histopatológica .....	73
Análise estatística.....	74
Resultados.....	75
Estudos <i>in vitro</i> .....	77
Atividade metabólica em resposta à doxorrubicina, ao metotrexato e à cisplatina .....	77
Atividade metabólica em resposta à terapia combinada .....	80
Avaliação da viabilidade celular .....	86
Tipos de morte celular .....	89
Ciclo celular .....	91
Potencial de membrana mitocondrial.....	92
Produção intracelular de peróxidos .....	93
Glutatião reduzido.....	94
Anião superóxido.....	94

Superóxido dismutase.....	95
Morfologia celular.....	96
Genotoxicidade.....	98
Estudos in vivo.....	99
Desenvolvimento do modelo animal ortotópico de osteossarcoma.....	99
Avaliação da taxa de crescimento tumoral.....	100
Análise Histopatológica.....	103
Discussão.....	107
Conclusão e perspectivas futuras.....	123
Bibliografia.....	129
Símbolos, abreviaturas e fórmulas.....	143
Anexo I.....	147



# **INTRODUÇÃO**



## OSTEOSSARCOMA

O cancro constitui uma das principais causas de morte no mundo. Inclui uma diversidade de doenças que têm em comum uma divisão celular descontrolada, capaz de invadir os tecidos adjacentes e à distância, consequência de alterações nos mecanismos de proliferação e de regulação celulares (Figura 1) (Laranjo, 2014).

Muitos cancros formam tumores sólidos, malignos, com capacidade de invadir os tecidos adjacentes. As células cancerígenas distinguem-se das células normais, entre outros fatores, por ignorarem os sinais que limitam a proliferação e por influenciarem o microambiente tumoral, incluindo as células normais e os vasos sanguíneos que alimentam o tumor. Além de influenciar a angiogénese, as células tumorais apresentam também mecanismos de escape ao sistema imunitário, que facilitam a sua proliferação e que permitem a invasão e a disseminação para outros locais do organismo (NIH- National Cancer Institute, 2015).

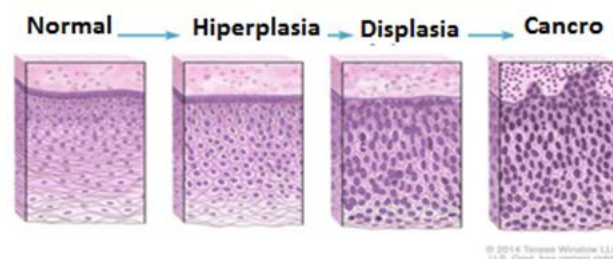


Figura 1- Origem do cancro. As células normais podem tornar-se cancerígenas. Na sua génese as células cancerígenas passam por alterações reconhecidas como hiperplasia e displasia. A hiperplasia caracteriza-se pelo aumento no número de células num órgão ou tecido com manutenção da sua morfologia. Na displasia verifica-se alteração na morfologia ou na constituição das células. Ambas as alterações podem evoluir para a formação de cancro. (Adaptado de NIH, 2015)

O progresso na investigação médica fundamental tem permitido uma melhor compreensão do cancro e a conceção de novas gerações de fármacos, dirigidos a alvos moleculares e o surgimento de novas terapêuticas emergentes, cada vez mais orientadas ao tumor, deu origem a um novo conceito, a medicina personalizada (Laranjo, 2014). Tanto a medicina como a indústria farmacêutica têm demonstrado importante interesse em diversas

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

áreas, nomeadamente a oncologia, que se encontra numa fase de crescimento exponencial e de constante mudança (Figura 2). O foco é a melhoria da qualidade de vida dos doentes através de abordagens multidisciplinares que combinam a eficácia da cirurgia, da radioterapia, e dos fármacos antitumorais. As combinações terapêuticas podem atuar especificamente na célula tumoral, no microambiente e no sistema imunitário.

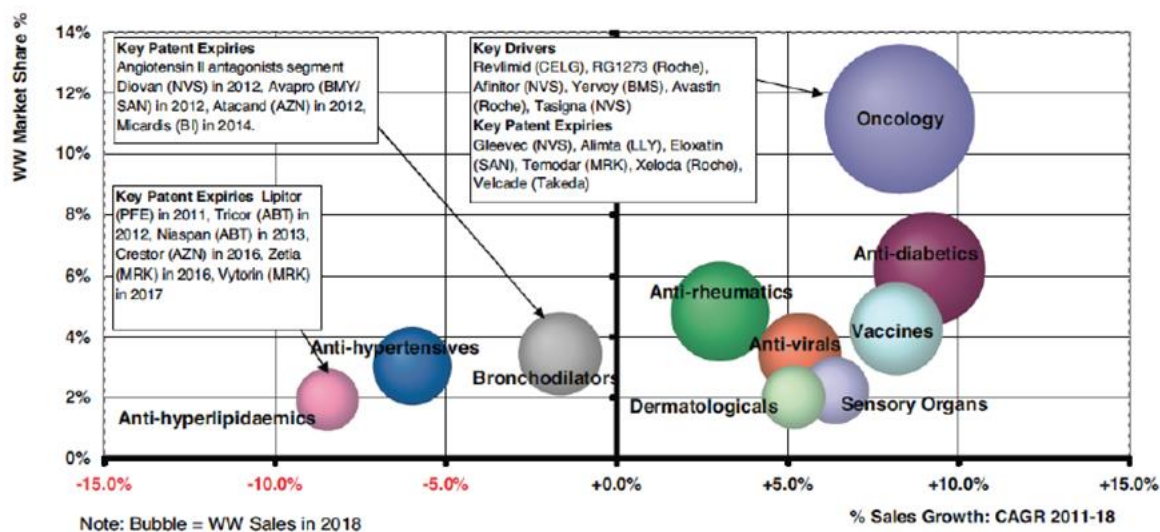


Figura 2- Previsão das áreas terapêuticas com mais vendas na indústria farmacêutica em 2018 (Adaptado de Evaluate Pharma 2012).

Existem vários tipos de cancro, usualmente classificados de acordo com o órgão ou com o tecido onde o cancro teve origem, nomeadamente, os carcinomas, os sarcomas, as leucemias, os linfomas, os mielomas e os tumores do sistema nervoso central (Kasper, 2015). Os sarcomas, neoplasias pouco frequentes e correspondem a cerca de 1% de todos os cancros, podem ter origem no osso e nos tecidos moles, incluindo o músculo, a gordura, os vasos sanguíneos, os gânglios linfáticos e os tecidos fibrosos adjacentes como os tendões e os ligamentos (Kasper, 2015; Katzung, Masters e Trevor, 2014).

O osteossarcoma é o sarcoma músculo-esquelético mais comum e corresponde a cerca de 45% de todos os sarcomas do osso (Kasper, 2015). Depois do mieloma e do linfoma, é o tumor maligno primário mais comum do tecido ósseo (Kumar, Abbas e Aster, 2015). É um tumor ósseo maligno, de comportamento clínico agressivo, mais comum em crianças e em adolescentes, que representa 5% de todos os cancros da infância (Isakoff *et al.*, 2015; Mirabello *et al.*, 2009). Em adultos está relacionado com a doença de Paget, com a síndrome de Li-



Fraumeni, com o retinoblastoma hereditário e com a síndrome de Rothmund-Thomson (Janeway e Walkley, 2010). Este sarcoma do osso deriva dos osteoblastos e dos seus precursores, as células mesenquimatosas primitivas formadoras de osso (Moriarity *et al.*, 2015). É considerado uma neoplasia rara e apresenta uma grande heterogeneidade (Jaffe, Bruland e Bielack, 2009; Kansara *et al.*, 2014).

Relativamente à incidência, é considerada uma doença órfã, tendo uma prevalência global de 0,2-3 por 100 000 habitantes por ano (Luetke *et al.*, 2014), com maior prevalência no sexo masculino (Kansara *et al.*, 2014; Mirabello *et al.*, 2009).

Este tumor é geneticamente complexo, sendo ainda pouco claro como é que a alteração de certos mecanismos pode provocar o seu desenvolvimento e progressão (Gorlick e Khanna, 2010). Está associado a uma grande instabilidade genómica, sendo difícil a identificação dos genes responsáveis pelo seu aparecimento (Moriarity *et al.*, 2015). Existem estudos que indicam que este cancro pode estar associado a erros mitóticos nos genes envolvidos no controlo, no crescimento e na maturação óssea. Como em muitos cancros, os osteossarcomas esporádicos também exibem frequentemente mutações no *TP53* e em outros genes que regulam o ciclo celular, como as ciclinas, as cinases dependentes de ciclinas e os inibidores de cinases (Majó, Cubedo e Pardo, 2010).

Do ponto de vista histológico, o osteossarcoma é caracterizado pela presença de células fusiformes e pela formação de osteoide, uma abundante matriz mineralizada e amorfa, sem as características de um osso maduro (Kumar, Abbas e Aster, 2015; Moriarity *et al.*, 2015; Oliveira, 2011). Macroscopicamente são tumores de tonalidade cinza-esbranquiçada e de aparência arenosa, exibindo frequentemente hemorragia e degenerescência quística. Estes tumores usualmente destroem o córtex circundante, e apresentam-se como massas de tecido mole. As células tumorais variam em tamanho e em formato, apresentando frequentemente grandes núcleos hipercromáticos e figuras mitóticas (Kumar, Abbas e Aster, 2015) (Figura 3).

De um modo geral, o osteossarcoma pode aparecer em qualquer osso, no entanto, ocorre principalmente nas extremidades dos ossos longos dos membros, especialmente no fémur, na tíbia e o úmero (Friebele *et al.*, 2015; Gill *et al.*, 2013). Os locais menos comuns, cerca de 10% dos casos, são o esqueleto axial, corresponde à coluna vertebral, ao crânio, à mandíbula e à pélvis (Kansara *et al.*, 2014). Nas idades mais precoces surge mais vezes na metáfise dos ossos longos, na tíbia proximal e no úmero proximal (Mirabello *et al.*, 2009), correspondentes a locais de maior crescimento ósseo (Kumar, Abbas e Aster, 2015).

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Segundo a classificação da *World Health Organization* (WHO), os diferentes tipos de osteossarcoma são classificados de acordo com a sua localização anatômica (Beckingsale e Shaw, 2015). O osteossarcoma central de alto grau é o mais comum, em cerca de 80% de todos os osteossarcomas, sendo subdividido com base nas características celulares predominantes (osteoblásticas, condroblásticas e fibroblásticas) (Carrle e Bielack, 2006; Luetke *et al.*, 2014). Os restantes 20% correspondem aos de baixo grau (Bacci *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2012). Existem também os osteossarcomas secundários que ocorrem em adultos idosos, mais frequentemente no contexto da doença de Paget ou de exposição prévia à radiação. Os últimos são bastante agressivos, não respondem bem às terapêuticas e são normalmente fatais (Kumar, Abbas e Aster, 2015).

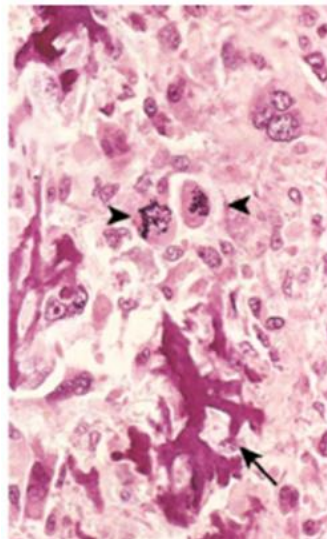


Figura 3- Aparência histológica, com padrão grosseiro e emaranhado de tecido ósseo neoplásico produzido por células tumorais anaplásicas. Podem-se observar figuras mitóticas extremamente aberrantes (Adaptado de: Abul K. ABBAS 2015).

Segundo a classificação da *World Health Organization* (WHO), os diferentes tipos de osteossarcoma são classificados de acordo com a sua localização anatômica (Beckingsale e Shaw, 2015). O osteossarcoma central de alto grau é o mais comum, em cerca de 80% de todos os osteossarcomas, sendo subdividido com base nas características celulares predominantes (osteoblásticas, condroblásticas e fibroblásticas) (Carrle e Bielack, 2006; Luetke *et al.*, 2014). Os restantes 20% correspondem aos de baixo grau (Bacci *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2012). Existem também os osteossarcomas secundários que ocorrem em adultos idosos, mais frequentemente no contexto da doença de Paget ou de exposição prévia à radiação. Os

últimos são bastante agressivos, não respondem bem às terapêuticas e são normalmente fatais (Kumar, Abbas e Aster, 2015).

Os principais sintomas incluem tumefação local, dor intensa e limitação funcional (Isakoff *et al.*, 2015; Lukschal *et al.*, 2012). O diagnóstico engloba estudos imagiológicos, análise bioquímica e posterior confirmação por biópsia (Jaffe, Bruland e Bielack, 2009). Aproximadamente 2/3 dos doentes que apresentam um osteossarcoma localizado esperam ser curados com a cirurgia e com a quimioterapia convencional. Porém, na maioria das situações, o diagnóstico é realizado numa fase tardia onde os doentes já apresentam evidências macroscópicas de doença metastática. No caso da doença metastática, mais de 85% das metástases ocorrem nos pulmões, sendo o osso, o local mais frequente para metástases à distância (Isakoff *et al.*, 2015), podendo estas surgir, também, nos gânglios linfáticos (Friebele *et al.*, 2015; Luetke *et al.*, 2014)(Figura 4).

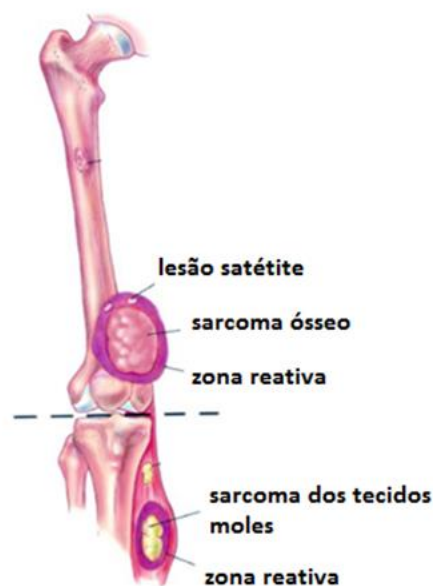


Figura 4- Padrão de crescimento do osteossarcoma. O osteossarcoma cresce radialmente e comprime os tecidos moles adjacentes, formando a zona reativa. Esta zona contém ainda extensões microscópicas da massa tumoral principal designadas por satélites (Adaptado de Wittig *et al.* 2002).

### Opções Terapêuticas no Osteossarcoma

O tratamento destes tumores altamente agressivos é complexo e requer um planeamento cuidadoso e o uso de várias modalidades terapêuticas. Durante os últimos 40 anos o tratamento do osteossarcoma tem evoluído (Isakoff *et al.*, 2015), maioritariamente devido à introdução de abordagens multidisciplinares (Jaffe, Bruland e Bielack, 2009). As opções terapêuticas atuais consistem na cirurgia, na quimioterapia (neoadjuvante e adjuvante) e na radioterapia (Ando *et al.*, 2013; Isakoff *et al.*, 2015). De facto, a cirurgia com a ressecção do tumor primário e das metástases detetáveis é uma das opções mais utilizadas e tem como objetivo a remoção do tumor com margens de segurança, preservando ao máximo os tecidos envolventes e a sua função, o que nem sempre é possível (Carrle e Bielack, 2006; Luetke *et al.*, 2014; Wang, Wan e Liao, 2015). No entanto, a cirurgia por si só permite a sobrevivência ao fim de 5 anos e é apenas possível em 15 a 17% dos doentes. Em alguns casos devido à localização anatómica do osso afetado a cirurgia não é possível. Nestes casos, existe uma necessidade crescente de novos tratamentos, possibilitando não só uma melhor estratégia terapêutica, mas também possibilitar uma melhor qualidade de vida aos doentes com osteossarcoma (Wang, Wan e Liao, 2015).

Na verdade, a grande revolução na terapêutica do osteossarcoma surgiu com a introdução da quimioterapia adjuvante (Friebele *et al.*, 2015), tendo-se obtido taxas de sobrevivência ao fim de 5 anos na ordem dos 50%. Foram estudados vários fármacos, como a vincristina e a bleomicina, no entanto, devido ao seu fraco efeito acabaram por ser descontinuados. Assim, outros fármacos como a cisplatina e a ifosfamida foram adicionados à doxorubicina e ao metotrexato, melhorando o prognóstico dos doentes com osteossarcoma não metastático. Outro dos avanços consistiu na realização da quimioterapia neoadjuvante, que resultou na remissão do tumor durante cinco anos (Friebele *et al.*, 2015). Atualmente, os regimes de quimioterapia no osteossarcoma baseiam-se sobretudo em quatro fármacos: o metotrexato, em regime de alta dose, a doxorubicina, a cisplatina e a ifosfamida (Friebele *et al.*, 2015).

O metotrexato é um antimetabolito antineoplásico que inibe o metabolismo do ácido fólico. Os antimetabolitos mimetizam as bases de purina ou de pirimidina e bloqueiam a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA). Evitam que se incorporem no DNA durante o ciclo celular, parando o seu desenvolvimento e divisão normal. Estudos com este fármaco

demonstraram que o metotrexato inibe a diidrofolato redutase, enzima responsável pela conversão de ácido fólico em tetrahidrofólico. Assim, a sua atividade antitumoral é o resultado da inibição da síntese de DNA e da replicação celular. Outros estudos indicaram que o metotrexato não atravessa a barreira hematoencefálica (Gilman e Goodman, 2005). O metotrexato foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como medicamento oncológico em 1953. Contudo, é também utilizado para o tratamento de outras doenças, como doenças autoimunes, nomeadamente a artrite reumatoide e certas doenças dermatológicas, como importante agente imunossupressor (Gilman e Goodman, 2005). Relativamente à sua farmacocinética, o metotrexato apresenta uma biodisponibilidade entre 17 e 90% e a semivida plasmática varia de 3 a 15 horas, com metabolismo e excreção por via hepatobiliar. A administração pode ser oral, endovenosa, intramuscular, subcutânea ou intralesional. No tratamento do osteossarcoma o metotrexato é um dos fármacos mais utilizados, em associação com outros fármacos, em regime de altas doses e num curto período de tempo (Ma *et al.*, 2015; Rowe e Chugh, 2011). Em regime de baixas doses os estudos existentes são ainda limitados (Nataraj *et al.*, 2015). No entanto, é importante salientar que nem sempre foi consensual a sua utilização. A leucovorina é usada como um fármaco de resgate das células normais à dose excessiva de metotrexato na terapia de altas doses (Katzung, Masters e Trevor, 2014). Deve-se ter em conta que o uso do metotrexato está associado a vários efeitos adversos e envolve uma monitorização que não é facilmente acessível em todas as partes do Mundo. Os mesmos autores indicam ainda que existem poucos dados quando é usado sem ser no regime de altas doses (Nataraj *et al.*, 2015).

Outro dos fármacos mais utilizados em osteossarcoma é a doxorrubicina, que é um antibiótico antraciclínico amplamente usado no tratamento de vários tipos de cancro (Luetke *et al.*, 2014). Começou a ser usado em 1974 (Costa, Cristina; Magalhães, Helena; Félix, Rui; Costa, Andreia; Cordeiro, [s.d.]), contudo, existem vários efeitos secundários associados ao seu uso, sendo a cardiotoxicidade o principal (Adão *et al.*, 2013). Existem dois mecanismos pelos quais a doxorrubicina atua nas células cancerígenas: através da sua intercalação no DNA e interrupção da sua reparação mediada pela topoisomerase II ou através da formação de radicais livres com consequentes danos nas membranas celulares, DNA e proteínas (Thorn *et al.*, 2012). As antraciclinas, em virtude do seu grupo quinona, geram radicais livres, tanto em tecidos normais, como em tecidos malignos. As antraciclinas reagem com a redutase do citocromo P450 na presença de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

(NADPH) para formar intermediários de radicais semiquinonas, os quais, por sua vez, podem reagir com o oxigênio para produzir radicais de aniões superóxido. Estes podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilo (OH<sup>•</sup>), que lesam o DNA através da oxidação das suas bases. A produção de radicais livres é significativamente estimulada pela interação da doxorubicina com ferro. Além disso, as reações de transferência de elétrons intramoleculares dos intermediários semiquinonas resultam na geração de peróxidos lipídicos, de óxido nítrico e de outros radicais destrutivos. Deste modo, acredita-se que as defesas enzimáticas, como a superóxido dismutase e a catalase, desempenhem um importante papel na proteção das células contra a toxicidade das antraciclina, podendo estas defesas ser aumentadas por antioxidantes exógenos que protegem contra a cardiotoxicidade. As antraciclina podem também interagir com as membranas celulares, produzindo peroxidação lipídica e alterando as suas funções, o que pode representar um importante papel tanto nas ações antitumorais desses fármacos, como na cardiotoxicidade por eles causada. A exposição das células a estes fármacos resulta sobretudo em apoptose (Gilman e Goodman, 2005; Katzung, Masters e Trevor, 2014). Relativamente à farmacodinâmica, a doxorubicina é oxidada com formação de semiquinona, um metabolito instável que é convertido novamente em doxorubicina, num processo que liberta espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas espécies reativas de oxigênio podem gerar danos membranares e peroxidação lipídica, danos no DNA, stresse oxidativo e ativação de vias de apoptose. Existem genes que podem modular estas vias, resultando em reações de oxidação (NADH desidrogenase, óxido nítrico síntase e xantina oxidase) e eliminação de radicais livres, como a glutatona peroxidase, a catálase e superóxido dismutase. Em alternativa, a doxorubicina pode entrar no núcleo e alterar a topoisomerase-II, o que resulta também em morte celular e em danos no DNA (Thorn *et al.*, 2012).

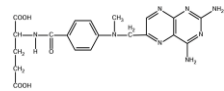
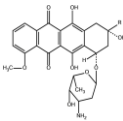
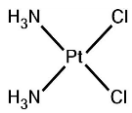
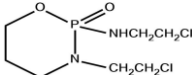
A cisplatina é um derivado da platina muito usado na prática clínica (Katzung, Masters e Trevor, 2014). É um complexo metálico inorgânico, um antineoplásico da classe dos agentes alquilantes. A cisplatina foi identificada pela primeira vez como agente citotóxico em 1965 por Rosenberg e seus colaboradores (Gilman e Goodman, 2005). Também denominada a “penicilina do cancro”, foi inicialmente descoberta em consequência de investigações onde se observou que este complexo inibia a divisão e o crescimento da *Escherichia coli*. A cisplatina foi aprovada pela FDA para uso clínico em 1978, e continua a ser um dos agentes de quimioterapia mais eficazes, com um largo espectro de ação contra vários tipos de cancro (Han *et al.*, 2015). A cisplatina pode ser utilizada isoladamente ou em combinação com outros

citostáticos (INFARMED Cisplatina 2010). O seu mecanismo de ação baseia-se na sua ligação ao DNA, formando ligações cruzadas, o que determina a inibição da síntese e da função do DNA. Este fármaco também se pode ligar a proteínas, quer citoplasmáticas, quer nucleares, contribuindo para os seus efeitos citotóxicos e antitumorais (Compagnin *et al.*, 2010; Katzung, Masters e Trevor, 2014). Vários ensaios pré-clínicos e clínicos comprovaram a eficácia deste fármaco, no entanto, nem todos os tipos de tumores malignos respondem à cisplatina (Han *et al.*, 2015). Apesar de ser um agente anticancerígeno potente, a sua aplicação clínica é limitada devido aos vários efeitos secundários que lhe estão associados, tais como a nefrotoxicidade, a neurotoxicidade e a ototoxicidade (Compagnin *et al.* 2010). No osteossarcoma, a cisplatina é o segundo fármaco mais usado, incluído na maioria dos protocolos de tratamento (Carrle e Bielack, 2006). Existem inclusivamente estudos *in vitro* que combinam este fármaco com outras estratégias terapêuticas (Ali *et al.*, 2015; Crescenzi *et al.*, 2006).

Outros dos fármacos muito usados é a ifosfamida que é um agente quimioterapêutico quimicamente relacionado com as mostardas de azoto e um análogo sintético da ciclofosfamida. É um forte imunossupressor e agente alquilante, usado em vários regimes de quimioterapia. O mecanismo exato de ação ainda não foi bem determinado, estando ainda a ser alvo de estudos, mas pode ser semelhante ao de outros agentes alquilantes. Este fármaco requer biotransformação hepática por oxídases de função mista (sistema citocromo P450). Após a ativação, os metabolitos da ifosfamida ligam-se com estruturas moleculares intracelulares, incluindo os ácidos nucleicos. A ação citotóxica é principalmente resultante da alquilação do DNA através da ligação da guanina na posição N-7. A formação de ligações intra e intermoleculares no DNA resulta em morte celular. É usado em monoterapia e em combinação com a doxorrubicina e/ou a cisplatina. Está associado a uma boa resposta terapêutica com níveis de toxicidade inferiores aos outros fármacos, sem comprometer a sua eficácia (Rowe e Chugh, 2011; Zalupski *et al.*, 2004). Pode também ser usado em regime de alta dose no caso de recorrência de osteossarcoma (Sakamoto e Iwamoto, 2008). As baixas taxas de resposta observadas, a falta de um regime ideal de tratamento e os efeitos secundários existentes, são limitações ao uso destes fármacos nos doentes portadores de osteossarcoma. Vários estudos indicam também alguns problemas como a quimiorresistência, devido a várias modificações celulares (Han *et al.*, 2015)(Tabela 1).

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Tabela 1: Pannel resumo dos 4 citostáticos mais utilizados atualmente na quimioterapia para tratamento do osteossarcoma (Kasper, 2015; Katzung, Masters e Trevor, 2014)(INFARMED, 2010).

Nome do fármaco	Estrutura química	Mecanismo de ação	Indicação terapêutica	Efeito secundário Principal
<b>Metotrexato</b> ( <i>fármaco antifolato</i> )		inibe o metabolismo do ácido fólico	psoríase e artrite reumatoide	náusea; inflamação da boca; perda de apetite; inflamação e úlceras na boca e garganta; aumento das transaminases hepáticas
<b>Doxorrubicina</b> ( <i>Antibiótico Anticiclina antitumoral</i> )		atividade anti-mitótica e citotóxica: intercalação no DNA ; formação de radicais livres	carcinoma da mama, pulmão, bexiga, tireoide e ovário; sarcomas ósseos e dos tecidos moles; linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin; neuroblastoma; tumor de Wilms; leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloblástica aguda	cardiotoxicidade
<b>Cisplatina</b> ( <i>agente alquilante</i> )		ligação ao DNA por ligações cruzadas	tumor dos testículos, tumor do ovário, tumor da bexiga, tumor epitelial da cabeça e pescoço e cancro do pulmão, e cancro do colo do útero	nefrotoxicidade; neurotoxicidade; ototoxicidade
<b>Ifosfamida</b>		alquilação do DNA; formação de ligações intra e inter moleculares	tratamento de vários tumores	forte hematúria, associada a cistite hemorrágica. Leucopenia; alopecia, náusea, vômito e toxicidade do sistema nervoso central

A radioterapia é pouco usada neste tipo de cancro, uma vez que as células de osteossarcoma são altamente resistentes (Luetke *et al.*, 2014; Uluçkan *et al.*, 2015). No entanto, esta modalidade terapêutica pode ser utilizada em tratamento de tumores irrissecáveis ou como paliativo de metástases sintomáticas (Luetke *et al.*, 2014). Alguns estudos indicam que os citostáticos como a ifosfamida, a cisplatina e o metotrexato podem aumentar a radiosensibilidade (Luetke *et al.*, 2014).

Apesar dos avanços, existe ainda uma grande necessidade de investigação de modo a melhorar os regimes de tratamento e a resposta terapêutica (Luetke *et al.*, 2014). A sobrevivência dos doentes com doença metastática é baixa, com frequente aparecimento de novas metástases durante o seguimento, associado a taxas de recorrência elevadas (Friebele *et al.*, 2015). Assim, são necessários novos estudos e novas estratégias terapêuticas (Mirabello *et al.*, 2009; Uluçkan *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015). A cirurgia e a quimioterapia deverão continuar a ser a base da terapêutica, porém, o grande desafio permanecerá nos doentes com osteossarcoma em estado avançado e com prognóstico reservado (Kansara *et al.*, 2014). Desde 2001 que quatro grupos concordaram em colaborar de modo a possibilitar a realização de ensaios de uma forma mais rápida, constituindo o EURAMOS (*European and American osteossarcoma studies*), formado pelo *Children's Oncology Group (COG)*, *Cooperative*



*Osteosarcoma Study Group (COSS) of the German Society for Pediatric Oncology and Hematology (GPOH), European Osteosarcoma Intergroup (EOI) e pelo Scandinavian Sarcoma Group (SSG).* Este consórcio multidisciplinar tem como missão facilitar a investigação no osteossarcoma, identificar novas abordagens terapêuticas e desenvolver novas metodologias para o estadiamento, a patogenia e outros aspetos desta doença (Whelan et al., 2015).

A nova fronteira da investigação clínica no osteossarcoma é o uso de fármacos direcionados de modo a personalizar cada vez mais os tratamentos. A utilização de anticorpos monoclonais que se ligam a certas proteínas das células cancerígenas e limitam o seu crescimento ou determinam a morte celular tem sido bastante investigado. É exemplo o anticorpo contra o *insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R)* uma proteína envolvida nas vias de crescimento das células cancerígenas. Outros fármacos estudados na terapêutica do osteossarcoma são o sorafenib e o pazopanib, que influenciam a neoangiogénese, e os fármacos que têm como alvo o mTOR, como a temsirolimus e o everolimus. Estão em curso vários ensaios clínicos com fármacos imunomoduladores, como o *muramyl tripeptide* (também conhecido por MTP ou mifamurtide), com vista a facilitar o reconhecimento das células tumorais. Fármacos dirigidos aos osteoclastos, células típicas do tecido ósseo, também podem ter aplicação no tratamento do osteossarcoma. Os bisfosfonatos, como o pamidronato e o ácido zoledrónico, são um grupo de fármacos já utilizados no tratamento da osteoporose e de certos tipos de cancro com metastização óssea (Ferrari & Serra 2015).

Infelizmente, apesar de todo o progresso científico e médico, que inclui estratégias de intensificação de doses, a alteração dos tempos de tratamento (intervalos) e a introdução da quimioterapia combinada, o prognóstico não tem melhorado nos últimos 30 anos (Serra e Hattinger, 2016).

Shaik e os seus co-autores referem que o desenvolvimento de novas terapêuticas passa por um maior entendimento das bases moleculares e da tumorigénese do osteossarcoma e pela identificação de marcadores de prognóstico e de resposta à terapêutica. A identificação deste tipo de alvos e a sua monitorização permitirá a implementação de terapêuticas de combinação contra vários alvos moleculares e de terapêuticas personalizadas (*tailor-made*) (Shaikh et al., 2016).

## TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

A PDT tem por base um processo fotoativo que usa a combinação entre um fotossensibilizador (PS), composto não tóxico, a luz com determinado comprimento de onda, e o oxigênio para o tratamento de tumores sólido e de outras doenças (Agostinis e Berg, 2011; Lucky, Soo e Zhang, 2015) (Figura 5). Por si só estes três componentes não têm efeito citotóxico, no entanto, combinados produzem a reação fotodinâmica (Laranjo, 2014). Na presença de oxigênio molecular, o fotossensibilizador ativado pela luz inicia uma sequência de reações fotoquímicas e fotobiológicas que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), capazes de provocar a morte celular (Laranjo, 2014; Laranjo et al., 2013). A PDT recebeu grande destaque depois da aprovação como uma terapêutica capaz de possibilitar efeitos citotóxicos seletivamente para as células malignas (Zhang et al., 2014). Atualmente, a aplicação clínica de PDT está bem estabelecida em áreas médicas e cirúrgicas. É utilizada com sucesso em dermatologia, em urologia, em gastroenterologia e em neurocirurgia (Lucky, Soo e Zhang, 2015).

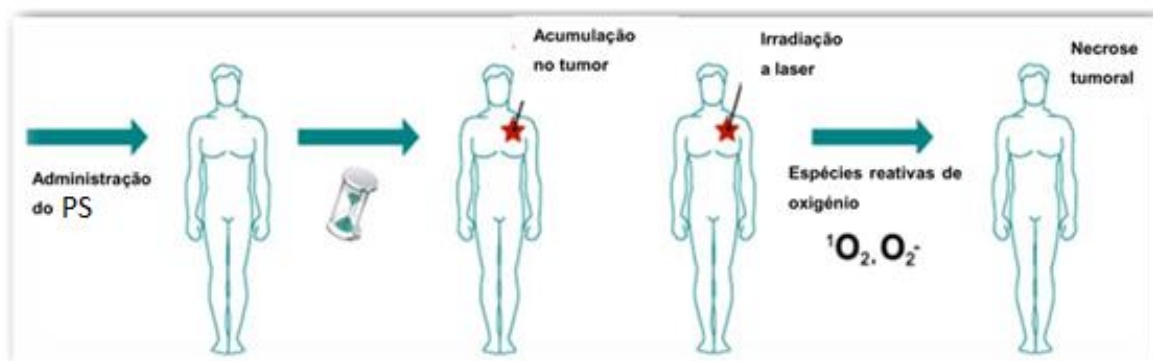


Figura 5- Esquema que ilustra como funciona o PDT nomeadamente a sequência cronológica: O paciente após se injetado com o fotossensibilizador é submetido a uma fonte luminosa, que vai interferir nas células cancerígenas (Adaptado de: <http://www.luzitin.pt/pdt.php>).

A descoberta da PDT foi acidental, quando Raab, um estudante de medicina, iluminou paramécias incubadas com um corante fluorescente e induziu a sua morte (Zhang et al., 2014). Apesar do seu sucesso inicial só Dougherty redescobriu a PDT, desenvolveu fotossensibilizadores e fontes de luz, e realizou ensaios clínicos que contribuíram para a

aprovação do Photofrin® (Juzeniene et al. 2007; Allison et al. 2010; Guan et al. 2014; Zhang et al. 2014).

A PDT está dependente da retenção preferencial do fotossensibilizador pelas células tumorais e da aplicação da luz de forma direcionada à região a tratar, tornando este procedimento duplamente seletivo (Dai et al., 2012; Laranjo, 2014; Sinha et al., 2006). Algumas particularidades desta terapêutica tornam-na atrativa do ponto de vista clínico. A PDT pode ser usada antes ou após a quimioterapia, da radioterapia e da cirurgia sem comprometer estes tratamentos, sendo o tempo de recuperação reduzido quando comparado com estes.

Estudos efetuados por diversos grupos mostraram que não existem interações com fármacos antineoplásicos o que permite o seu uso combinado, e a sua atuação apenas na região do tumor minimiza os efeitos secundários típicos das terapias anticâncer convencionais (Brown, Brown e Walker, 2004; Laranjo, 2014). Durante o tratamento fotodinâmico não se verificam alterações significativas da temperatura e a preservação do tecido conjuntivo proporciona fibrose mínima, o que permite a manutenção da integridade anatômica e mecânica dos órgãos mesmo os olhos (Agostinis e Berg, 2011; Laranjo, 2014). A PDT revelou ser uma terapia não genotóxica, e a repetição dos tratamentos não resulta em toxicidade cumulativa. A PDT poupa a arquitetura dos tecidos porque não danifica os elementos fibrilares como o colagénio e a elastina, preservando a matriz que serve de suporte à regeneração do tecido (Laranjo, 2014). É um tratamento minimamente invasivo requerendo apenas uma única administração e irradiação para a eliminação do tumor (Brown, Brown e Walker, 2004; Dai et al., 2012; Laranjo, 2014).

Muita investigação tem sido feita de modo a ultrapassar muitas das limitações da PDT. Têm sido desenvolvidas várias estratégias como a entrada do PS num local específico para evitar a fototoxicidade nos tecidos normais (Lucky, Soo e Zhang, 2015).

O efeito fotodinâmico é um processo relativamente simples. Após excitação pela luz, o fotossensibilizador no seu estado fundamental ( $^1PS$ ) passa, em determinadas condições, ao estado tripleto metaestável (Zawacka-Pankau et al., 2008). O fotossensibilizador no estado tripleto é capaz de transferir a sua energia para o oxigénio molecular ( $O_2$ ). Este processo leva à formação de oxigénio singleto, numa reação designada por reação fotodinâmica do tipo II (Agostinis e Berg, 2011; Allison, Bagnato e Sibata, 2010). A reação do tipo I envolve a interação do estado excitado tripleto com substratos celulares e a formação de radicais livres como descreve a Figura 6. Detalhadamente, ocorre transferência de eletrões e/ou de iões  $H^+$  de

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

modo a formar radicais anião ou catião, respetivamente que, por sua vez, podem reagir com o oxigénio e formar espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). Esta reação, frequentemente, resulta na formação de anião superóxido,  $O_2^{\cdot-}$ , por transferência de um eletrão do estado excitado tripleto para o oxigénio molecular (Agostinis e Berg, 2011; Garg *et al.*, 2010; Laranjo, 2014). As espécies reativas de oxigénio geradas durante a reação fotodinâmica do tipo II são mecanisticamente mais simples do que as formadas através da reação do tipo I (Agostinis e Berg, 2011). A reação do tipo I forma espécies altamente reativas de oxigénio que causam danos a muitas moléculas biológicas, incluindo lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Juzeniene, Peng e Moan, 2007). O seu tempo de vida é muito curto e, conseqüentemente, os danos fotodinâmicos ocorrem perto da localização intracelular do fotossensibilizador (Agostinis e Berg, 2011). A acumulação destas espécies reativas de oxigénio resulta em stresse oxidativo nas células tumorais e, conseqüentemente, em morte celular por apoptose e por necrose (Dai *et al.*, 2012; Zawacka-Pankau *et al.*, 2008) (Figura 6).

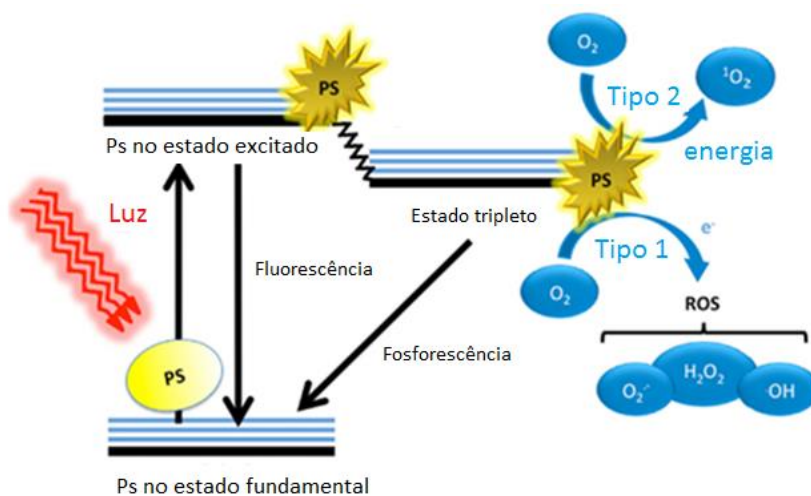


Figura 6- Princípio da terapia fotodinâmica. Após ativação pela luz, o fotossensibilizador atinge o seu estado tripleto excitado, podendo seguir dois tipos de reação: a reação do tipo I, onde se verifica a formação de radicais; a reação do tipo II que leva à formação de oxigénio singleto, sendo a espécie citotóxica mais importante na PDT (Adaptado de Dai *et al.* 2012).

### As moléculas fotossensibilizadoras

O fotossensibilizador constitui o mais importante componente da PDT. É a molécula que absorve energia da luz e a transforma em energia útil (Laranjo, 2014; Yoon, Li e Shim, 2013). Várias características do fotossensibilizador contribuem para a sua eficácia. Pretendem-

se moléculas com elevada capacidade de produção de oxigénio singleto após ativação por uma luz adequada e de comprimento de onda longo, sem toxicidade na ausência da luz evitando assim os efeitos adversos(Laranjo, 2014; Yoon, Li e Shim, 2013)..

Relativamente à farmacocinética, o fotossensibilizador deve concentrar-se rapidamente na lesão, de modo a permitir a irradiação o mais precoce possível, e a sua eliminação do organismo deve ser rápida minimizando potenciais efeitos adversos. Pretendem-se moléculas que se acumulem seletivamente nos tumores. A absorção da luz nos comprimentos de onda entre os 600 e os 800 nm garante uma boa penetração da luz nos tecidos (Agostinis e Berg, 2011; Allison, Bagnato e Sibata, 2010; Laranjo, 2014; Lucky, Soo e Zhang, 2015; Triesscheijn *et al.*, 2006).

Entre os fotossensibilizadores de primeira geração, destacou-se o Photofrin® (Lucky, Soo e Zhang, 2015), aprovado para utilização clínica pela primeira vez em 1993 no Canadá. Este fotossensibilizador continua a ser um dos mais preponderantes na clínica apesar de ter várias limitações como a fotossensibilidade prolongada da pele e necessitar de luz de comprimentos de onda com baixa capacidade de penetração nos tecidos (Allison, 2014; Allison, Bagnato e Sibata, 2010; Laranjo, 2014; Laranjo *et al.*, 2013). Foram desenvolvidos posteriormente os fotossensibilizadores de segunda geração como o ácido 5-aminovulínico (5-ALA), o Foscan® e o Verteporfin®. Estes absorvem luz de comprimento de onda mais longos, com maior capacidade de penetração nos tecidos e com um elevado rendimento quântico de formação de oxigénio singleto. A terceira geração de fotossensibilizadores corresponde a modificações de modo a aumentar a especificidade para os tumores, através da conjugação com um péptido ou com um anticorpo. Outra opção é a encapsulação do fotossensibilizador num veículo de entrega que permita o transporte mais eficaz para o tecido alvo. Estes ainda se encontram em estudos, estando ainda a ser avaliados os seus potenciais efeitos, bem como a ser comprovada a sua seletividade *in vivo* (Laranjo, 2014; Laranjo *et al.*, 2013; Lucky, Soo e Zhang, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

Atualmente existe grande motivação por parte dos grupos de investigação para melhorar as propriedades existentes ou para desenvolver novas moléculas para a PDT encontrando-se em ensaios clínicos de fase I/II moléculas que, para além de gerarem uma grande quantidade de ROS, também são capazes de estimular o sistema imunitário (Laranjo, 2014; Laranjo *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2015)

### **Importância das fontes de iluminação**

A escolha de uma boa fonte de luz é um dos parâmetros cruciais no sucesso desta terapia (Agostinis e Berg, 2011). Para que o PDT produza um efeito eficaz, a luz tem que irradiar de forma suficiente e adequada o tecido a tratar; para tal é fundamental compreender a forma como a luz se propaga através dos tecidos. A escolha da fonte de luz depende da natureza e da localização da lesão (Laranjo, 2014; Zhang *et al.*, 2014). O comprimento de onda tem que coincidir com o espectro de absorção do fármaco escolhido de modo a produzir a máxima concentração de oxigênio singleto.

A introdução das fontes de luz laser tornou possível uma iluminação mais precisa e reprodutível (Allison, Bagnato e Sibata, 2010). Vários novos tipos de fontes de luz têm vindo a ser desenvolvidos, tendo-se evoluído muito neste campo. As primeiras fontes de luz eram lâmpadas convencionais, depois apareceram os lasers e, mais recentemente, a tecnologia de fibras óticas, permitindo um direcionamento mais eficaz da luz, chegando mais facilmente a locais menos acessíveis e garantindo uma distribuição homogênea da luz (Agostinis e Berg, 2011; Firczuk, Winiarska e Szokalska, 2011; Laranjo, 2014; Triesscheijn *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014). Os sistemas de iluminação acoplados a dispositivo médico necessitam de uma aprovação por parte das agências reguladoras para uso na clínica (Allison, 2014; Allison, Bagnato e Sibata, 2010).

### **Importância da presença de oxigênio**

O oxigênio desempenha uma função fundamental no processo da PDT porém, a sua disponibilidade no tecido, é um fator importante no resultado do tratamento (Laranjo, 2014). O oxigênio singleto tem a capacidade de oxidar inúmeros grupos funcionais orgânicos. A sua produção, no contexto da célula, pode iniciar cascatas de eventos que caracterizam a apoptose ou, então, infligir danos locais suficientes para levar à morte celular por necrose. O oxigênio singleto é a ROS formada em maior quantidade como resultado da terapia fotodinâmica (Allison, 2014; Brandes e Janiszewski, 2005).

Pelo limitado raio de ação do oxigênio singleto, sabe-se que o dano fotodinâmico ocorre próximo da localização intracelular do fotossensibilizador, por isso a localização subcelular é um dos fatores a ter em conta aquando da sua utilização. Sabe-se também que o

comportamento do oxigénio singlete é influenciado pelo ambiente no qual é produzido, pelo que a molécula fotossensibilizadora dever estar próxima do alvo no momento da irradiação (Laranjo, 2014).

A hipoxia tumoral é uma das consequências que ocorre diretamente pelo consumo de oxigénio durante o tratamento (Allison, 2014). A pressão parcial de oxigénio intratumoral pode condicionar a formação de ROS e, assim, a eficácia da PDT fica comprometida. É importante perceber os mecanismos fisiológicos básicos e a dosimetria da PDT (He, Ni e Huang, 2014; Laranjo, 2014; St Denis *et al.*, 2011). Foram, por isso, também descritas várias estratégias para ultrapassar a hipoxia tumoral, nomeadamente a redução da taxa de fluência ou a irradiação fracionada (intervalos alternados de luz e de escuro), no entanto isto pode levar ao aumento dos tempos de tratamento. Além disto, existem ensaios clínicos em curso onde se estuda o efeito da hiperoxigenação na PDT com recurso a uma camara com oxigénio hiperbárico. Sabe-se que a hiperoxigenação pode oxigenar as células hipoxias pré-existentes tornando-as mais suscetíveis à PDT (Laranjo, 2014; Olive *et al.*, 2009).

## **Mecanismos de citotoxicidade da PDT**

A PDT determina três mecanismos que desempenham um papel na morte celular: os efeitos citotóxicos diretos nas células tumorais, a destruição da vascularização do tumor e a indução de uma reação inflamatória (Sun *et al.*, 2015). Contudo, verifica-se uma grande heterogeneidade entre os mecanismos que levam à morte celular mediada pela PDT (Laranjo, 2014)(Kumar, Abbas e Aster, 2015).

A formação de ROS pode levar diretamente à morte das células tumorais através da ativação de vias de morte celular como a apoptose, a necrose e, em alguns casos, a autofagia (Allison, 2014; Allison, Bagnato e Sibata, 2010). Pode também ocorrer um efeito indireto levando à lesão da vasculatura tumoral, isolando o tumor ao aporte de oxigénio e outros nutrientes (Laranjo, 2014; O'Connor, Gallagher e Byrne, 2009; Plaetzer *et al.*, 2013).

No caso da PDT formam-se proteínas de choque tóxico, havendo uma expressão de anti-oxidantes, que contribuem para a eliminação das espécies reativas de oxigénio. Estes mecanismos reparam, com sucesso, e restauram o funcionamento da célula (Agostinis e Berg, 2011). No entanto, a PDT ultrapassa essa reparação e induz morte celular. Os mecanismos de morte estão associados a alterações morfológicas características como a condensação da

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

cromatina durante a apoptose e a formação de corpos apoptóticos. A vacuolização massiva do citoplasma e a formação de estruturas de duplas membranas, os autofagossomas, ocorrem no processo autofágico que pode terminar em morte celular.

A necrose é o tipo de morte celular morfológicamente caracterizada pela vacuolização do citoplasma, exibindo um aumento da eosinofilia e perda de integridade da membrana citoplasmática, resultando numa reação inflamatória devido à libertação do conteúdo celular e de moléculas pró-inflamatórias (Kumar, Abbas e Aster, 2015; Laranjo, 2014). Ocorrem também alterações nucleares, devido à degradação da cromatina (Kumar, Abbas e Aster, 2015). Este tipo de morte tem sido associado a elevadas concentrações de fotossensibilizador ou a elevadas doses de luz (Agostinis e Berg, 2011; Laranjo, 2014).

Vários estudos indicam que a apoptose é o tipo de morte predominante na PDT, sendo a sua indução o objetivo da maioria dos regimes (Agostinis e Berg, 2011). É uma via de morte celular induzida por um programa altamente regulado, no qual as células ativam enzimas que degradam o seu próprio DNA, bem como as proteínas nucleares e citoplasmáticas. Pode ser iniciada por duas vias principais, a via mitocondrial também denominada de intrínseca e a via de recetores ou extrínseca.

O tipo de morte que predomina depende das características do tratamento principalmente do fotossensibilizador, da sua concentração, da potência das fontes de luz e da energia total da luz recebida (Allison, 2014; Allison, Bagnato e Sibata, 2010; Laranjo, 2014). Segundo alguns autores, caso a irradiação seja intensa e rápida ocorre mais predominantemente a necrose, havendo alguma libertação de moléculas inflamatórias (Agostinis e Berg, 2011; Allison, 2014; Allison, Bagnato e Sibata, 2010; Laranjo, 2014).

Por vezes podem, a apoptose e a necrose, ocorrer em simultâneo e a apoptose ser induzida por alguns estímulos patológicos e progredir para necrose (Kumar, Abbas e Aster, 2015). Também poderá ocorrer autofagia, um processo rigidamente controlado em que os organelos são captados para vesículas membranares, que se fundem, para a degradação e o reaproveitamento dos componentes. Esta via de sobrevivência celular pode ser ativada fornecendo assim elementos para a síntese de proteínas durante a privação de nutrientes (Laranjo, 2014). Este mecanismo pode resultar na eliminação da lesão (Allison, 2014) ou culminar em apoptose. A dinâmica entre a autofagia e a apoptose na PDT são dependentes do tipo de célula, da natureza do fotossensibilizador e da dose da luz (Allison, Bagnato e Sibata, 2010; Laranjo, 2014; Yoon, Li e Shim, 2013).



Os avanços na compreensão da biologia molecular da PDT contribuem para uma melhoria dos protocolos de tratamento e para a escolha criteriosa dos fotossensibilizadores, (Laranjo, 2014). Tem-se registado um avanço na compreensão do papel da sinalização intracelular em resposta à PDT (Laranjo, 2014; O'Connor, Gallagher e Byrne, 2009; Pizova et al., 2012).

### **Efeito da PDT nos vasos sanguíneos**

Tem havido grande investigação no desenvolvimento de moléculas fotossensibilizadoras tanto com grande seletividade para células tumorais como também seletivas para a vascularização do tumor (Laranjo, 2014; Laranjo et al., 2013). Os fotossensibilizadores podem acumular-se nas células endoteliais ou nas células tumorais, a nível dos lisossomas, das mitocôndrias, do retículo endoplasmático e da membrana plasmática, locais esses onde ocorre a reação fotodinâmica. A PDT vai parar ou diminuir o fluxo sanguíneo levando à hipoxia e à morte celular. Os danos nas células vasculares levam a uma libertação de citocinas que resultam na formação de agregados plaquetários que, por sua vez, levam à hipoxia pela formação de um coágulo. Esses danos podem prevenir a formação de novos vasos sanguíneos e aumentar a eficácia dos tratamentos ao causar o colapso da microcirculação (Allison, 2014; Laranjo, 2014; Olivo et al., 2010).

Os danos vasculares da PDT vão desde a vasoconstrição dos vasos de tumor, à estase do fluxo de sangue, ao aparecimento de hemorragia e, em vasos de maior diâmetro, à formação de agregados de plaquetas e de trombos dentro do lúmen dos vasos (Laranjo, 2014).

### **Inflamação e Imunidade**

A destruição direta das células tumorais, a oclusão dos vasos e a isquemia causada provocam frequentemente uma reação inflamatória aguda que se traduz por edema na região submetida a tratamento (Pizova et al., 2012). Vários estudos indicam que a PDT é eficaz para desencadear a resposta imunitária contra o tumor, podendo ativar tanto o sistema imune inato como o adaptativo. Como resultado desta ação pode haver uma remissão de metástases não

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

tratadas e de outros tumores localizados longe do tumor primário tratado (Gollnick e Brackett, 2010; Laranjo, 2014; Pizova *et al.*, 2012; St Denis *et al.*, 2011).

A terapia fotodinâmica, para além de influenciar a resposta adaptativa imune, pode igualmente levar à imunossupressão. Vários estudos mostraram que a PDT potencia a imunidade antitumoral (Gollnick, 2013). Os autores observaram que a imunidade adaptativa parece ser independente da inflamação local e da inflamação sistémica, sendo esta caracterizada pelo rápido influxo de neutrófilos na zona do tumor e pela elevada expressão de citocinas pro-inflamatórias (Gollnick, 2013).

Já em 2015, Rocha e seus coautores desenvolveram um fotossensibilizador que para além de gerar um elevado rendimento de espécies reativas de oxigénio, é capaz de eliminar o tumor primário e desencadear uma resposta imune sistémica capaz de controlar as metástases. Este fotossensibilizador encontra-se em ensaio clínico de fase I/II (Rocha *et al.*, 2015).

Ainda se conhece pouco sobre estes mecanismos, sabendo-se apenas que estão relacionados com o sistema imunitário, a área tratada e o tipo de fotossensibilizador (Agostinis e Berg, 2011; Laranjo, 2014). Uma maior compreensão da resposta imunitária prevê o desenvolvimento de mecanismos úteis para melhorar a eficácia do tratamento clínico da PDT (Agostinis e Berg, 2011; Laranjo, 2014).

## PDT COMO OPÇÃO NO OSTEOSARCOMA

Do ponto de vista de aplicação clínica a PDT é uma terapêutica realizada em dois procedimentos sequenciais. O fotossensibilizador é administrado por via intravenosa, distribuindo-se por todo o organismo, tendo uma acumulação preferencial no tumor (Laranjo, 2014). Uma das especialidades médicas em que a PDT é mais utilizada é na dermatologia, no tratamento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas (Agostinis e Berg, 2011). Frequentemente usa-se a propriedade de fluorescência dos fotossensibilizadores e a sua acumulação preferencial nas células tumorais para demarcar os tecidos tumorais dos que não fluorescem (Agostinis e Berg, 2011)..

Vários autores postulam que cada vez mais a PDT fará parte das opções terapêuticas, no entanto, requer a existência de uma equipa multidisciplinar (Agostinis e Berg, 2011; Laranjo, 2014; Lucky, Soo e Zhang, 2015). A aplicação clínica da PDT é um processo moroso e

complexo uma vez que ,como a maior parte dos fármacos, requer que todos os ensaios clínicos sejam feitos com sucesso, é também necessário a aprovação do sistema de aplicação de luz (Agostinis e Berg, 2011; Allison, 2014; Laranjo, 2014). No âmbito da PDT, atualmente estão em curso 416 ensaios clínicos em todo o Mundo. Nos EUA decorrem cerca de 170 e na Europa 118. As patologias em estudo são o colangiocarcinoma, a queratose actínica, os tumores cerebrais, os vários cancros da pele, o cancro do esófago, o cancro da cabeça e pescoço, a periodontite crónica, a colite ulcerosa, a degenerescência macular relacionada com a idade, o cancro do pulmão, o cancro do cólon, o cancro do rim entre outros, segundo a página da web [clinicaltrials.org](http://clinicaltrials.org) (REF). Em Portugal estão a decorrer três ensaios clínicos, um em Fase I e 2 para a porfirina LUZ11 em cancro avançado da cabeça e pescoço da responsabilidade da Luzitin S.A. Na área da oftalmologia, está em fase de recrutamento um ensaio clínico de fase 4 que estuda a combinação do aflibercept, desenvolvido em colaboração pela Sanofi com a Regenron, um bloqueador do VEGF (do Inglês *vascular endothelial growth factor*) com o verteporfin, para o tratamento da vasculopatia polipoidal idiopática da coróide.

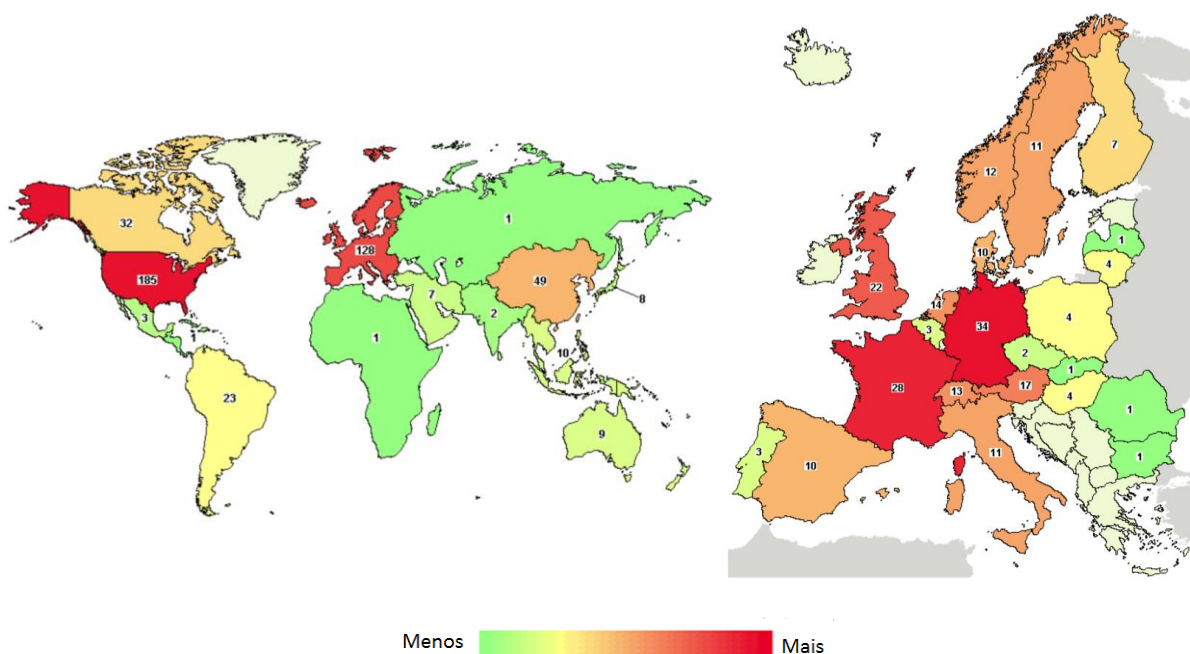


Figura 7-, Número de ensaios clínicos de terapia Fotodinâmica realizados no Mundo e na Europa (Adaptado de (*Clinical trials*, 2016)).

Existem alguns estudos que indiciam que a terapia fotodinâmica parece ser promissora em neoplasias músculo-esqueléticas, no entanto a sua aplicação clínica ainda é muito limitada

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

ou mesmo inexistente necessitando ainda de estudos (Chohfi de Miguel *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Em tumores ósseos primários, o objetivo é frequentemente a cura, com o uso de uma terapia multimodal que inclui a cirurgia, a quimioterapia neoadjuvante e adjuvante e a radioterapia. Contudo, existem muitos tumores que ocorrem em locais que tornam a remoção cirúrgica um problema, como é a calote craniana ou uma vértebra. A terapia fotodinâmica parece ser uma terapia promissora nestas situações (Reidy *et al.*, 2012)

Em 1993, Hourigan *et al.* corroboram a sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de sarcomas primários humanos à terapia fotodinâmica. Os autores confirmaram *in vitro* um efeito dependente da dose de energia para a terapia fotodinâmica à base de porfirina em três diferentes neoplasias músculo-esqueléticas humanas. Quando comparado com o osteossarcoma humano e o condrossarcoma indiferenciado, o tumor de células gigantes exibiu uma melhor resposta citotóxica à terapia. Existem também relatos que demonstram a eficácia da terapia fotodinâmica *in vivo* em modelos ortotópicos de condrossarcoma e fibrossarcoma em ratos e de uma linha celular de osteossarcoma de ratos (Singh e Rabbani, 2005). Bisland e a sua equipa mostraram que o tratamento de doenças ósseas com recurso à PDT tem um efeito benéfico conseguindo diminuir tanto o tumor primário como as metástases. Outra equipa em 2009 mostrou que ratos C3H com xenotransplante de osteossarcoma, quando submetidos à PDT, revelaram uma inibição do crescimento tanto por apoptose como por necrose (Satonaka *et al.*, 2010). Yanase e co-autores também observaram que as células de osteossarcoma eram sensíveis quando submetidas à PDT em ambiente de hipertermia (Yanase *et al.*, 2009). Rossi observou o efeito do ALA em células de uma linha celular de osteossarcoma, sendo os resultados obtidos, muito promissores, uma vez que a terapia causou morte celular tanto por apoptose como por necrose (Rossi *et al.*, 2011). Em 2012, Reidy e seus co-autores, mostraram que a PDT, com o uso do fotossensibilizador mTHPC, foi bastante eficaz em osteossarcomas metastáticos, sendo que este PS se acumulou em altas doses na linha celular de osteossarcoma estudada (Reidy *et al.*, 2012). Já em 2014, Guan *et al.*, avaliaram a ação fotodinâmica do azul de metileno numa linha celular de osteossarcoma. A ação fotodinâmica do azul-de-metileno sob irradiação LED revelou destruição das células e indução de apoptose (Guan *et al.*, 2014). Nagai em 2014, também observou através dos estudos *in vitro* que a PDT induziu apoptose através da ativação da caspase 9 e da caspase 3 (Nagai *et al.*, 2014). Mais recentemente Sun e a sua equipa ao realizarem estudos com hiporfin-PDT mostraram que houve um efeito significativo nas células de osteossarcoma, ocorrendo tanto

morte por apoptose como por necrose, gerando uma quantidade significativa de ROS capaz de causar danos nas células tumorais. Demonstraram também, através dos estudos *in vivo*, que esta estratégia era segura para uso na clínica, tendo já sido aprovado pela Chinese SFDA (Sun *et al.*, 2015). Estudos de Rasalkar *et al.* mostraram que a taxa de sobrevivência global dos doentes com osteossarcoma localizado, sem doença metastática, é 60 a 70% e que, no caso de doença metastática a taxa de sobrevivência reduz para 10 a 30%. A existência de metástases confere numerosas desvantagens no tratamento de osteossarcoma, no entanto, vários estudos indicaram que a terapia fotodinâmica pode ser uma opção útil, dado ser considerada uma terapêutica efetiva no osteossarcoma metastático (Burch e Bisland, 2005; Reidy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). A terapia fotodinâmica não é útil apenas no tratamento de neoplasias ósseas mas também no diagnóstico destas doenças quando usada como marcador (Zhang *et al.*, 2014). Mais recentemente, no nosso grupo, foi iniciado um projeto com o objetivo de se estudar o papel que a terapia fotodinâmica poderia desempenhar no tratamento de osteossarcoma. Realizaram-se estudos *in vivo* num modelo animal ortotópico desenvolvido e *in vitro* onde se comprovaram propriedades fotodinâmicas favoráveis do fotossensibilizador e o efeito citotóxico em células de uma linha celular de osteossarcoma humano (Chohfi de Miguel *et al.*, 2014).

Atualmente existem seis ensaios clínicos em doenças ósseas com terapia fotodinâmica no mundo. Num ensaio de fase I é administrado ácido aminovulínico no tratamento da síndrome de Gorlin. Este ensaio tem como colaborador a Genetech e pretende comprovar a segurança e a eficácia do vismodegib. Noutro ensaio, este de fase III é administrado o verteporfin, de modo a verificar o seu *outcome* neste tipo de doenças. Dois outros ensaios clínicos estão em fase de recrutamento, o primeiro, de fase 2, consiste na administração do cloridrato de ácido aminolevulínico e irradiação com luz azul ou com luz vermelha no tratamento do carcinoma basocelular e da síndrome nevoide basocelular, e o segundo corresponde a um estudo de avaliação da segurança e da eficácia do mesmo composto em doença óssea metastática. Os resultados destes novos estudos parecem indicar que esta estratégia terapêutica pode ser uma nova esperança aos sucessivos insucessos e recorrências nos tratamentos de osteossarcoma (Duchi *et al.*, 2013). Dos restantes ensaios ainda existe pouca informação (Figura 7).

## **COMBINAÇÃO DA PDT COM OUTRAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS**

A combinação de várias modalidades terapêuticas sem toxicidade cumulativa constitui uma estratégia importante em oncologia, que permite potencializar o resultado terapêutico. Vários autores indicam que cada vez mais o tratamento do cancro passa por uma estratégia combinada (Agostinis e Berg, 2011; Allison, 2014; Kemp *et al.*, 2015; Laranjo, 2014). A combinação de terapêuticas pode resultar num tratamento mais efetivo, ocorrendo a destruição do tumor e um controlo a longo tempo, havendo assim a possibilidade de diminuir a dose dos fármacos, mantendo a sua eficácia clínica, minimizando ou diminuindo a resistência aos fármacos e diminuindo ou eliminando os efeitos secundários característicos das terapias convencionais (Chou, 2010, 2006; Fernando e Jones, 2015; Yoon, Li e Shim, 2013). A terapia combinada pode constituir uma opção no tratamento das doenças oncológicas onde a monoterapia, na maioria dos casos não tem eficácia clínica (Pinto, Moreira e Simões, 2010; Sambasivarao, 2013; Yoon, Li e Shim, 2013). Possibilita ainda uma maior faixa de interação entre fármacos e células tumorais com diferentes anomalias genéticas numa população tumoral heterogénea (Katzung, Masters e Trevor, 2014).

No caso da PDT a sensibilização das células tumorais e a interferência com mecanismos de proteção das células ao tratamento são abordagens que podem melhorar o resultado terapêutico (Agostinis e Berg, 2011; Laranjo, 2014). A citotoxicidade está dependente da produção de ROS, o que permite que esta terapia seja precisa e sem impedimento à combinação com outras estratégias convencionais. Existem vários grupos de investigação que relatam estudos de combinação entre a PDT e outras estratégias. Existem vários estudos onde se associa a PDT com fármacos de quimioterapia demonstrando que esta estratégia de combinação pode ser bem tolerada (Compagnin *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2011; Nahabedian *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2010; Zuluaga e Lange, 2008). No entanto, as interações observadas podem ser sinérgicas, neutras ou antagonistas, de acordo com o tipo de tumor, o fármaco utilizado, o tempo de exposição, a dose de luz ou a administração do fotossensibilizador. Muitos estudos indicam que a terapia fotodinâmica em combinação com a terapia tem um efeito anticancerígeno acentuado, superando mesmo em alguns casos a

resistência dos tumores aos fármacos (Firczuk, Winiarska e Szokalska, 2011; Laranjo, 2014; Pinto, Moreira e Simões, 2010; St Denis *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014; Zuluaga e Lange, 2008).

Está descrito por alguns autores que a quimioterapia induz principalmente apoptose e a terapia fotodinâmica causa morte das células tumorais através da apoptose e da necrose (Laranjo, 2014; Laranjo *et al.*, 2013; St Denis *et al.*, 2011). A terapia fotodinâmica em combinação com fármacos de quimioterapia originou um efeito sinérgico no tratamento do colangiocarcinoma (Nonaka *et al.*, 2013). A combinação da PDT com doxorrubicina em diversos tipos de cancro, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, melhorou significativamente o resultado (Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011). A atividade da doxorrubicina, cujo mecanismo de ação depende da intercalação no DNA e da inibição da topoisomerase II, foi potenciado devido a uma reação fotoquímica durante a PDT. Além disto, os estudos *in vivo* mostraram que o crescimento de xenotransplantes em ratinhos foi controlado com o uso desta opção terapêutica. Também num modelo de cancro resistente à quimioterapia se verificou a inibição significativa da proliferação celular (Nahabedian *et al.*, 1988; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011; Zuluaga e Lange, 2008). Também foi avaliado o efeito do irinotecano e do ectoposídeo em combinação com a PDT, o que resultou num efeito sinérgico, ocorrendo inibição do crescimento celular, perda significativa do potencial clonogénico, paragem do ciclo celular e fragmentação do DNA (Laranjo, 2014; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011). Do mesmo modo, o metotrexato em combinação com a PDT resultou num aumento significativo da concentração intracelular de protoporfirina (Anand *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2006)

Outra das estratégias que pode ser usada é a combinação da PDT com a radioterapia. Segundo alguns autores a radioterapia pode potenciar o efeito antineoplásico da PDT (Agostinis e Berg, 2011).

A PDT também pode ser combinada com o oxigénio hiperbárico, tendo já sido feitos estudos revelando os efeitos benéficos do tratamento combinado, diminuindo a condição de hipoxia e aumentando a morte celular (Laranjo, 2014).

A combinação da PDT com anticorpos monoclonais, com fármacos que promovem a captação ou a retenção do PS pelas células tumorais pode constituir uma estratégia para melhorar o resultado terapêutico. Foram também estudadas várias estratégias com o objetivo de aumentar a acumulação de fotossensibilizadores nas células tumorais. Existem também outras estratégias que visam minimizar possíveis efeitos citoprotetores e aumentar a formação

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

de ROS (Laranjo, 2014). Outros estudos onde a PDT é usada em combinação com a aspirina, um fármaco de baixa toxicidade, resulta numa inibição prolongada da atividade do proteossoma com o aumento da apoptose, mesmo em células resistentes a esta via de morte (Laranjo, 2014; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011).

A ação da PDT a nível do sistema imunitário proporcionou o surgimento de muitas estratégias relacionadas com a utilização de mediadores de inflamação e de imunidade levando a uma maior redução do crescimento tumoral e ao aumento da sobrevivência de ratinhos (Gollnick, 2013; Laranjo, 2014; Ostrand-Rosenberg, 2004; Pizova *et al.*, 2012).

A nanotecnologia também veio revolucionar a forma de entrega dos fotossensibilizadores, podendo estes ser transportados mais eficientemente, de forma mais controlada e com maior segurança tanto para o tratamento como para o diagnóstico. A incorporação em lipossomas a nível da bicamada lipídica possibilita a conjugação com múltiplos ligandos de modo a melhorar as propriedades farmacocinéticas, farmacológicas e a eficiência terapêutica. O tempo de circulação dos fármacos pode ser controlado pela incorporação de componentes como o PEG, o polietilenoglicol. A conjugação na camada exterior de biomoléculas como anticorpos, aptameros ou péptidos contribui para direcionar a terapêutica apenas às células tumorais (Duchi *et al.*, 2013; Federman *et al.*, 2012; Sambasivarao, 2013; Susa *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2007).

Nos últimos anos tem sido feito um esforço no sentido de desenvolver diversas funcionalidades de diagnóstico que sejam simples e fáceis de usar, o chamado “*see and treat*” (Lucky, Soo e Zhang, 2015). Surge então um conceito, relativamente recente, a teranóstica, que define a combinação de uma modalidade terapêutica com uma modalidade de imagem como a já utilizada na prática clínica com recurso à medicina nuclear, mais precisamente à radioterapia metabólica. A PDT pode também ser usada em diagnóstico nomeadamente como traçador para a obtenção de imagem (Allison, 2014; Allison, Bagnato e Sibata, 2010; Laranjo, 2014).

A PDT é, sem margem para dúvidas, uma terapêutica muito promissora no tratamento do cancro. No entanto ainda não ganhou aceitação necessária para ser considerado como tratamento de primeira linha muito devido à falta de eficácia dos fotossensibilizadores já aprovados. A estratégia de combinação pode, por isso, adicionar mais um contributo a esta terapia aumentando assim a sua aplicação clínica (Canti *et al.*, 1998; Chun *et al.*, 2000; Lucky, Soo e Zhang, 2015; Peterson *et al.*, 1996; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011).



# **OBJETIVOS**



## Objetivos

A relevância deste trabalho é apoiada em estudos que reforçam a combinação da terapia fotodinâmica com a quimioterapia e que revelam um efeito citotóxico bastante promissor, tendo como objetivo a procura de uma sinergia que traduza a melhoria da eficácia e a diminuição da toxicidade do tratamento.

Desta forma, pretende-se com a realização deste trabalho avaliar o potencial efeito sinérgico da PDT com os fármacos de quimioterapia doxorrubicina, metotrexato e cisplatina sobre a linha celular humana de osteossarcoma (MNNG-HOS) *in vitro* e *in vivo*.



# **MATERIAIS E MÉTODOS**



## ESTUDOS *IN VITRO*

O âmbito da realização de estudos *in vitro* para a avaliação do efeito terapêutico da combinação entre a quimioterapia e a terapia fotodinâmica prende-se com o facto de frequentemente constituírem uma primeira abordagem para a análise do potencial efeito terapêutico de um fármaco e de fornecerem informações importantes para dar continuidade ao estudo experimental. Os estudos foram realizados em ambiente controlado, em linhas celulares, de modo a investigar os efeitos de uma determinada variável experimental num pequeno grupo de constituintes de um organismo, para determinar os mecanismos de ação biológica sem que haja a interferência de outras variáveis.

De modo a avaliar o efeito que advém da combinação entre a quimioterapia e a terapia fotodinâmica, utilizou-se uma linha celular humana de osteossarcoma, a MNNG-HOS. Por outro lado, de forma a monitorizar uma possível toxicidade da terapia combinada em linhas celulares normais, usou-se uma linha celular humana, a *HFF1* (linha celular normal de fibroblastos).

### Culturas celulares

As culturas celulares possuem como objetivo o cultivo e a propagação de células dispersas, sendo necessário o estabelecimento de condições rigorosas de assepsia e de esterilidade. Assim, para os estudos *in vitro* foram utilizadas as linhas celulares MNNG-HOS e a linha celular *HFF1* adquiridas e certificadas pela American Type Culture Collection (ATCC).

A linha celular MNNG-HOS deriva da linha celular HOS. Foi quimicamente transformada com 0,01 µg/mL MNNG, uma nitrosamina carcinogénica e deriva de um osteossarcoma de uma criança caucasiana do género feminino com 13 anos. Estas células tem a característica de crescer com alta densidade de saturação e ser altamente tumorigénicas em ratinhos nude (SIGMA-ALDRICH, 2016)(Figura 8).

As linhas celulares utilizadas foram propagadas em cultura aderente de acordo com as instruções do fornecedor e mantidas a 37°C em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora *Binder*.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

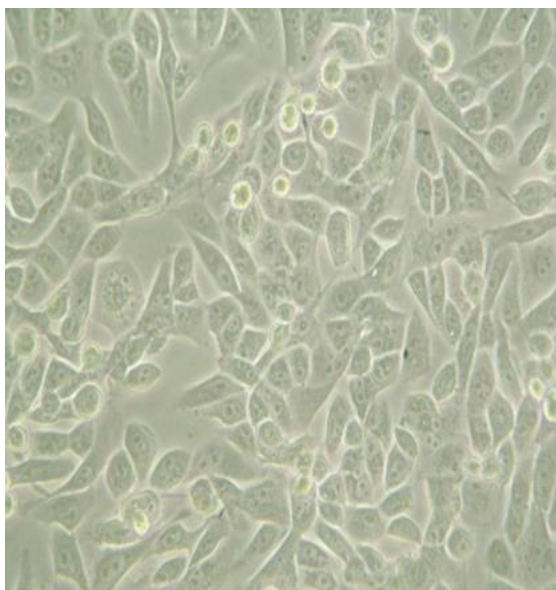


Figura 8- Imagem microscópica da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS. A imagem foi obtida com a ampliação de 10x

Como já foi referido, as linhas celulares formam uma monocamada, crescendo aderentes ao suporte sólido (frascos e placas próprias para cultura de células). Estas células necessitam, para a realização de estudos *in vitro*, de ser transferidas para outros suportes apropriados, frequentemente placas de múltiplos compartimentos, tendo-se para tal recorrido a métodos enzimáticos, de modo a preparar suspensões celulares. Assim, inicialmente procedeu-se à lavagem das culturas celulares com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*), constituída por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma, S5011) e 1,8 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma, P0662), com pH acertado a 7,4 e incubaram-se a 37°C com 2mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049) durante o tempo necessário para que as células se soltassem do frasco. De seguida, adicionaram-se pelo menos 4 mL de meio de cultura a fim de inativar a solução enzimática, homogeneizou-se a suspensão celular e procedeu-se à determinação da concentração de células.

Para tal, diluiu-se um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano e procedeu-se à contagem num microscópio invertido (Motic, AE31) com ampliação de 10 vezes, utilizando o hemocítmetro (Figura 9). O método do azul tripano permite fazer a contagem de células numa suspensão celular. Esta técnica é simples e não dispendiosa, fornecendo informação fiável do número total de células da suspensão (Sarma, Ray e Antony, 2000).



Por último, adicionou-se meio de cultura à suspensão celular de forma a obter a concentração celular pretendida, de acordo com o estudo a realizar.



Figura 9- Hemocitómetro e técnica de contagem celular utilizando o método de exclusão do azul tripano.

## Estudos de citotoxicidade

Neste trabalho foi utilizado o fotossensibilizador BBr2HPP (5,15-bis(2-bromo-3-hydroxifenil)porfirina), previamente sintetizado pelo nosso grupo (Laranjo *et al.*, 2013).

Os fármacos quimioterapêuticos doxorubicina e metotrexato foram cedidos pelo Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra. A cisplatina foi adquirida à Sigma na forma de pó, a partir do qual se prepararam soluções imediatamente antes da realização dos estudos.

A concentração de todas as soluções, de fotossensibilizador e dos fármacos quimioterapêuticos foram ajustadas de modo a que a sua adição apenas alterasse, no máximo, o volume do meio de cultura dos compartimentos celulares em 1%.

Nos ensaios com doxorubicina e cisplatina, foi utilizado um controlo em que não houve administração de qualquer composto. Para os ensaios com o metotrexato ou com a combinação de doxorubicina e PDT, foram realizados dois controlos: culturas celulares em que não houve administração de qualquer composto e culturas celulares tratadas com dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D4540) e com o solvente do fotossensibilizador, uma mistura ternária de água, polietilenoglicol<sub>400</sub> (PEG<sub>400</sub>) e etanol (50:30:20, v/v/v), respetivamente. Todas as soluções utilizadas foram previamente filtradas utilizando filtros de 0,22 µm (Syringe Filter;

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Frilabo, 1520012). Para estes estudos, foram preparadas suspensões celulares com 50 mil células/mL em meio de cultura para a linha MNNG-HOS e com 100 mil células/mL para a linha celular HFF1. Estas suspensões foram distribuídas por placas de 48 poços, de forma a obter um volume final de 500  $\mu$ L por poço.

### Quimioterapia

Numa primeira fase, apesar do objetivo deste trabalho ter sido a avaliação do efeito da PDT em combinação com a quimioterapia, foi necessário conhecer o efeito de cada um dos compostos individualmente.

Deste modo, para avaliar a ação citotóxica dos agentes quimioterápicos, as culturas celulares foram incubadas, durante 24, 48 e 72 horas, com diferentes concentrações de doxorubicina que variaram entre 0,01  $\mu$ M e 30  $\mu$ M, de metotrexato que variaram entre 0,001  $\mu$ M e 500  $\mu$ M e de cisplatina que variaram 0,25  $\mu$ M e 40  $\mu$ M.

Após estes períodos de incubação foi realizado o ensaio de MTT, conforme descrito de seguida. Estes estudos permitiram a obtenção de curvas dose-resposta e a determinação do  $IC_{50}$  (concentração que inibe a atividade metabólica em 50%) e do  $IC_{10}$  (concentração que inibe a atividade metabólica em 10%) destes fármacos para os tempos de incubação de 24, de 48 e de 72 horas.

Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa Origin Pro 9.0.

### Terapia combinada: quimioterapia associada à terapia fotodinâmica

De modo a avaliar o efeito do fotossensibilizador, individualmente nas duas linhas celulares, a linha celular de osteossarcoma MNNG-HOS e a de fibroblastos humanos HFF1, procedeu-se à incubação das mesmas com o fotossensibilizador BBr2HPC 5,15-*bi*(2-bromo-3-hydroxifenil), uma porfirina desenvolvida e já estudada anteriormente pelo grupo de investigação (Chohfi de Miguel *et al.*, 2014). Nesses estudos, nas células MNNG-HOS, obteve-se um  $IC_{50}$  de 86 nM. Assim, no presente trabalho optou-se por usar três concentrações diferentes de fotossensibilizador, 42 nM, 86 nM (correspondente ao  $IC_{50}$ ) e 170 nM.

Nos estudos de combinação terapêutica optou-se por submeter as culturas celulares às concentrações de quimioterapêuticos correspondentes ao IC<sub>10</sub>, para os tempos de incubação de 24 e de 72 horas.

Para a realização destes estudos, preparou-se uma solução de meio de cultura suplementada com os fármacos quimioterápicos. A cada placa de experiência foi substituído o meio de cultura por meio com o respectivo fármaco. Por sua vez, nos poços controlo o meio foi renovado por meio sem fármaco. As placas foram incubadas em atmosfera húmida com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 horas.

Para o estudo de combinação de 24 horas, após a preparação incubaram-se as placas com a concentração correspondente ao IC<sub>10</sub> de cada agente quimioterapêutico e com o fotossensibilizador simultaneamente nas condições acima descritas. Após 24 horas efetuou-se o tratamento fotodinâmico. Para tal o meio de cultura foi retirado da placa, transferiram-se 200 µL de PBS para cada poço para realizar uma lavagem e colocou-se novo meio. Procedeu-se à irradiação que foi realizada por uma fonte de luz fluorescente que contém um filtro vermelho ( $\lambda_{cut-off} < 560\text{nm}$ ) durante 27 minutos até obter um total de 10 J (Ge *et al.*, 2011; Laranjo, 2014; Teixo, 2013).

Para o estudo de combinação de 72 horas, após a preparação incubaram-se as placas com a concentração correspondente ao IC<sub>10</sub> de cada agente quimioterapêutico e 24 horas depois do adicionou-se fotossensibilizador. Após outras 24 horas procedeu-se ao tratamento fotodinâmico como descrito anteriormente. Após a irradiação renovou-se o meio de cultura mantendo a concentração do quimioterapêutico.

Após o tratamento, trataram-se as placas do mesmo modo que nos estudos de monoterapia. Na Figura 10 estão representadas temporalmente as etapas que constituíram os dois procedimentos utilizados nos estudos *in vitro*.

Para verificar o tipo de resposta induzida pela combinação da PDT com a doxorubicina, foi utilizado o método de Chou e Talalay para avaliação da existência de sinergia, adição ou antagonismo (Chou, 2010). Este método avalia o tipo de resposta obtida a nível da atividade metabólica através da seguinte equação:

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

$$IC = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2}$$

em que IC representa o índice de combinação,  $(D)_1$  representa o valor da concentração para se atingir um valor determinado de atividade metabólica com o fármaco 1,  $(D)_2$  representa a concentração para atingir a mesma atividade metabólica após o tratamento com o fármaco 2, e  $(Dx)_1$  e  $(Dx)_2$  representam os respectivos valores obtidos em combinação de ambos os fármacos. Para valores de IC inferiores a 1 é obtida sinergia, para valores iguais a 1 verifica-se efeito de adição, e para valores superiores a 1 verifica-se antagonismo.

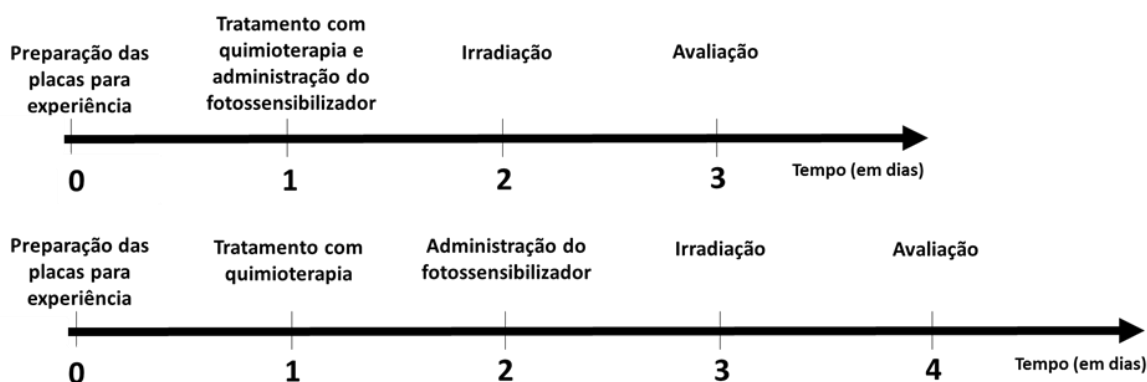


Figura 10- Representação esquemática das etapas que constituíram os estudos da terapia de combinação de 24 e de 72 horas de incubação, respectivamente.

### Determinação da atividade metabólica pelo ensaio MTT

Após incubação foi avaliada a atividade metabólica, por colorimetria, através do ensaio do MTT, representando este ensaio uma medida da atividade metabólica.

O método do MTT, do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, é baseado na capacidade da enzima desidrogenase, presente nas células metabolicamente ativas, clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor violeta, insolúveis em soluções aquosas. Este processo de redução está associado à função das desidrogenases, contudo também pode ser devido à ação de moléculas como a NADH e a NADPH (equivalentes redutores) (Buch *et al.*, 2012). Conseqüentemente, o número de células metabolicamente ativas é proporcional à quantidade de cristais de formazano produzidos (Mosmann, 1983). Após se proceder à solubilização dos cristais de formazano, através da

adição de solventes orgânicos, é possível quantificar por espectrofotometria a quantidade de cristais formados.

Para avaliar a proliferação celular, descartou-se o meio de cultura e procedeu-se a uma lavagem com PBS. Adicionaram-se 200 µL de uma solução de MTT, na concentração de 0,5 mg/mL (Sigma, M2128) em PBS, com pH de 7,4. Após incubação no escuro, a 37°C, dissolveram-se os cristais de formazano pela adição de 200 µL de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol e agitaram-se as placas até a dissolução total dos mesmos. Após a solubilização dos cristais, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 compartimentos (Sarstedt, Alemanha), medindo-se posteriormente a absorvância num espectrofotómetro, usando o comprimento de onda de 570 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm (Encarnação, 2014). Os resultados foram expressos em percentagem de atividade metabólica das células tratadas em relação às células controlo, representadas pelo valor de 100%, utilizando a equação abaixo indicada, onde Abs corresponde à absorvância.

$$\% \text{ atividade metabólica} = \frac{\text{Células Tratadas (Abs 570 - Abs 620)}}{\text{Células Controlo (Abs 570 - Abs 620)}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa Origin Pro 9.0. Esta abordagem permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar os respetivos valores de IC<sub>50</sub>.

## **Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB**

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) permite avaliar a viabilidade celular através do conteúdo proteico total, ou seja, há uma relação entre a massa total de proteína e o número de células. A sulforrodamina B é um corante arroxeadado, aniónico e com afinidade para os aminoácidos. Em condições ácidas este corante liga-se aos aminoácidos das proteínas celulares e em condições alcalinas pode ser extraído (Laranjo, 2014). Para este estudo prepararam-se suspensões celulares com 250.000 células/mL que se distribuíram por placas de 24 poços e foram submetidas ao tratamento conforme descrito.

Para a realização do ensaio do SRB, descartou-se o meio de cultura, efetuou-se uma lavagem com PBS e deixou-se secar. Adicionaram-se 200 µL de ácido acético a 1% em metanol

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

e incubou-se durante 1 hora à temperatura de 4 °C. Após este período retirou-se o metanol e deixou-se secar à temperatura ambiente. Adicionaram-se de seguida 200 µL de uma solução de 0,4 % de sulforrodamina B (Sigma S9012) em ácido acético a 1 % e incubou-se durante 1,5 horas ao abrigo da luz. Após este período de tempo, lavou-se a placa de modo a remover o excesso de SRB e, após secagem adicionaram-se 200 µL de TRIS-NaOH (pH=10). A leitura da absorvância foi feita com o comprimento de onda de 540 nm, com um filtro de referência de 690 nm, num espectrofotómetro Biotek® Synergy HT.

Os resultados foram expressos em percentagem do conteúdo proteico das células submetidas ao tratamento de quimioterapia, tratamento fotodinâmico e à combinação das terapias em relação às culturas celulares controlo (Laranjo, 2014).

### Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica muito utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas num meio líquido em fluxo e que permite a análise de vários parâmetros simultaneamente. Através de um citómetro de fluxo é possível analisar as características físicas e/ou químicas de uma simples célula. Este aparelho é um sistema constituído por 5 elementos: uma fonte de luz, (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros óticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico, a partir duma gama espectral mais vasta, fotodíodos ou fotomultiplicadores para a deteção e possibilidade de processamento dos sinais com interesse numa unidade que processa os dados recolhidos (Encarnação, 2014; Laranjo, 2014)

O princípio da técnica consiste num feixe de luz de um único comprimento de onda que é direcionado para um meio líquido em fluxo. Vários detetores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz; um na linha do feixe de luz (*forward scatter* ou FSC) e vários feixes perpendiculares (*side scatter* ou SSC). Cada partícula suspensa que atravessa o feixe dispersa a luz de uma forma, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou ligados à mesma podem ser excitados emitindo luz de menor frequência do que a da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detetores e a partir da análise de flutuações de brilho de cada detetor (uma para cada pico de emissão fluorescente) é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula. O FSC correlaciona-se com o volume celular e o SSC depende da

complexidade interna da partícula (por exemplo, forma do núcleo, a quantidade e o tipo dos organelos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana).

A detecção por citometria de fluxo foi efetuada utilizando um citómetro FACSCalibur. Para todas as marcações foram necessárias aproximadamente  $1 \times 10^6$  células. O número de eventos foi obtido através do programa CellQuest™. Para a análise e a quantificação da informação utilizou-se um software específico que corre em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

### **Avaliação dos tipos de morte celular**

A perda de função de transporte ou da integridade estrutural da membrana plasmática é um dos fatores de distinção entre células vivas e células mortas. Diversos ensaios de viabilidade celular usam diferentes fluorocromos catiónicos, como o iodeto de propídeo (IP), de modo a analisar a função de transporte da membrana plasmática. O teste de exclusão de IP é usado frequentemente em citometria de fluxo. Após uma incubação com o IP é possível distinguir células vivas de células mortas (Bedner et al., 1999). As células em apoptose inicial incorporam o corante lentamente e fluorescem com baixa intensidade enquanto as células em apoptose tardia e as em necrose incorporam o corante rapidamente e fluorescem com forte intensidade. Em células vivas os fosfolípidos da membrana plasmática distribuem-se assimetricamente entre os folhetos da membrana. No início da apoptose ocorre um colapso nesta assimetria e a fosfatidilserina, que numa situação normal se encontra no folheto interno da membrana, sofre uma translocação para o folheto externo. A proteína anticoagulante anexina V (AnV) liga-se com alta afinidade a fosfolípidos aniónicos (como a fosfatidilserina) e conjugada com um fluorocromo (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) é usada como marcador de células em apoptose em citometria de fluxo. Pela coloração de células através da combinação de AnV-FITC e IP torna-se possível a identificação de células vivas, células em apoptose inicial e células em apoptose tardia ou em necrose e células em necrose. Se estivermos perante uma marcação negativa para ambas as sondas as células identificadas correspondem a células vivas. Caso a marcação com a sonda AnV-FITC for positiva e a do IP negativa as células estão em apoptose inicial. Já se a marcação for positiva para ambas as sondas estamos perante células em apoptose tardia ou em necrose e neste caso têm comprometida

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

a integridade da membrana plasmática e finalmente, em necrose se apresentarem uma marcação negativa para AnV-FITC e positiva para o IP (Bedner et al., 1999).

As culturas celulares foram centrifugadas e o sedimento incubado com 100 µL de tampão de ligação (0,01 M de HEPES [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl<sub>2</sub> [Sigma, C4901]), 2,5 µL de AnV-APC (Immunostep ANXVFKIT Immunotech) e 1 µL de IP (KIT Immunotech), durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 400 µL de PBS e analisou-se no citómetro com o comprimento de onda de excitação de 494 nm e o de emissão de 519 nm. Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose.

### **Avaliação do potencial de membrana mitocondrial**

Vários tipos de fluorocromos catiónicos lipofílicos de membrana permeável podem servir como sondas de potencial de membrana em citometria de fluxo. Quando as células são incubadas na sua presença, estas sondas acumulam-se na mitocôndria e a extensão da sua penetração é medida pela intensidade da fluorescência celular, refletindo assim o potencial de membrana mitocondrial (Bedner et al., 1999).

A sonda que permite avaliar o potencial de membrana mitocondrial, utilizada neste trabalho, foi o composto fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,18,3,3-tetraetilbenzimidazolcarbocianino de iodo). A ligação desta sonda à mitocôndria é detetada pela mudança de cor de fluorescência verde (que é característica da sua forma monomérica) para laranja que reflete a sua agregação na mitocôndria, conduzido pelo potencial transmembranar. A fluorescência verde é detetada por citometria de fluxo a 585 nm diminuindo para 530 nm aquando da mudança de fluorescência para laranja. A diminuição do potencial de membrana é um dos primeiros sinais de apoptose (Bedner et al., 1999; Bortner e Cidlowski, 1999).

Para a realização deste estudo utilizaram-se frascos de 75 cm<sup>2</sup>, contendo 10<sup>6</sup> células cada um, submetidos ao tratamento conforme descrito. Procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5 min. De seguida o sedimento obtido foi suspenso em 1 mL de PBS, com adição



de 1  $\mu\text{L}$  de JC-1 (Sigma T4069), preparado em DMSO na concentração de 5 mg/mL, para a obtenção de uma concentração final 5 $\mu\text{g/mL}$ . As suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos a 37°C e ao abrigo da luz. De seguida, centrifugaram-se as suspensões celulares com 2 mL de PBS a 2500 rpm durante 5 min, com a posterior suspensão em 400  $\mu\text{L}$  de PBS. A deteção foi efetuada no citómetro com o comprimento de onda de excitação de 488 nm. Os resultados obtidos correspondem à média de intensidade de fluorescência para os agregados e para os monómeros, tendo-se calculado posteriormente a razão monómeros/agregados para cada condição experimental.

### **Avaliação do ciclo celular**

O ciclo celular consiste na sequência de eventos pelos quais uma célula duplica o seu material genético e se divide em duas células-filhas idênticas entre si. Este ciclo divide-se em quatro fases principais. A fase S, na qual o material genético é replicado e, posteriormente, na fase M (mitose), os cromossomas duplicados são distribuídos equitativamente pelas células-filhas. Entre estas duas fases, existem outras duas, denominadas G1 e G2 (*gap-1* e *gap-2*), sendo que a fase G1 precede a fase S e a fase G2 precede a mitose (Encarnação, 2014; Laranjo, 2014).

De forma a avaliar o ciclo celular usou-se um método que utiliza uma solução de iodeto de propídeo (IP) e RNase. Como referido anteriormente o IP é um composto com a capacidade de se intercalar no DNA e no RNA pelo que, só é possível conseguir uma especificidade para a marcação do DNA através da remoção do RNA pelo uso de RNase. As análises de ciclo celular por citometria de fluxo são representadas em histogramas de intensidade de fluorescência.

Para este ensaio as células foram centrifugadas (1300 xG, durante 5 minutos) e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% com o tubo em agitação no vórtex e incubaram-se durante 30 minutos no escuro, a 4°C. Lavaram-se as células com 2 mL de PBS, depois foram centrifugadas (1300 xG, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi decantado. De seguida adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de solução IP/RNase (Immunostep, PI/RNase) e incubaram-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

### **Avaliação da produção intracelular de peróxidos**

A oxidação de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>) para o composto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) constitui um indicador relativamente específico da formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando a citometria de fluxo. A forma diacetato de DCFH (DCFH<sub>2</sub>-DA) é incorporada pelas células, onde o DCFH-DA é metabolizado por esterases intracelulares com formação de DCFH, que permanecem intracelularmente. Na presença de peróxido de hidrogénio, o DCFH é oxidado em DCF, emitindo fluorescência com o comprimento de onda de 522 nm após excitação com um comprimento de onda de 490 nm (Bedner et al., 1999; Salvioli et al., 1997). A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio (Laranjo, 2014).

As suspensões celulares foram lavadas com PBS e centrifugadas. O sedimento foi suspenso em 1 mL de PBS e incubado durante 45 minutos no escuro a 37°C com 5 µM de DCFH<sub>2</sub>-DA (Molecular probes, Invitrogen). A suspensão foi lavada com PBS, centrifugada a 200 xG durante 5 minutos e suspensa em tampão. Posteriormente, foi feita a deteção por citometria de fluxo utilizado o comprimento de onda de excitação de 494 nm e o de emissão 519 nm.

Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação às culturas celulares controlo, às quais se atribuiu o valor 1 (Laranjo, 2014).

### **Avaliação do glutatião reduzido**

De forma a avaliar a expressão intracelular de glutatião reduzido (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, foi utilizada a citometria de fluxo, com recurso a um composto fluorescente, o alaranjado de mercúrio. Este composto reage rapidamente com o GSH, dando origem a um produto de reação que emite uma intensa fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon no comprimento de onda de 488 nm (Laranjo, 2014). Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas às condições acima referidas.

Para este procedimento, as células foram centrifugadas a 200 xG durante 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. Suspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS e foram adicionados 4 µL de alaranjado de mercúrio na concentração de 10 mM (Sigma M7750).

Homogeneizou-se a suspensão e incubou-se durante 15 minutos, no escuro, a 37°C, após o que suspensão foi lavada com PBS e centrifugada a 200 xG durante 5 minutos, e suspensa em tampão. A detecção foi feita com o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação a culturas celulares controlo às quais se atribuiu o valor 1.

### **Avaliação do anião superóxido**

A avaliação da produção intracelular de radical superóxido foi realizada com recurso à sonda DHE, sendo que este composto é lipofílico, pelo que tem a capacidade de atravessar facilmente a membrana celular para o espaço intracelular, onde ocorre a sua conversão a etídeo pelo radical superóxido. O etídeo é um composto fluorescente de cor vermelha, que possui a capacidade de se intercalar no DNA, ficando retido no interior da célula. Sabe-se que esta reação não é totalmente específica, havendo uma oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou pelo ácido hipocloroso (Dikalov, Griendling e Harrison, 2007).

Para a realização deste estudo utilizaram-se as condições acima descritas. Após os tratamentos procedeu-se à remoção dos meios de cultura dos frascos e tripsinizou-se o seu conteúdo celular, que foi submetido a centrifugação a 2500 rpm durante 5min. De seguida o sedimento obtido foi suspenso num mL de PBS com adição de 5µL de DHE (Sigma Aldrich, D7008), de modo a obter uma concentração final de 5µM. Incubou-se durante 15 minutos a 37°C. Após este passo, centrifugaram-se as suspensões celulares com 2 mL de PBS a 2500 rpm durante 5 min, com a posterior suspensão em 400 µL de PBS. A detecção foi feita no citómetro utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados foram obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram apresentados em relação às culturas celulares controlo, às quais se atribuiu o valor 1.

### **Microscopia ótica e morfologia celular**

A técnica de May-Grünwald-Giemsa é muito usada para avaliar o tipo de morte celular induzida pelos fármacos através da análise das características morfológicas das células, por

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

microscopia ótica e a realização de esfregaços de células e coloração dos mesmos com o corante May-Grünwald-Giemsa (Mendes, 2016).

Assim, os esfregaços foram preparados a partir da recolha de células submetidas aos tratamentos referidos anteriormente. Desta forma, foram recolhidas 50 000 células que foram sujeitas a centrifugação durante 5 minutos a 300 xG e posteriormente lavadas com PBS, por centrifugação similar à anterior. As células então obtidas foram suspensas num pequeno volume de FBS, de forma a melhorar a sua adesão à lâmina, para a realização dos esfregaços. Os esfregaços realizados foram posteriormente corados durante 5 minutos com solução de May-Grünwald (preparada em 0,3% de metanol e diluída de 1:1 com água destilada, na altura da sua utilização), adicionando-se de seguida solução de Giemsa (1 gr de corante Giemsa, 66 mL de glicerol e 66 mL de metanol, diluída numa razão de 1 para 8 com água destilada na altura da utilização) por um período de 15 minutos (Mendes, 2016).

Por fim, os esfregaços foram lavados com água destilada e secos ao ar, tendo a morfologia celular sido, posteriormente, analisada por microscopia ótica. Para o efeito, utilizou-se o microscópio ótico Axioskop2 (ZEISS), com câmara digital acoplada, tendo-se registado e processado as imagens recorrendo ao programa AxioVision LE (Mendes, 2016).

### **Avaliação da atividade da superóxido dismutase**

A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável pela catalização da dismutação do  $O^{2\cdot-}$  que dá origem a  $H_2O_2$  e a  $O_2$ , que é um dos mecanismos antioxidantes mais importantes. Para avaliação da atividade desta enzima foi utilizado o SOD Assay Kit-WST (Sigma, I9160, Switzerland).

Para a realização destes estudos, após 72 horas de incubação, foi descartado o meio de cultura e foram feitas 3 lavagens com PBS. Em seguida, adicionou-se uma solução de extração de proteínas RIPA, (*radio-immunoprecipitation assay*) e, com a ajuda de um raspador, soltaram-se as células da superfície do frasco e colocou-se o conteúdo num microtubo. Após agitação no vórtex, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 35 %, centrifugadas durante 15 minutos a 14000 xG e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, devidamente identificados, que foram guardados a  $-80^\circ C$ .

Para a determinação da quantidade da proteína usou-se o método de BCA (BCATM protein assay kit, Pierce) e para a determinação da SOD utilizou-se o kit referido de acordo

com as instruções do fabricante. Os resultados foram apresentados como a razão entre a atividade da SOD e a concentração de proteína total (Almeida, 2016).

## Ensaio de Cometas

A eletroforese em microgel de agarose, também conhecida como o ensaio de cometa, é uma técnica simples e sensível para a detecção de danos no DNA a nível da célula eucariota. É reconhecida como uma técnica padrão não só para a avaliação de danos a nível do DNA, mas também para a reparação e a genotoxicidade de compostos. Consiste no isolamento de células numa suspensão de agarose e eletroforese de DNA obtendo-se, após coloração, células com aspeto de cometa, em que a cabeça corresponde à localização do núcleo e a cauda corresponde à migração de DNA, a qual é proporcional à extensão dos danos. Esta técnica foi primeiramente descrita por Östling & Johanson (Ostling e Johanson, 1984), e era realizada em condições de pH neutro o que permitia apenas verificar danos de DNA a nível de cadeias da dupla hélice. Mais tarde, uma modificação permitiu obter também a informação acerca de danos numa única cadeia da dupla hélice do DNA, nomeadamente, a realização do procedimento em condições alcalinas (Laranjo, 2014; Mendes, 2016).

Para a realização destes estudos, as culturas celulares foram submetidas ao tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador e com doxorrubicina na concentração de 86 nM, na concentração de IC<sub>10</sub> e à combinação das duas terapias respetivamente, conforme descrito no esquema. A análise foi realizada conforme descrito anteriormente no esquema de tratamento de 72 horas.

Com este propósito, revestiram-se previamente lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha) com uma camada de agarose utilizando uma solução 1 % de agarose (Sigma A2790). Preparou-se a agarose que formará uma segunda camada nas lâminas, agarose de baixo ponto de fusão (Sigma A9414) a 1 %. Esta agarose como tem um ponto de fusão mais baixo, permite adicioná-la ainda líquida às células a 37°C, uma temperatura que não as lesa. As suspensões foram centrifugadas a 500 xG durante 5 minutos, lavadas com PBS e diluídas de modo a obter suspensões celulares com 5x10<sup>4</sup> células/mL. Num microtubo homogeneizaram-se cuidadosamente as suspensões celulares com a solução de agarose e colocaram-se 500 µL sobre as lâminas já revestidas. Após a solidificação da segunda camada de agarose, colocaram-se as lâminas em solução de lise constituída por NaCl na concentração de 2,5 M, EDTA na

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

concentração de 100 mM, Trizma Base na concentração de 10 mM, 1 % de Triton X-100 e 10 % de DMSO, durante a noite, à temperatura de 4 °C, para promover a destruição da membrana citoplasmática.

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

Por último, a análise e a aquisição de imagens foram efetuadas num microscópio de fluorescência Motic AE31 (Motic®, Wetzlar, Alemanha), equipado com um filtro de excitação de 546 nm e com uma lâmpada de mercúrio de 100 W. A aquisição de imagem foi realizada no *software* Motic Images (Mendes, 2016).

## ESTUDOS *IN VIVO*

Os estudos *in vivo* são fundamentais na avaliação dos mecanismos moleculares do cancro, uma vez que são efetuados utilizando condições controladas. Com estes estudos pretendeu-se avaliar o potencial da combinação da PDT com a quimioterapia perante o microambiente tumoral.

Para o seu desenvolvimento foram utilizados ratinhos Balb/c nu/nu adquiridos aos Laboratórios Internacionais Charles River, Inc. (Espanha), com 3 semanas de idade. Estes são mantidos numa sala climatizada própria, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, ração padrão de laboratório para murinos nude (Mucedola 4RFN, Itália) e acesso livre a água devidamente filtrada.

O uso desta estirpe de animais imunossuprimidos, isto é, sem timo e, por isso, incapazes de produzir células T, permitiu o desenvolvimento de xenotransplantes com células de origem humana, sem que haja rejeição pelo animal.

O modelo ortotópico baseou-se num modelo animal previamente desenvolvido e implementado pelo grupo (Chohfi de Miguel *et al.*, 2014).

Todos os estudos realizados em animais foram objeto de aprovação pela comissão de ética da Faculdade de Medicina de Universidade de Coimbra. Todos os procedimentos cirúrgicos foram executados com o auxílio de uma pessoa devidamente certificada em experimentação animal, em condições estéreis em câmara de fluxo laminar, sendo o material cirúrgico utilizado devidamente esterilizado.

Para a realização deste estudo foram inoculadas  $2 \times 10^7$  células da linha celular humana de osteossarcoma (MNNG-HOS) como demonstra a Figura 11. A inoculação das células foi realizada a nível da calote craniana, entre as duas tábuas ósseas, mimetizando o microambiente do tumor de origem.

Após a administração das células os ratinhos foram monitorizados diariamente de modo a calcular o volume tumoral em  $\text{mm}^3$  de acordo com a seguinte expressão:

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

com L a corresponder ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor (Laranjo, 2014). (Figura 12)



Figura 11- Inoculação das células MNNG-HOS no ratinho balb/c nu/nu



Figura 12- Monitorização dos ratinhos com recurso a uma balança e a um paquímetro

### Tratamentos

Sendo o foco do trabalho a avaliação do potencial da combinação de doxorubicina com PDT, foram necessários quatro grupos de animais: (grupo I) controlo, não sujeitos a tratamento; (grupo II) terapia com doxorubicina; (grupo III) terapia com PS; (grupo IV) terapia combinada.

Relativamente ao tratamento com doxorubicina, que teve por base o protocolo utilizado por (Ge *et al.*, 2011) e co-autores. Assim que se atingiu o volume tumoral de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup> a doxorubicina foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) na concentração de 2 mg/kg aos ratinhos do grupo II. Segundo os autores referidos, esta é uma dose tolerada pelos animais e correspondente a uma dose não terapêutica por si só, que era o pretendido tendo em conta o contexto deste trabalho.

Os animais do grupo III, através da monitorização diária e quando se verificou que se atingiu o volume tumoral de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, foram administrados os fotossensibilizadores via intraperitoneal na concentração de 2 mg/kg. Após essa administração e decorridas 72 horas os animais deste grupo (Grupo III) foram inicialmente pesados e de seguida anestesiados com injeção intraperitoneal de 2 µL/g de uma solução contendo uma proporção de 3:1 de quetamina (50 mg/mL) (Ketalar®, Parke-Davis, Pfizer Laboratories Lda., Portugal.) e clorpromazina a 2,5% (Largatil®, Rhône-Poulenc Rorer, Laboratórios Vitória, Portugal). A quetamina é um fármaco anestésico que também promove sedação e amnésia anterógrada por ação direta no córtex e no sistema límbico, causando interferência na perceção sensorial dos estímulos dolorosos. A clorpromazina é um composto com propriedades antipsicóticas e antieméticas.

Depois de se verificar que o animal está anestesiado, procedeu-se à irradiação do mesmo utilizando um dispositivo de luz laser com potência de 0,13 watts durante 1500 segundos, perfazendo um total de 180 joules, a cerca de 2 cm do tumor como demonstra a Figura 13



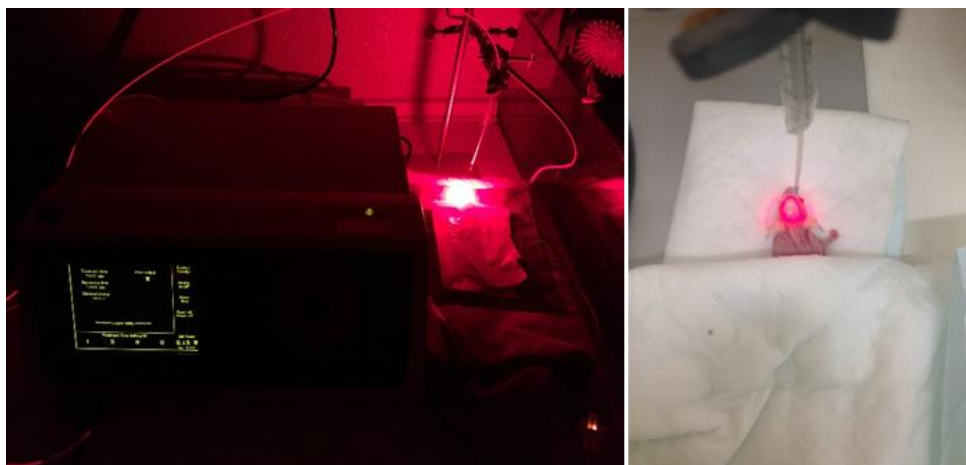


Figura 13- Tratamento dos animais com terapia fotodinâmica.

O tratamento a que os animais do grupo terapia combinada (GrupoIV) foram sujeitos foi baseado na junção dos dois protocolos. Desta forma, o BBr2HPC foi administrado e irradiado 72 horas depois como acima referido, e a doxorrubicina foi administrada nas mesmas condições do grupo II após a irradiação.

Os animais foram monitorizados e controlados todos os sinais de doença durante 12 dias.

### **Análise histopatológica**

No final dos 12 dias de tratamento os animais foram anestesiados como referido e posteriormente occidados por deslocamento cervical e os respectivos tumores excisados para análise histológica em pelo menos 1 ratinho de cada grupo. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, com posterior desidratação em concentrações crescentes de álcool, seguida de diafanização em xilol e envolvimento em parafina. Na preparação das amostras para análise fez-se microtomia aleatória e coloração das respectivas lâminas com base na técnica de hematoxilina e eosina (H&E). A observação microscópica foi realizada com recurso a um microscópio Nikon ACT-1 equipado com câmara digital Nikon DMXM120F e a computador dedicado com o *software* Nikon eclipse 80i.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Os resultados dos estudos *in vitro* são apresentados na forma da média e o desvio padrão e nos estudos *in vivo*, na forma da média e o erro padrão. A comparação da atividade metabólica e conteúdo proteico das culturas celulares submetidas a tratamento foi realizada com o teste t-student para uma amostra, tendo sido comparado o valor amostral de cada grupo com o valor de normalização 100%.

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

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

Na análise inferencial dos estudos *in vivo* foi utilizada a estimativa de Kaplan-Meier, para avaliar o tempo necessário para ser atingido o volume tumoral relativo de 2,5 (Heitjan, Manni e Santen, 1993). A comparação entre os grupos foi realizada segundo o teste log-rank, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas, sendo considerada uma significância de 5%.

# **RESULTADOS<sup>1</sup>**



## RESULTADOS<sup>1</sup>

O objetivo principal deste trabalho foi a avaliação do efeito da quimioterapia associada à terapia fotodinâmica como uma nova estratégia terapêutica para o osteossarcoma. Assim numa primeira fase, *in vitro*, pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico da quimioterapia nas células tumorais e, posteriormente o efeito da quimioterapia associada à PDT a nível da atividade metabólica, da viabilidade celular, do ciclo celular, da morte celular, da produção intracelular de peróxidos, do potencial de membrana mitocondrial, do stresse oxidativo e das defesas antioxidantes, dos danos no DNA e da citomorfologia, recorrendo-se para tal a diferentes técnicas de biologia celular e molecular. Já numa fase posterior do trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da combinação terapêutica no crescimento tumoral *in vivo*, com recurso a um modelo animal ortotópico. Para obter estes resultados foram utilizadas as metodologias descritas no capítulo anterior.

## ESTUDOS IN VITRO

### **Atividade metabólica em resposta à doxorrubicina, ao metotrexato e à cisplatina**

A partir das curvas de dose-resposta à doxorrubicina, ao metotrexato e à cisplatina foi possível calcular a concentração correspondente ao  $IC_{50}$ , ao  $IC_{10}$  e os respetivos intervalos de confiança, que estão representados na Tabela 2.

Na Figura 14 verifica-se que os 3 fármacos induzem a inibição da atividade metabólica nas células da linha celular tumoral MNNG-HOS, após os diferentes períodos de incubação estudados, 24, 48 e 72 horas. De um modo geral é possível verificar que a inibição da atividade

---

<sup>1</sup> Parte dos resultados apresentados ao longo deste trabalho foram obtidos em co-autoria com o Mestre Guilherme Chohfi de Miguel e com a Licenciada Beatriz Serambeque

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

metabólica nos três fármacos é dependente da concentração de fármaco e do tempo de incubação, diminuindo com o aumento dos dois parâmetros.

Tabela 2 - Valores de IC<sub>50</sub> e de IC<sub>10</sub> obtidos para a incubação das células da linha celular com doxorubicina, metotrexato e cisplatina durante 24, 48 e 72 horas, e os respectivos valores de intervalo de confiança a 95% [(\*) concentração >500nM]

Fármaco	Tempo de incubação(h)	IC <sub>50</sub> (nM)	Intervalo de confiança (95%) IC <sub>50</sub>	IC <sub>10</sub> (nM)	Intervalo de confiança (95%) IC <sub>10</sub>
Doxorrubicina	24	4089,4	[2345,0; 7131,6]	246,3	[67,4;971,4]
	48	350,2	[263,2; 465,8]	14,1	[10,2; 26,4]
	72	326,4	[168,9; 630,9]	31,9	[14,7; 86,4]
Metotrexato	24	*	*	*	*
	48	*	*	*	*
	72	74,1	*	31,6	[3,1;95,5]
Cisplatina	24	32935,9	[11050,1;39227,44]	6670,9	[3877,8; 12108,2]
	48	10025,6	[7359,9;12679,4]	2128,4	[1361,9;3703,1]
	72	6346,3	[4535,9;8258,9]	1900,3	[1288,6;3269,7]

Após 24 horas de incubação obteve-se, para a doxorubicina, um valor de IC<sub>50</sub> de 4,09 µM, após 48 horas de incubação, um valor de 0,35 µM e após 72 horas de incubação um valor de 0,33 µM. Verificou-se que o IC<sub>50</sub> obtido após 24 horas de incubação com a doxorubicina foi significativamente superior ao obtido após 48 horas (p<0,001) e ao obtido após 72 horas (p<0,05). Com este estudo determinaram-se também os valores de IC<sub>10</sub> do fármaco que apresentou um valor de 246,3 nM para o tempo de 24 horas, de 14,13 nM para o tempo de 48 horas e de 31,9 nM para o tempo de 72 horas, não se verificando diferenças significativas entre as 48 e as 72 horas porque os intervalos de confiança são sobreponíveis.

Quando as células foram tratadas com metotrexato durante 24 e 48 horas de incubação não foi possível determinar os valores de IC<sub>50</sub>, tendo sido testado o valor máximo possível de concentração, que foi de 500 µM. No entanto, para esta concentração obteve-se uma atividade metabólica de 68,82±84% após 24 horas de incubação e de 41,58±6,09% após 48 horas de incubação. No caso da incubação com metotrexato durante 72 horas obteve-se e um valor de IC<sub>50</sub> de 74,1 nM e um valor de IC<sub>10</sub> de 31,6 nM.

Considerando a cisplatina houve uma também uma diminuição da viabilidade tendo-se obtido um valor de  $IC_{50}$  de 329,36  $\mu$ M e um valor de  $IC_{10}$  de 6,68  $\mu$ M após 24 horas de incubação. Para as 48 horas de incubação registaram-se os valores de  $IC_{50}$  de 10,03  $\mu$ M e valores de  $IC_{10}$  de 2,18  $\mu$ M. Após 72 horas de incubação obtiveram-se os valores de 6,35  $\mu$ M para o  $IC_{50}$  e de 1,90  $\mu$ M para o  $IC_{10}$ .

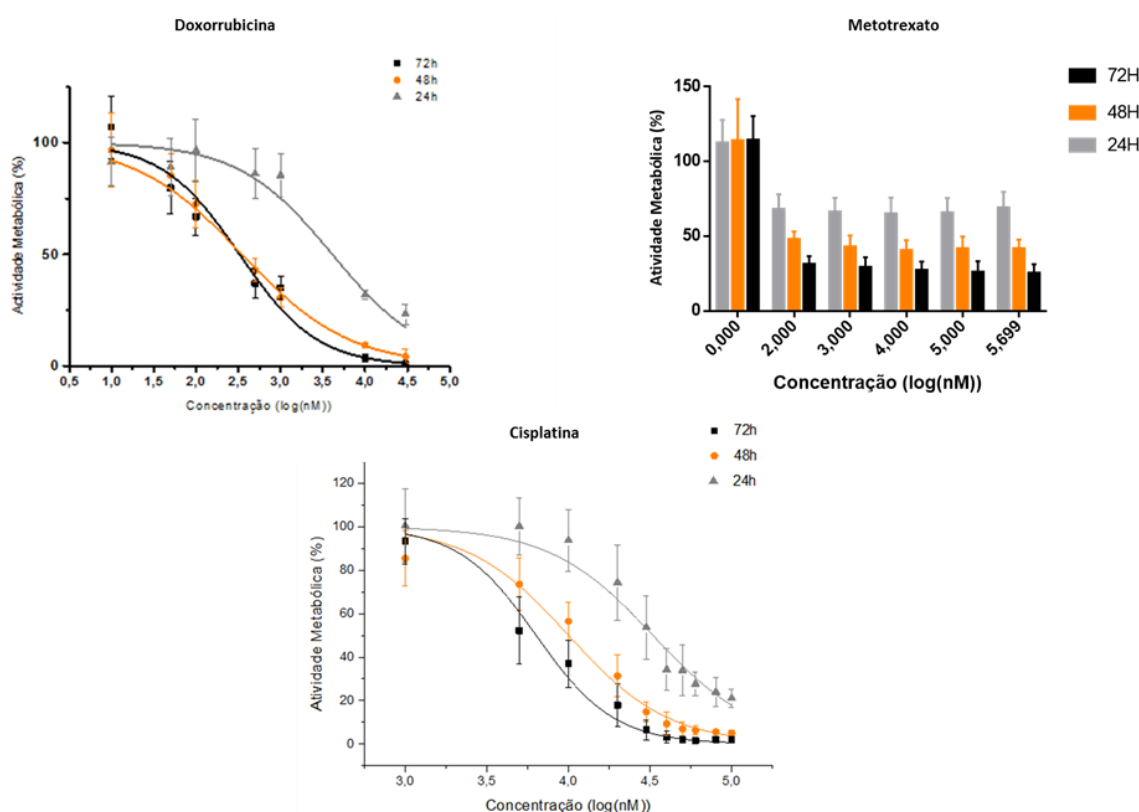


Figura 14 - Curvas de dose-resposta para as células da linha celular humana de osteossarcoma (MNNG-HOS) 24, 48 e 72 horas após o tratamento com doxorubicina e cisplatina e gráfico da atividade metabólica às 24, 48 e 72 horas após o tratamento com metotrexato. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos seis ensaios.

Como se pode apreciar na Tabela 2 observando os valores de  $IC_{50}$  constata-se que, na globalidade, quanto maior o tempo de incubação, menores os valores de  $IC_{50}$ . Comparando os três fármacos pode-se constatar que se obtiveram-se valores de  $IC_{50}$  mais baixos na doxorubicina que na cisplatina tanto às 24 horas como às 48 horas. Nas 72 horas de incubação o fármaco mais citotóxico foi o metotrexato, seguido da doxorubicina e da cisplatina.

### **Atividade metabólica em resposta à terapia combinada**

Uma vez efetuada a avaliação do efeito citotóxico da doxorubicina, do metotrexato e da cisplatina em monoterapia, foi analisado o efeito da sua combinação com a terapia fotodinâmica. Nos estudos apresentados subsequentemente as concentrações de doxorubicina, metotrexato e cisplatina utilizadas corresponderam  $IC_{10}$  conforme descrito na Tabela 2.

Foi necessário ter em conta o estudo anterior realizado pela equipa, na Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade Coimbra, em que se caracterizou o efeito fototóxico do fotossensibilizador BBr2HPP na linha celular humana de osteossarcoma MNNG-HOS. A Figura 41, apresentada no anexo I, representa a curva de dose-resposta, a partir da qual se calculou o valor de  $IC_{50}$  deste fotossensibilizador que foi de 86 nM (Chohfi de Miguel *et al.*, 2014).

Na Figura 15 podemos observar que, para os tempos de incubação de 24 e de 72 horas, a atividade metabólica das células tratadas apenas com doxorubicina corresponde a  $85,25 \pm 13,30\%$  e a  $83,88 \pm 8,91\%$ , respetivamente, valor que para o tempo de incubação mais longo foi significativamente inferior ao das culturas celulares controlo ( $p=0,003$ ). No caso do estudo de combinação das 24 horas também se verificou diminuição da atividade metabólica em relação às culturas celulares controlo, para a concentração de fotossensibilizador de 42 nM, concentração com que se obteve um valor de  $57,55 \pm 7,56\%$  ( $p<0,001$ ). Para a concentração de fotossensibilizador de 86 nM obteve-se um valor de atividade metabólica de  $47,40 \pm 6,59\%$  ( $p<0,001$ ) e para a concentração de 170 nM um valor de  $37,96 \pm 12,75\%$  ( $p<0,001$ ).

No caso do estudo de combinação das 72 horas igualmente se verificou a diminuição da atividade metabólica em relação às culturas controlo, para a concentração de fotossensibilizador de 42 nM, com que se obteve um valor de  $45,79 \pm 7,20\%$  ( $p<0,001$ ), enquanto para a concentração de 86 nM se obteve um valor de  $16,48 \pm 5,35\%$  ( $p=0,001$ ), e para a concentração de 170 nM um valor de  $5,08 \pm 1,74\%$  ( $p=0,001$ ). Assim, verificou-se que, para ambos os tempos de incubação com doxorubicina e com o fotossensibilizador, a atividade metabólica decresce com o aumento da concentração de fotossensibilizador.



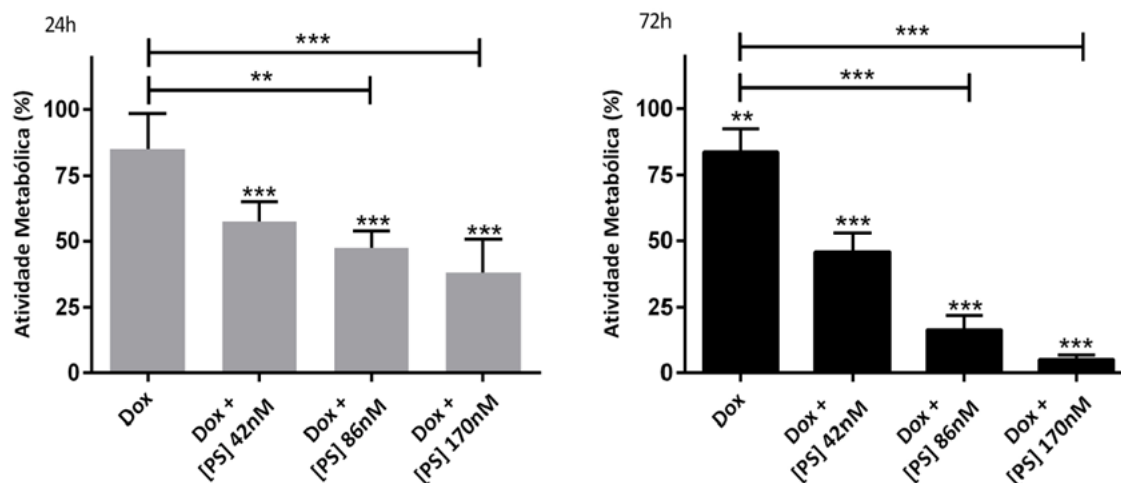


Figura 15 - Avaliação da atividade metabólica das células da linha celular de osteossarcoma humano MNGG-HOS submetidas ao tratamento com doxorubicina ( $IC_{10}$ ) e com a combinação da doxorubicina ( $IC_{10}$ ) com a terapia fotodinâmica. O gráfico da esquerda representa o estudo de combinação às 24 horas e o gráfico da direita representa o estudo de combinação às 72 horas. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos sete ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Também se compararam as atividades metabólicas das células submetidas ao tratamento combinado com as células tratadas apenas com doxorubicina. Para o estudo de combinação das 24 horas verificou-se que as células tratadas com a combinação apresentaram uma atividade metabólica significativamente inferior, quer para a concentração de fotossensibilizador de 86 nM ( $p = 0,003$ ) quer para a concentração de 170 nM ( $p < 0,001$ ). Para o estudo de combinação das 72 horas verificou-se que as células tratadas com a combinação apresentaram uma atividade metabólica significativamente inferior quer para a concentração de fotossensibilizador de 86 nM ( $p < 0,001$ ) quer para a concentração de 170 nM ( $p < 0,001$ ).

A terapia de combinação também foi comparada com o tratamento fotodinâmico isolado, considerando a curva-dose resposta representada na Figura 41 do anexo I. Para o estudo de combinação das 24 horas e a concentração de fotossensibilizador de 170 nM verificou-se que a atividade metabólica das células sujeitas ao tratamento combinado foi significativamente inferior ( $p = 0,044$ ). Para o estudo de combinação das 72 horas e a concentração de fotossensibilizador de 42 nM verificou-se que a atividade metabólica das células sujeitas ao tratamento combinado foi significativamente inferior ( $p = 0,006$ ).

Na Figura 16 podemos observar que a atividade metabólica das células tratadas com metotrexato durante 72 horas corresponde a  $98,6 \pm 6,55\%$ . No caso do estudo de combinação

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

com a concentração mais baixa de fotossensibilizador, 42 nM, observou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica em relação às culturas celulares controle, para um valor de  $81,41 \pm 11,94\%$  ( $p=0,008$ ). Para o estudo de combinação com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM observou-se também uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle, obtendo-se um valor de  $56,42 \pm 16,29\%$  ( $p<0,001$ ). No que respeita à concentração de 170 nM, a mais elevada, observou-se uma situação semelhante, com um valor de  $21,26 \pm 14,59\%$  ( $p<0,001$ ).

A atividade metabólica das células sujeitas ao estudo de combinação foi significativamente inferior ( $p=0,008$ ) à das células tratadas apenas com metotrexato, com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM. O mesmo se verificou para a concentração de fotossensibilizador de 170 nM ( $p<0,001$ ). No entanto, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na comparação desta combinação terapêutica com o tratamento fotodinâmico por si só.

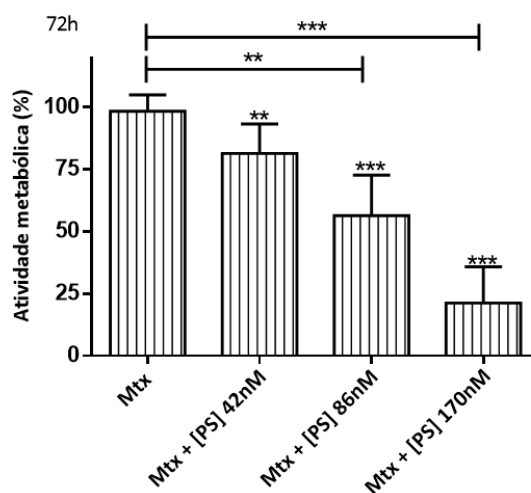


Figura 16 - Avaliação da atividade metabólica das células da linha celular de osteossarcoma humana MNNG-HOS submetida ao tratamento com metotrexato ( $IC_{10}$ ) e com a combinação do metotrexato ( $IC_{10}$ ) com a terapia fotodinâmica. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle estão representadas com \* para  $p<0,05$ , \*\* para  $p<0,01$  e \*\*\* para  $p<0,001$ .

No estudo de combinação com a cisplatina, de um modo geral, verificou-se um decréscimo significativo da atividade metabólica das células submetidas à terapia de combinação mesmo com a concentração mais baixa de fotossensibilizador. Para o estudo de combinação das 24 horas verificou-se uma atividade metabólica significativamente inferior quer

para a concentração de fotossensibilizador de 86 nM ( $p < 0,001$ ), como para a concentração de 170 nM ( $p < 0,001$ ), relativamente às culturas celulares controlo.

Para o estudo de combinação das 72 horas verificou-se uma atividade metabólica significativamente inferior tanto com a concentração de fotossensibilizador de 42 nM ( $p = 0,040$ ), como a de 86 nM ( $p < 0,001$ ) e de 170 nM ( $p < 0,001$ ), relativamente às culturas celulares controlo, como representado na Figura 17.

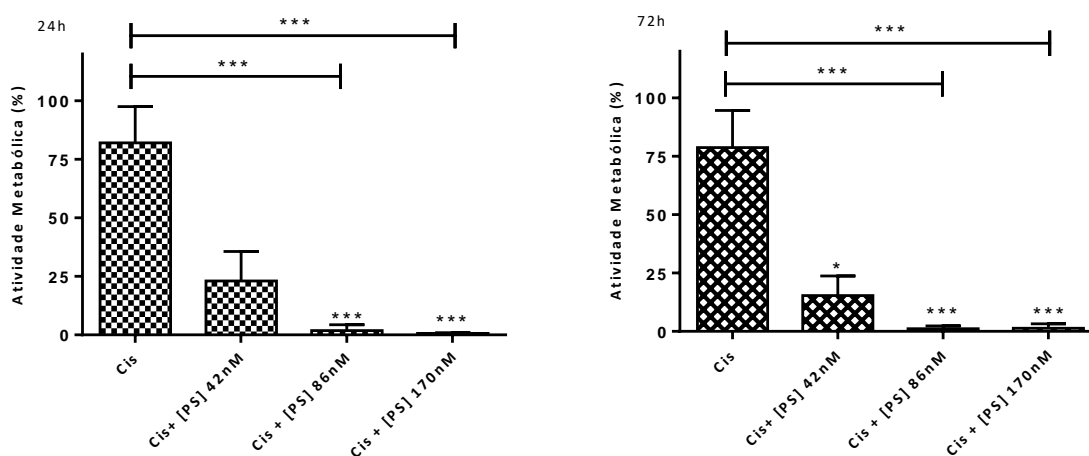


Figura 17- Avaliação da atividade metabólica s células da linha celular humana de osteossarcoma MNNG-HOS submetida ao tratamento com cisplatina ( $IC_{10}$ ) e com a combinação da cisplatina ( $IC_{10}$ ) com a terapia fotodinâmica. O gráfico da esquerda representa o estudo de combinação das 24 horas e o gráfico da direita representa o estudo de combinação das 72 horas. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos sete ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Em relação à comparação da terapia de combinação com a cisplatina *per se* para as 24 horas observaram-se diferenças significativas na combinação de cisplatina e de 86 nM de fotossensibilizador e na combinação de cisplatina com 170 nM de fotossensibilizador. No estudo às 72 horas também se observaram diferenças estatisticamente significativas na combinação com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM ( $p < 0,001$ ) e de 170 nM ( $p < 0,001$ ).

A terapia de combinação também foi comparada com o tratamento fotodinâmico por si, considerando a curva-dose resposta representada na Figura 4I do anexo I. Para o estudo de combinação das 24 horas verificou-se que a atividade metabólica das células sujeitas ao tratamento combinado foi significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) à das células sujeitas à

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

terapêutica fotodinâmica por si só com a concentração de fotossensibilizador de 42 nM. Para a concentração de fotossensibilizador de 86 nM também se observou uma relação semelhante ( $p=0,001$ ). Para o estudo de combinação das 72 horas, verificou-se que a atividade metabólica das células sujeitas ao tratamento combinado foi significativamente inferior à das células tratadas com a terapia fotodinâmica com a concentração de 42 nM ( $p<0,001$ ) e com a concentração de 86 nM ( $p=0,001$ ) de fotossensibilizador.

De forma a avaliar o efeito citotóxico da terapia combinada em células de uma linha normal, foi testado o efeito da combinação numa linha de fibroblastos humanos (HFF1) utilizando as mesmas condições de estudo das células da linha tumoral de osteossarcoma humano, no entanto sem irradiação do fotossensibilizador, cujos resultados podemos observar na Figura 18.

De um modo geral não houve diferenças significativas relativamente ao controlo nas condições em estudo, nem nas culturas celulares submetidas ao fotossensibilizador, por si só, nem à associação do fotossensibilizador com a quimioterapia. No caso da associação terapêutica com doxorrubicina não houve efeito citotóxico significativo, sendo a atividade metabólica sempre superior a 64% no estudo de combinação das 72 horas e sempre superior a 100% no estudo de combinação das 24 horas. No caso da associação terapêutica com o metotrexato às 72 horas verificou-se que também não houve efeito citotóxico, com atividade metabólica sempre superior a 70% e sem diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo. Relativamente à cisplatina também não houveram diferenças significativas relativamente ao controlo nem entre condições, sendo a atividade metabólica sempre superior a 100%.

A avaliação da combinação teve por base o método desenvolvido por Chou e colaboradores (Chou, 2010) e os resultados estão apresentados na Tabela 3. No caso da doxorrubicina obteve-se um índice de combinação de 0,985 no estudo das 24 horas, o que revela a existência de um efeito aditivo, e um valor de 0,541 para o estudo de combinação de 72 horas, o que sugere a existência de um efeito sinérgico. Para o metotrexato foi possível avaliar o estudo de combinação das 72 horas para o qual se obteve um índice de combinação de 1,406, o que revela a existência de um efeito antagónico. Na análise da combinação com a cisplatina, obteve-se um índice de 0,391 para o estudo de combinação das 24 horas e de 0,3691 para o estudo de combinação das 72 horas, o que sugere a existência de um efeito sinérgico para ambos os procedimentos.

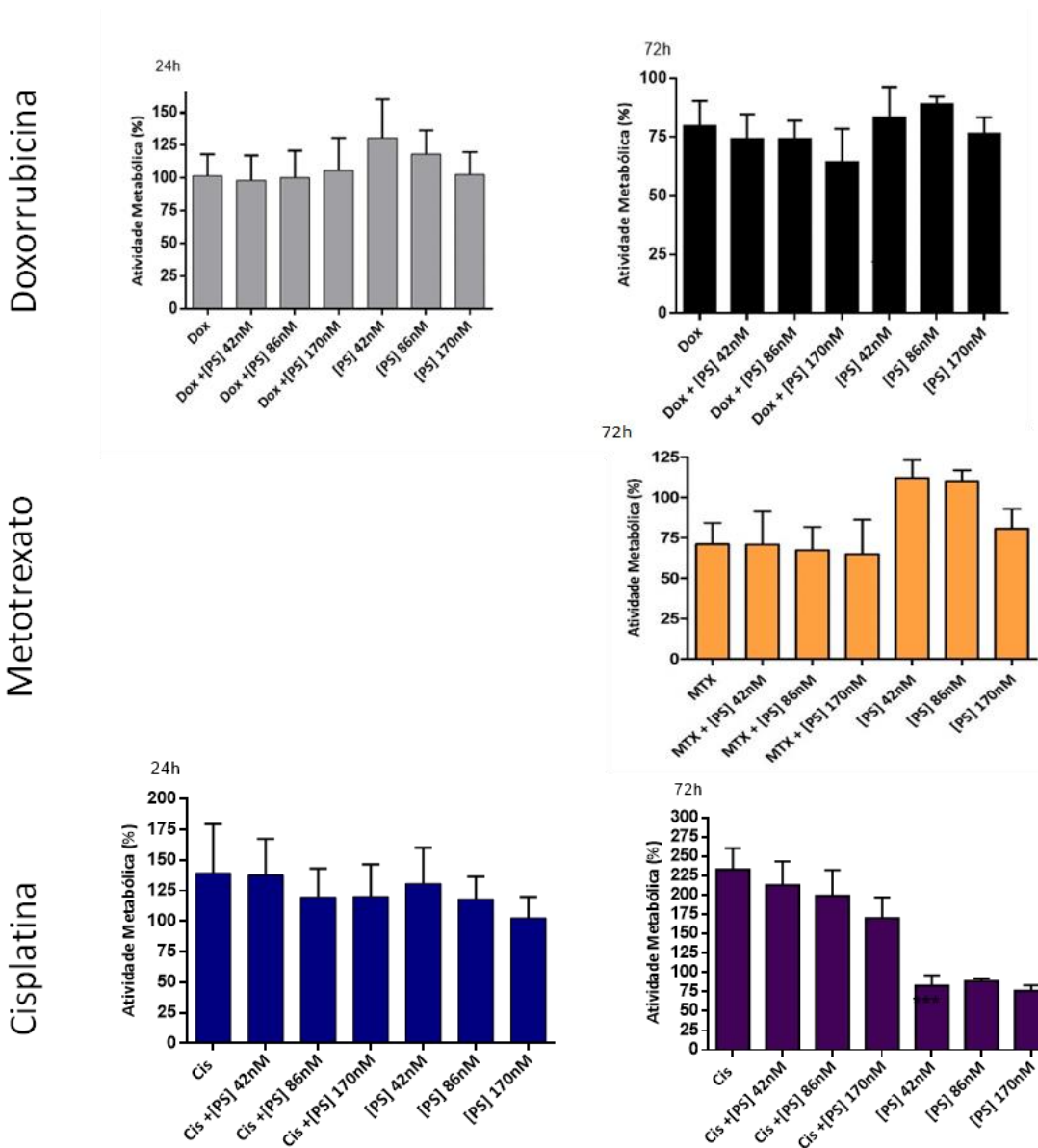


Figura 18 - Avaliação da atividade metabólica das células da linha celular de fibroblastos humanos HFF1 após 24 e 72 horas de incubação com doxorubicina, metotrexato e cisplatina e após incubação com doxorubicina, metotrexato e cisplatina em associação com o fotossensibilizador BBr2HPP. Os resultados apresentados correspondem á média e desvio padrão de pelo menos sete ensaios.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Tabela 3 - Valores do índice de combinação obtidos após incubação das células da linha celular de osteossarcoma após 24 e 72 horas. Os valores do índice de combinação representados a negrito demonstram as combinações dos compostos em que se obteve sinergia.

Fármaco	Tempo de incubação (h)	Índice de Combinação
Doxorrubicina	24	0,985
	72	<b>0,541</b>
Metotrexato	72	0,985
Cisplatina	24	<b>0,391</b>
	72	<b>0,369</b>

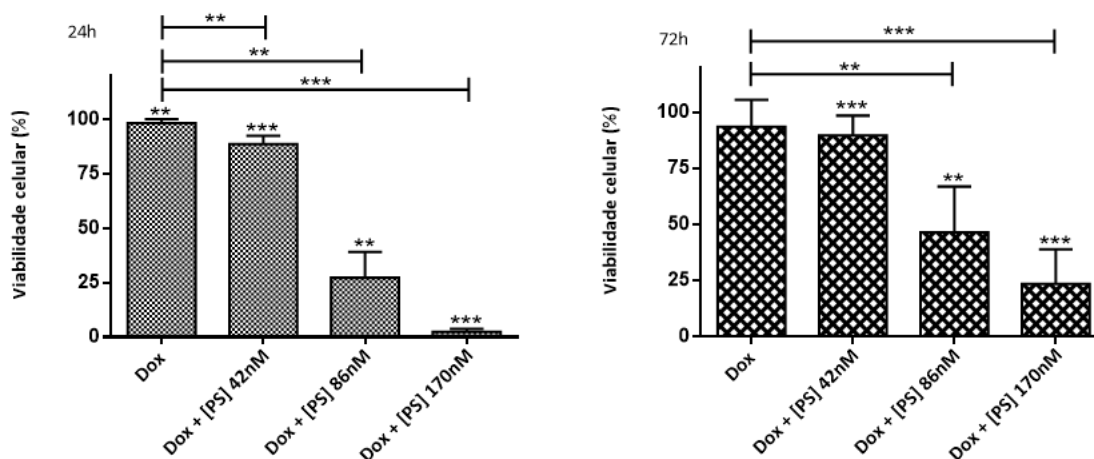
### Avaliação da viabilidade celular

Os resultados dos estudos da viabilidade celular são apresentados nas Figuras 19, 20 e 21.

As culturas celulares submetidas ao tratamento com doxorrubicina durante 24 e 72 horas apresentaram uma viabilidade de  $98,37 \pm 1,77\%$  ( $p=0,004$ ) e de  $93,62 \pm 12,06\%$ , respetivamente.

No caso do estudo combinado das 24 horas, a viabilidade diminuiu para  $86,18 \pm 12,93\%$  ( $p < 0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 42 nM, para  $27,27 \pm 11,80\%$  ( $p=0,002$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM, e para  $4,02 \pm 5,65\%$  ( $p < 0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 170 nM, relativamente ao controlo. No caso do estudo de combinação das 72 horas, a viabilidade correspondeu a  $89,76 \pm 8,78\%$  ( $p < 0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 42 nM, a  $46,60 \pm 20,35\%$  ( $p=0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM e a  $23,51 \pm 15,48\%$  ( $p < 0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 170 nM, valores significativamente inferiores ao controlo. Assim, confirmou-se que a viabilidade celular decresce com o aumento da concentração de fotossensibilizador.

Associadamente, verificou-se que a viabilidade das células submetidas ao estudo de combinação das 24 horas com as concentrações de fotossensibilizador de 42 nM ( $p=0,002$ ), de 86 nM ( $p=0,002$ ) e de 170 nM ( $p < 0,001$ ) foi significativamente inferior à das culturas celulares submetidas apenas à doxorrubicina. Para o estudo de combinação das 72 horas obteve-se uma relação semelhante para as concentrações de fotossensibilizador de 86 nM ( $p=0,003$ ) e de 170 nM ( $p < 0,001$ ).



A Figura 19 - Avaliação da viabilidade das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas ao tratamento com doxorubicina ( $IC_{10}$ ) e com a combinação da doxorubicina ( $IC_{10}$ ) com a terapia fotodinâmica. O gráfico da esquerda representa o estudo de combinação de 24 horas e o gráfico da direita representa o estudo de combinação de 72 horas. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos sete ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Relativamente ao tratamento com a terapia fotodinâmica isolada, verificou-se que para o estudo de combinação das 24 horas a viabilidade foi significativamente inferior no caso da concentração de fotossensibilizador de 42 nM ( $p < 0,001$ ) e de 170 nM ( $p < 0,001$ ). No estudo de combinação das 72 horas verificou-se uma relação semelhante para as mesmas concentrações de fotossensibilizador (para 42 nM:  $p < 0,002$  e para 170 nM  $p < 0,001$ ).

A viabilidade das células MNNG-HOS submetidas ao tratamento com metotrexato durante 72 horas foi de  $98,96 \pm 6,49\%$ . No estudo de combinação com este quimioterapêutico observou-se uma diminuição significativa da viabilidade, relativamente ao controlo, para valores de  $81,48 \pm 15,21\%$  ( $p = 0,039$ ) com o tratamento com a concentração de fotossensibilizador de 42 nM, para valores de  $9,07 \pm 6,48$  ( $p < 0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM e para valores de  $8,64 \pm 9,24$  ( $p < 0,001$ ) com a concentração de 170 nM. Esta diminuição de viabilidade foi também significativa em relação às células submetidas apenas ao metotrexato com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM ( $p < 0,001$ ) e de 170 nM ( $p < 0,001$ ). Relativamente ao tratamento fotodinâmico por si só, a terapia combinada com base no metotrexato foi significativamente mais favorável tanto para a concentração de fotossensibilizador de 42 nM ( $p = 0,032$ ) como para a de 170 nM ( $p < 0,005$ ).

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

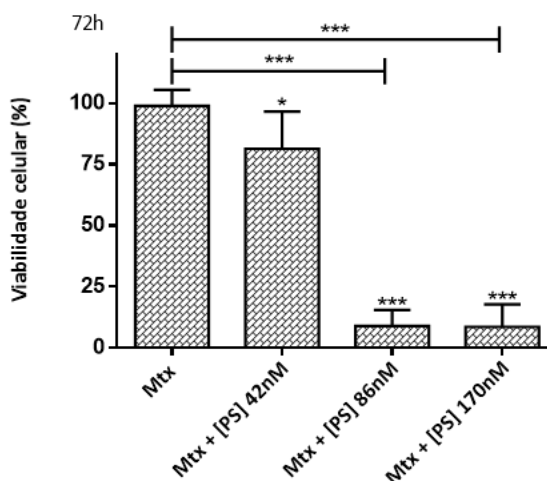


Figura 20 - Avaliação da viabilidade das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetida ao tratamento com metotrexato ( $IC_{10}$ ) e com a combinação do metotrexato ( $IC_{10}$ ) com a terapia fotodinâmica. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos dez ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

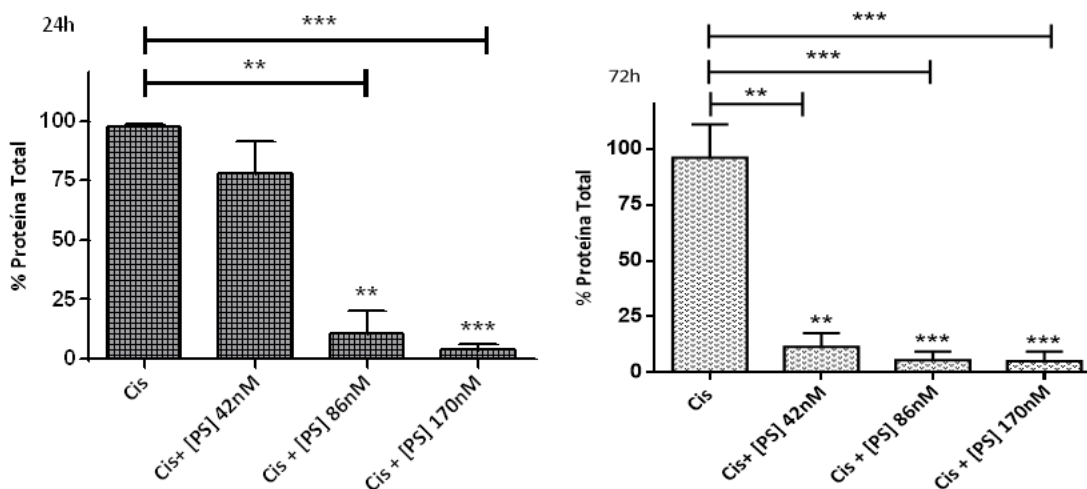


Figura 21 - Avaliação da atividade metabólica das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetida ao tratamento com cisplatina ( $IC_{10}$ ) e com a combinação da cisplatina ( $IC_{10}$ ) com a terapia fotodinâmica. O gráfico da esquerda representa o estudo de combinação de 24 horas e o gráfico da direita representa o estudo de combinação de 72 horas. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

As culturas celulares tratadas apenas com cisplatina durante 24 ou 72 horas apresentaram uma viabilidade de  $98,47 \pm 2,76\%$  e de  $96,13 \pm 14,84$ , respetivamente. No caso do estudo combinado de 24 horas observou-se uma viabilidade de  $77,86 \pm 13,75\%$  com a



concentração de fotossensibilizador de 42 nM, de  $10,73 \pm 9,40\%$  ( $p=0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador 86 nM e de  $3,72 \pm 2,24\%$  ( $p<0,001$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 170 nM, relativamente ao controlo. Para o estudo de combinação das 72 horas a viabilidade correspondeu a  $11,44 \pm 6,18\%$  ( $p=0,006$ ) com a concentração de fotossensibilizador de 42 nM, a  $5,52 \pm 3,92\%$  ( $p<0,001$ ) com a concentração de 86 nM e a  $5,11 \pm 4,26\%$  ( $p<0,001$ ) com a concentração de 170 nM, valores significativamente inferiores ao controlo. Assim, também nestes estudos de combinação a viabilidade celular decresceu com o aumento da concentração de fotossensibilizador.

Para o estudo de combinação de 24 horas verificou-se que a viabilidade celular foi significativamente inferior à das células tratadas apenas com cisplatina com a concentração de fotossensibilizador de 86 nM ( $p=0,001$ ) e de 170 nM ( $p<0,001$ ). Para o estudo de combinação das 72 horas obteve-se uma relação semelhante para a concentração de fotossensibilizador de 42 nM ( $p=0,003$ ), de 86nM ( $p<0,001$ ) e de 170 nM ( $p<0,001$ ).

Para o estudo de combinação das 24 horas verificou-se que a viabilidade foi significativamente inferior à das células tratadas com a terapia fotodinâmica por si só, no caso da concentração de fotossensibilizador de 42 nM ( $p=0,009$ ) e de 170 nM ( $p=0,008$ ). Para o estudo de combinação das 72 horas verificou-se que a viabilidade foi significativamente inferior à das células tratadas com a terapia fotodinâmica por si só, no caso da concentração de fotossensibilizador de 42 nM ( $p<0,001$ ) e da concentração de 170 nM ( $p=0,003$ ).

Com base nos resultados apresentados até aqui, optou-se por prosseguir os estudos subsequentes com o estudo de combinação das 72 horas que associa a doxorrubicina à terapia fotodinâmica, uma vez que se verificou efeito sinérgico nesta situação.

## **Tipos de morte celular**

A viabilidade celular, como foi descrito anteriormente no capítulo de materiais e métodos, foi avaliada por citometria de fluxo a partir da dupla marcação com AnV e IP. O gráfico da Figura 22 representa as diferentes populações identificadas, em cada uma das condições testadas e mostra a viabilidade e os tipos de morte celular consequentes do tratamento.

Como podemos verificar, de um modo geral os estudos de viabilidade celular realizados revelaram que a terapia combinada da doxorrubicina com a terapia fotodinâmica induziram

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

uma diminuição da população de células viáveis e o aumento das células em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose da linha celular MNNG-HOS.

A população de células viáveis nas culturas celulares controlo correspondeu a  $89,13 \pm 1,46\%$  sendo que após o tratamento com terapia fotodinâmica (86 Nm) esta diminuiu para  $39,25 \pm 8,10\%$  com significância estatística em relação ao controlo ( $p=0,002$ ). Verificaram-se também diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,001$ ) com o tratamento combinado uma vez que a diminuição foi ainda mais acentuada, para o valor de  $20,38 \pm 9,05\%$ .

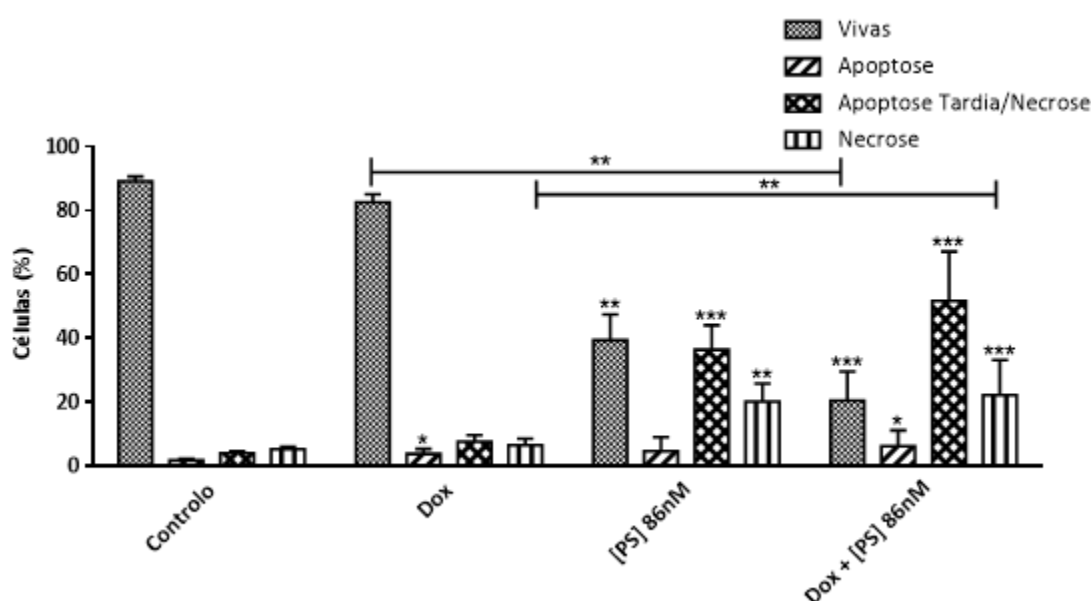


Figura 22 - Tipos de morte das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetida ao tratamento com doxorrubicina ( $IC_{10}$ ), com terapia fotodinâmica e com terapia combinada. Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (A), em apoptose tardia/necrose (A/N) e em necrose (N). Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p<0,05$ , \*\* para  $p<0,01$  e \*\*\* para  $p<0,001$ .

Em relação às células em apoptose inicial as culturas celulares tratadas com doxorrubicina houve um aumento para  $3,63 \pm 1,60\%$ , estatisticamente significativo em relação ao controlo ( $p=0,011$ ) o qual apresentou um valor de  $1,63 \pm 0,52\%$ . Quando submetidas ao tratamento combinado também se verificou um aumento significativo ( $p=0,019$ ) das células em apoptose para valores de  $6,00 \pm 5,01\%$ . A percentagem de células em apoptose tardia/necrose também aumentou significativamente de  $3,88 \pm 0,64\%$  (controlo) para  $36,25 \pm 7,74\%$  após o tratamento fotodinâmico ( $p<0,001$ ) e, de forma ainda mais acentuada,

após o tratamento combinado, para o valor de  $51,63 \pm 15,45\%$  ( $p < 0,001$ ). Comparando a percentagem de células em necrose, enquanto as culturas celulares controlo apresentaram um valor de  $5,13 \pm 0,83\%$ , as culturas celulares submetidas ao tratamento fotodinâmico e ao tratamento de combinação apresentaram valores significativamente superiores, de  $20,00 \pm 5,68\%$  ( $p = 0,006$ ) e de  $22,00 \pm 11,05\%$  ( $p < 0,001$ ), respetivamente.

## Ciclo celular

No que respeita ao ciclo celular, de um modo geral, como representado na Figura 23,

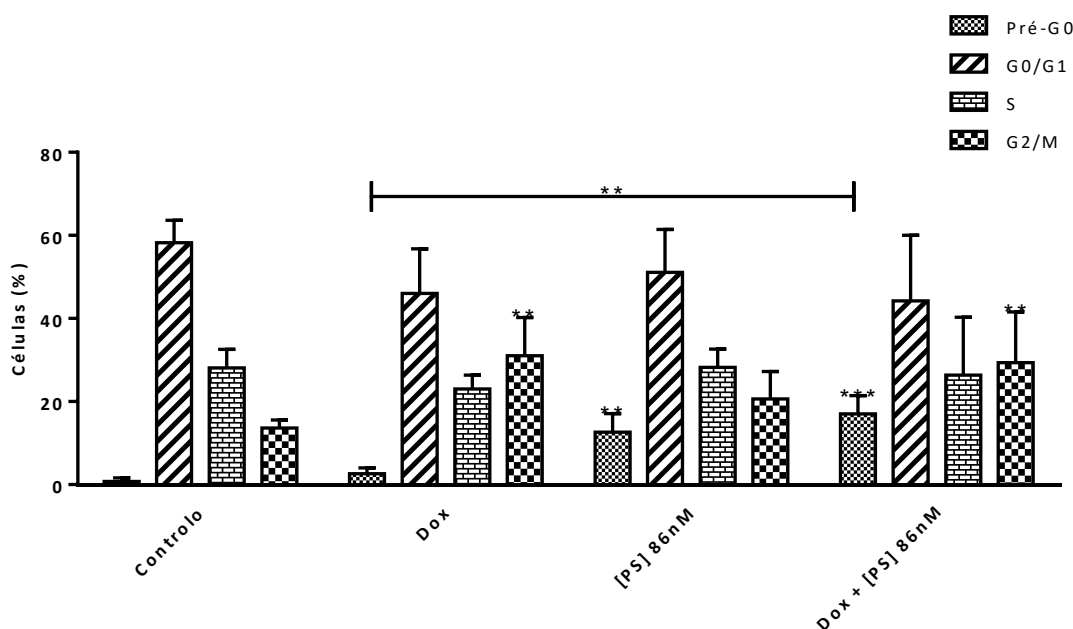


Figura 23 - Ciclo celular das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas ao tratamento com doxorrubicina ( $IC_{10}$ ), com terapia fotodinâmica ou com terapia combinada. Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagem (%) de células em cada uma das fases do ciclo celular. Os resultados apresentados correspondem à média e ao erro padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão representadas com \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

os acontecimentos mais relevantes são o surgimento do pico pré-G0 nas células tratadas com a doxorrubicina correspondente a  $2,63 \pm 1,41\%$  ( $p = 0,002$ ), na terapia fotodinâmica correspondente a  $12,63 \pm 4,50\%$  ( $p < 0,001$ ) e na terapia combinada correspondente a  $17,00 \pm 4,41\%$  ( $p < 0,01$ ). Verificou-se também um aumento estatisticamente significativo do pico pré-G0 na terapia combinada em relação à incubação apenas com a doxorrubicina ( $p = 0,004$ ).

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Nas fases G0/G1 e S não houve diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das condições em estudo. No que respeita aos resultados obtidos na fase G2/M verificaram-se diferenças estatisticamente significativas no tratamento com doxorrubicina ( $p=0,002$ ) e na terapia combinada ( $p=0,005$ ) mas somente em relação às culturas celulares controlo.

### Potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria é um organelo central na morte celular principalmente na morte por apoptose. A disrupção do potencial de membrana mitocondrial constitui uma característica distintiva deste tipo de morte. Utilizou-se o indicador do potencial de membrana mitocondrial JC-1 para avaliar os efeitos das várias opções terapêuticas sobre as culturas celulares, cujos resultados podem ser observados na Figura 24.

Verificou-se que o potencial de membrana mitocondrial foi perturbado com o tratamento fotodinâmico e com a terapia de combinação, com o aumento significativo da razão monómeros/agregados para o valor de  $3,70 \pm 1,24$  ( $p > 0,001$ ) e de  $4,77 \pm 2,34$  ( $p = 0,003$ ), respetivamente. A razão monómeros/agregados das culturas celulares tratadas com a combinação terapêutica foi significativamente superior à das culturas celulares incubadas apenas com doxorrubicina ( $p < 0,001$ ).

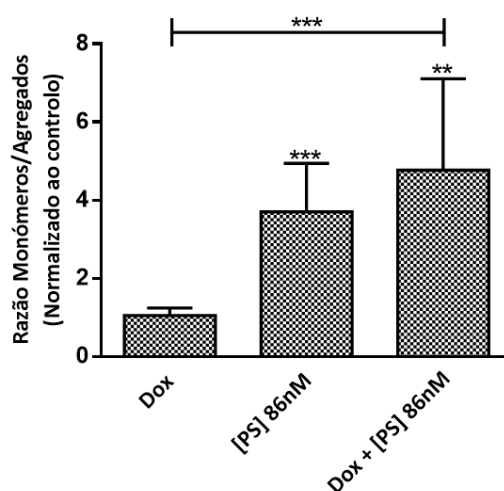


Figura 24 - Potencial de membrana mitocondrial das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas ao tratamento com doxorrubicina ( $IC_{10}$ ), com terapia fotodinâmica ou com terapia combinada. Os resultados representam a razão de monómeros/ agregados (M/A) para cada condição. A sonda JC-1 coexiste na forma monomérica ou agregada de acordo com o potencial de

membrana mitocondrial, um aumento na razão M/A indica uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial. Os resultados representam a média e o erro padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$

## Produção intracelular de peróxidos

No que concerne à produção intracelular de peróxidos, esta foi avaliada através da sonda DCF e verificou-se um desequilíbrio na produção destas ROS em todas as condições em estudo. Como se pode observar na Figura 25, o tratamento com doxorrubicina levou ao aumento significativo de peróxidos comparado com as células controlo, atingindo o valor de  $1,86 \pm 0,40$  ( $p < 0,001$ ). A terapia fotodinâmica também levou a um aumento da produção intracelular de peróxidos para o valor de  $1,66 \pm 0,43$  ( $p = 0,004$ ). A terapia combinada revelou ser o tratamento em que houve uma maior produção de peróxidos levando ao aumento para o valor de  $2,19 \pm 0,37$  ( $p < 0,001$ ) comparativamente às células não tratadas. A terapia de associação levou a uma maior despolarização do potencial de membrana mitocondrial do que a terapia fotodinâmica por si só ( $p = 0,018$ ).

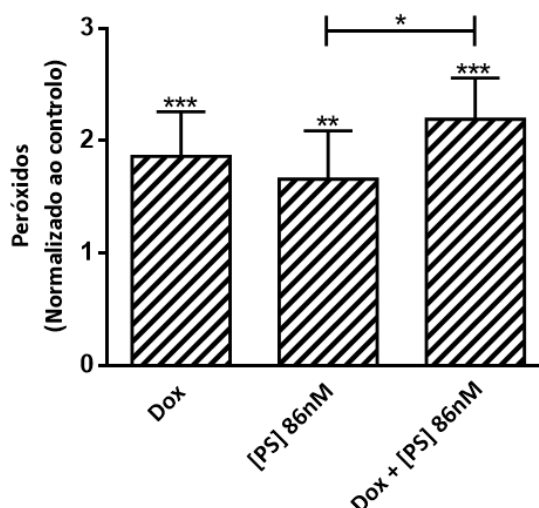


Figura 25 - Produção intracelular de peróxidos pelas células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas ao tratamento com doxorrubicina ( $IC_{10}$ ), com terapia fotodinâmica ou com terapia combinada. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação à cultura celular controlo. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

## Glutatião reduzido

A glutatião reduzida é uma defesa antioxidante descrita como responsável pela metabolização de vários peróxidos e espécies radicalares.

Nas células de osteossarcoma, tratadas com doxorubicina, cujos resultados estão representados na Figura 26, observou-se um aumento significativo do glutatião reduzido, comparativamente com o controlo, para o valor de  $1,38 \pm 0,22$  ( $p=0,002$ ). Considerando o tratamento fotodinâmico e a terapia combinada não se observaram diferenças significativas em relação ao controlo.

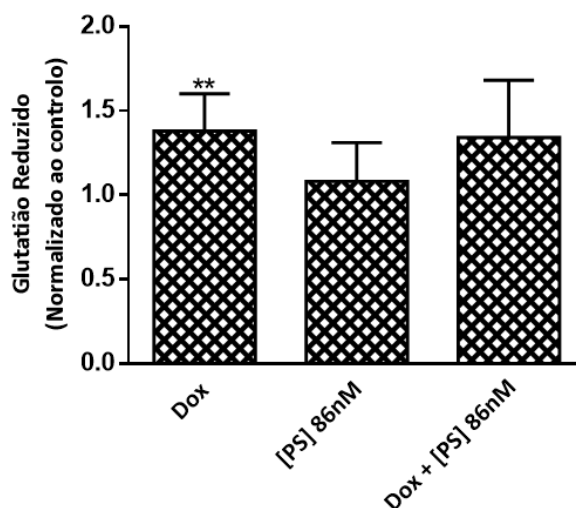


Figura 26- Atividade da enzima glutatião reduzido pelas células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas ao tratamento com doxorubicina ( $IC_{10}$ ), com terapia fotodinâmica ou com terapia combinada. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação à cultura celular controlo. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos oito ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

## Anião superóxido

A produção intracelular de anião superóxido está representada na Figura 27. De um modo geral observa-se um aumento significativo desta ROS em todas as condições. Quando tratadas apenas com doxorubicina as células de osteossarcoma apresentaram um aumento estatisticamente significativo, com valor de  $1,83 \pm 0,43$  ( $p < 0,001$ ). Com o tratamento

fotodinâmico houve um aumento significativo da concentração intracelular de anião superóxido, com valor de  $2,33 \pm 0,42$  ( $p < 0,001$ ) comparativamente às culturas celulares controlo. No tratamento de combinação verificou-se um aumento ainda mais acentuado atingindo o valor de  $4,09 \pm 1,17$  ( $p = 0,002$ ). A terapia combinada apresentou um aumento da produção intracelular de anião superóxido significativamente superior tanto à terapia fotodinâmica *per se* ( $p = 0,045$ ) como à doxorubicina *per se* ( $p < 0,001$ ).

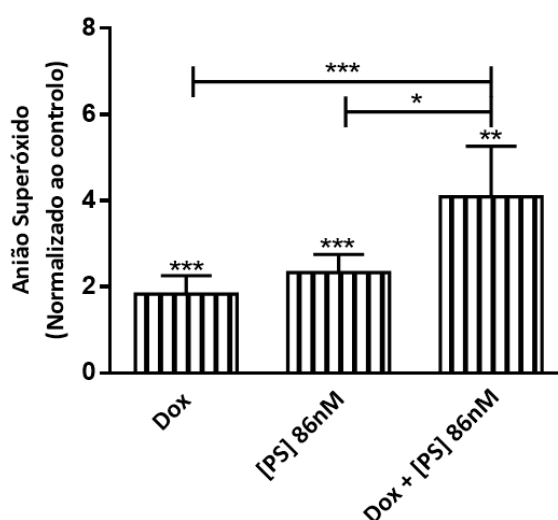


Figura 27- Produção intracelular de anião superóxido pelas células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas ao tratamento com doxorubicina ( $IC_{10}$ ), com terapia fotodinâmica ou com terapia combinada. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação à cultura celular controlo. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos sete ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

## Superóxido dismutase

Para além das ROS também as defesas antioxidantes tem um papel importante podendo influenciar o resultado terapêutico pelo seu efeito citoprotetor. Neste contexto avaliámos a superóxido dismutase (SOD). Como se pode verificar na Figura 28 verifica-se que não houve diferenças estaticamente significativas em nenhuma das estratégias terapêuticas estudadas. Assim, de um modo geral a atividade da SOD não parece estar alterada nas células de osteossarcoma.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

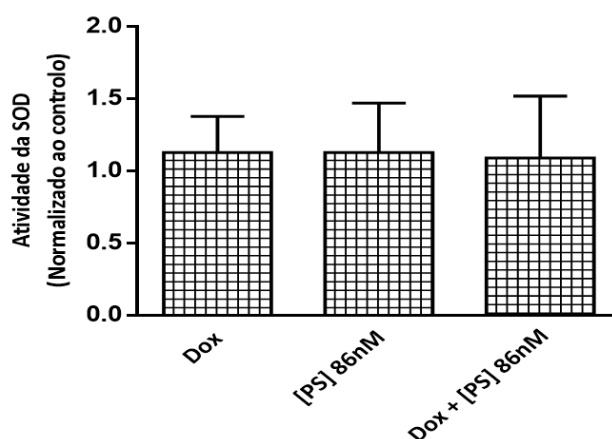


Figura 28 - Atividade da SOD das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas ao tratamento com doxorubicina ( $IC_{10}$ ), com terapia fotodinâmica ou com terapia combinada. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação à cultura celular controle. Os resultados apresentados são preliminares e correspondem à média e ao desvio padrão de pelo menos oito ensaios.

### Morfologia celular

Como referido no capítulo materiais e métodos, a morfologia celular foi analisada com recurso à microscopia ótica após coloração das células com meio May-Grünwald-Giemsa. Os corantes utilizados conferem propriedades cromáticas às células onde os núcleos aparecem corados de vermelho a violeta e o citoplasma de rosa a azul.

Os resultados de citomorfologia demonstraram que, de forma geral, tanto a doxorubicina, como a PDT, ou a terapia combinada induzem um aumento do número de células em morte celular, pelas características morfológicas de morte celular associadas a estes eventos. As células não tratadas (controlo) da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS (Figura 29) apresentaram-se dispostas em aglomerados, com cromatina condensada, principalmente junto à membrana nuclear, com membrana citoplasmática intacta e elevado número de células em mitose.



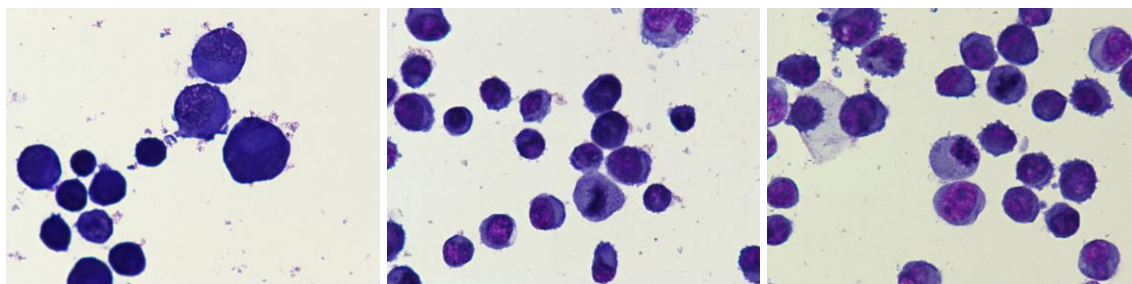


Figura 29- Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald-Giemsa onde se pode observar as características morfológicas das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS não submetidas a qualquer tratamento (controlo). As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x. Encontram-se representados aglomerados de células com a cromatina condensada e com um elevado índice mitótico.

Com o tratamento das células apenas com doxorrubicina verificou-se um aumento do número de células com características morfológicas de apoptose (Figura 30). A membrana celular apresentou prolongamentos, habitualmente designados por *blebs* e o núcleo celular apresentou fragmentos envoltos pela membrana nuclear. É também possível observar algumas alterações morfológicas compatíveis com a morte por necrose onde se verificam células apenas com o núcleo evidenciado e com o citoplasma muito claro.

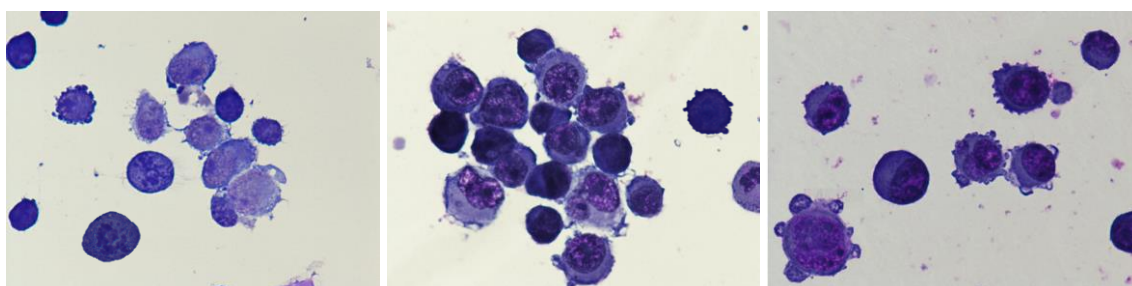


Figura 30 - Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald-Giemsa onde se pode observar as características morfológicas das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS tratadas com doxorrubicina ( $IC_{10}$ ). As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x. Podem observar-se características da morte celular por apoptose particularmente *blebs* a nível da membrana.

Com o tratamento apenas com PDT, as células de osteossarcoma apresentaram maior retração celular e os prolongamentos da membrana celular apresentaram maior número e maior tamanho, por vezes apresentaram-se com descontinuidades. Observaram-se vários corpos apoptóticos, como se pode constatar na Figura 31.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

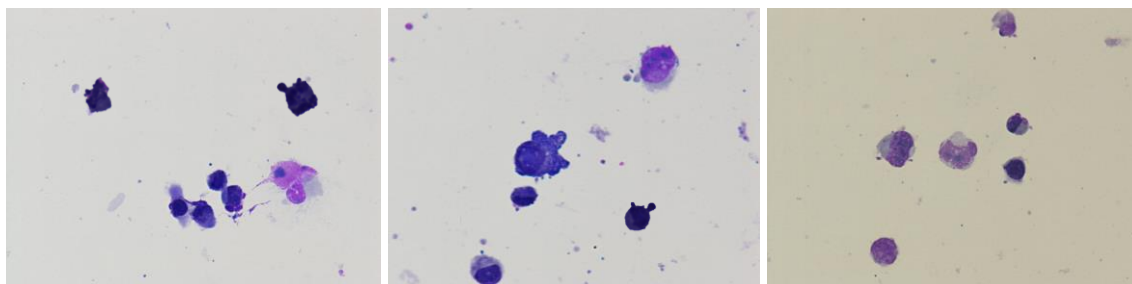


Figura 31- Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald-Giemsa onde se pode observar as características morfológicas das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas à terapia fotodinâmica. As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x. Pode observar-se uma menor densidade celular e características de morte por apoptose e por necrose.

Com a terapia combinada de doxorrubicina com PDT observa-se um aumento da retração celular, e uma diminuição do número de células, aumento do número de corpos apoptóticos, formação de *blebbings* e aumento da relação entre o núcleo e o citoplasma. Observa-se ainda a presença de várias mitoses residuais Figura 32.

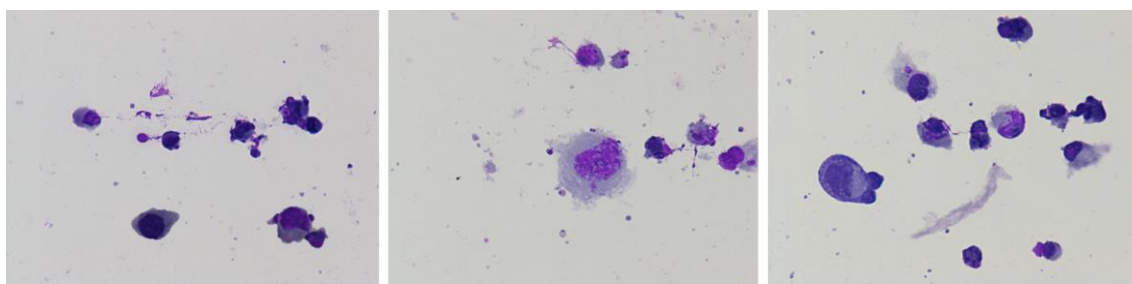


Figura 32- - Imagens representativas de esfregaços corados com May-Grünwald-Giemsa onde se pode observar as características morfológicas das células da linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas à combinação da terapia fotodinâmica com doxorrubicina ( $IC_{10}$ ). As imagens foram obtidas com uma ampliação 400x. Pode observar-se uma menor densidade celular e características de morte por apoptose e por necrose.

### Genotoxicidade

Para estudar a genotoxicidade das várias opções terapêuticas em estudo recorreu-se ao ensaio cometa.

O tratamento das células de osteossarcoma com doxorrubicina, com a terapia fotodinâmica ou com a terapia combinada, de uma forma geral, levou à obtenção de células com a forma de cometa.

Assim, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas no momento da cauda para as células tratadas com doxorubicina ( $p < 0,001$ ), com a terapia fotodinâmica ( $p < 0,001$ ), e ainda com a terapia combinada ( $p < 0,001$ ) relativamente ao controlo. As medianas e o percentil 90 (P90) das distribuições obtidas estão representados na Tabela 4. A Figura 33 mostra algumas imagens ilustrativas obtidas das condições estudadas.

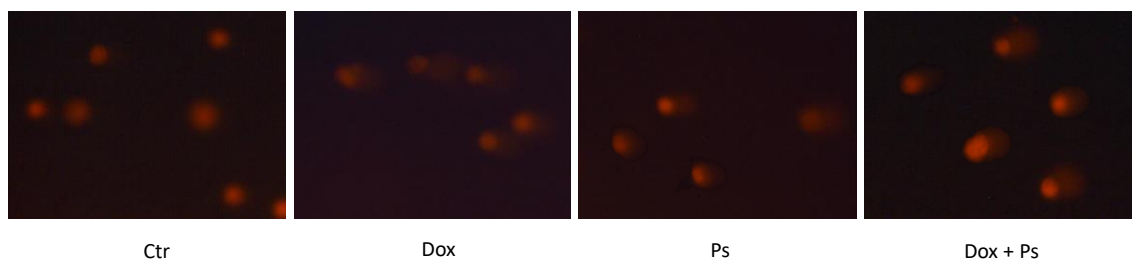


Figura 33 - Imagens ilustrativas dos cometas obtido em cada uma das condições experimentais. As imagens representadas foram obtidas com uma ampliação de 400x.

Tabela 4 Genotoxicidade nas células da linha celular MNNG-HOS 72 horas após o tratamento com doxorubicina e 24 horas após o tratamento fotodinâmico. A tabela apresenta a mediana e o P90 do momento da cauda dos cometas após as várias modalidades de tratamento

Ctr		Dox		PS		Dox+PS	
Mediana	P90	Mediana	P90	Mediana	P90	Mediana	P90
0,03	8,51	2,62	28,64	4,53	35,94	8,57	36,38

## ESTUDOS IN VIVO

### Desenvolvimento do modelo animal ortotópico de osteossarcoma

Após os estudos *in vitro*, os quais se revelaram bastante promissores e comprovaram que a combinação da terapia fotodinâmica com a doxorubicina tem um efeito sinérgico e induz morte celular, iniciaram-se os estudos *in vivo*.

Para tal, como descrito no capítulo Materiais e Métodos, foi possível estudar o potencial efeito da combinação no crescimento tumoral de um tumor ortotópico de

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

osteossarcoma obtido a partir da injeção das células humanas da linha celular MNNG-HOS em ratinhos *Balb/c nu/nu*.

Os modelos animais foram monitorizados diariamente estando representado na Figura 33 o registo fotográfico de alguns desses dias. O modelo animal revelou-se reprodutível e de simples obtenção e monitorização. Pode constatar-se que ao fim de 3 semanas, desde a injeção, se observa uma massa tumoral, perfeitamente evidenciada e de fácil medição.

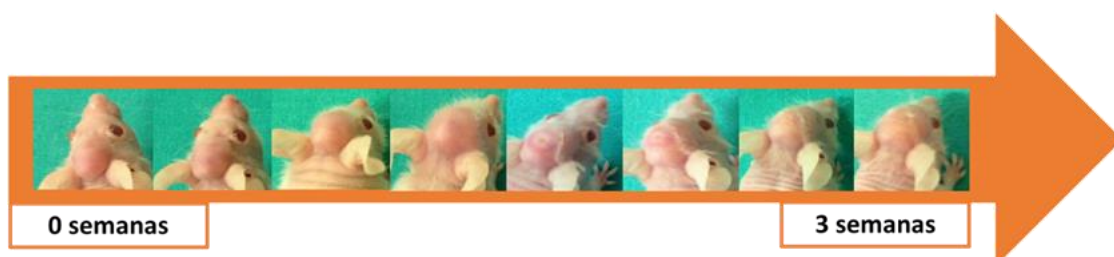


Figura 34 - Monitorização ao longo de 3 semanas dos ratinhos *Balb/c nu/nu* injetados na calote craniana com  $2 \times 10^3$  células da linha celular humana de osteossarcoma MNNG-HOS.

### Avaliação da taxa de crescimento tumoral

Procedeu-se então à avaliação da taxa de crescimento tumoral. A população do estudo foi constituída por 22 ratinhos com tumor. Destes, 5 constituíram o grupo de controlo, de animais não tratados, 4 constituíram o grupo injetado apenas com uma concentração não terapêutica de doxorrubicina (2 mg/kg), 8 constituíram grupo submetido à terapia fotodinâmica e 5 constituíram o grupo da combinação terapêutica.

Os resultados obtidos, representados na Figura 35 mostram a média e o desvio padrão do volume relativo dos tumores de cada grupo. Com os valores experimentais foi ainda possível estabelecer curvas pela estimativa de Kaplan-Meier, representadas na Figura 36, nas quais se definiu como ponto de corte o volume tumoral relativo superior a 2,5.

Verifica-se na Figura 35, que nos ratinhos do grupo controlo a taxa de crescimento tumoral aumenta até ao fim da monitorização. No grupo de ratinhos tratados com doxorrubicina também se verifica um aumento da taxa de crescimento ao longo da monitorização, embora de forma menos acentuada e sem diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Verificou-se que a terapia fotodinâmica induziu uma diminuição da taxa de crescimento tumoral em relação ao controlo, mas sem diferenças

significativas. Já relativamente à taxa de crescimento tumoral dos ratinhos sujeitos à terapia combinada, verificamos que decresce significativamente em relação ao controlo ( $p=0,015$ ).

Fazendo a comparação entre os tratamentos observam-se diferenças estatisticamente significativas comparando a terapia combinada com a PDT per se ( $p=0,020$ ) e a terapia combinada com a doxorubicina ( $p=0,025$ ).

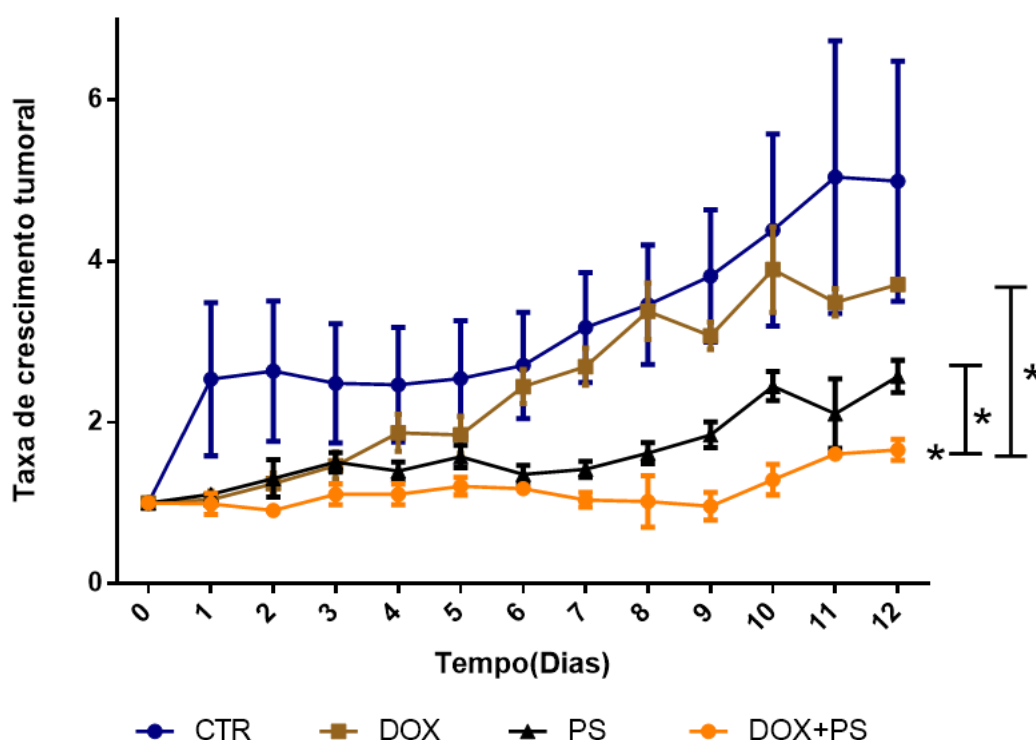


Figura 35 - Taxa de crescimento tumoral. A figura evidencia quatro grupos de animais: (1) CTR, Controlo; (2) Dox, terapia com doxorubicina (dose não terapêutica); (3) PS, terapia fotodinâmica (4) Dox+PS, terapia combinada. As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas por \*\* para  $p<0,01$ .

Na Figura 36 apresentam-se as curvas de sobrevivência estimadas pela estimativa de Kaplan-Meier. Esta análise permite usar a informação de todos os animais até ao momento em que desenvolveram o evento, constituindo uma técnica ideal para analisar o efeito terapêutico dos 3 tratamentos. Definiu-se como evento o momento em que o volume tumoral relativo atingiu um valor superior ou igual a 2,5. Os animais que não atingiram o evento até ao final do tempo de terapia são censurados. Desta forma obtiveram-se 17 eventos (22,7%) num universo de 22 ratinhos.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Verifica-se ainda que no grupo controlo (ausência de tratamento), após 8 dias, todos os animais tinham atingido o volume tumoral relativo superior a 2,5. Quando verificamos o grupo de tratamento com doxorrubicina com concentração não terapêutica, reparamos que todos os animais atingiram o evento em estudo após 6 dias. No grupo de animais submetido à PDT isolada reparamos também que todos os animais atingiram o evento após 10 dias. No entanto, apenas após 12 dias é que se registou o primeiro evento no grupo de animais sujeitos a terapia de combinação.

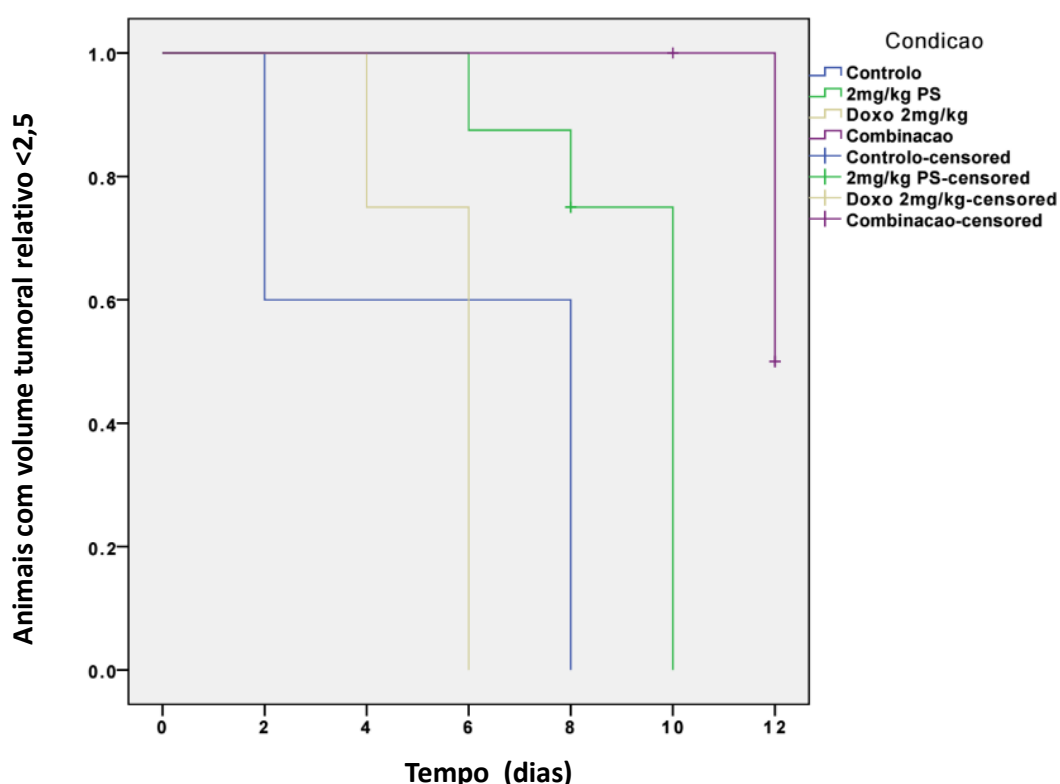


Figura 36- Curvas de Kaplan-Meier com a avaliação do tempo de evento para os grupos de tratamento que traduzem a probabilidade de o volume tumoral relativo atingir 2,5 vezes o volume inicial durante 12 dias. Os resultados representam a média e o erro padrão dos valores experimentais obtidos.

A Figura 37 ilustra o crescimento tumoral de um ratinho do grupo controlo, um do grupo tratado com doxorrubicina, dois do grupo submetido à terapia fotodinâmica e dois do grupo submetido à terapia combinada.

Nas imagens, e fazendo uma análise macroscópica do ratinho do grupo controlo, verifica-se o aumento tumoral progressivo. Nas imagens do ratinho tratado com doxorrubicina verifica-se o mesmo. Analisando as imagens dos ratinhos submetidos à terapia

fotodinâmica podemos verificar que houve uma diminuição perceptível do volume tumoral após a irradiação, com o tumor a manter o mesmo volume ao longo do tempo de monitorização. Relativamente à terapia combinada observa-se uma diminuição do volume tumoral, tendo o tumor mantido o mesmo volume ao longo dos 12 dias de monitorização.

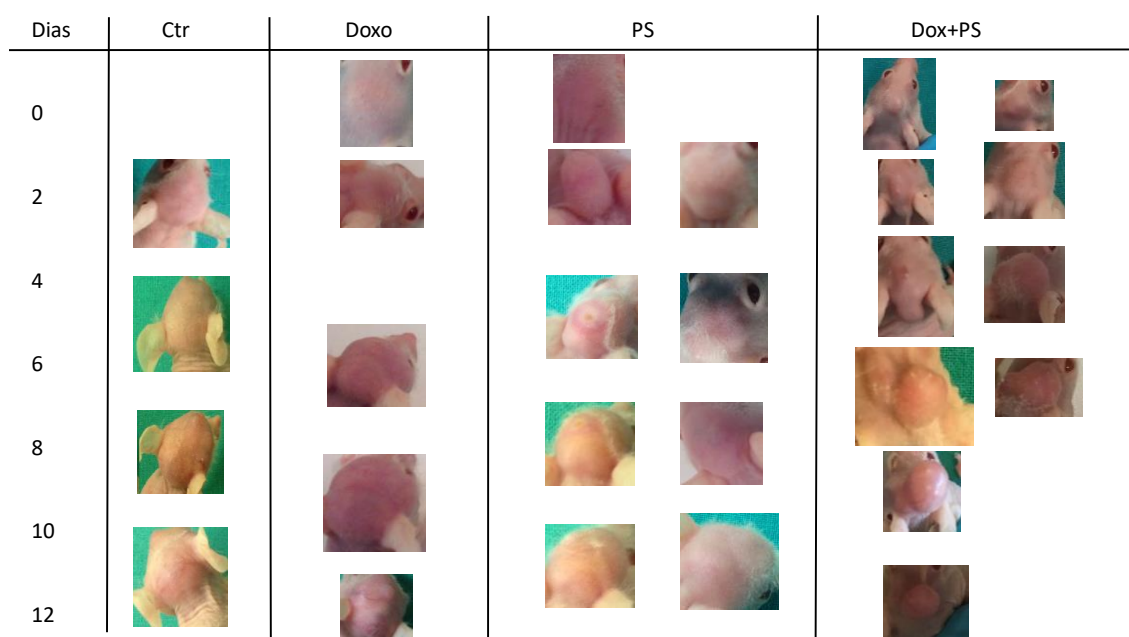


Figura 37 - Registo fotográfico da monitorização dos ratinhos balb/c nu/nu durante 12 dias para os 4 grupos em estudo: Ctr, Controlo; (2) Doxo, terapia com doxorubicina (dose não terapêutica); (3) PS, terapia fotodinâmica (4) Dox+PS, sujeitos a terapia combinada.

## Análise Histopatológica

Como referido no capítulo anterior, os tumores dos animais foram excisados para posterior avaliação microscópica. As imagens representativas da histologia dos tumores excisados após o *follow-up* e a occisão dos ratinhos do grupo controlo estão representadas na Figura 38.

De um modo geral, verificou-se nos animais sem tumor e sem tratamento que a lamela de tecido ósseo era constituída por trabéculas hialinas, com medula óssea ligeiramente hipercelular, com calcificações, contendo elementos mieloides e eritroides. É ainda possível observar a evidência de músculo estriado esquelético à periferia, por vezes vagamente nodular, ou seja, tecido ósseo normal com ausência de neoplasia. Ou seja, no grupo de ratinhos controlo, temos uma neoplasia malina invasiva de alto grau com características histológicas



## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

semelhantes à doença humana. Na Figura 38A, observou-se a arquitetura geral de um corte de um osteossarcoma. Na figura 38B, observou-se que esta é uma neoplasia maligna necrosada, que infiltra e destrói o osso craniano invadindo o espaço encefálico com aparente compromisso do encéfalo. Na figura 38C, com uma ampliação de 400x observam-se células pleomórficas com citoplasma eosinófilo e núcleo irregular e hiper cromático com uma intensa atividade mitótica.

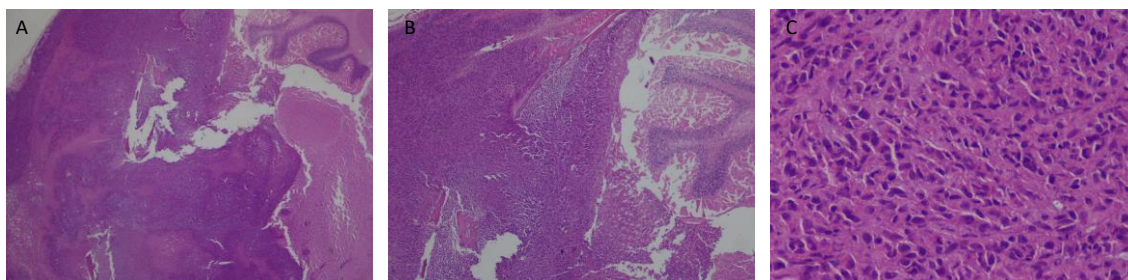


Figura 38 - Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de osteossarcoma humano em ratinhos do grupo de controle. A imagem A foi obtida com ampliação de 20x e a imagem B foi obtida com 40x e C foi obtidas com ampliação de 400x

Observando as imagens dos cortes histológicos dos ratinhos do grupo 2, submetidos ao tratamento com doxorrubicina observou-se uma neoplasia sólida, subcutânea, de padrão organoide/insular, composta por células de citoplasma eosinófilo, com aumento da relação núcleo/citoplasma, com núcleos pleomórficos e de nucléolo evidente, com atividade mitótica. A neoplasia invade o osso, atingindo focalmente a medula. Observou-se ainda a existência de necrose em cerca de 20-25% da área observada (Figura 38).

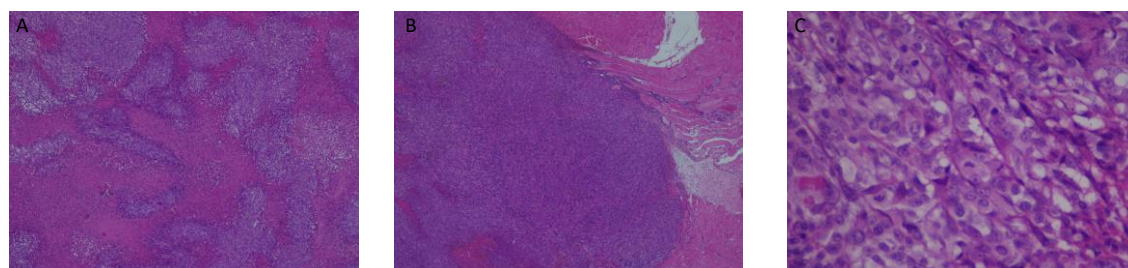


Figura 39 - Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de osteossarcoma de ratinhos do grupo submetido à doxorrubicina. A imagem A foi obtida com ampliação de 40x e a imagem B foi obtida com 40x e C foi obtidas com ampliação de 400x



Relativamente ao grupo de ratinhos submetidos à terapia de combinação como representado na Figura 39, observou-se uma neoplasia sólida, subcutânea, de padrão organoide/insular, composta por células de citoplasma eosinófilo, por vezes vacuolizado, com aumento da relação núcleo/citoplasma, com núcleos pleomórficos e de nucléolo evidente, com atividade mitótica. A neoplasia invade o osso, destruindo-o, atingindo a cavidade craniana, com aparente compressão do encéfalo, mas sem sinais de invasão do sistema nervoso central. De um modo geral verificou-se necrose entre cerca de 33% e 50% da área observada. Em alguns ratinhos observaram-se ainda calcificações distólicas bem como trabéculas ósseas, anastomosadas, de tipo neoplásico no seio do tumor. Registou-se também a existência de invasão do tecido muscular com embolias tumorais em pequenos vasos. Conclui-se assim que, de uma forma geral, se observou uma neoplasia de alto grau com invasão e com destruição óssea atingindo a cavidade craniana, pouco diferenciada, de grau 3 com necrose variável 20-50% com provável relação à terapêutica.

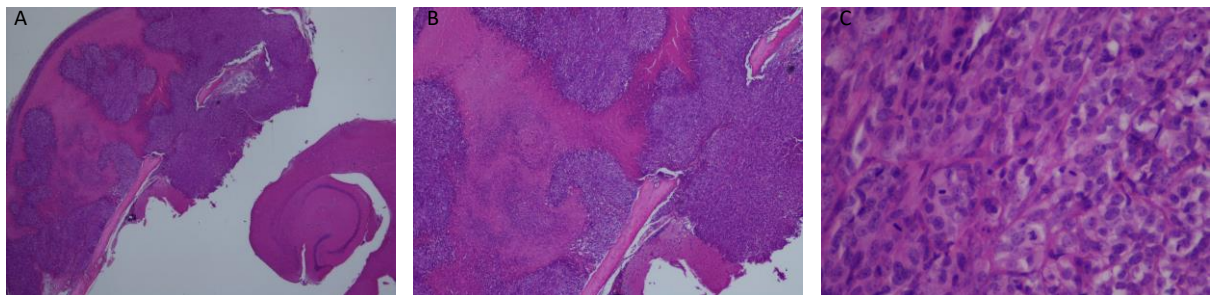


Figura 40 - Imagens dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) de osteossarcoma de ratinhos do grupo submetido à terapia de combinação de doxorrubicina com terapia fotodinâmica. A imagem A foi obtida com ampliação de 20x e a imagem B foi obtida com 40x e C foi obtidas com ampliação de 400x



# **DISCUSSÃO**



## DISCUSSÃO

As principais abordagens terapêuticas no tratamento do osteossarcoma são a cirurgia, que pode permitir a ressecção do tumor e de algum tecido adjacente, e a quimioterapia, tratamento sistémico que pode ser usado de modo neoadjuvante e/ou adjuvante (Ando et al., 2013; Bacci et al., 2003; Bielack et al., 2015). No que concerne à quimioterapia, os fármacos indicados para o osteossarcoma incluem a doxorrubicina, o metotrexato e a cisplatina (Bacci et al., 2005; Fernando e Jones, 2015). Apesar dos avanços recentes, a quimioterapia, amplamente usada no tratamento do osteossarcoma, está frequentemente associada a riscos, a resistência e a limitações ao seu uso, que podem resultar em tratamento subótimo. No entanto, o controlo de sintomas, a manutenção e a melhoria da qualidade de vida e o aumento da sobrevivência são benefícios evidentes (Pinto, Moreira e Simões, 2010). Devido a este balanço de prós e contras esta estratégia é comumente usada (Adão et al., 2013) no entanto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas pode constituir uma mais valia.

A quimioterapia de combinação constitui o “*standard care*”, esta estratégia proporciona o aumento da resposta e da tolerabilidade e a diminuição da resistência. De facto, a combinação de fármacos anticancerígenos constitui uma estratégia relevante em oncologia que permite maximizar a eficácia e minimizar a toxicidade sistémica, através do uso de combinações mais baixas e cada vez mais precisas e adequadas a cada doente (Compagnin et al., 2010; Fernando e Jones, 2015; Pinto, Moreira e Simões, 2010; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011).

O fundamento da combinação de fármacos quimioterapêuticos assenta na utilização de fármacos cujos efeitos tóxicos não se sobreponham, de modo a permitir a administração numa dose próxima do máximo, na combinação de agentes com diferentes mecanismos de ação e mínima resistência cruzada, de modo a minimizar a resistência dos fármacos, a utilização de fármacos com atividade comprovada como fármaco individual e, por último, a administração em doenças em estado inicial, permitindo a recuperação dos tecidos sensíveis (Pinto, Moreira e Simões, 2010).

A terapia fotodinâmica constitui uma opção terapêutica eficaz pouco invasiva para o tratamento do cancro (Duchi et al., 2013; Laranjo, 2014). De facto, a terapia fotodinâmica

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

pode constituir uma opção mesmo no caso de tumores irresssecáveis e pode permitir a melhoria da qualidade de vida dos doentes e o aumento da sobrevivência (Agostinis e Berg, 2011; Garg et al., 2010). Existem vários artigos que relatam a sua aplicação no osteossarcoma (Burch e Yee, [s.d.]; Matsubara et al., 2008; Rossi et al., 2011; Yanase et al., 2009).

A terapia fotodinâmica é, por isso, passível de ser usada em combinação com outras estratégias terapêuticas e com outros fármacos, existindo atualmente vários grupos de investigação que relatam várias evidências da eficácia destas duas terapias usadas em combinação (Laranjo, 2014). Posto isto, e dada a complexidade, a heterogeneidade, a resistência, a recorrência e a frequência de tumores que não podem ser removidos cirurgicamente, surgiu o interesse em estudar o efeito da terapia fotodinâmica em combinação com a quimioterapia em osteossarcoma.

Um dos testes mais utilizados em cultura de células, na avaliação da citotoxicidade, é ensaio de MTT. O ensaio baseia-se no princípio de que, para a maioria das células viáveis, a atividade mitocondrial é constante e, conseqüentemente, um aumento ou uma diminuição do número de células viáveis está linearmente relacionada com a atividade mitocondrial. A atividade mitocondrial das células é refletida pela conversão do sal de tetrazólio MTT em cristais de formazano (Meerlo, Kaspers e Cloos, 2011). A avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT é muito útil para obter um *screening* rápido de vários compostos (Laranjo, 2014).

O fotossensibilizador BBr2HPP, utilizado neste estudo, foi sintetizado anteriormente pelo grupo e caracterizado tendo sido testado em várias linhas celulares cancerígenas e em modelos animais heterotópicos e ortotópicos de cancros humanos, tendo-se concluído que as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e atividade biológica são bastante promissoras (Laranjo, 2014; Laranjo et al., 2013; Teixeira et al., 2015). Os estudos *in vitro* realizados anteriormente na linha humana de osteossarcoma MNNG-HOS mostraram que o fotossensibilizador ativado com 10 J ( $\lambda > 570\text{nm}$ ) após 24 horas de incubação apresenta um efeito fotodinâmico promissor, ou seja, um efeito citotóxico significativo. Estes estudos permitiram estabelecer a concentração correspondente ao IC<sub>50</sub> nesta linha celular, que foi de 86 nM (Chohfi de Miguel et al., 2014). O IC<sub>50</sub> é um valor comumente utilizado para quantificar e comparar o efeito terapêutico de fármacos com efeito anticancro (Chohfi de Miguel et al., 2014; Laranjo, 2014).

Assim, seguindo esta linha de investigação neste trabalho começamos por avaliar o efeito citotóxico dos três fármacos antineoplásicos mais utilizados na clínica, a doxorubicina, o metotrexato e a cisplatina na linha celular humana de osteossarcoma MNNG-HOS. Observando as curvas de dose-resposta podemos constatar que de uma forma geral os fármacos estudados foram citotóxicos para a linha em estudo, tendo a atividade metabólica diminuindo quando aumenta a concentração do fármaco. Ou seja, constata-se que na globalidade quanto maior o tempo de incubação menores valores de  $IC_{50}$ . Verificou-se que a atividade metabólica diminuiu com o aumento da concentração dos fármacos quimioterapêuticos e foi possível calcular valores de  $IC_{50}$  e de  $IC_{10}$ . Os resultados destes estudos permitiram determinar os tempos de incubação e as concentrações, com base nos valores de  $IC_{10}$ , usados nos estudos de combinação realizados posteriormente.

Outros autores usaram a linha celular de osteossarcoma MG-63 e incubaram células com doxorubicina durante 24, 48 e 72 horas (Kamba et al., 2013). Este estudo também revelou que para todos os tempos de incubação os valores de proliferação celular decresceram com o aumento da concentração do fármaco (Kamba et al., 2013). Noutro grupo, Palmero e os seus colaboradores incubaram três linhas celulares de osteossarcoma, a SJSa, a MG-63 e a HOS, com doxorubicina em concentrações que variaram entre 0,1 e 10  $\mu$ M durante 24, 72 e 144 horas. Este estudo demonstrou que para as três linhas celulares e para todos os tempos de incubação a proliferação celular diminuiu com o aumento da concentração do fármaco (Palmero et al., 2006). Da mesma forma, Shin e os seus colaboradores incubaram a linha celular U2OS com doxorubicina nas concentrações de 50, de 100, de 200 e de 500 nM para os tempos de 24 e 48 horas. Após 48 horas, verificou-se um decréscimo significativo da proliferação nas células tratadas com as concentrações mais altas de doxorubicina de 200 e 500 nM (Nagai et al., 2014). Jiang utilizando duas linhas celulares humanas de osteossarcoma a MG63 e a U-2 OS, testou o efeito citotóxico da cisplatina e do metotrexato. Os resultados do ensaio MTT utilizando duas concentrações, 20  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, e três tempos de incubação 12, 24 e 48 horas mostraram inibição da proliferação e da apoptose (Jiang et al., 2015).

Estes estudos corroboraram os resultados por nós obtidos no âmbito deste trabalho na medida em que, de um modo geral, com o aumento da concentração dos três fármacos estudados e do tempo de incubação, a atividade metabólica das células diminuiu.

Os valores apresentados na Tabela 2 mostraram que o  $IC_{50}$  da doxorubicina e da cisplatina decrescem com o tempo de incubação, das 24 às 48 horas. Por exemplo, com a

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

doxorrubicina obteve-se um  $IC_{50}$  de 4,09  $\mu$ M após 24 horas de incubação enquanto se obteve um  $IC_{50}$  de 326,4 nM após 72 horas. Estes dados levam a crer que os fármacos estudados causam danos irreversíveis ou, pelo menos, que as células de osteossarcoma não conseguiram recuperar no período de tempo em causa.

O método de Chou e Talalay constitui um dos métodos mais usados atualmente em investigação para aferir sobre o potencial efeito sinérgico, aditivo ou antagónico de dois fármacos (Chou, 2010). A sinergia, a aditividade e o antagonismo são definidos como sendo interações entre dois ou mais componentes, levando a um efeito combinado superior, igual ou inferior, respetivamente, em relação à soma dos efeitos individuais esperados (Pinto, Moreira e Simões, 2010).

Uma vez estudado o efeito citotóxico dos fármacos quimioterapêuticos, da terapia fotodinâmica com base no fotossensibilizador BBr2HPP e da associação destas estratégias terapêuticas foi possível avaliar se existiu sinergia, adição ou antagonismo. Obtiveram-se índices de combinação sinérgicos para o estudo de combinação de 72 horas com doxorrubicina e para ambos os estudos (de 24 horas e de 72 horas) com a cisplatina.

O metotrexato foi já estudado em combinação com a terapia fotodinâmica. Neste caso, nas células humanas de cancro da próstata, foi utilizado o fotossensibilizador 5-ALA tendo-se também obtido uma maior eficácia no tratamento da PDT (Sinha et al., 2006; Zuluaga e Lange, 2008).

Crescenzi e os seus co-autores avaliaram a combinação da terapia fotodinâmica com cisplatina na linha celular humana de carcinoma do pulmão H1299, considerando a variação da concentração do cistostático e a intensidade do tratamento fotodinâmico. Para as concentrações mais baixas das terapias obteve-se efeito aditivo e para concentrações mais elevadas obteve-se efeito sinérgico (Crescenzi et al., 2006). Nonaka testou o efeito da talaporfina de sódio com vários fármacos convencionais de quimioterapia onde se incluiu a cisplatina, a gemcitabina, a oxaliplatina e o 5-fluorouracilo, no carcinoma avançado dos ductos biliares. Verificou-se efeito sinérgico nos estudos com gemcitabina e com oxaliplatina com observação de necrose, de apoptose e de alterações citostáticas (Nonaka et al., 2013).

No contexto dos estudos de combinação terapêutica, vários autores afirmam a importância da sequência de tratamentos para a obtenção de sinergia, ou seja, do fármaco que se aplica primeiro e do que se aplica depois, do intervalo de tempo dos tratamentos, da concentração dos fármacos, da intensidade e do tempo, no esquema da terapia fotodinâmica



(Nagai et al., 2014; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011; Yu et al., 2009; Yu et al., 2015; Zuluaga e Lange, 2008).

No nosso trabalho, os estudos em fibroblastos humanos (HFF1) foram realizados com o propósito de esclarecer a citotoxicidade intrínseca do fotossensibilizador, definindo assim a importância da irradiação para ativar a citotoxicidade, e também, avaliar a citotoxicidade das combinações terapêuticas em células distantes da lesão, uma vez que, no contexto clínico, tanto o fotossensibilizador como os fármacos quimioterapêuticos seriam administrados por via sistêmica (Bergmann et al., 2008; Laranjo, 2014). Utilizando condições similares aos estudos com células de osteossarcoma humano, mas omitindo a irradiação, os resultados obtidos demonstraram que não houve alterações significativas em relação ao controlo em todas as condições estudadas. A concentração usada de doxorrubicina, de cisplatina e de metotrexato também não provoca nenhum efeito citotóxico significativo nos fibroblastos. Com esta avaliação provou-se assim que a ativação pela luz é um requisito fundamental para a atividade citotóxica do fotossensibilizador e que a toxicidade das combinações terapêuticas deste composto nas células normais, caso não ocorra ativação pela luz, é muito baixa, e só se verifica para concentrações muito superiores às concentrações terapêuticas tal como já verificado anteriormente num estudo com o mesmo fotossensibilizador noutras linhas celulares (Laranjo, 2014).

Como complemento do ensaio de redução de MTT foi realizado o ensaio de SRB para avaliação da viabilidade celular. Este ensaio tem em conta o conteúdo proteico, que é corado pela sulforrodamina b fornecendo uma estimativa do número de células presentes (Papazisis et al., 1997). Os resultados de viabilidade obtidos pelo ensaio de SRB corroboraram os resultados obtidos pelo ensaio do MTT e confirmaram que a diminuição da viabilidade celular ocorre como consequência de morte celular. Os resultados demonstraram de um modo geral um decréscimo significativo na viabilidade celular com o aumento da concentração de fotossensibilizador. É ainda evidente que o efeito do fotossensibilizador *per se* continua a ser inferior do que quando administrado em combinação com a doxorrubicina e com a cisplatina, uma vez que se observou sinergia com a quimioterapia, tal como demonstrado nos estudos de MTT. As concentrações de 86 nM e de 170 nM de fotossensibilizador continuam a ser as em que se observaram mais alterações estatisticamente significativas tanto relativamente ao controlo como ao fármaco de quimioterapia *per se*. Verificou-se assim que a terapia de

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

combinação apresenta um efeito citotóxico em que a diminuição da atividade metabólica está dependente da diminuição da viabilidade celular.

A sinergia observada para o estudo de combinação das 72 horas com doxorrubicina determinou a realização de estudos com vista a aprofundar os mecanismos subcelulares de atuação da terapêutica. Pretendeu-se explorar com mais detalhe o efeito citotóxico da combinação da terapia fotodinâmica com doxorrubicina, de modo a compreender os tipos de morte celular e outros mecanismos envolvidos. A distinção entre apoptose e necrose foi determinada através da externalização da fosfatidilserina e pela capacidade de exclusão do iodeto de propídeo (Laranjo, 2014).

Verificou-se um decréscimo de células vivas nas populações submetidas ao tratamento fotodinâmico e à terapia de combinação, em relação ao controlo. O número de células vivas diferiu com o tipo de tratamento verificando-se um número de células vivas menor para o tratamento de combinação em relação à terapia fotodinâmica por si só. De modo concomitante observou-se aumento do número de células nas populações em morte celular nas culturas celulares submetidas a tratamento, de forma mais acentuada nas células submetidas ao estudo de combinação. Os estudos de citomorfologia vieram confirmar estes resultados. Pode-se concluir assim que o tratamento com doxorrubicina está associado à morte celular por apoptose enquanto nas células tratadas com a terapia fotodinâmica e com a terapia de combinação se observam células em necrose e numa fase mais tardia da apoptose.

Frequentemente tem sido descrita a ativação da apoptose em resposta à combinação da terapia fotodinâmica associada com fármacos de quimioterapia. Chung e colaboradores utilizando uma combinação de terapia fotodinâmica com base no Photogen com cisplatina, verificaram *in vitro* e *in vivo*, que a cisplatina por si só induziu apoptose mas esse efeito foi potenciado com a combinação das duas terapias (Ge et al., 2011). Também na combinação da PDT com cisplatina numa linha celular de cancro esofágico foi observado que a PDT sozinha não induzia apoptose, no entanto as imagens de citomorfologia obtidas por esta equipa demonstram que o mesmo não se verificava nas células submetidas à terapia combinada onde a apoptose era predominante (Compagnin et al., 2010).

O efeito apoptótico aumentado também foi demonstrado por outro grupo numa linha celular de linfoma onde combinaram a PDT e a cisplatina em condições idênticas à de outros grupos de investigação (Nonaka, Ikeda e Inokuchi, 2002; Nonaka et al., 2013). Usando uma combinação sinérgica de doxorrubicina e de terapia fotodinâmica com base em protoporfirina

outro grupo observou um aumento significativo de células em apoptose numa linha celular multirresistente de leucemia (Wang et al., 2015).

Ahn e os seus co-autores também observaram um efeito citotóxico aumentado e maior número de células em apoptose através da ativação da caspase-8 e da caspase-3 após tratamento combinado entre a terapia fotodinâmica com base em o Photofrin® e o fármaco genisteína, em células humanas de cancro do ovário SK-OV-3 (Ahn, Biswas e Kim, 2014). Pode-se concluir assim que a terapia fotodinâmica influencia significativamente a viabilidade das células sendo potenciado o efeito citotóxico quando em combinação com a quimioterapia devendo, por isso, esta abordagem ser alvo de estudos aprofundados de modo a perceber que mecanismos estão envolvidos.

No que respeita ao ciclo celular verificou-se o surgimento de um pico pré-G<sub>0</sub>, também designado de pico apoptótico, que é indicativo de morte celular, particularmente nas culturas celulares submetidas à terapia fotodinâmica e à terapia de combinação. No que respeita às células tratadas com doxorrubicina destacou-se o aumento da população de células na fase G<sub>2</sub>/M, que também se veio a observar nas células submetidas à terapia de combinação.

Um estudo recente revelou que o tratamento das células com doxorrubicina (incluindo as células de osteossarcoma) pode resultar numa acumulação celular na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular e, eventualmente, terminar em apoptose o que também se verificou neste trabalho (Spina et al., 2013). O estudo realizado por Lüpertz e os seus colaboradores revelou que as células de cancro do cólon tratadas com 1 µM de doxorrubicina durante 3 e 24 horas sofreram uma redução significativa na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e uma acumulação na fase G<sub>2</sub>/M. Com a concentração de 5 µM de doxorrubicina, para o tempo de exposição de 3 horas, verificou-se uma acumulação na fase G<sub>2</sub>/M e uma indução significativa da fração apoptótica (Lüpertz et al., 2010). Além da indução de apoptose, a doxorrubicina é conhecida por mediar o ciclo celular em células cancerígenas. No seguimento dos danos no DNA podem ocorrer processos de reparação ou, caso isto não seja possível, as células entram num estado de senescência (Lüpertz et al., 2010).

O efeito da combinação de terapias no ciclo celular foi também anteriormente estudado. A terapia fotodinâmica com base em hiporfina também desencadeou a acumulação celular na fase G<sub>2</sub>/M em duas linhas celulares de osteossarcoma, a linha I43B e a linha HOS (Sun et al., 2015), no entanto, no nosso estudo, a terapia fotodinâmica por si só, com base no fotossensibilizador BBr2HPP não induziu esse resultado. Compagnin tratou a linha celular

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

KYSE-510 com a combinação de terapia fotodinâmica e cisplatina e verificaram que houve um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e na fase S, após a incubação durante 24 horas, e concomitantemente ocorreu um aumento do pico pré-G0 (Compagnin et al., 2010).

O potencial de membrana mitocondrial reflete a atividade da cadeia transportadora de elétrons e a própria função mitocondrial (Laranjo, 2014; Shao et al., 2012). Verificou-se um aumento da razão monómeros agregados quando se submetem as células à terapia fotodinâmica e um aumento ainda mais acentuado quando expostas à terapia combinada. A disrupção do potencial de membrana mitocondrial, juntamente com a libertação de citocromo C, Smac (do inglês *second mitochondrial activator of caspases*) ou AIF (do inglês *apoptosis-inducing factor*), constituem as *hallmarks* típicas da apoptose (Laranjo, 2014; Mikešová et al., 2013). A disrupção do potencial de membrana pode indicar que a mitocôndria está implicada na resposta à fotossensibilização com BBr2HPP. (Laranjo et al., 2013).

A oxidação de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>) com produção de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) é um indicador relativamente específico da formação de peróxido de hidrogénio pois a fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares (Laranjo, 2014). A análise realizada à produção intracelular de peróxidos mostrou que houve um aumento destas espécies reativas de oxigénio nas culturas celulares tratadas em relação às controlo. As células tratadas com a terapia de combinação foram as que produziram significativamente maior quantidade de peróxidos ( $2,19 \pm 0,37$ ;  $p < 0,001$ ), seguindo-se as células tratadas com doxorrubicina ( $1,86 \pm 0,40$ ;  $p < 0,001$ ) e, por fim, as células tratadas apenas com o tratamento fotodinâmico ( $1,66 \pm 0,43$ ;  $p = 0,004$ ).

A produção de espécies reativas de oxigénio em excesso afeta direta ou indiretamente vários processos celulares, desempenhando papéis críticos no desenvolvimento do tumor e nos processos cancerígenos. Na maioria dos casos estas espécies de oxigénio são os principais mediadores dos danos do DNA (Wang et al., 2015). No contexto da terapia fotodinâmica a formação de elevadas concentrações de espécies reativas de oxigénio é responsável pela indução das vias de morte celular (Laranjo, 2014; Serambeque, 2015). Por outro lado, a citotoxicidade mediada pela doxorrubicina também proporcionou a acumulação de espécies reativas de oxigénio. Lüpertz e os seus co-autores no estudo com doxorrubicina em células do cancro de cólon verificaram um aumento destas espécies de oxigénio após o tratamento (Lüpertz et al., 2010). Num outro estudo em que a terapia fotodinâmica com base na protoporfirina foi realizada em combinação com a administração de doxorrubicina, numa linha

celular de leucemia, também se verificou o aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio, tendo-se verificado um aumento quando administrada a doxorubicina *per se* e um aumento ainda maior quando administrada em combinação com a terapia fotodinâmica (Wang, Wan e Liao, 2015).

No nosso estudo, relativamente aos resultados do anião superóxido, de um modo geral obteve-se um aumento gradual desta ROS, estaticamente significativo relativamente ao controlo. Esse aumento significativo verificou-se tanto na doxorubicina *per se*, na terapia fotodinâmica *per se* havendo um aumento ainda mais acentuado na terapia combinada. Estes resultados, em conjunto com a avaliação da produção intracelular de peróxidos, parecem apontar para a importância das espécies reativas de oxigénio como efetoras terapêuticas. Como se sabe a indução de morte celular consequente da terapia fotodinâmica depende da produção destas espécies e no que respeita à doxorubicina são apontados vários mecanismos nos quais a produção de espécies reativas é preponderante.

De forma a contrariar a indução de stresse oxidativo pelas ROS o organismo possui várias defesas antioxidantes, entre as quais alguns substratos como a glutationa (GSH), o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol e a enzima antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) (Valko et al., 2016). No entanto, as células tumorais possuem níveis basais de espécies reativas superiores em comparação com as células normais, pelo que as suas defesas antioxidantes têm maior expressão e atividade. Este facto vai determinar que são necessárias concentrações superiores para causar danos irreparáveis que impeçam a promoção da proliferação e da diferenciação celulares (Mendes, 2016).

A presença de glutatião reduzido, molécula antioxidante, é capaz de eliminar radicais livres e reduzir peróxidos, foi já avaliada por outros autores (Chiou et al., 2010). No nosso estudo as células de osteossarcoma, verificámos um aumento significativo do glutatião reduzido após o tratamento com doxorubicina e uma reposição dos seus níveis basais, após o tratamento fotodinâmico. Na terapia de combinação também não se verificaram diferenças significativas em relação às culturas celulares controlo. Já foram descritas alterações na atividade do glutatião reduzido após PDT com vários fotossensibilizadores e em várias linhas celulares (Guan et al., 2014; Hadjur et al., 1996; Joshi e Wang, 2010; Laranjo, 2014; Mikešová et al., 2013). No entanto, estas evidências parecem apontar para uma depleção transiente de GSH poucas horas após o tratamento, com os seus níveis basais a serem progressivamente repostos, à medida que a concentração de espécies reativas de oxigénio presentes diminui.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Por outro lado, pode colocar-se a hipótese de o tratamento com doxorrubicina estar associado ao aumento da GSH, resposta citoprotetora celular, enquanto na terapia fotodinâmica e na terapia de combinação o desequilíbrio na concentração de espécies reativas de oxigénio é capaz de desencadear um processo que já não permite a ativação das defesas antioxidantes.

A superóxido dismutase é responsável pela catalização da dismutação do  $O_2$  que dá origem a  $H_2O_2$  e  $O_2$ , e que é um dos mecanismos antioxidantes mais importantes (Laranjo, 2014). De facto não se verificaram alterações na atividade desta enzima neste estudo. Em estudos anteriores com outros fotossensibilizadores também se verificou que esta enzima não foi envolvida (Laranjo, 2014). Assim, na globalidade, os resultados obtidos relativamente às defesas antioxidantes e considerando o resultado dos tratamentos estudados, parece que os níveis celulares destas defesas não limitam a eficácia dos mesmos na linha celular tumoral de osteossarcoma.

A exposição de qualquer célula a agentes quimioterapêuticos desencadeia lesões nos organelos, nas membranas celulares ou em biomoléculas (Mendes, 2016). O dano no DNA é o principal fator de indução de morte celular quando se usa a doxorrubicina (PosthumaDeBoer, Royen, van e Helder, 2013; Wang et al., 2015). Por outro lado, a PDT não costuma causar danos no DNA, provocar mutações ou induzir a carcinogénese (Laranjo, 2014). A extensão de eventuais lesões a nível do DNA foi avaliada através do ensaio cometa, desenvolvido por Ostling e Johanson em 1984, técnica frequentemente usada para avaliar a genotoxicidade de diversas substâncias (Laranjo, 2014; Mendes, 2016). Através da combinação da eletroforese em microgel de agarose em condições alcalinas com a microscopia de fluorescência, é possível avaliar a formação de quebras nas duas cadeias da dupla hélice do DNA (Mendes, 2016). Os resultados obtidos demonstraram que, na generalidade na linha celular de osteossarcoma, se verificaram lesões no DNA em todas as células tratadas sendo mais evidente quando foram sujeitas à terapia combinada. Tal como Wang e os colegas observaram que houve uma potenciação sinérgica dos danos no DNA, mais evidente através da combinação destes dois tipos de tratamento, numa linha celular multirresistente de leucemia (Wang et al., 2015). Adicionalmente, as ROS são, como já referido, o principal mediador dos danos no DNA, e como outros resultados apontaram para o aumento destas espécies pode colocar-se hipótese deste aumento dos danos no DNA estar relacionado com o aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio.

Foi avaliado o efeito da terapia de combinação num modelo animal, de modo a averiguar se o potencial terapêutico se mantinha *in vivo*. Os modelos animais são utilizados para diversos fins na investigação, nomeadamente, para compreender o desenvolvimento e a progressão de determinadas doenças, para testar novos tratamentos, para identificar mecanismos importantes de desenvolvimento de doenças e para identificar componentes celulares das doenças humanas. O uso adequado de modelos animais, em ambiente controlado, permite testar hipóteses e comprovar resultados que se obtiveram *in vitro*, a possibilidade de novos procedimentos operatórios, bem conhecer as consequências fisiopatológicas, com o objetivo de, no final, tirar conclusões sobre a eficácia terapêutica. Estes modelos são indispensáveis na investigação biomédica, uma vez que fornecem o microambiente impossível de ser reproduzido *in vitro*. Assim, constituem uma das partes fundamentais nos estudos pré-clínicos na área da oncologia, tendo vindo a ajudar a entender a tumorigénese bem como a avaliação, o diagnóstico e os protocolos terapêuticos em muitos dos cancros humanos (Brites, 2013; Ruggeri et al., 2007).

No âmbito do grupo de investigação foi previamente desenvolvido um modelo ortotópico humano de osteossarcoma no calote craniana. Este modelo animal veio a revelar-se promissor pela sua reprodutibilidade, facilidade de obtenção e monitorização e rápido desenvolvimento (Chohfi de Miguel et al., 2014).

De um modo geral, verificou-se ausência de toxicidade para os animais em estudo, uma vez que não houve registo de mortes causadas pela administração de qualquer uma das modalidades de tratamento *per se* ou em combinação. Em relação ao bem-estar animal dados como o peso, ou outros sinais de doença, foram registados durante a monitorização dos animais, e não se observaram variações significativas (dados não apresentados). Três semanas após a inoculação o tumor era evidente e tinha uma forma arredondada e era de consistência dura, com cerca de 200 mm<sup>3</sup>.

Ao observar os resultados obtidos verificou-se que a terapia combinada apresentou uma taxa de crescimento tumoral significativamente inferior à do grupo controlo ( $p=0,015$ ), ao final dos 12 dias de terapia. Por sua vez, o grupo de ratinhos submetidos à terapia fotodinâmica em combinação com doxorrubicina apresentou a menor taxa de crescimento tumoral, significativamente inferior à dos ratinhos tratados apenas com doxorrubicina ( $p=0,025$ ) e à dos ratinhos tratados apenas com a terapia fotodinâmica ( $p= 0,020$ ).

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

As curvas de Kaplan-Meier são representativas do número de ratinhos cujo volume tumoral relativo atinge um valor superior ou igual a 2,5. Esta análise robustece os resultados e evidencia que a terapia combinada demonstra uma maior inibição do crescimento tumoral comparado com os restantes grupos.

Alguns estudos *in vivo* têm sido desenvolvidos para testarem os efeitos anti-tumorais da terapia fotodinâmica em combinação com a quimioterapia. Postiglione e co-autores avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica com base no 5-ALA e da doxorrubicina no adenocarcinoma mamário. Começaram por irradiar as xenotransplantes *in vitro* e posteriormente reimplantaramnos nos ratinhos. O grupo obteve resultados promissores na medida em que houve uma inibição do crescimento tumoral. A equipa afirmou que a terapia fotodinâmica foi potenciada uma vez que se verificou diminuição dos mecanismos de defesa celulares consequente da geração de radicais livres após o tratamento com doxorrubicina (Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011). Canti também combinou a terapia fotodinâmica com a doxorrubicina, neste caso usando ftalocianinas e baixas concentrações de doxorrubicina em tumores de ratos com leucemia e com linfoma, tendo observado um efeito aditivo anti-tumoral (Canti et al., 1998; Canti, Simone, De e Korbelik, 2002; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011). Outro estudo feito por Peterson demonstrou a seletividade e a eficácia anti-tumoral da associação da quimioterapia, mais precisamente de um co-polímero que incorpora a doxorrubicina, associado a terapia fotodinâmica com base no composto Mce6 (do inglês, mesochlorin e6 monothylenedediamine) em xenotransplantes de carcinoma do ovário (OVCAR-3) (Peterson et al., 1996; Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011).

Nahabedian num estudo onde combinou doxorrubicina e cisplatina com a terapia fotodinâmica em tumores de rato referiu que ainda existem poucos estudos que demonstrem a eficácia destas duas terapias em combinação, sendo necessário mais estudos rigorosos (Nahabedian et al., 1988). Os resultados, que demonstraram efeito aditivo das terapêuticas, foram justificados por diferenças observadas a nível da vascularização tumoral e pela possibilidade de resistência das células cancerígenas (Nahabedian et al., 1988). Recentemente Nonaka obteve um efeito sinérgico entre a terapia fotodinâmica com base no talaporfin de sódio em combinação comos fármacos usados na quimioterapia convencional do carcinoma dos ductos biliares. Os resultados obtidos, em que se observou necrose, apoptose e alterações citostáticas tanto *in vitro* como *in vivo*, indicaram a que a melhor combinação foi conseguida com os fármacos gemcitabina e oxaliplatina (Nonaka et al., 2013).



Chung e os seus co-autores têm demonstrado grande interesse na combinação da terapia fotodinâmica com a quimioterapia (Chung, 2012; Peng et al., 2008). Num dos seus artigos mais recentes a associação com a cisplatina, tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrou sinergia em ambos os sistemas. Otimizaram também a sequência de administração tendo obtido resultados mais promissores fazendo primeiro o tratamento com cisplatina e uma hora depois a terapia fotodinâmica (Chung, 2012; Peng et al., 2008). Feng desenvolveu uma nanopartícula que conjuga um fotossensibilizador e um fármaco de quimioterapia. Os resultados revelaram-se promissores tendo sido observado não só um efeito anti-proliferativo contra as linhas celulares HUVEC e HCT-15 superior às duas terapias isoladas. O direcionamento (“*targeting*”) *in vivo* possibilitou ainda constatar que as nanopartículas se acumulavam no parênquima do tumor e também nos vasos sanguíneos que o irrigavam de uma forma bastante eficiente (Feng et al., 2016). Zhang também desenvolveu uma sonda de última geração capaz de detetar células cancerígenas, com possibilidade de uso em estudos de imagem, mas também com propriedades anticancerígenas devido à incorporação de um agente quimioterapêutico e de um fotossensibilizador (Zhang et al., 2015).

Os resultados obtidos com o nosso estudo estão de encontro com a bibliografia existente. Assim, é de realçar que na globalidade as associações terapêuticas da terapia fotodinâmica com fármacos de quimioterapia são mais eficazes que as terapias isoladas. Nestes estudos comprovou-se o efeito da associação com a doxorrubicina em osteossarcoma e no futuro pretende-se estudar também a associação com a cisplatina e com o metotrexato no modelo animal por nós usado.

No final dos 12 dias de monitorização, os animais foram occidados e os tumores retirados para a realização de estudos de histopatologia. A análise histológica foi realizada com recurso à coloração com H&E. Os resultados obtidos pela análise histológica confirmaram assim a presença de células tumorais com características semelhantes às do tumor humano. Observou-se nos ratinhos não tratados a presença de tecido ósseo neoplásico podendo assim confirmar que se trata de um osteossarcoma. Em osteossarcomas nem sempre a resposta tumoral é avaliada pela percentagem de necrose, visto que esta poderá corresponder a áreas de tumor que não conseguem vascularização suficiente devido ao seu crescimento rápido. Quando temos uma neoplasia pouco diferenciada um dos efeitos da quimioterapia é a indução da diferenciação tornando-a menos agressiva, muito comum em retinoblastomas e em neuroblastomas, mas normalmente isso não é avaliado no osteossarcoma (Lucas et al., 2008).

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Tendo em conta os resultados por nós obtidos, o que parece estar a acontecer é que o tumor fica menos agressivo, tonando-se menos indiferenciado. Apesar de não ocorrer uma regressão tumoral direta, verificou-se uma passagem a um estado menos agressivo, o que pode ser considerado como efeito da terapêutica.

Apesar de o crescimento dos tumores ser maioritariamente expansivo, em alguns ratinhos observaram-se focos de invasão de tecido. Num dos ratinhos o tumor parecia infiltrar as fibras musculares diretamente e observaram-se focos delimitados por fina orla de tecido conjuntivo que corresponderão a múltiplas embolias vasculares, podendo pôr-se a hipótese de ser um rato com metástases. Pode assim concluir-se que houve diferenças entre a percentagem de necrose nos grupos de ratinhos submetidos a terapia combinada e os grupos de ratinhos submetidos a cada terapêutica *per se*. No futuro pretende-se também avaliar marcadores como o VEGF, de modo a verificar se a quimioterapia em combinação com a PDT tem potencial na limitação do crescimento tumoral pela supressão da angiogénese, de forma a permitir avaliar melhor o potencial terapêutico e o mecanismo de ação desta combinação de compostos.

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que a combinação entre a PDT e a doxorrubicina constitui uma abordagem sinérgica do efeito anticancerígeno na linha celular de osteossarcoma humano MNNG-HOS. No entanto é de salientar que vários fatores poderão influenciar o sucesso desta terapia combinada (Yu et al., 2015). Para além da natureza e da concentração do fotossensibilizador, é também importante ter em conta a ordem e o intervalo de tempo entre a administração dos fármacos e o tempo de irradiação, bem com a fluência de luz e a acessibilidade de oxigénio. (Postiglione, Chiaviello e Palumbo, 2011; Yu et al., 2015). Foram evidentes comportamentos diferentes entre os três tratamentos, isto é, doxorrubicina, terapia fotodinâmica, e terapia combinada.

Foi possível também verificar o sucesso da combinação das duas terapias em ratinhos, sem penalização do bem-estar dos animais, reforçando o potencial terapêutico entre a combinação da PDT e a quimioterapia. Seria extremamente interessante a realização de estudos em biópsias de tumor humano, estabelecendo primeiramente uma cultura primária de forma a poder comparar com os resultados já obtidos na linha celular humana de osteossarcoma e assim melhor mimetizar a resposta clínica. Estes estudos poderiam contribuir para comprovar se esta associação teria um verdadeiro impacto clínico de forma personalizada.

# **CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**



## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Ao longo deste trabalho experimental, que teve como objetivo principal avaliar o potencial terapêutico da combinação entre a PDT e a quimioterapia convencional em estudos *in vitro* e *in vivo*, foi possível avaliar os efeitos da terapia combinada na linha celular tumoral de osteossarcoma humano, bem como o seu efeito no crescimento tumoral em ratinhos *balb/c nu/nu*. Foram assim apresentados e discutidos os resultados obtidos no trabalho experimental por nós realizado. No entanto, há conclusões de maior importância que importa destacar, assim como, perspetivar o trabalho que se pretende realizar no futuro.

O ensaio MTT permitiu verificar o efeito citotóxico que três fármacos de quimioterapia têm na inibição da proliferação celular sendo esta dependente da concentração em que estão presentes. A linha tumoral de osteossarcoma MNNG-HOS, demonstrou ser sensível ao efeito dos três fármacos quimioterapêuticos estudados.

Confirmou-se que o fotossensibilizador apresentou boas propriedades fotodinâmicas e efeito citotóxico nas células de osteossarcoma, como já tinha sido demonstrado em estudos anteriores do grupo.

A associação do fotossensibilizador BBr2HPP à quimioterapia diminuiu significativamente a atividade metabólica das células tumorais, bem como a viabilidade celular, de forma dependente da concentração de fotossensibilizador e da concentração e do tempo de administração dos fármacos quimioterapêuticos em estudo.

Com este trabalho concluiu-se que a combinação da terapia fotodinâmica com quimioterapia com doxorrubicina e a combinação da terapia fotodinâmica com cisplatina apresentou um efeito citotóxico sinérgico e, portanto, superior ao das terapias aplicadas de forma isolada.

Demonstrou-se que o decréscimo da atividade metabólica, nas células submetidas à combinação entre a PDT e a doxorrubicina, está relacionado com os mecanismos de morte celular, apoptose e necrose, associados a disfunção mitocondrial, a produção intracelular de espécies reativas de oxigénio, e a danos no DNA.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

Na segunda parte do trabalho, foi avaliado o efeito da terapia de combinação *in vivo*, de modo a averiguar o seu potencial terapêutico. O modelo ortotópico mimetiza o osteossarcoma humano como indica a caracterização histológica.

A taxa de crescimento tumoral foi inferior quando os ratinhos foram submetidos à combinação entre a PDT e a doxorrubicina. Foi possível também verificar o sucesso da terapia de combinação sem a penalização do bem-estar dos ratinhos, reforçando mais uma vez o potencial terapêutico. Os estudos de histologia vieram confirmar os resultados promissores obtidos *in vitro*, que mostrou haver uma percentagem de necrose superior na terapia fotodinâmica e na terapia combinada do que na terapia apenas com doxorrubicina.

O potencial e as aplicações da terapia fotodinâmica, quer individualmente ou em combinação com outras abordagens terapêuticas aprovadas ou experimentais, constituem uma abordagem nova e promissora em oncologia. O futuro da terapia fotodinâmica pode incluir sem dúvida a combinação com outras abordagens terapêuticas como a quimioterapia podendo assim aumentar a eficácia do tratamento com a diminuição de efeitos adversos.

Concretizaram-se assim os objetivos principais desta dissertação, o estudo do potencial terapêutico *in vitro* e *in vivo* da combinação da PDT com a quimioterapia, tendo os resultados obtidos sido bastante promissores. No entanto este projeto não se esgota aqui. O desenvolvimento deste trabalho experimental permitiu adquirir conhecimento e otimização de procedimentos, que numa fase posterior se ambiciona alargar ainda a outras vertentes de estudo.

Poderão testar-se outras moléculas fotossensibilizadoras que demonstrem atividade citotóxica superior nas células humanas de osteossarcoma. Neste contexto, podemos mesmo pensar num fotossensibilizador com propriedades adequadas à aplicação no diagnóstico como, por exemplo, a conjugação com um radioisótopo como já proposto pelo nosso grupo.

Seria interessante comparar também o efeito do tratamento na linha de osteossarcoma estudada em culturas primárias obtidas a partir da biópsia de tumores humanos de modo a abrir portas às terapêuticas personalizadas.

Além da doxorrubicina pode ser promissor o estudo aprofundado dos mecanismos envolvidos na combinação da terapia fotodinâmica com outros fármacos usados nos tratamentos de quimioterapia como a cisplatina o qual também demonstrou um efeito sinérgico.

## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

De modo a obter mais informação acerca da resposta terapêutica seria interessante realizar estudos de imunohistoquímica de modo a avaliar marcadores relevantes como o Ki-67, o VEGF ou a P53.

Estas perspetivas futuras constituem uma visão, com trabalho experimental já em curso, que foi alvo de uma Bolsa Liga Portuguesa contra o Cancro/ANA, no âmbito do projeto “Terapia fotodinâmica em combinação com a quimioterapia como opção no osteossarcoma”.





# **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

ADÃO, Rui *et al.* - Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**. . ISSN 08702551. 32:5 (2013) 395–409. doi: 10.1016/j.repc.2012.11.002.

AGOSTINIS, Patrizia; BERG, Kristian - Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal ...** 2011). doi: 10.3322/caac.20114.Available.

ALI, Safdar *et al.* - Study of low doses Cisplatin synergistic effect on photodynamic outcome of aluminum phthalocyanine on soft tissue sarcoma (RD) cell line. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**. . ISSN 1873-1597. 2015). doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.011.

ALLISON, Ron R. - Photodynamic therapy: oncologic horizons. **Future oncology (London, England)**. . ISSN 1744-8301. 10:2014) 123–4. doi: 10.2217/fon.13.176.

ALLISON, Ron R.; BAGNATO, Vanderlei S.; SIBATA, Claudio H. - Future of oncologic photodynamic therapy. **Future oncology (London, England)**. . ISSN 1479-6694. 6:6 (2010) 929–940. doi: 10.2217/fon.10.51.

ALMEIDA, Nuno - Terapia Fotodinâmica em combinação com Ácido Acetilsalicílico. 2016).

ANAND, Sanjay *et al.* - Low-dose Methotrexate Enhances Aminolevulinic acid-based Photodynamic Therapy in Skin Carcinoma Cells In-vitro and In- vivo. **Clin Cancer Res**. 15:10 (2009) 3333–3343. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3054.Low-dose.

ANDO, Kosei *et al.* - Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. **Cancers**. . ISSN 2072-6694. 5:2013) 591–616. doi: 10.3390/cancers5020591.

BACCI, Gaetano *et al.* - Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities: 27 year experience at Rizzoli Institute, Italy. **European Journal of Cancer**. . ISSN 09598049. 41:18 (2005) 2836–2845. doi: 10.1016/j.ejca.2005.08.026.

BECKINGSALE, Thomas B.; SHAW, Colin - (v) Epidemiology of bone & soft tissue sarcomas. **Orthopaedics and Trauma**. . ISSN 18771327. 29:3 (2015) 182–188. doi: 10.1016/j.mporth.2015.03.001.

BEDNER, E. *et al.* - Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. **Cytometry**. 35:3 (1999) 181–95.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

BORTNER, Carl D.; CIDLOWSKI, John A. - Caspase Independent / Dependent Regulation of K<sup>+</sup>, Cell Shrinkage, and Mitochondrial Membrane Potential during Lymphocyte Apoptosis \*. *274:31* (1999) 21953–21962.

BRANDES, R. P.; JANISZEWSKI, M. - Direct detection of reactive oxygen species ex vivo. *Kidney Int.* 67:5 (2005) 1662–1664.

BROWN, Stanley B.; BROWN, Elizabeth A; WALKER, Ian - The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology*. . ISSN 14702045. 5:8 (2004) 497–508. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3.

BUCH, Karl *et al.* - Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. *Radiation oncology (London, England)*. . ISSN 1748-717X. 7:1 (2012) 1. doi: 10.1186/1748-717X-7-1.

BURCH, Shane; BISLAND, Stuart - PHOTODYNAMIC THERAPY FOR BONE METASTASES An avenue for earlier identification and treatment. 4:June (2005) 6–9.

CANTI, Gianfranco *et al.* - Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumors. *Cancer Letters*. . ISSN 03043835. 125:1–2 (1998) 39–44. doi: 10.1016/S0304-3835(97)00502-8.

CARRLE, Dorothe; BIELACK, Stefan S. - Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. *International orthopaedics*. . ISSN 0341-2695. 30:6 (2006) 445–51. doi: 10.1007/s00264-006-0192-x.

CHOHFI DE MIGUEL, G. *et al.* - Photodynamic therapy as an option for osteosarcoma. *European Journal of Cancer*. . ISSN 09598049. 50:2014) S228. doi: 10.1016/S0959-8049(14)50830-1.

CHOU, Ting Chao - Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*. . ISSN 00085472. 70:2 (2010) 440–446. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.

CHOU, Ting-chao - Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies □. 58:3 (2006) 621–681. doi: 10.1124/pr.58.3.10.

CHUN, R. *et al.* - Cisplatin and doxorubicin combination chemotherapy for the treatment of canine osteosarcoma: a pilot study. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. . ISSN 0891-6640. 14:5 (2000) 495–498.

**Clinical trials** - [Em linha], atual. 2016. [Consult. 8 set. 2016]. Disponível em WWW:<URL:https://clinicaltrials.gov/>.

COMPAGNIN, C. *et al.* - Cell proliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin in combination with photodynamic therapy. **Cell proliferation**. . ISSN 1365-2184. 43:3 (2010) 262–74. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00673.x.

COSTA, CRISTINA; MAGALHÃES, HELENA; FÉLIX, RUI; COSTA, ANDREIA; CORDEIRO, Sara - **O cancro e a qualidade de vida: a quimioterapia e outros fármacos no combate ao cancro**. 1st. ed. ISBN ISBN 972-9119-94-5.

CRESCENZI, Elvira *et al.* - Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). **Molecular cancer therapeutics**. . ISSN 1535-7163. 5:3 (2006) 776–85. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0425.

DAI, Tianhong *et al.* - Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 3:APR (2012) 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2012.00120.

DIKALOV, Sergey; GRIENDLING, Kathy K.; HARRISON, David G. - Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. **Hypertension**. . ISSN 0194911X. 49:4 (2007) 717–727. doi: 10.1161/01.HYP.0000258594.87211.6b.

DUCHI, S. *et al.* - Mesenchymal stem cells as delivery vehicle of porphyrin loaded nanoparticles: Effective photoinduced in vitro killing of osteosarcoma. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 1873-4995. 168:2 (2013) 225–237. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.03.012.

ENCARNAÇÃO, João - **O butirato e o irinotecano: a sinergia na terapêutica do Cancro do Cólon 2014**. [S.l.] : University of Coimbra, 2014

FEDERMAN, Noah *et al.* - Enhanced growth inhibition of osteosarcoma by cytotoxic polymerized liposomal nanoparticles targeting the alcam cell surface receptor. **Sarcoma**. . ISSN 1369-1643. 2012:2012) 126906. doi: 10.1155/2012/126906.

FERNANDO, Jenny; JONES, Rob - The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**. . ISSN 02639319. 33:3 (2015) 131–135. doi: 10.1016/j.mpsur.2015.01.005.

FERRARI, Stefano *et al.* - Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, and doxorubicin with or without ifosfamide in nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: an Italian sarcoma group trial ISG/OS-I. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**. . ISSN 1527-7755. 30:17 (2012) 2112–8. doi:

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

10.1200/JCO.2011.38.4420.

FERRARI, Stefano; SERRA, Massimo - An update on chemotherapy for osteosarcoma. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. . ISSN 1465-6566. 6566:November (2015) 1–10. doi: 10.1517/14656566.2015.1102226.

FIRCZUK, M.; WINIARSKA, M.; SZOKALSKA, A. - Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. **Front Biosci**. 2011).

FRIEBELE, Jill C. *et al.* - Osteosarcoma : A Meta-Analysis and Review of the Literature. **The American Journal of Orthopedics**. December (2015) 547–553.

GARG, Abhishek D. *et al.* - Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**. . ISSN 1573-675X. 15:9 (2010) 1050–71. doi: 10.1007/s10495-010-0479-7.

GE, Ruifeng *et al.* - An in vitro and in vivo study of combination therapy with Photogem®-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26). **Photomedicine and laser surgery**. . ISSN 1557-8550. 29:3 (2011) 155–60. doi: 10.1089/pho.2009.2750.

GILL, Jonathan *et al.* - New targets and approaches in osteosarcoma. **Pharmacology & therapeutics**. . ISSN 1879-016X. 137:1 (2013) 89–99. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.09.003.

GILMAN; GOODMAN - **Bases farmacologicas da Terapeutica**

GOLLNICK, Sandra O. - Photodynamic Therapy and Antitumor Immunity. **National Comprehensive Cancer Network**. 10:0 2 (2013) 1–7.

GOLLNICK, Sandra O.; BRACKETT, Craig M. - Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. 46:2010) 216–226. doi: 10.1007/s12026-009-8119-4.Enhancement.

GORLICK, Richard; KHANNA, Chand - Osteosarcoma. **Journal of Bone and Mineral Research**. . ISSN 08840431. 25:4 (2010) 683–691. doi: 10.1002/jbmr.77.

GUAN, J. *et al.* - Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. . ISSN 18731597. 11:1 (2014) 13–19. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.09.003.

HAN, Xiu-guo *et al.* - CXCR1 knockdown improves the sensitivity of osteosarcoma to cisplatin. **Cancer Letters**. . ISSN 03043835. 2015) 1–11. doi: 10.1016/j.canlet.2015.09.002.

HE, Hongtao; NI, Jiangdong; HUANG, Jun - Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review). **Oncology Letters**. . ISSN 1792-1074. 2014) 1352–1362. doi:

10.3892/ol.2014.1935.

HEITJAN, Daniel F.; MANNI, Andrea; SANTEN, Richard J. - Statistical Analysis of in Vivo Tumor Growth Experiments. **Cancer research**. . ISSN 0008-5472. 53:1993) 6042–6050.

**INFARMED** - [Em linha], atual. 2010. [Consult. 2 fev. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>.

ISAKOFF, M. S. *et al.* - Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. **Journal of Clinical Oncology**. . ISSN 0732-183X. 2015) 1–8. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4895.

JAFFE, Norman; BRULAND, Øyvind S.; BIELACK, Stefan S. - **Pediatric and Adolescent Osteosarcoma**. second ed. [S.l.] : Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2009. ISBN 9781441902832.

JANEWAY, Katherine A.; WALKLEY, Carl R. - Modeling human osteosarcoma in the mouse: From bedside to bench. **Bone**. . ISSN 87563282. 47:5 (2010) 859–865. doi: 10.1016/j.bone.2010.07.028.

JUZENIENE, Asta; PENG, Qian; MOAN, Johan - Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**. . ISSN 1474-905X. 6:12 (2007) 1234–45. doi: 10.1039/b705461k.

KANSARA, Maya *et al.* - Translational biology of osteosarcoma. **Nature reviews. Cancer**. . ISSN 1474-1768. 14:11 (2014) 722–35. doi: 10.1038/nrc3838.

KASPER - **Harrisons 19th ed.** ISBN 9788184487442.

KATZUNG, Bertram; MASTERS, Susan; TREVOR, Anthony - **Farmacologia Básica Clínica**. 12ª ed. ISBN 0071764011.

KEMP, Jessica A. *et al.* - «Combo» nanomedicine: Co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 18728294. 2015). doi: 10.1016/j.addr.2015.10.019.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. - **Robbins, Patologia Básica**. 9th Editio ed. [S.l.] : Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, 2015. ISBN 9780323222754.

LARANJO, Mafalda *et al.* - 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**. . ISSN 1873-1597. 10:1 (2013) 51–61. doi:

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

10.1016/j.pdpdt.2012.05.003.

LARANJO, Mafalda - **Fotossensibilizadores para terapia e imagem em oncologia**. [S.l.] : University of Coimbra, 2014

LUCKY, Sasidharan Swarnalatha; SOO, Khee Chee; ZHANG, Yong - Nanoparticles in Photodynamic Therapy. **Chemical Reviews**. . ISSN 0009-2665. 115:4 (2015) 1990–2042. doi: 10.1021/cr5004198.

LUETKE, Anja *et al.* - Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. **Cancer treatment reviews**. . ISSN 1532-1967. 40:4 (2014) 523–32. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.11.006.

LUKSCHAL, Luís Filipe *et al.* - Osteossarcoma em maxila : relato de caso. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**. . ISSN 1646-2890. 54:1 (2012) 48–52. doi: 10.1016/j.rpemd.2012.08.001.

MA, Hecheng *et al.* - Localized Co-delivery of Doxorubicin, Cisplatin, and Methotrexate by Thermosensitive Hydrogels for Enhanced Osteosarcoma Treatment. **ACS Applied Materials & Interfaces**. . ISSN 1944-8244. 2015) acsami.5b09112. doi: 10.1021/acsami.5b09112.

MAJÓ, J.; CUBEDO, R.; PARDO, N. - Treatment of Osteosarcoma. A Review. **Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition)**. . ISSN 19888856. 54:5 (2010) 329–336. doi: 10.1016/S1988-8856(10)70255-8.

MENDES, Fernando - **Caracterização celular e molecular dos efeitos da radiação em neoplasias. Estudo experimental em linfoma e carcinoma do pulmão de pequenas células**. [S.l.] : Universidade de Coimbra, 2016

MIRABELLO, Lisa *et al.* - Osteosarcoma incidence and survival improvement. **Cancer**. 115:7 (2009) 1531–1543. doi: 10.1002/cncr.24121.Osteosarcoma.

MORIARITY, Branden S. *et al.* - A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis. **Nature Genetics**. . ISSN 1061-4036. 47:6 (2015) 615–624. doi: 10.1038/ng.3293.

MOSMANN, Tim - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. . ISSN 00221759. 65:1–2 (1983) 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NAGAI, Yu *et al.* - Phototoxic Effect of Na-Pheophorbide A Toward Osteosarcoma Cells *in Vitro* Using a Laser Diode. **Photomedicine and Laser Surgery**. . ISSN 1549-5418.



32:9 (2014) 481–489. doi: 10.1089/pho.2014.3736.

NAHABEDIAN, Maurice Y. *et al.* - Combination Cytotoxic Chemotherapy With Cisplatin or Doxorubicin and Photodynamic Therapy in Murine Tumors. 1988).

NATARAJ, Vijayamurugan *et al.* - Developing a prognostic model for patients with localized osteosarcoma treated with uniform chemotherapy protocol without high dose methotrexate: A single-center experience of 237 patients. **Journal of Surgical Oncology**. . ISSN 00224790. September (2015) n/a-n/a. doi: 10.1002/jso.24045.

**NIH- National Cancer Institute** - [Em linha], atual. 2015. [Consult. 2 fev. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.cancer.gov/>.

NONAKA, Yoshikazu *et al.* - Synergic effect of photodynamic therapy using talaporfin sodium with conventional anticancer chemotherapy for the treatment of bile duct carcinoma. **The Journal of surgical research**. . ISSN 1095-8673. 181:2 (2013) 234–41. doi: 10.1016/j.jss.2012.06.047.

O'CONNOR, Aisling E.; GALLAGHER, William M.; BYRNE, Annette T. - Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**. . ISSN 0031-8655. 85:5 (2009) 1053–74. doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x.

OLIVE, Kenneth P. *et al.* - Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. **Science (New York, N.Y.)**. . ISSN 1095-9203. 324:5933 (2009) 1457–61. doi: 10.1126/science.1171362.

OLIVEIRA, Vitor - **Identifying Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Osteosarcoma Tumor Stem Cells**. [S.l.] : University of Coimbra, 2011

OLIVO, Malini *et al.* - Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities. **Pharmaceuticals**. . ISSN 14248247. 3:5 (2010) 1507–529. doi: 10.3390/ph3051507.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. - Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. . ISSN 10902104. 123:1 (1984) 291–298. doi: 10.1016/0006-291X(84)90411-X.

OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne - Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. **Current opinion in immunology**. . ISSN 0952-7915. 16:2 (2004) 143–50. doi: 10.1016/j.coi.2004.01.003.

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

PETERSON, C. Matthew *et al.* - Combination Chemotherapy Hydroxypropyl) methacrylamide Heterotransplanted. 801 (1996).

PINTO, Ana Catarina; MOREIRA, João Nuno; SIMÕES, Sérgio - Combination Chemotherapy in Cancer: Principles, Evaluation and Drug Delivery Strategies. **Current Cancer Treatment**. 2010) 695–714. doi: 10.5772/22656.

PIZOVA, Klara *et al.* - Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**. . ISSN 1213-8118. 156:2 (2012) 93–102. doi: 10.5507/bp.2012.056.

PLAETZER, Kristjan *et al.* - New applications of photodynamic therapy in biomedicine and biotechnology. **BioMed research international**. . ISSN 2314-6141. 2013:2013) 161362. doi: 10.1155/2013/161362.

POSTIGLIONE, Ilaria; CHIAVIELLO, Angela; PALUMBO, Giuseppe - Enhancing Photodynamic Therapy Efficacy by Combination Therapy: Dated, Current and Oncoming Strategies. 2011) 2597–2629. doi: 10.3390/cancers3022597.

REIDY, Kerstin *et al.* - mTHPC-Mediated Photodynamic Therapy is Effective in the Metastatic Human 143B Osteosarcoma Cells. **Photochemistry and Photobiology**. . ISSN 00318655. 88:3 (2012) 721–727. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01096.x.

ROCHA, Luis B. *et al.* - Elimination of primary tumours and control of metastasis with rationally designed bacteriochlorin photodynamic therapy regimens. **European Journal of Cancer**. . ISSN 09598049. 2015). doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.002.

ROSSI, Vincent M. *et al.* - In vitro photodynamic therapy of MG-63 osteosarcoma cells mediated by aminolevulinic acid. 7886:2011) 78860T–78860T–12. doi: 10.1117/12.876337.

ROWE, R. Gran.; CHUGH, Rashmi - Clinical trials of systemic therapy in osteosarcoma and Ewing's sarcoma: Past, present and future. **Clinical Investigation**. . ISSN 2041-6792. 1:10 (2011) 1421–1443.

SAKAMOTO, Akio; IWAMOTO, Yukihide - Current status and perspectives regarding the treatment of osteo-sarcoma: chemotherapy. **Reviews on recent clinical trials**. . ISSN 1574-8871. 3:3 (2008) 228–31. doi: 10.2174/157488708785700267.

SAMBASIVARAO, Somiseti V - Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. . ISSN 1878-5832. 18:9 (2013) 1199–1216. doi: 10.1016/j.micin.2011.07.011. Innate.

SARMA, K. D.; RAY, D.; ANTONY, A. - Improved sensitivity of trypan blue dye

exclusion assay with Ni<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> salts. **Cytotechnology**. . ISSN 09209069. 32:2 (2000) 93–95. doi: 10.1023/A:1008144527206.

SATONAKA, Haruhiko *et al.* - In vivo anti-tumor activity of photodynamic therapy with intravenous administration of acridine orange, followed by illumination with high-power flash wave light in a mouse osteosarcoma model. **Oncology Letters**. 1:4 (2010) 627–631. doi: 10.3892/ol.

SERRA, M.; HATTINGER, C. M. - The pharmacogenomics of osteosarcoma. . ISSN 1470-269X. April (2016) 1–10. doi: 10.1038/tpj.2016.45.

SHAIKH, Atik Badshah *et al.* - Present Advances and Future Perspectives of Molecular Targeted Therapy for Osteosarcoma. 2016). doi: 10.3390/ijms17040506.

SINHA, A. K. *et al.* - Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. **British journal of cancer**. . ISSN 0007-0920. 95:4 (2006) 485–95. doi: 10.1038/sj.bjc.6603273.

ST DENIS, Tyler G. *et al.* - Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**. . ISSN 1474-905X. 10:5 (2011) 792–801. doi: 10.1039/c0pp00326c.

SUN, Mengxiong *et al.* - Hiporfin-Mediated Photodynamic Therapy in Preclinical Treatment of Osteosarcoma. **Photochemistry and Photobiology**. . ISSN 00318655. 91:3 (2015) 533–544. doi: 10.1111/php.12424.

SUSA, Michiro *et al.* - Doxorubicin loaded Polymeric Nanoparticulate Delivery System to overcome drug resistance in osteosarcoma. **BMC cancer**. . ISSN 1471-2407. 9:2009) 399. doi: 10.1186/1471-2407-9-399.

TEIXO, Ricardo - **Terapia fotodinâmica: uma abordagem em retinoblastoma**. [S.l.] : Universidade de Coimbra, 2013

THORN, Caroline; *et al.* - Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**. 21:7 (2012) 440–446. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.Doxorubicin.

TRIESSCHEIJN, Martijn *et al.* - Photodynamic therapy in oncology. **The oncologist**. . ISSN 1083-7159. 11:9 (2006) 1034–44. doi: 10.1634/theoncologist.11-9-1034.

ULUÇKAN, Özge *et al.* - Preclinical mouse models of osteosarcoma. **BoneKEy**

**Reports.** . ISSN 2047-6396. 4:MAY (2015) 670. doi: 10.1038/bonekey.2015.37.

VERMA, Sarika *et al.* - Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. **Photochemistry and Photobiology.** . ISSN 00318655. 83:5 (2007) 996–1005. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00166.x.

WANG, Wei-guang; WAN, Chao; LIAO, Guang-jun - The efficacy of high-dose versus moderate-dose chemotherapy in treating osteosarcoma: a systematic review and meta-analysis. 8:9 (2015) 15967–15974.

WHELAN, J. S. *et al.* - EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. **Annals of Oncology.** . ISSN 0923-7534. 26:2 (2015) 407–414. doi: 10.1093/annonc/mdu526.

WITTIG, James C. *et al.* - Osteosarcoma: A multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. **American Family Physician.** . ISSN 0002838X. 65:6 (2002) 1123–1132. doi: 10.1111/j.1529-8019.2010.01352.x.

XU, Meng *et al.* - Effects of endostar combined multidrug chemotherapy in osteosarcoma. **Bone.** . ISSN 87563282. 57:1 (2013) 111–115. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.035.

YANASE, Shigeaki *et al.* - Synergistic increase in osteosarcoma cell sensitivity to photodynamic therapy with aminolevulinic acid hexyl ester in the presence of hyperthermia. **Photomedicine and laser surgery.** . ISSN 1557-8550. 27:5 (2009) 791–7. doi: 10.1089/pho.2008.2329.

YOON, Il; LI, Jia Zhu; SHIM, Young Key - Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clinical Endoscopy.** . ISSN 22342400. 46:1 (2013) 7–23. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.7.

ZALUPSKI, Mark M. *et al.* - Adjuvant therapy of osteosarcoma--A Phase II trial: Southwest Oncology Group study 9139. **Cancer.** . ISSN 0008-543X. 100:4 (2004) 818–25. doi: 10.1002/cncr.20021.

ZAWACKA-PANKAU, Joanna *et al.* - The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. **Toxicology and applied pharmacology.** . ISSN 1096-0333. 232:3 (2008) 487–97. doi: 10.1016/j.taap.2008.07.012.

ZHANG, Li-Jun *et al.* - Photosensitizing effectiveness of a novel chlorin-based photosensitizer for photodynamic therapy in vitro and in vivo. **Journal of cancer research and clinical oncology.** . ISSN 1432-1335. 140:9 (2014) 1527–36. doi: 10.1007/s00432-014-1717-0.

ZHANG, Xianghong *et al.* - Progress of photodynamic therapy applications in the treatment of musculoskeletal sarcoma (Review). **Oncology Letters**. . ISSN 1792-1074. 2014) 1403–1408. doi: 10.3892/ol.2014.2332.

ZHOU, Lin *et al.* - Combination of chemotherapy and photodynamic therapy using graphene oxide as drug delivery system. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**. . ISSN 1873-2682. 135:2014) 7–16. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.04.010.

ZHU, Ke-wei *et al.* - Letter regarding Zhang *et al.* entitled «Systematic review of high-dose and standard-dose chemotherapies in the treatment of primary well-differentiated osteosarcoma». **Tumor Biology**. . ISSN 1010-4283. 2015) 4–5. doi: 10.1007/s13277-015-3910-4.

ZOU, Jun *et al.* - Sensitization of osteosarcoma cell line SaOS-2 to chemotherapy by downregulating survivin. **Archives of medical research**. . ISSN 1873-5487. 41:3 (2010) 162–9. doi: 10.1016/j.arcmed.2010.04.006.

ZULUAGA, M. F.; LANGE, N. - Combination of Photodynamic Therapy with Anti-Cancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**. . ISSN 09298673. 15:17 (2008) 1655–1673. doi: 10.2174/092986708784872401.



# **SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS**





## Lista de Símbolos, Abreviaturas e Fórmulas

°C	Celcius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigénio singleto
O <sub>2</sub>	Oxigénio molecular
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
ALA	<i>Aminolevulinic acid</i>
AnV-FITC	<i>AnnexinV-fluorescein isothiocyanate</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BBr2HPP	5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina
BCA	<i>Bicinchononic acid</i>
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
Cis	Cisplatina
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DCF	<i>2'-7'-diclorofluoresceína</i>
DCFH	<i>2'-7'-diclorodihidrofluoresceína</i>
DCFH <sub>2</sub> -DA	<i>2',7'-dichlorofluorescein diacetate</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Dox	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GSH	Glutatião reduzido
h	Horas
H&E	Hematoxilina e eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
Hepes	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HO•	Radical hidroxilo
HpD	<i>Hematoporphyrin derivative</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IC	Índice de combinação
IC <sub>10</sub>	Concentração que inibe a proliferação celular em 10%
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe a proliferação celular em 50%
IC95	Intervalo de confiança a 95%
IP	Iodeto de propídeo
J	Joules
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM COMBINAÇÃO COM QUIMIOTERAPIA

LED	<i>Light Emitting Diode</i>
M	Molar
Met	Metotrexato
mg/kg	Miligramas por quilograma
mg/mL	Miligramas por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatts por centímetro quadrado
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Hidróxido de sódio
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anião superóxido
P53	Proteína 53
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PDT	Photodynamic therapy
PEG	Polietilenoglicol
PI	Propidium iodide
PS	<i>Photosensitizer</i>
RIPA	Tampão de radioimunoprecipitação
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
S <sub>0</sub>	Estado fundamental
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Smac	<i>mitochondrial activator of caspases</i>
SOD	Superóxido dismutase
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
Tris-HCl	<i>Tris (hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
Tris-NaOH	<i>Tris (hydroxymethyl)aminomethane sodium hydroxide</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
λ	Comprimento de onda
μL/g	Microlitros por grama

# **ANEXO I**



## Anexo I

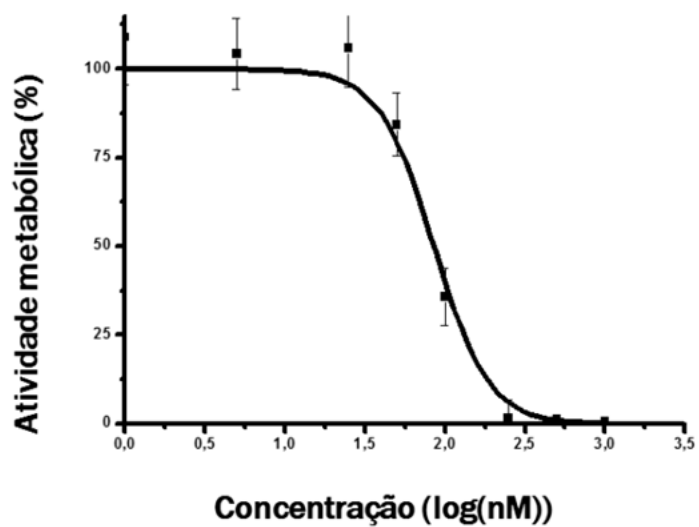


Figura 41 - Curva de dose resposta das células de osteossarcoma humano MNNG-HOS submetidas à terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador BBr2HPP. A irradiação foi realizada com 10 J ( $\lambda > 570\text{nm}$ ) após 24 horas de incubação com o fotossensibilizador (Chohfi de Miguel et al., 2014).