

Maria Inês Pimentel Mendes

IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE GLICÓLISE COM EFEITO POTENCIADOR DE TERAPIA FOTODINÂMICA *IN VITRO*

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Inês Pimentel Mendes

**IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE
GLICÓLISE COM EFEITO POTENCIADOR
DE TERAPIA FOTODINÂMICA *IN VITRO***

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Medicinal**

Orientador: Professor Doutor Luis Arnaut

Setembro de 2017

Universidade de Coimbra

Dias felizes

Foi ontem
que cheguei a Coimbra
e me cruzei com o futuro.
Senti-o distante,
escapando ao meu entendimento,
mas caí no seu encantamento
e deixei-me enredar nas suas promessas de dias felizes.
Pedi-lhe que esperasse por mim,
pois, juntos, iríamos ser capazes de grandes feitos.

Dia após dia
o futuro foi-se chegando de mansinho.
Vai mantendo os seus segredos,
mas sinto-o mais próximo,
à medida que ouço seus desabafos e conheço seus devaneios.
A esperança de dias felizes não esmoreceu
e continuo a pedir-lhe que espere por mim
pois, algures, haverá um lugar para cumprir os nossos sonhos.

Amanhã,
quando, enfim, o futuro me acolher em seus braços,
sei que os caminhos serão sinuosos
e que, a par de avenidas de luz, nos aguardam becos sombrios.
Mas sei também
que o futuro precisa de quem corra em sua direção
sem medo de lutar pelos sonhos...
Só esses sustentam a esperança de dias felizes e alcançam grandes feitos.

Da minha mãe,
Luísa Pimentel

Agradecimentos

No fim de mais um ciclo, repleto de bons momentos e de aprendizagem, quero deixar um agradecimento às pessoas que contribuíram para que fosse possível chegar aqui.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Luis Arnaut, pelo apoio científico e por toda a ajuda, motivação e apoio para que o desenvolvimento deste projeto fosse possível. Agradeço a oportunidade para desenvolver um projeto ambicioso como este e a possibilidade de crescer a nível académico.

Ao Helder, agradeço o tempo despendido na transmissão de conhecimento, determinação e paixão pela Ciência. Agradeço a amizade e a disponibilidade para responder a todas as minhas questões, quer a nível laboratorial, quer a nível científico, a sua ajuda foi indispensável para a concretização deste trabalho com sucesso.

À Luzitin, SA, pelo fornecimento da redaporfin.

A todo o grupo de Estrutura, Energia e Reatividade, obrigada por proporcionarem um ambiente fantástico para crescer a nível pessoal e, principalmente, a nível científico. Não é possível negar que o ambiente criado abre portas à discussão constante para que todos os projetos cresçam. Aos meus colegas e amigos do grupo, obrigada pelo apoio e discussão de ideias. À Catarina, por ter sempre tempo para ver mais um gráfico, mais umas células e para ajudar em tudo o que precisasse. Ao Alexandre, por ter ajudado e apoiado nas minhas decisões científicas ao longo do meu percurso académico. À Ana Mata, por toda a ajuda, sempre que necessária. To Kamilla, thank you for your advices trough this year. Ao Fábio Schaberle, por todas as discussões científicas que fazem pensar e avançar, obrigada por fomentares o meu espírito crítico. Agradeço a todos por terem permitido o meu crescimento num ambiente alegre e de amizade, foram indispensáveis!

A Coimbra, por me proporcionar todos os momentos que me fizeram feliz ao longo destes anos e a possibilidade de conhecer pessoas fantásticas!

Aos amigos que Coimbra me deu: Inês Guerra, Melanie, Inês Fonseca, Adriana Carvalho, Adriana Mamede, Hugo, Cátia e Joana Cunha, obrigada por tornarem estes os melhores anos da minha vida, da nossa vida! Obrigada por todos os momentos de amizade, discussão, maluqueira e apoio, sem vocês não teria sido o mesmo, nem tão fantástico! Que nada se perca com o passar dos anos e com a distância, estarei aqui! Um agradecimento especial à Ana Tomé, André e Bea, os meus amigos e colegas de casa, que criaram um ambiente de pura alegria e brincadeira, que sempre aliviou o stress! À Sara, obrigada por toda a companhia, conselhos, amizade e por estar sempre presente! Às minhas

afilhadas, Maria Inês, Vanessa e Joana Tocha Lima, obrigada por todos os mimos e companhia ao longo destes anos.

Aos meus amigos de Condeixa, JP, Fernando, Daniel, Andreia, Tiago Costa, obrigada por toda a companhia nestes últimos anos, por me distraírem sempre que precisava e por todos os momentos em que me fizeram rir! Ao Tiago, por toda a companhia e apoio sempre que precisava. Obrigada por serem amigos fantásticos, diminuírem o meu stress sempre que precisava e trazerem alegria ao meu percurso!

Por fim, à minha família, que permitiu que tudo isto fosse possível. Aos meus avós, Avô Manel, Avó Lucinda e Avó Maria, obrigada por me apoiarem desde que sou pequenina, por todo o amor, por todos os tupperwares que me fizeram mais feliz em Coimbra e por todos os mimos! Aos meus tios, João e Didi, obrigada por todos os momentos de descontração ao longo destes anos, e agora, obrigada pela Francisca! Ao meu irmão João Pedro, agradeço por todos os conselhos de irmão mais velho e por me fazeres ver a vida com outros olhos sempre que era preciso. À minha irmã Ana Rita, que partilha a vida comigo desde o primeiro segundo, obrigada por seres tão fantástica, por me apoiares, por me limpares as lágrimas sempre que precisei, a minha vida sem ti não teria sentido. Ao meu pai, agradeço todo o amor, proteção e conselhos ao longo destes anos, que isso nunca mude. À minha mãe, o meu exemplo, obrigada por todo amor e conselhos, e por me fazeres crescer assim, como tu. Agradeço a todos por tornarem esta, a melhor família do mundo!

Todos contribuíram para a pessoa que me tornei, todos contribuíram para este percurso pessoal e científico, e para a realização de alguns sonhos, obrigada!

Índice

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Símbolos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Capítulo 1:	1
Introdução	1
1. Cancro	1
1.1. Características das células tumorais	2
1.2. Terapia do Cancro	7
2. Terapia Fotodinâmica.....	8
2.1. Interação da luz com os tecidos	9
2.2. Fotoquímica.....	11
2.3. Fotossensibilizadores	14
2.4. Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica	18
2.5. Vantagens e limitações da terapia fotodinâmica.....	20
3. Glicólise e cancro.....	21
3.1. A via Glicolítica	21
3.2. Efeito de Warburg.....	23
3.3. Via da Pentose Fosfato e o Cancro.....	25
3.4. Inibição da glicólise para tratamento do cancro.....	26
4. Terapia Fotodinâmica e Metabolismo	30
5. Proposta de Trabalho	32
Capítulo 2:	33
Materiais e Métodos	33
1. Reagentes:.....	33
2. Equipamento	34
3. Preparação da solução stock de redaporfin.....	35
4. Cultura de células	36
5. Estudos de PDT in vitro	36
6. Estudos de citotoxicidade dos inibidores da glicólise	37
7. Estudos de combinação	37
8. Análise estatística.....	39
Capítulo 3:	41

Resultados e Discussão	41
1. Estudos in vitro.....	41
1.1. Avaliação do IC50 da PDT-redaporfin.....	43
1.2. Combinação PDT-redaporfin e 2-deoxiglucose.....	46
1.3. Combinação PDT-redaporfin e 3-bromopiruvato.....	49
1.4. Combinação PDT-redaporfin e oxitiamina.....	54
Capítulo 4:	59
Conclusão	59
1.1. Perspetivas Futuras:	61
Capítulo 5:	63
Bibliografia	63
Material Suplementar	71

Lista de Figuras

Figura 1.1. Características típicas do desenvolvimento de um tumor	2
Figura 1.2. Representação esquemática das diferentes etapas da terapia fotodinâmica	9
Figura 1.3. Esquema da profundidade de penetração da luz na pele e fenómenos de interação da luz com os tecidos	10
Figura 1.4. Espectro de absorção dos cromóforos endógenos e janela fototerapêutica.	10
Figura 1.5. Diagrama de Jablonski com a representação das transições que ocorrem entre o PS e o oxigénio ou as biomoléculas	12
Figura 1.6. Representação esquemática de PSs de 1 ^a e 2 ^a geração	14
Figura 1.7. Representação Esquemática da molécula Tookad Soluble	16
Figura 1.8. Representação esquemática da molécula Redaporfin	17
Figura 1.9. Vias de metabolismo da glucose na célula	22
Figura 1.10. Via glicolítica e enzimas envolvidas nesta via	23
Figura 1.11. Via da pentose fosfato e enzimas envolvidas nesta via	26
Figura 1.12. Via glicolítica, via da pentose fosfato e seus inibidores	28
Figura 1.13. Representação esquemática de diferentes inibidores de glicólise	28
Figura 2.1. Espectro de absorção UV/visível da redaporfin	35
Figura 2.2. Representação esquemática das condições utilizadas para os estudos de combinação	38
Figura 2.3. Representação esquemática da combinação de inibidor por 24 h antes da irradiação	38
Figura 2.4. Representação esquemática da combinação de inibidor por 24 h antes da irradiação e 24 h depois da irradiação	39
Figura 2.5. Representação esquemática da combinação de inibidor por 48 h antes da irradiação	39
Figura 3.1. Representação esquemática das vias afetadas pela terapia combinacional	42

Figura 3.2. Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da redaporfin	45
Figura 3.3. Gráfico do IC50 da redaporfin	45
Figura 3.4. Avaliação da citotoxicidade do inibidor 2DG	46
Figura 3.5. Estudos de combinação entre PDT-redaporfin e 2DG	48
Figura 3.6. Avaliação da citotoxicidade do inibidor 3BP	50
Figura 3.7. Estudos de combinação entre PDT-redaporfin e 3BP	53
Figura 3.8. Avaliação da citotoxicidade do inibidor OXY	55
Figura 3.9. Estudos de combinação entre PDT-redaporfin e OXY	56

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Intervalos de concentrações avaliados para os diferentes inibidores de glicólise	37
Tabela 3.1. Valores de IC50 da redaporfin para as duas linhas celulares	45

Lista de Abreviaturas e Símbolos

2DG	2-Deoxiglucose
2DG-P	2-Deoxiglucose-fosfato
3BP	3-Bromopiruvato
A	Absorvância
acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Proteína da Célula-B do Linfoma 2
CT26	Linha Celular de Carcinoma do Colon de Murganho
DLI	Intervalo Fármaco-luz (do inglês <i>Drug-to-light Interval</i>)
DMEM	Meio de Cultura (do inglês, <i>Dubbelco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
FBS	Soro Fetal de Bovino (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FWHM	Largura à meia altura (do inglês, <i>Full width at half maximum</i>)
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
GLUT1	Transportador de glucose 1
GLUT3	Transportador de glucose 3
GTP	Guanina trifosfato
HEPES	Tampão de Ácido de 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HMEC	Células Primárias Mamárias Epiteliais de Humano (do inglês, <i>Primary Mammary Epithelial Cells, Human</i>)
HUVEC	Endotélio Vascular Umbilical de Humano (do inglês <i>Umbilical Vein/Vascular Endothelium, Human</i>)
IC50	Concentração Inibitória para 50% da população (do inglês, <i>Inhibitory Concentration for 50% of population</i>)
LED	Diodo Emissor de Luz (do inglês <i>Light-emitting Diode</i>)
MCT	Transportadores de Ácidos Monocarboxílicos (do inglês <i>Monocarboxylic Acid Transporters</i>)
mTOR	Alvo da Mecanístico da Rapamicina (do inglês <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>)
NADH	Dinucleótido de Nicotinamina e Adenina
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamina e Adenina
NIH/3T3	Linha Celular de Fibroblastos de Murganho
OXY	Oxitiamina (do inglês <i>Oxythiamine</i>)
p53	Proteína p53
PBS	Solução de Tampão Fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDT	Terapia Fotodinâmica (do inglês <i>Photodynamic Therapy</i>)

PenStrep	Penicilina-estreptomicina
PET	Tomografia de Emissão de Positrões (do inglês <i>Positron Emission Tomography</i>)
P_{ow}	Coeficiente de Partição Octanol-água
PS	Fotossensibilizador (do inglês <i>Photosensitizer</i>)
RB	Proteína do Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucleíco (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP	Redaporfin
UV	Ultravioleta
ϵ	Coeficiente de Absortividade Molar
τ_T	Tempo de Vida do Estado Tripleto
ϕ_F	Rendimento Quântico de Fluorescência
ϕ_{pd}	Rendimento Quântico de Fotodecomposição
ϕ_T	Rendimento Quântico de Estado Tripleto
ϕ_Δ	Rendimento Quântico de Oxigénio Singuleto

Resumo

A seletividade nos tratamentos utilizados em cancro é essencial para que haja uma maior capacidade de matar as células cancerígenas sem alterar as células normais. A maioria das abordagens para aumentar a seletividade passam por direcionar a terapia para o tumor fazendo alterações no fármaco, mas isto leva a novos fármacos e à necessidade de passarem por uma nova fase de aprovação e autorização de venda. Uma alternativa é a utilização de combinações de fármacos, podendo potenciar a sua eficácia e seletividade, administrando-se doses mais baixas e minimizando os efeitos secundários, facilitando a aprovação clínica da sua utilização. Neste trabalho apresenta-se a combinação de terapia fotodinâmica com inibidores da glicólise, com o objetivo de aumentar a eficácia e seletividade da terapia do cancro.

A Terapia Fotodinâmica (PDT) utiliza um fotossensibilizador, que é um fármaco que por si só não é prejudicial para a saúde, e luz, que no comprimento de onda adequado, ativa o fotossensibilizador, de modo a produzir espécies reativas de oxigénio e, conseqüentemente, danos nas células. As células tumorais apresentam uma alteração do metabolismo da glicose, caracterizada por um aumento da glicólise, mesmo em ambientes com concentrações normais de oxigénio (efeito de Warburg), sendo esta uma característica útil para o design de novas estratégias terapêuticas para eliminar, preferencialmente, as células tumorais por inibição da glicólise. Esta modificação tem sido estudada a nível clínico, com a expectativa de que, inibindo a glicólise, se afete, mais significativamente, o metabolismo das células tumorais.

A 2-deoxiglucose (2DG) é um composto que, uma vez no interior da célula, é fosforilado a 2-deoxiglucose-6-fosfato, que não é metabolizado, acumulando-se no meio intracelular, inibindo a glicólise. O 3-bromopiruvato (3BP) inibe a hexocinase, uma enzima da via glicolítica, e provoca efeitos na mitocôndria, induzindo morte celular. A oxitiamina (OXY) é um análogo da tiamina e um inibidor não competitivo da transquetolase (uma enzima da via da pentose fosfato). A transquetolase é essencial para a síntese de moléculas importantes para a sobrevivência celular, relacionando-se diretamente com a via glicolítica. A inibição desta via, leva a apoptose das células tumorais.

A hipótese avaliada neste estudo é que a inibição da glicólise, através destas moléculas, aumente o stress oxidativo nas células, podendo aumentar a sensibilidade das células para o stress oxidativo produzido durante a PDT.

Os estudos *in vitro* foram realizados numa linha celular tumoral e numa linha celular normal, as CT26 (carcinoma do colon de murganho) e NIH/3T3 (fibroblastos de murganho), respetivamente. Os estudos começaram com a avaliação do IC50 da redaporfin nas duas

linhas celulares seguida da aplicação de doses não tóxicas de 2DG, 3BP e OXY, para avaliar se a combinação é mais eficaz do que os efeitos individuais.

A combinação entre PDT-redaporfin e 2DG ou OXY não mostrou melhorias muito significativas, nem a nível da eficácia, nem a nível da seletividade. Porém, a combinação de uma dose de 10 μ M de 3BP com PDT-redaporfin aumentou a eficácia da terapia e mostrou uma maior seletividade para a linha celular tumoral em comparação com a não tumoral.

Abstract

The selectivity of treatments used in cancer therapies is essential to enable drugs to kill cancer cells while sparing normal cells. Most approaches to improve selectivity aim at targeting the tumor through chemical modifications of the drug. This leads to new drugs and lengthy regulatory pathways for marketing authorization. Alternatively, the combination of different drugs may potentiate the efficacy and selectivity of a treatment leading to the administration of lower doses, thereby minimizing adverse effects, and facilitate clinical approval. This work presents the combination of photodynamic therapy (PDT) with glycolysis inhibitors to improve efficacy and selectivity in cancer treatments.

PDT uses a photosensitizer and light with an appropriate excitation wavelength that activates the photosensitizer in the presence of oxygen to produce reactive oxygen species and, consequently, cell damage. Tumor cells have an alteration in glucose metabolism, characterized by an increase in glycolysis pathway, even in environments with normal oxygen concentration (Warburg Effect). This modification has been explored, including in clinical trials, with the expectation that the inhibition of glycolysis should alter especially the metabolism of tumor cells.

2-Deoxyglucose (2DG) is a compound that is phosphorylated to 2-deoxyglucose-6-phosphate, which is not metabolized and accumulates in the cell, inhibiting glycolysis. 3-Bromopyruvate (3BP) inhibits hexokinase (an enzyme of the glycolytic pathway) and also has effects on mitochondria, inducing cell death. Oxythiamine (OXY) is an analogue of thiamine and a noncompetitive inhibitor of transketolase (an enzyme of pentose phosphate pathway). Transketolase plays a vital role in the synthesis of important molecules for cell survival, directly correlated to glycolytic pathway. The inhibition of this enzyme leads to apoptosis of cancer cells.

The hypothesis investigated in this study is that the inhibition of glycolysis, through these molecules, increases oxidative stress in the cell which may increase the sensitivity to the oxidative stress produced by PDT.

In vitro combination studies were performed in both cancer and normal cell lines, CT26 (colon carcinoma – mouse) and NIH/3T3 (fibroblasts – mouse), respectively. We started our studies with the evaluation of IC50 of redaporfin in the different cell lines and then co-incubation with 2DG, 3BP and OXY at nontoxic concentrations, in order to examine which combination was more effective than the individual effects.

Combination of PDT-redaporfin with 2DG and OXY did not improve neither the efficacy nor the selectivity of the treatment. The most promising result is the combination of a 10 μ M dose of 3BP with PDT-redaporfin. This combination increases the efficacy of the treatment and is more selective to the cancer cell line.

Capítulo 1:

Introdução

1. Cancro

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cancro é um termo genérico para um conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento anormal de células, para lá dos seus limites habituais e que podem invadir tecidos adjacentes e espalhar-se para outros órgãos. Outros termos utilizados são tumores malignos ou neoplasias. O cancro pode afetar qualquer parte do corpo e tem vários subtipos anatómicos e moleculares que requerem estratégias específicas de tratamento¹. O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial e, em 2012, foram diagnosticados 14.1 milhões de novos casos de cancro a nível mundial e 8.2 milhões de mortes relacionadas com esta doença². O impacto económico do cancro é muito significativo e está a aumentar. Apesar de ainda não se conhecer o custo global do tratamento do cancro, sabe-se que se situa nos biliões de dólares por ano. Só nos Estados Unidos da América, em 2011, o custo estimado para o tratamento do cancro era de 88.7 biliões de dólares³.

O processo tumoral ocorre em vários passos e é caracterizado por diversas alterações no genoma de células normais que, progressivamente, se transformam em células cancerígenas. No desenvolvimento do tumor, as alterações genéticas que conferem vantagem para o crescimento e adaptação das células são mantidas, enquanto que as características desvantajosas não, levando à evolução das células com um fenótipo maligno. Com o tempo foram descobertas mutações que produzem oncogenes, que levam a um ganho de função, e outras que produzem genes supressores tumorais, que provocam

uma perda de uma função. A desregulação do genoma, com o surgimento de mais oncogenes e uma diminuição dos genes supressores tumorais leva ao surgimento de células tumorais^{4,5}.

1.1. Características das células tumorais

Os tumores são compostos por diferentes tipos de células, não apenas células tumorais proliferativas, mas também células endoteliais, células do sistema imunitário, entre outras, que interagem uns com os outros e promovem a tumorigênese, através da criação de um microambiente favorável para o crescimento do tumor. As células cancerígenas manifestam características típicas, como uma sustentação da sinalização proliferativa, insensibilidade para os sinais de inibição de crescimento, disrupção da morte celular, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese e invasão e metastização (Figura 1.1. Características típicas do desenvolvimento de um tumor. Adaptado de ⁶).

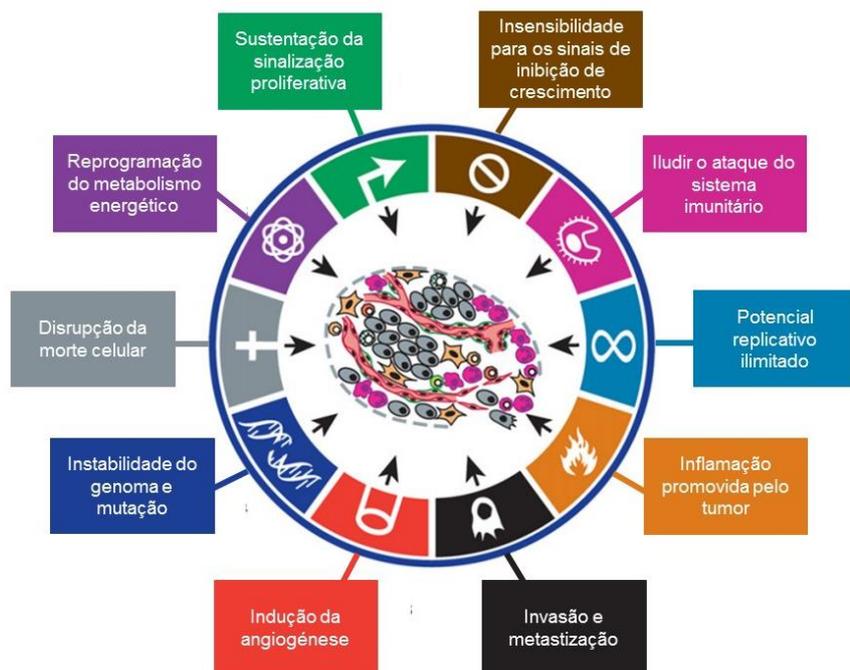


Figura 1.1. Características típicas do desenvolvimento de um tumor. Adaptado de ⁶

1.1.1. Sustentação da sinalização proliferativa

Os tecidos normais controlam a produção e liberação de sinais que promovem o crescimento celular, garantindo a homeostase do número de células e a manutenção da função dos tecidos. No caso das células cancerígenas, quando há desregulação destas vias de sinalização, há uma alteração do número e função das células. Normalmente, os

sinais são transmitidos por fatores de crescimento que se ligam a recetores, que existem na superfície das mesmas. Estes recetores contêm domínios intracelulares tirosina-cinase e ao serem ativados recorrem a vias intracelulares que regulam o ciclo celular, o crescimento celular e também outras propriedades, provocando diversas alterações nas células⁷. Nas células tumorais há um aumento da capacidade de proliferação que se pode dever a diversos processos, nomeadamente, sinais autócrinos, sinais que estimulam as células normais associadas ao tumor, o aumento dos níveis de recetores na superfície celular e mecanismos de feedback negativo⁸⁻¹⁰.

1.1.2. Insensibilidade para os sinais de inibição de crescimento

As células cancerígenas apresentam uma desregulação dos sinais que inibem o crescimento e a proliferação celular, muitas vezes regulados através da ação de genes supressores tumorais, que estão inativados em diferentes formas de cancro. Os genes supressores tumorais mais conhecidos codificam as proteínas RB (Proteína do Retinoblastoma) e p53 (Proteína p53), que são essenciais para os circuitos regulatórios que controlam a decisão da célula proliferar ou entrar em processos de senescência ou apoptose⁶. As proteínas supressoras tumorais recebem informação através de diversos sinais intra e extracelulares e, em resposta a esses sinais, a célula pode ou não prosseguir o seu ciclo de crescimento e divisão^{11,12}.

1.1.3. Disrupção da morte celular

A apoptose é um tipo de suicídio celular regulado, essencial para a manutenção da homeostase dos tecidos, eliminando células desnecessárias ou prejudiciais, sendo por isso, uma barreira natural ao desenvolvimento de tumores. A regulação deste processo é fundamental e orquestrada por uma rede complexa de vias de sinalização, e a sua desregulação leva a uma proliferação exagerada e acumulação de alterações genéticas nas células. A apoptose pode ser iniciada por sinais internos, como níveis elevados de oncogenes, ou externos, como a ligação de moléculas aos recetores da morte presentes na membrana celular^{6,13}. Devido à apoptose servir como uma barreira à tumorigénese, as células cancerígenas sofrem alterações que danificam as vias de sinalização apoptóticas, facilitando o crescimento do tumor e a metastização. Um dos primeiros reguladores de apoptose descoberto foi a Bcl-2 (Proteína da Célula-B do Linfoma 2), uma oncoproteína que atua através da promoção da sobrevivência das células e diminuindo a proliferação. Outro fator a considerar é que as alterações na apoptose podem provocar resistência às terapias para o cancro, uma vez que muitas se baseiam na eliminação das células por apoptose¹⁴.

1.1.4. Potencial replicativo ilimitado

As células cancerígenas dependem de um potencial replicativo ilimitado para que possam gerar tumores macroscópicos. Esta característica vai contra o comportamento das células normais, uma vez que estas passam por um número limitado de divisões celulares, que culmina em um de dois processos: senescência (entrada irreversível num estado não proliferativo, mas viável) ou apoptose (morte celular)⁶. O final dos cromossomas é constituído por telómeros, que são estruturas que protegem estas regiões, impedindo a degradação dos cromossomas. A telomerase é a enzima responsável por adicionar segmentos repetidos ao DNA (Ácido Desoxirribonucleíco) telomérico, evitando a sua degradação. Em células não imortalizadas, esta enzima, não é normalmente expressa, mas existe em níveis elevados na maioria das células imortalizadas, incluindo nas células tumorais. A atividade da telomerase leva a uma resistência à morte celular ou senescência, uma vez que permite a manutenção dos telómeros nos cromossomas e que as células se continuem a multiplicar¹⁵⁻¹⁷.

1.1.5. Indução da Angiogénese

Os tumores necessitam de nutrientes e oxigénio para sobreviver, tal como de excretar desperdício metabólico e dióxido de carbono, por isso, a neovasculatura do tumor é essencial para a sobrevivência das células cancerígenas¹⁸. Nos adultos a angiogénese está normalmente quiescente mas, pelo contrário, durante a progressão tumoral, a angiogénese é ativada e mantém-se, permitindo que a vasculatura normal, em tempos quiescente, se renove e origine novos vasos sanguíneos, possibilitando o crescimento e expansão do tecido tumoral¹⁹. A angiogénese surge cedo no desenvolvimento dos tumores, contribuindo para o seu desenvolvimento desde o início e, a partir do momento em que é ativada, os tumores exibem diferentes padrões de neovascularização, podendo ter mais ou menos densidade vascular²⁰. Os vasos sanguíneos produzidos nos tumores são, normalmente, aberrantes, isto porque se trata de uma angiogénese cronicamente ativada e de uma mistura de sinais proangiogénicos mal regulados, levando à formação de vasos demasiado ramificados, distorcidos e alargados, com um fluxo sanguíneo anormal, microhemorragias e uma proliferação e apoptose desregulada das células endoteliais^{21,22}.

1.1.6. Invasão e Metástase

Até há pouco tempo, os mecanismos subjacentes aos processos de invasão e metástase eram pouco conhecidos, mas sabia-se que as células cancerígenas alteravam a sua forma e também a sua adesão a outras células e à matriz extracelular. A alteração melhor caracterizada nas células tumorais é a perda, pelas células cancerígenas, da E-

caderina, uma molécula essencial no processo de adesão célula-célula. Níveis elevados desta molécula são considerados como um antagonismo à invasão e metástase, ao passo que a sua redução potencia este fenótipo. Frequentemente, em células tumorais, os níveis desta molécula estão diminuídos ou o gene sofre uma mutação que inativa a proteína, sendo considerado um fator determinante para a invasão e metastização. Para além disso, existem outros genes e moléculas de adesão célula-célula que estão alterados em carcinomas. Pelo contrário, moléculas de adesão associadas à migração celular, que ocorre durante a embriogénese e inflamação, estão normalmente em níveis mais elevados, como é o caso da N-caderina. Para além das diferenças entre os níveis destas moléculas, não se conhecem bem os principais reguladores da invasão e metástase^{23,24}.

A aquisição das características típicas das células tumorais, explicadas anteriormente, e que permitem o crescimento, sobrevivência e metastização tumoral depende de duas características principais: o desenvolvimento de uma instabilidade do genoma das células tumorais, gerando mutações; e do estado inflamatório das lesões pré-malignas e malignas que, em certos casos, promove a tumorigénese.

1.1.7. Instabilidade do genoma e mutação

A aquisição das diferentes características das células cancerígenas deve-se em grande parte a diversas alterações no genoma das células neoplásicas. Alguns genótipos mutantes conferem uma vantagem adaptativa, permitindo o crescimento das células tumorais⁵. Nas células normais existem sistemas que permitem a manutenção do genoma, detetando e resolvendo os defeitos no DNA, e impedindo que os níveis de mutação se tornem demasiado elevados. A acumulação de mutações pode ser acelerada se se comprometerem os sistemas de sobrevivência que, normalmente, monitorizam a integridade do genoma e conduzem as células danificadas para processos de senescência ou apoptose^{25,26}. A proteína p53 é essencial para a maioria dos processos de proteção do DNA, sendo chamada de “guardiã do genoma”. Esta proteína é considerada um supressor tumoral, por isso, quando sofre mutações induz instabilidade genética e leva ao surgimento de tumores^{27,28}.

1.1.8. Inflamação promovida pelo tumor

Os tumores, para além de células cancerígenas, contêm diversas células do sistema imunitário associadas, tanto do sistema imunitário inato como do adaptativo. Há evidências de que a resposta inflamatória associada ao tumor tenha um efeito paradoxal, levando a um aumento da tumorigénese. As células do sistema imunitário podem contribuir com moléculas bioativas para o microambiente do tumor, nomeadamente, fatores de

crescimento, que aumentam a proliferação, fatores de sobrevivência, que limitam a morte celular, fatores proangiogênicos, entre outros, favorecendo o crescimento do tumor^{29,30}. A inflamação pode surgir em fases iniciais das neoplasias e promover o seu progresso para tumores completamente desenvolvidos.

Existem ainda outros fatores que podem ser adicionados à lista de características propostas anteriormente para o desenvolvimento de tumores, como é o caso da reprogramação do metabolismo energético celular, que permite um crescimento celular e proliferação contínuo, ou a capacidade de as células tumorais resistirem ao ataque e eliminação pelas células do sistema imunitário^{5,6,25,31}.

1.1.9. Reprogramação do metabolismo energético

A proliferação descontrolada das células tumorais deve-se a uma desregulação do controlo da proliferação, mas também a ajustes no metabolismo energético da célula, de forma a obter mais energia para o crescimento e divisão celular. Em condições aeróbicas, as células normais processam a glucose, primeiro em piruvato no citosol e depois em dióxido de carbono na mitocôndria. Já em condições anaeróbicas, a glicólise é favorecida e a grande maioria do piruvato não é usada na mitocôndria. As alterações no metabolismo das células cancerígenas foram observadas, inicialmente, por Otto Warburg^{32,33} que concluiu que, mesmo na presença de oxigênio, as células tumorais reprogramam o seu metabolismo de glucose e a sua produção de energia, limitando o seu metabolismo energético maioritariamente à glicólise, levando a um estado denominado glicólise aeróbica. A adaptação metabólica das células cancerígenas é contraintuitiva, mas as células aumentam os níveis de transportadores de glucose e os níveis de enzimas da via glicolítica, para permitir uma maior produção de energia^{34,35}. Outro fator a considerar é que os intermediários da via glicolítica são utilizados noutras vias biossintéticas, como é o caso da produção de nucleótidos e aminoácidos, o que facilita, por sua vez, a produção de macromoléculas e organelos essenciais para as novas células³⁶.

1.1.10. Iludir o ataque do sistema imunitário

As células e tecidos são monitorizados por células do sistema imunitário, que reconhecem e eliminam as células que apresentam anormalidades, nomeadamente, células cancerígenas. O problema surge quando há uma inaptidão do sistema imunitário em reconhecer e combater a formação e progressão de neoplasias, tumores ou micrometástases. Apesar de existirem evidências de que o sistema imunitário serve de barreira para a formação de tumores, existem células que conseguem resistir à deteção e

ataque pelas células do sistema imunitário, evitando a sua eliminação e levando à formação de neoplasias^{6,37,38}.

1.2. Terapia do Cancro

As diferentes modalidades terapêuticas utilizadas dependem de cada tipo de cancro e da sua evolução. Os principais tratamentos para o cancro passam por cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia direcionada, hormonoterapia, transplante de células estaminais ou terapia fotodinâmica³⁹.

A cirurgia permite retirar o tumor macroscópico do paciente, mas nem sempre é bem-sucedida uma vez que podem existir células fora da área abrangida pela cirurgia e, por vezes, não pode ser repetida no mesmo doente e nem todos os tecidos podem ser alvo deste tipo de intervenção. A radioterapia utiliza radiação ionizante para matar as células tumorais e, conseqüentemente, diminuir o tamanho dos tumores ou eliminá-los, mas apresenta efeitos adversos como irritação cutânea⁴⁰. A quimioterapia surgiu para combater alvos específicos das células cancerígenas, de modo a levar à sua morte, utilizando um fármaco administrado sistematicamente, mas pode ser pouco seletivo para as células tumorais e provocar diversos efeitos secundários⁴¹. A imunoterapia permite modular a interação entre as células cancerígenas e o microambiente onde estas se encontram e facilita a ação das células imunitárias, para que estas destruam as células malignas, tanto em lesões primárias, como em locais de metastização⁴². A terapia direcionada tem como objetivo fazer chegar fármacos a genes ou proteínas específicos das células cancerígenas ou do microambiente do tumor, que promovem o crescimento tumoral. A eficácia desta terapia depende da capacidade de libertar o fármaco apenas no local do tumor, minimizando os efeitos secundários. Tem como principais alvos o bloqueio da proliferação celular, a regulação do ciclo celular ou a apoptose ou autofagia das células cancerígenas⁴³. A hormonoterapia é um tratamento que diminui o crescimento de células cancerígenas dependentes de hormonas, como é o caso de alguns casos de cancro da mama ou da próstata³⁹. No entanto, todas estas terapias têm limitações, sendo necessário investir em diferentes modalidades terapêuticas com menos efeitos secundários. Assim, surge a terapia fotodinâmica, que é um processo aprovado clinicamente, e trata-se de uma terapia seletiva pouco invasiva que permite eliminar células malignas⁴⁴.

2. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) é uma terapia aprovada clinicamente, pouco invasiva, e pode ser utilizada para o tratamento de lesões neoplásicas ou outro tipo de doenças⁴⁵, tendo como objetivo a remoção de células prejudiciais ou indesejadas^{46,47}.

A terapia fotodinâmica depende de três componentes essenciais: um fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*), luz e oxigênio, sendo que nenhum é tóxico individualmente, mas combinados culminam na formação de espécies altamente reativas⁴⁴.

A PDT inicia-se com a administração de um fármaco fotoativo, isto é, que ao absorver luz, preferencialmente na janela fototerapêutica (650 a 850 nm – gama de comprimentos de onda onde os tecidos são mais transparentes à passagem da luz), se torna ativo, denominado fotossensibilizador. Após a administração do fármaco, espera-se um intervalo de tempo específico, denominado “intervalo fármaco-luz” (DLI, do inglês *drug-to-light interval*). Caso o DLI seja curto, trata-se de PDT vascular, uma vez que o PS se encontra nos vasos sanguíneos, mas, se o DLI for maior, é possível ocorrer uma maior acumulação do PS no tecido alvo, tratando-se de PDT celular. Após o DLI irradia-se o local do tumor. O PS é inativo no escuro, mas quando ativado pela luz, é excitado eletronicamente e transfere um elétron para o oxigênio molecular, ou outros aceitadores de elétrons, levando à formação de aniões superóxido e outras espécies radicalares (reações do tipo I). Uma vez no estado excitado, o PS pode também transferir a sua energia eletrônica para o oxigênio molecular, que se encontra no estado fundamental, levando à formação de oxigênio singuleto (reações do tipo II) (Figura 1.2. Representação esquemática das diferentes etapas da terapia fotodinâmica. Imagem cedida por Ana I. Mata.. A formação destas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) desencadeia três mecanismos principais de ação da PDT: efeitos citotóxicos diretos nas células tumorais, devido ao aumento do stress oxidativo, danos na vasculatura do tumor, com conseqüente morte por isquemia do tecido tumoral, e indução de uma reação inflamatória que pode levar a uma resposta do sistema imunológico⁴⁶.

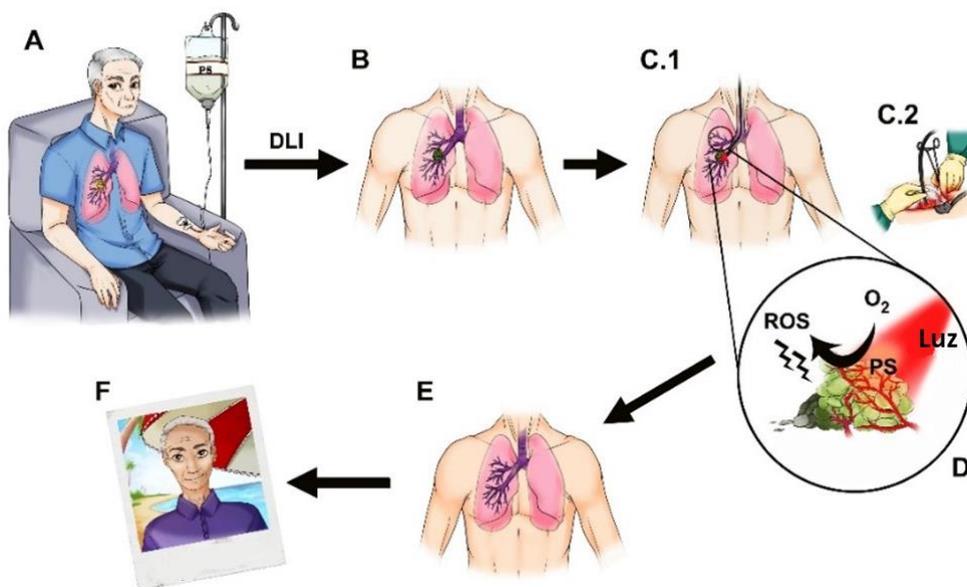


Figura 1.2. Representação esquemática das diferentes etapas da terapia fotodinâmica. Imagem cedida por Ana I. Mata.

A luz pode ser aplicada em qualquer zona do corpo, mesmo em órgãos internos, recorrendo a dispositivos compostos por fibras óticas flexíveis ou endoscópios. A seletividade é conseguida com a capacidade que o PS tem de se acumular nas células cancerígenas e também com a precisão com que aplicamos a luz no local a ser tratado⁴⁸.

2.1. Interação da luz com os tecidos

Os tecidos biológicos não são um meio homogêneo, uma vez que contêm diversas partículas microscópicas, como é o caso de macromoléculas ou organelos celulares. Por isso, na passagem da luz pelos tecidos ocorrem diversos processos de refração, reflexão, absorção e dispersão, levando a um espalhamento da luz, a uma diminuição da direccionalidade do feixe de luz e a uma variação da profundidade atingida pelo feixe de luz (Figura 1.3). A extensão de cada um destes processos depende do tipo de tecido e do comprimento de onda da luz⁴⁹.

A dispersão da luz nos tecidos é um dos efeitos que afeta de forma mais acentuada a intensidade e direção do feixe de luz utilizado para a PDT. A dispersão, em conjunto com a refração, leva a um alargamento do feixe de luz, resultando numa diminuição da fluência⁵⁰.

Para além da dispersão, a absorção da luz pelos tecidos leva a uma diminuição da intensidade da luz com a profundidade de penetração. A absorção da luz deve-se, maioritariamente, a cromóforos endógenos dos tecidos, como por exemplo água, hemoglobina, mioglobina, melanina ou citocromos⁴⁹.

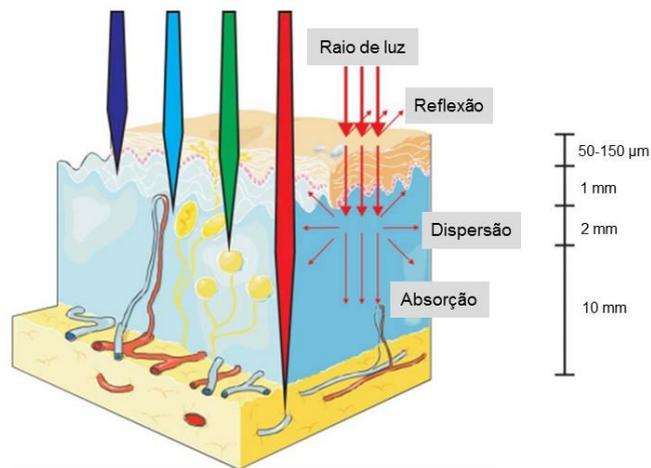


Figura 1.3. Esquema da profundidade de penetração da luz na pele e fenômenos de interação da luz com os tecidos. Adaptado de⁴⁴.

O conceito de janela fototerapêutica surge da combinação de três fatores principais: a maior absorção de luz de comprimentos de onda baixos pelos cromóforos dos tecidos; diminuição da dispersão da luz com a utilização de comprimentos de onda mais elevados; e a elevada absorção pela água de luz com comprimentos de onda superiores a 1000 nm. A gama de comprimentos de onda ideal para utilizar em PDT situa-se entre os 700 e os 800 nm (Figura 1.4)^{46,49}.

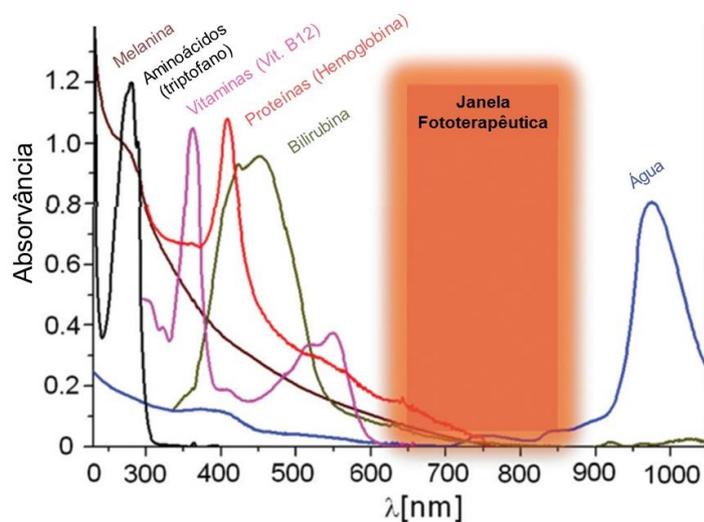


Figura 1.4. Espectro de absorção dos cromóforos endógenos e janela fototerapêutica. Adaptado de⁴⁶.

Cada PS tem um comprimento de onda específico que maximiza a penetração da luz nos tecidos e a excitação da molécula. A maior penetração da luz de maiores comprimentos de onda na pele levou ao desenvolvimento de PS que absorvessem mais nesta gama,

como é o caso das bacterioclorinas, que têm um elevado coeficiente de absorção molar na região dos 740 a 780 nm⁴⁶.

Para além dos processos de dispersão e absorção da luz por cromóforos endógenos dos tecidos, podem ocorrer processos de auto-blindagem (self-shielding), que consistem na absorção de luz pelo PS no local da irradiação, limitando a penetração da luz no tecido alvo. Outro efeito relacionado com os PSs são os processos de fotodegradação, que ocorrem por ação dos produtos formados pela PDT sobre os PSs, reduzindo a sua eficácia⁴⁹.

2.2. Fotoquímica

O PS no estado fundamental é caracterizado por um par de eletrões emparelhado, com spins opostos, perfazendo um spin total de $S=0$. Esta configuração denomina-se estado singuleto e a configuração com todos os eletrões nas orbitais com o valor de energia mais baixo possível é chamada de estado fundamental S_0 . Após a absorção de luz com um comprimento de onda adequado, ocorre a excitação do PS e um dos eletrões passa para um orbital desocupada com maior energia. Dependendo da energia transferida, o PS pode passar para um dos estado singuleto excitado S_x ($x=1, 2, 3, \dots$). Como os estados excitados são sempre menos estáveis que o fundamental, a molécula retorna a S_0 após um período curto de tempo. Esta desativação para o estado fundamental pode ocorrer por diversos mecanismos⁵¹.

Cada estado singuleto S_x subdivide-se em vários níveis vibracionais com energias crescentes. Um PS num estado vibracional mais alto de um estado excitado rapidamente passa para o nível vibracional de menor energia daquele estado excitado. Este processo é denominado relaxação vibracional e a energia é dissipada na forma de calor. Um PS que tenha sido excitado para um nível S_x superior, também pode decair para S_1 através de relaxação vibracional. A passagem para o estado S_0 pode ocorrer por emissão de um fóton (emissão de fluorescência) ou por dissipação de calor. A emissão de fluorescência inicia-se sempre com o PS no estado vibracional mais baixo de S_1 e o fóton emitido tem sempre energia menor ou igual do que a usada para excitar o PS⁵¹.

Para além da emissão de fluorescência ou dos processos de relaxação vibracional, o PS no estado S_1 pode passar para um nível isoenergético do estado tripleto, T_1 , onde passamos a ter dois eletrões desemparelhados, com o mesmo spin. Este processo, não-radiativo, trata-se de um cruzamento intersistemas. A maioria dos PSs têm uma elevada eficiência para esta transição, permanecendo no estado tripleto mais tempo do que no estado S_1 ⁵².

Depois de uma rápida relaxação vibracional no estado energético T_1 , pode ocorrer uma relaxação radiativa para S_0 , ou seja, processos de fosforescência, onde há emissão de um fóton. Para que isto aconteça, tem de ocorrer, novamente, uma alteração no spin do elétron, por isso, os estados tripleto são caracterizados por terem um tempo de vida relativamente elevado e, para além da emissão de fosforescência, permitem a ocorrência de outras reações fotoquímicas com as moléculas em seu redor.

Os PSs têm uma elevada probabilidade de formação de estado tripleto após a excitação da molécula, por isso e porque os estados T_1 têm um tempo de vida relativamente longo (microsegundos), a maioria das reações ocorre com a molécula neste estado⁵³. O PS no estado tripleto excitado pode provocar alterações nas moléculas da vizinhança por duas vias competidoras, chamadas de reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II. As transições explicadas acima estão esquematizadas na Figura 1.5.

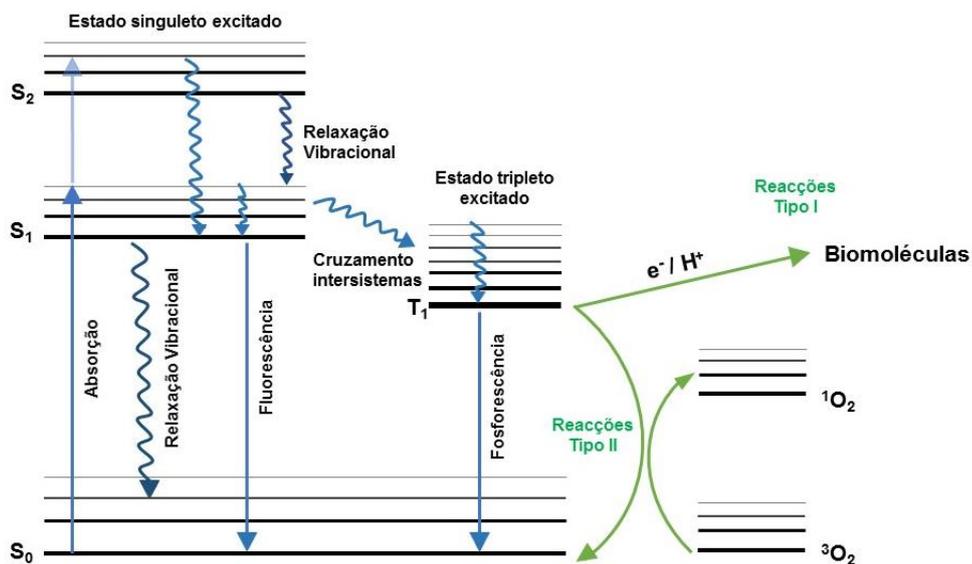


Figura 1.5. Diagrama de Jablonski com a representação das transições que ocorrem entre o PS e o oxigênio ou as biomoléculas. Adaptado de⁵⁴.

O PS, nas reações de tipo I, pode reagir diretamente com um substrato, como por exemplo a membrana celular ou qualquer outra molécula, e transferir um próton ou um elétron, levando à formação de radicais. Já nas reações de tipo II, o estado tripleto do PS transfere energia diretamente para o oxigênio molecular, que está no estado tripleto fundamental, para formar oxigênio num estado singuleto excitado⁴⁹.

As reações do tipo I implicam a transferência ou remoção de elétrons, ou prótons, para o oxigênio, ou outras moléculas adjacentes, para formar radicais iónicos⁵⁵. Estes radicais podem reagir com o oxigênio molecular para produzir ROS. As reações de tipo I, normalmente, resultam na formação de aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por transferência de um

elétron do PS no estado tripleto para o oxigénio molecular. Os aniões superóxido não são muito reativos em sistemas biológicos, provocando poucos danos oxidativos, mas podem reagir entre si e levar à formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Em concentrações elevadas, o peróxido de hidrogénio pode reagir com os aniões superóxido para formar uma espécie altamente reativa, o radical hidroxilo ($OH\cdot$). Este radical, altamente reativo, pode reagir com moléculas orgânicas, como é o caso de ácidos gordos e, pode adicionar-se à molécula, levando à formação de um radical hidroxilado, ou oxidando-o, retirando-lhe um elétron e tornando-o, mais uma vez, num radical. Estes radicais podem reagir com outras moléculas levando a uma reação em cadeia, muito comum na oxidação de ácidos gordos ou outros lípidos. O anião superóxido também pode reagir com o radical hidroxilo, para formar oxigénio singuleto, ou com óxido nítrico, para formar peroxinitrito, outra espécie altamente reativa⁵⁶

As reações de tipo II são caracterizadas por uma transferência de energia, não de elétrões, para o oxigénio molecular. O oxigénio molecular (3O_2) tem uma característica particular, uma vez que no seu estado fundamental se encontra numa configuração em tripleto, contendo dois elétrões desemparelhados, com spins paralelos em duas orbitais degeneradas anti-ligantes, podendo interagir com o PS no estado tripleto. Durante a transferência de energia forma-se oxigénio singuleto (1O_2), uma espécie altamente reativa, caracterizada por um par de elétrões emparelhado, com spins opostos, numa orbital exterior^{47,57}. O oxigénio singuleto é uma molécula sem carga e, como tal, pode difundir no citoplasma e pelas membranas biológicas. O tempo de meia vida do oxigénio singuleto no interior das células ronda os 3 μs ⁵⁸, com um raio máximo de difusão de 150 nm⁴⁶, por isso, a localização celular do PS influencia o dano provocado pela PDT.

As reações do tipo I e do tipo II ocorrem em paralelo, e a razão entre elas depende de diversos parâmetros, nomeadamente do tipo de PS utilizado, da sua localização na célula e da concentração de oxigénio e de outros substratos da célula. Para muitos PS, as reações de tipo II são dominantes⁴⁹.

As espécies produzidas por ambas as vias são espécies oxidantes que podem reagir diretamente com diversas moléculas biológicas, como por exemplo resíduos de aminoácidos, lípidos insaturados ou DNA, tanto nas bases nucleicas, como nos açúcares. Apesar das células terem alguma capacidade de reparar danos oxidativos nas proteínas e no DNA, danos em excesso provocam mutações e morte celular. Ainda assim, devido ao tempo de vida do oxigénio singuleto e do radical hidroxilo ser curto, apenas moléculas que estejam próximas da área de produção é que são diretamente afetadas pela PDT⁴⁹.

2.3. Fotossensibilizadores

A terapia fotodinâmica recorre, muitas vezes, a moléculas baseadas na estrutura tetrapirrólica da porfirina para obter fotossensibilizadores eficientes. Esta estrutura pode ser encontrada no grupo heme da hemoglobina ou em clorinas, que absorvem grandes quantidades de luz⁵⁹. Assim, a maioria dos PS sintéticos utilizados em PDT são porfirinas, clorinas ou bacterioclorinas. Várias moléculas têm tido sucesso no tratamento do cancro com PDT, como é o caso do porfímero sódico (Photofrin® - Figura 1.6.A), um derivado da hematoporfirina, que representa a primeira geração de compostos para PDT. Este composto tem desvantagens, nomeadamente o facto de a luz no comprimento de onda de ativação do PS, 630 nm, não penetrar bem os tecidos e o composto ter uma baixa eficácia de absorção de luz. Para além disso, tem um período de fotossensibilidade cutânea elevado, sendo este o principal efeito secundário⁶⁰. O ácido 5-aminolevulínico (Levulan® - Figura 1.6.B), e o seu éster mais apolar aminolevulinato de metilo (Metvix®), são outros compostos importantes na PDT. Ambos são pró-fármacos que, após serem metabolizados no interior das células, formam a protoporfirina IX, o verdadeiro PS. Este PS é muito utilizado no tratamento de lesões pré-cancerígenas da pele, como a queratose actínica, uma vez que é possível administrá-lo topicamente, com menos efeitos secundários, nomeadamente de fotossensibilidade⁶¹. A temoporfina (Foscan® - Figura 1.6.C) é um PS de segunda geração, que tem um comprimento de onda de absorção superior ao do porfímero sódico, 652 nm, que permite uma profundidade de tratamento maior e uma absorção mais eficiente. Para além disso, a fotossensibilidade cutânea deste PS é significativamente menor⁶⁰.

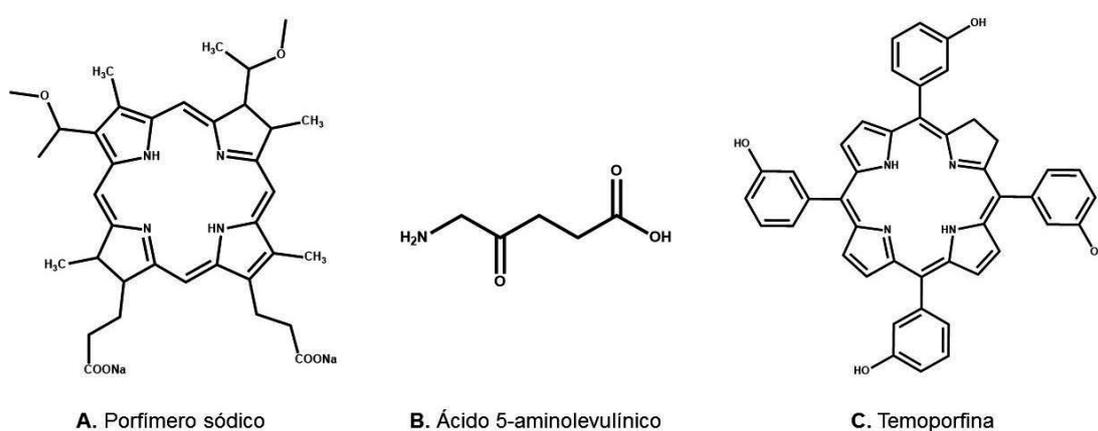


Figura 1.6. Representação esquemática de PSs de 1ª e 2ª geração. **A.** Porfímero sódico, **B.** Ácido 5-aminolevulínico, **C.** Temoporfina.

Mesmo com o desenvolvimento e aprovação destas moléculas, ainda existe uma grande margem para o desenvolvimento de novos PS, que reúnam propriedades farmacológicas mais favoráveis⁵⁹.

2.3.1. Fotossensibilizador ideal

Os fotossensibilizadores têm que reunir algumas características químicas, biológicas e clínicas base para serem utilizados em terapia fotodinâmica. O comprimento de onda para ativação do PS e o rendimento quântico do estado tripleto são duas das características mais importantes. Para além disso, deve ser estável, ter uma baixa toxicidade no escuro, ser anfifílico, ter uma eliminação rápida pelo organismo, ter uma formulação simples, uma síntese simples e com elevado rendimento e a possibilidade de se fazer *scale-up*⁴⁷.

O pico máximo de absorção do PS deve estar contido no intervalo de comprimentos de onda de 700 a 800 nm, correspondente à janela fototerapêutica. Nesta gama de comprimentos de onda, a penetração da luz é maior e a energia do estado tripleto ainda é alta o suficiente para levar à formação de oxigénio singuleto. Para além disso, o coeficiente de absorção deve estar na ordem de grandeza dos $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A elevada eficiência do processo de cruzamento intersistemas e um tempo de vida elevado do estado tripleto levam, também, a uma maior eficiência da PDT, por permitirem uma maior formação de espécies citotóxicas. Assim, os valores para as propriedades fotoquímicas utilizadas para avaliar um PS devem encontrar-se dentro de determinados valores, como por exemplo, um rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) cerca de 0,2, um rendimento quântico de estado tripleto (ϕ_T) superior a 0,7, um tempo de vida do estado tripleto (τ_T) superior a 100 μs , um rendimento quântico de oxigénio singuleto (ϕ_Δ) superior a 0,5 e um rendimento quântico de fotodecomposição (ϕ_{pd}) inferior a 10^{-5} ⁶².

Os PS fotoestáveis, isto é, que sofram uma menor fotodegradação, são bons porque permitem maiores tempos de irradiação e maior produção de ROS. O problema surge quando a *clearance* destas moléculas dos tecidos não é eficaz, levando a fotossensibilidade nos pacientes durante um longo período de tempo. A solubilidade também é importante para a administração dos PSs, uma vez que uma maior anfifilicidade permite um melhor transporte no sangue, com menos riscos de a molécula agregar (se houver agregação, a eficácia de absorção da luz diminui e, conseqüentemente, diminui o rendimento quântico do estado tripleto), e uma passagem eficaz pelas membranas celulares. O PS deve, também, ser seletivo, isto é, acumular-se em maior quantidade nas células cancerígenas e não nas células normais, diminuindo os danos causados nos tecidos que rodeiam o tumor. Esta seletividade pode ser conseguida utilizando anticorpos ou outros transportadores específicos para células tumorais na formulação. Após a PDT, a eliminação do PS por fotodegradação, metabolização ou excreção, deve ser o mais rápida possível, para diminuir possíveis efeitos de fotossensibilidade. Para além disto, um PS não

deve ser tóxico antes de ser fotoativado e os seus produtos de fotodegradação ou metabolização também não^{47,63}.

Os PS de 3^o geração são moléculas com comprimentos de onda de ativação maiores, com menor possibilidade de originar reações de fotossensibilidade cutânea e mais seletivos para os tumores. As bacterioclorinas são da família dos macrociclos tetrapirrólicos e são compostos com características fotoquímicas e fotofísicas próximas das do PS ideal, tendo apresentado bons resultados em estudos pré-clínicos e clínicos⁵⁹.

O Tookad Soluble (WST11) (Figura 1.7) é um derivado do pigmento fotossintético *Bacteriochlorophyll a*. Este PS é solúvel em meio aquoso, não necessitando de ser incorporado em micelas para ser administrado nos pacientes, e mantém-se no plasma até ser eliminado do organismo, sendo útil para terapia fotodinâmica vascular. Os estudos com este PS mostram que as espécies reativas formadas durante a irradiação são superóxido e radicais hidroxilo, não havendo vestígios da formação de oxigénio singuleto. Este composto encontra-se em ensaios clínicos para o cancro da próstata⁶⁴.

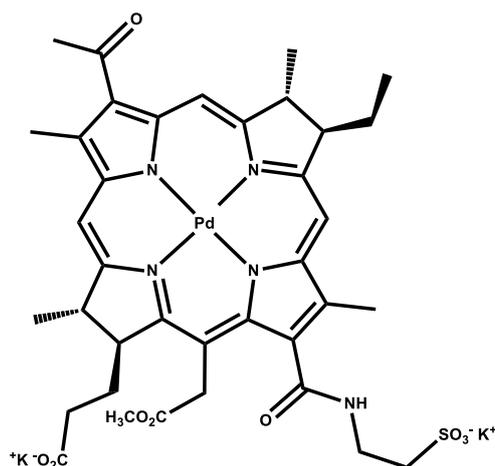


Figura 1.7. Representação Esquemática da molécula Tookad Soluble

2.3.2. Redaporfin

A maior vantagem da última geração de PS é a sua elevada absorção na região dos 740 a 780 nm que combina energia suficiente para uma transferência de eletrão ou energia suficiente para o oxigénio molecular, e permite uma maior penetração do tecido.

A redaporfin, 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil) bacterioclorina (Figura 1.8), é uma bacterioclorina meso substituída com grupos fenilo, que contém átomos de flúor nas posições *orto* e grupos sulfonamida nas posições *meta* dos grupos fenilo.

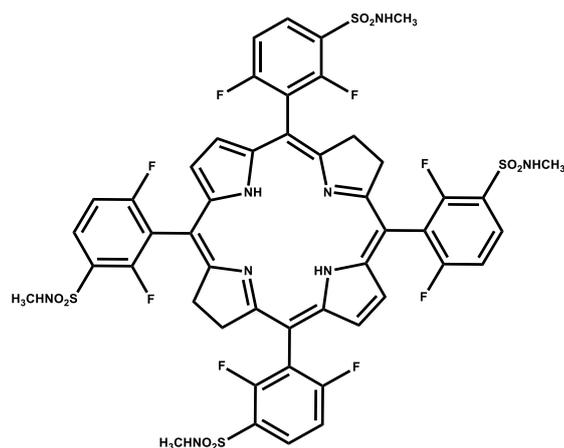


Figura 1.8. Representação esquemática da molécula Redaporfin

A redaporfin é uma bacteriocloringina sintética que combina as propriedades fotoquímicas características desta classe de compostos, com uma fotoestabilidade difícil de conseguir nos compostos desta família. O rendimento quântico de fotodecomposição da redaporfin em Cremophor EL:etanol:NaCl 0.9% (0.2 : 1 : 98.8, v : v : v) é $\Phi_{pd} = 8 \times 10^{-6}$, valor baixo quando comparado com os outros PS desta família⁶². Esta propriedade foi conseguida com a introdução de átomos de flúor nas posições orto dos anéis fenilo. Para além disso, a introdução de halogénios permite aumentar o rendimento quântico de estado tripleto devido ao efeito do átomo pesado. Este PS também contém grupos sulfonamida nas posições meta dos fenilos que permitem modular a anfifilicidade do composto (coeficiente de partição octanol-água de $P_{OW} = 1.9$)⁶². A estabilidade da redaporfin também tem implicações na sua farmacocinética, uma vez que, 80% do composto é eliminado do plasma em 12h, mas o tempo de meia vida terminal no plasma é longo⁶⁵. Esta característica permite utilizar a redaporfin tanto para modalidades de PDT-vascular como de PDT-celular (DLI superior a 24h, permitindo a acumulação no tecido tumoral). No ensaio clínico (NCT02070432 - Photodynamic Therapy With LUZ11 in Advanced Head and Neck Cancer) foram já demonstrados benefícios terapêuticos⁶⁶.

O tempo de vida do radical hidroxilo em células é 1 ns e o raio de ação 1 nm, já o oxigénio singuleto, tem um tempo de vida de 2 μ s e pode difundir até 150 nm do local onde foi formado⁶⁷. Assim, o radical hidroxilo tem um menor raio de ação que o oxigénio singuleto, o que localiza ainda mais os danos oxidativos gerados pela PDT. Os radicais hidroxilo também podem levar a uma decomposição do PS, diminuindo o número de ciclos de absorção e geração de ROS do PS⁴⁶.

A redaporfin participa tanto em reações do tipo I como do tipo II, e a competição entre a transferência de energia ou de eletrões do PS para o oxigénio molecular favorece a primeira reação. A geração simultânea de oxigénio singuleto e de radicais hidroxilo parece ter efeitos sinérgicos e aumentar a fototoxicidade⁶⁸. Para além desta característica, a

redaporfin absorve numa gama de comprimentos de onda onde os tecidos são mais transparentes, aumentando a ativação do PS⁴⁶.

2.4. Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica

Os PSs bem-sucedidos clinicamente têm uma acumulação preferencial no tumor e na neovasculatura, podendo acumular-se em diferentes organelos celulares, tal como mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, mas também nas membranas celulares, tanto do tecido tumoral como da vasculatura. A razão para a acumulação preferencial do PS nas células tumorais e na neovasculatura ainda não é bem conhecida, mas parece dever-se a um aumento da internalização do PS mediado por recetores nas células tumorais e de uma capacidade diminuída da vasculatura de evacuar o PS⁶³.

Os três mecanismos por trás do sucesso da PDT, contribuindo para a diminuição do tumor ou o seu desaparecimento, são: (i) efeitos citotóxicos diretos nas células (morte das células do tumor por necrose ou apoptose), (ii) danos na vasculatura do tumor (diminuição do oxigénio e nutrientes) e (iii) ativação de uma resposta do sistema imunitário contra as células do tumor. Estes mecanismos podem ocorrer em simultâneo e têm influência uns sobre os outros, e é a combinação dos três que permite curas a longo termo⁶⁹. A contribuição de cada um destes mecanismos depende de diversos fatores, nomeadamente a natureza do PS, a sua localização durante a irradiação, o tempo de exposição à luz, o tipo de tumor e a sua vasculatura⁵³.

2.4.1. Efeitos citotóxicos diretos nas células

A exposição do tumor à PDT leva a uma redução do número de células tumorais devido a efeitos citotóxicos diretos, mas pensa-se ser insuficiente para a cura total do tumor. Os estudos *in vitro* mostram que é possível eliminar todas as células tumorais recorrendo a doses de luz elevadas, mas parecem existir limitações quando o tratamento é aplicado *in vivo*. A distribuição pouco homogénea do PS no tumor pode ser uma das razões para que a terapia *in vivo* não seja tão eficaz, uma vez que células mais distantes da vasculatura do tumor não têm acesso às mesmas quantidades de PS e de oxigénio que as células junto dos vasos, por isso, serão menos afetadas pela PDT^{69,70}. Vários fatores podem influenciar a concentração dos PSs nas células, como por exemplo o tipo de PS, a via de administração ou a vasculatura do tumor. Outro parâmetro importante para a citotoxicidade direta nas células é a concentração de oxigénio no tecido durante o processo de fotodinâmico, sendo que em tecidos em condições de hipoxia a terapia não é tão eficaz⁷¹.

O protocolo de irradiação utilizado na PDT influencia o tipo de morte celular das células irradiadas. Se a irradiação for feita de forma intensa e rápida, ocorrem mais processos de necrose, enquanto que uma irradiação mais prolongada e menos intensa leva a processos de apoptose. A morte celular por apoptose é um processo relativamente controlado, mais confinado, e, por isso, não leva à libertação de citocinas e outros materiais pró-inflamatórios, não envolvendo uma resposta imunitária. No entanto, a necrose, por ser um processo mais exacerbado, pode instigar uma resposta imunitária, sendo mais útil a nível clínico⁷².

2.4.2. Efeitos Vasculares

A vasculatura do tumor é essencial para a disseminação de células tumorais para órgãos distantes, mas, principalmente, para a obtenção de nutrientes e oxigénio, essenciais para a viabilidade do tumor⁵³. A PDT pode provocar danos ao nível da vasculatura do tumor, contribuindo para um maior controlo do tumor a longo termo. Como os tumores têm muitos vasos formados recentemente, o PS acumula-se preferencialmente nestes locais, uma vez que a neovasculatura do tumor não funciona no seu pleno, e não consegue excretar tão facilmente o composto⁴⁹. Os efeitos na microvasculatura do tumor são observados pouco tempo após a PDT, e cada PS pode provocar diferentes efeitos, nomeadamente vasoconstrição, adesão de leucócitos, inflamação local, formação de trombos ou aumento da permeação dos vasos. Estes efeitos estão muitas vezes relacionados com a agregação plaquetar ou danos no endotélio dos vasos⁷³.

A distribuição do PS altera-se com o tempo, uma vez que, pouco tempo após a administração, o PS está na corrente sanguínea e na neovasculatura do tumor, e com o passar do tempo vai-se acumulando no interior das células tumorais. Assim, se a irradiação for realizada com um DLI curto, o PS afeta, principalmente, os vasos sanguíneos⁷⁴. A utilização desta modalidade terapêutica leva a uma diminuição dos níveis de oxigénio e nutrientes no tumor e conduzem a uma inibição ou um atraso no crescimento tumoral.

2.4.3. Resposta Imunitária

Inicialmente a PDT foi desenvolvida como um tratamento local, com efeitos apenas no local da irradiação. No entanto, com o avançar da pesquisa tornou-se claro que o sistema imunológico tem um papel importante no sucesso da PDT⁷⁵.

O sistema imunológico pode contribuir para a PDT por dois mecanismos: atividade anti-tumoral mediada pela PDT através das células do sistema imunológico ou geração de uma resposta imunológica anti-tumoral a longo termo. Estes efeitos surgem devido a danos fototóxicos que podem não ser letais para todas as células do tumor, mas estimulam o sistema imunológico⁶⁹.

A morte das células tumorais por necrose, após uma irradiação intensa e rápida, leva à libertação de proteínas e citocinas, estimulando o sistema imunitário, mas a morte por apoptose não é tão imunogénica⁷⁶. Isto leva a um reconhecimento do tumor e infiltração com glóbulos brancos, interleucinas e citocinas para levar à destruição do tumor, com o mínimo de danos para as células normais. Para além disso, algumas das células ativadas durante este processo vão apresentar antígenos às células dendríticas, tanto junto ao tumor como nos nódulos linfáticos, possibilitando o aparecimento de memória nas células do sistema linfático. Esta memória pode permitir o reconhecimento e ataque de lesões metastáticas ou impedir o reaparecimento do tumor, através das células T de memória⁷⁷⁻⁷⁹.

2.5. Vantagens e limitações da terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica apresenta diversas vantagens sendo uma das principais a capacidade de destruir o tecido tumoral provocando poucos danos no tecido saudável que o rodeia. Isto é possível porque muitos PS têm a capacidade de se acumularem em maior quantidade no tecido tumoral e não no tecido saudável e, para além disso, a luz é aplicada exclusivamente na zona da lesão⁸⁰. Outro fator que contribui para que os efeitos da PDT sejam localizados é o facto de que as espécies reativas de oxigénio que se formam após a ativação do PS têm tempos de vida curtos e só se formam enquanto o tecido está a ser irradiado. Assim, o seu raio de ação destrutiva está limitado ao local onde são produzidas, não afetando os tecidos saudáveis circundantes⁴⁴.

No caso de existirem lesões múltiplas ou se houver recorrência do tumor, a PDT pode ser repetida no mesmo paciente, uma vez que não são conhecidos mecanismos de resistência a esta modalidade terapêutica. Para além disso, a PDT pode ser utilizada em simultâneo com cirurgia, quimioterapia ou radioterapia⁵⁹. A combinação de PDT com outros fármacos convencionais está a ser estudada com o objetivo de encontrar efeitos de sinergismo⁸¹.

O facto da PDT ser um tratamento localizado pode ser visto como uma limitação desta terapia, uma vez que não permite o tratamento de tumores metastizados^{60,80}. Para ultrapassar esta limitação, existem diversos estudos sobre como a PDT afeta o sistema imunitário e como podemos modulá-lo, por exemplo, através de imunoterapia combinada com PDT⁸², com o objetivo de criar uma resposta anti-tumoral específica que elimine as células tumorais espalhadas pelo organismo^{83,84}.

Os PS podem permanecer no organismo e acumular-se na pele, provocando reações de fotossensibilidade cutânea, efeito secundário apontado como o mais significativo da PDT. Para evitar este tipo de reações, os pacientes devem permanecer em casa algumas

semanas depois do tratamento, para que o PS seja excretado do organismo⁵⁹. Este efeito secundário tem vindo a diminuir com os novos PS que surgem na clínica, uma vez que estes apresentam perfis farmacocinéticos que se caracterizam por uma rápida eliminação do composto do organismo, levando a uma menor acumulação na pele e, conseqüentemente, a menos efeitos de fotossensibilidade cutânea^{46,85,86}.

3. Glicólise e cancro

3.1. A via Glicolítica

O metabolismo é a soma de todas as transformações químicas que ocorrem dentro da célula⁸⁷. A glucose é a molécula mais importante para a produção de energia nos organismos vivos, uma vez que contém um elevado potencial energético e é um precursor versátil, originando diversos intermediários metabólicos para diversas vias biossintéticas. A glucose pode ser metabolizada por três vias: glicólise, caso a célula esteja em condições anaeróbicas, oxidação completa, em condições aeróbicas, e via da pentose fosfato. As células cancerígenas optam por seguir a via glicolítica, mesmo em condições aeróbicas, em vez de seguirem a via da fosforilação oxidativa⁸⁸. O piruvato resultante da glicólise pode ser convertido em acetil-CoA e CO₂ na mitocôndria. O acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, onde é totalmente oxidado a CO₂ e H₂O, produzindo 36 ATP. Para além disso, o piruvato da glicólise pode ser transformado em lactato, caso os níveis de oxigénio ou as funções das mitocôndrias estejam comprometidos, sendo depois expulso da célula (Figura 1.9)⁸⁹.

Na glicólise, uma molécula de glucose, que contém seis carbonos, é degradada por uma série de reações catalisadas por enzimas para formar duas moléculas de três carbonos, o piruvato. Durante a glicólise, a energia que se vai libertando é armazenada na forma de ATP ou NADH⁸⁷.

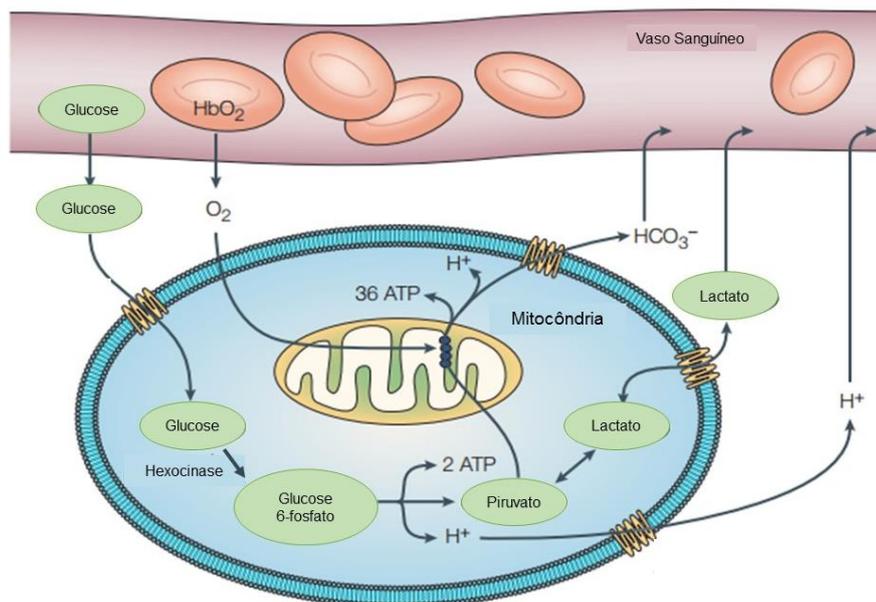
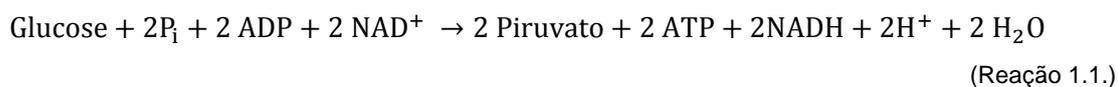


Figura 1.9. Vias de metabolismo da glicose na célula. Adaptado de⁸⁹.

A reação total da glicólise é:



A via glicolítica ocorre em 10 passos. O primeiro passo consiste na fosforilação do grupo hidroxilo do carbono 6 da glucose, com consumo de ATP, e é catalisada pela enzima hexocinase. A glucose-6-fosfato formada é convertida em frutose-6-fosfato pela enzima fosfoglucose isomerase. Este metabolito é novamente fosforilado, recorrendo a ATP, originando frutose 1,6-difosfato, por ação da enzima fosfofrutocinase. A frutose 1,6-difosfato é quebrada em duas moléculas de três carbonos, dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, reação catalisada pela aldolase. Como a dihidroxiacetona fosfato é um isómero do gliceraldeído 3-fosfato, a enzima triosefosfato isomerase converte-a em gliceraldeído 3-fosfato, que é o composto que vai continuar na via metabólica. Cada molécula de gliceraldeído 3-fosfato é oxidada e fosforilada por fosfato inorgânico, não por ATP, para formar 1,3-bifosfoglicerato, reação catalisada pela enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). De seguida libertam-se duas moléculas de ATP, uma vez que as duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato são convertidas em 3-fosfoglicerato pela enzima fosfoglicerato cinase. De seguida há uma transferência do grupo fosfato catalisada pela enzima fosfoglicerato mutase, que origina 2-fosfoglicerato. Com perda de água e com a catálise da enzima enolase, o 2-fosfoglicerato passa a fosfoenolpiruvato. No último

passo, e com libertação de mais duas moléculas de ATP, forma-se piruvato, numa reação catalisada pela enzima piruvato cinase⁸⁷. A via está esquematizada na Figura 1.10.

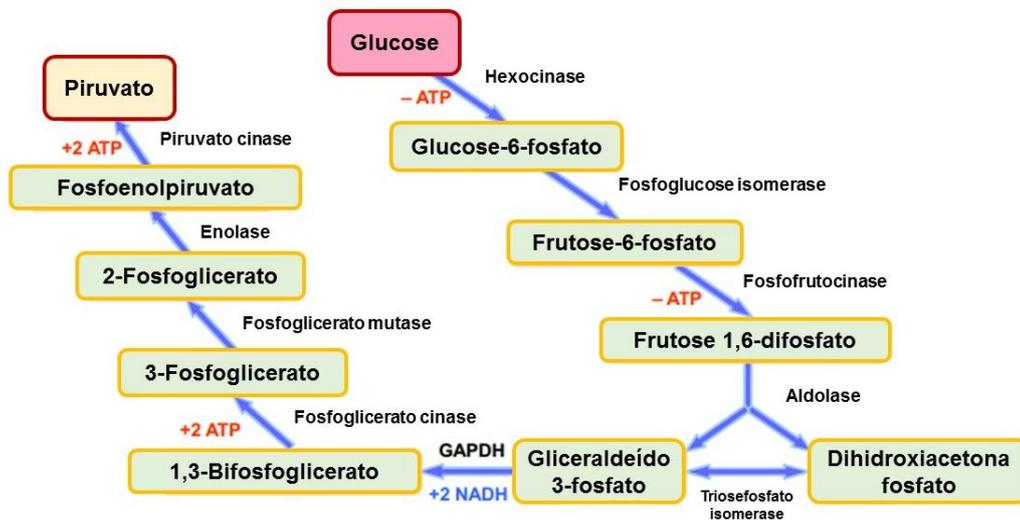


Figura 1.10. Via glicolítica e enzimas envolvidas nesta via. Adaptado de⁸⁸.

3.2. Efeito de Warburg

Na maioria das células, a glicólise é inibida pela presença de oxigénio, ocorrendo oxidação do piruvato na mitocôndria e produção de CO_2 e H_2O . Esta versatilidade das células é essencial para manter a produção de energia a diferentes concentrações de oxigénio⁹⁰. De qualquer forma, em células cancerígenas ocorre glicólise mesmo em condições aeróbicas, sendo denominado “Efeito de Warburg”⁸⁹.

Otto H. Warburg foi o primeiro a reportar que células de cancro do fígado tinham um metabolismo diferente das células normais, com um aumento da atividade glicolítica mesmo na presença de oxigénio. Os seus trabalhos seguintes mostraram que o aumento da glicólise não se verificava apenas em tumores sólidos, mas também em células de leucemia, que têm muito oxigénio disponível. Warburg sugeriu que estas alterações se deviam a alterações na respiração celular, levando a um aumento da fermentação aeróbica, que ele denominou como “a origem das células tumorais”^{32,33}.

Atualmente sabe-se que as células tumorais apresentam diferentes graus de glicólise, dependendo do tipo celular e das condições de crescimento das células. Em condições de hipoxia, algumas células tumorais produzem até 60% do seu ATP pela glicólise, apesar das células normais parecerem gerar a maioria do seu ATP através da fosforilação oxidativa⁹¹. Apesar do aumento dos níveis de glicólise serem observados consistentemente em células tumorais, não se sabe se será uma causa ou um sintoma do

cancro. O metabolismo alterado da glucose nas células tumorais não é apenas uma simples adaptação à hipoxia e mantém-se mesmo em condições com disponibilidade de oxigénio, conferindo uma vantagem adaptativa proliferativa, crucial no desenvolvimento de um fenótipo maligno⁸⁹. No entanto, é claro que as células cancerígenas dependem da glicólise para geração de ATP, o que representa uma diferença entre células normais e tumorais, e pode ser utilizado como estratégia terapêutica para matar preferencialmente células tumorais⁹².

Esta característica do metabolismo tumoral está na base da técnica de imagiologia tomografia de emissão de positrões (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) com a sonda ¹⁸Fluorodeoxiglucose. Esta técnica mostra que a maioria dos tumores primários ou metastáticos têm um aumento do *uptake* de glucose. O aumento do *uptake* é dependente dos níveis de glicólise, relacionando-se também com um aumento dos níveis de transportadores de glucose (GLUT1 e GLUT3) e das enzimas hexocinase I e II. Dado que o *uptake* de glucose é maior nas células tumorais, a sonda ¹⁸Fluorodeoxiglucose também vai ser mais internalizada por estas células, comparativamente com as células normais, permitindo localizar os tumores^{93,94}.

A glicólise é menos eficiente na produção de ATP quando comparada com a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Isto é verdade porque a glicólise só leva à produção de duas moléculas de ATP, enquanto que a oxidação completa da glucose na fosforilação oxidativa tem um rendimento total de 38 ATPs⁸⁹. Para além disso, os produtos secundários da glicólise, como iões hidrogénio (H⁺), levam a uma acidificação do meio extracelular, o que pode resultar em citotoxicidade⁹⁵. Ainda assim, a glicólise aeróbica parece trazer vantagens no crescimento das células tumorais no microambiente do tumor⁹⁶. O piruvato produzido pela via glicolítica pode ser utilizado na síntese de lípidos⁹⁷ e a ativação da glicólise aeróbica liberta as células tumorais da sua dependência por oxigénio para a produção de ATP, funcionando mesmo em condições de hipoxia⁹⁸. Seria de esperar que a evolução das células cancerígenas excluísse as células que produzem energia de forma, aparentemente, menos eficiente e com produção de compostos tóxicos para as células, mas, apesar disso, estas características metabólicas das células cancerígenas parecem ser resultado de uma adaptação a restrições do ambiente durante a carcinogénese e, como são consistentes em lesões primárias ou metastáticas, conferem uma vantagem proliferativa⁸⁹.

Os mecanismos por trás do efeito de Warburg ainda não são bem conhecidos, mas têm sido realizados diversos estudos para compreender os mecanismos moleculares envolvidos e quais as suas potenciais aplicações clínicas. Os mecanismos que podem contribuir para este efeito passam por mutações ou deleções no DNA mitocondrial,

mutações ou expressão genética anormal de DNA nuclear, transformações oncogénicas e o microambiente do tumor⁹².

3.3. Via da Pentose Fosfato e o Cancro

A via da pentose fosfato deriva da glicólise no primeiro passo desta via, após a catálise da glicose a glucose-6-fosfato pela hexocinase⁹⁹. Na maioria dos tecidos, o destino final da glucose-6-fosfato é a quebra glicolítica para se obter piruvato, sendo que este piruvato vai ser oxidado na fosforilação oxidativa para se obter energia na forma de ATP. No entanto, a glucose-6-fosfato pode ter outros destinos, levando a produtos específicos que são necessários para a célula. Uma das vias mais importantes é a via da pentose fosfato, que promove a oxidação da glucose-6-fosfato para pentoses fosfato. Células que se dividam com muita regularidade utilizam esta via para produzir RNA, DNA e outras coenzimas, como ATP, NADPH ou coenzima A⁸⁷.

A via da pentose fosfato parece detetar alterações nas condições intra e extracelulares, podendo potenciar a formação de moléculas redutoras ou de moléculas que são essenciais para biossíntese de lípidos ou nucleótidos, permitindo a sobrevivência e proliferação celular¹⁰⁰. As células têm diferentes necessidades energéticas, por isso, em alguns casos, a via da pentose fosfato pode ser necessária para a produção de ribose-5-fosfato, essencial para a síntese de RNA ou DNA, enquanto que noutras situações, o produto essencial da via da pentose fosfato não é a ribose, mas sim o dador de eletrões NADPH, essencial para biossíntese redutiva (lípidos, por exemplo) ou para combater os efeitos oxidativos de radicais de oxigénio. Se se mantiver um ambiente redutor na célula, podem-se reverter processos de oxidação de proteínas, lípidos ou outras moléculas⁸⁷.

A via da pentose fosfato tem dois ramos, o oxidativo e o não oxidativo. A glucose-6-fosfato é metabolizada no ramo oxidativo, que culmina na formação de ribose-5-fosfato¹⁰¹. A transquetolase e a transaldolase são duas enzimas essenciais no ramo não oxidativo da via, que transforma diversos açúcares¹⁰⁰.

A primeira reação da via da pentose fosfato é a oxidação da glucose-6-fosfato, pela glucose-6-fosfato desidrogenase, para originar 6-fosfoglucono- δ -lactona. Neste processo, o NADP⁺ aceita um eletrão, formando-se NADPH. A lactona é hidrolisada a ácido 6-fosfogluconato, por uma lactonase específica, e este ácido sofre oxidação e descarboxilação, pela 6-fosfogluconato desidrogenase, para formar uma cetopentose, a ribulose-5-fosfato, sendo que esta reação gera mais uma molécula de NADPH. A fosfopentose isomerase converte a ribulose-5-fosfato num isómero, uma aldose, a ribose-5-fosfato. Em alguns tecidos a via termina neste passo, com a formação de NADPH (redutor) e ribose-5-fosfato, um precursor na síntese de nucleótidos⁸⁷. A fase não oxidativa

da via pentose fosfato permite recuperar a glucose-6-fosfato, reciclando a ribulose-5-fosfato sendo um processo útil em células que necessitem de mais NADPH. Na fase não oxidativa, a ribulose-5-fosfato é epimerizada a xilulose-5-fosfato, pela ribose-5-fosfato epimerase. Depois, por uma série de rearranjos do esqueleto de carbono formam-se diversos intermediários com diferentes números de carbonos. Isto permite a obtenção de glucose-6-fosfato e, novamente, a sua oxidação, levando à formação de NADPH. Nestas interconversões de açúcares atuam apenas duas enzimas, a transquetolase e a transaldolase. A Figura 1.11 resume a via da pentose fosfato.

A via da pentose fosfato é fundamental para células de cancro uma vez que gera pentoses fosfato, essenciais para a síntese de ácidos nucleicos, mas em simultâneo fornece NADPH, que é utilizado na síntese de ácidos gordos, mas também é importante para a sobrevivência das células em condições de stress. Assim, muitos estudos demonstram que as células cancerígenas têm alterações na via da pentose fosfato⁹⁹.

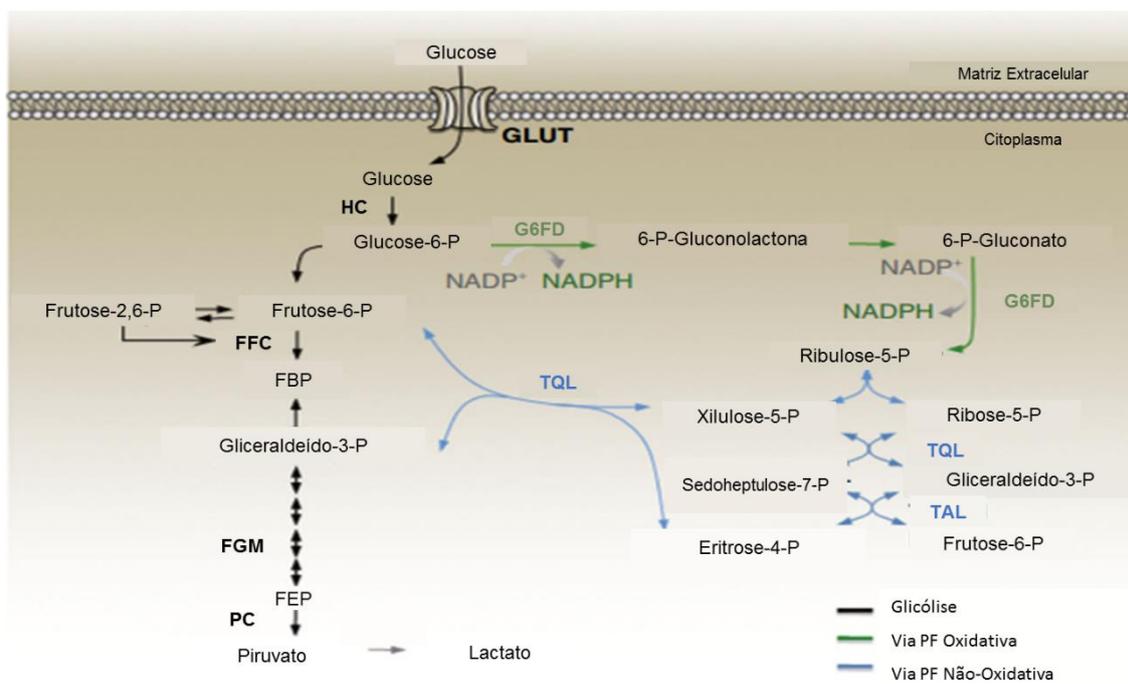


Figura 1.11. Via da pentose fosfato e enzimas envolvidas nesta via. Adaptado de¹⁰⁰.

3.4. Inibição da glicólise para tratamento do cancro

A seletividade para matar preferencialmente células cancerígenas e poupar as células normais é uma das considerações mais importantes no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do cancro. Uma forma de obter uma terapia seletiva é utilizar as diferenças metabólicas entre células normais e tumorais, como é o caso do aumento da glicólise aeróbica e da dependência das células da via glicolítica para obter ATP. Dado que

esta alteração é quase universal, direcionar a terapia para a via glicolítica pode matar preferencialmente as células tumorais¹⁰².

Os inibidores da glicólise são desenvolvidos para afetar enzimas específicas do tumor ou enzimas que estejam com uma expressão aumentada nas células tumorais quando comparado com células normais (como é o caso da hexocinase ou da transquetolase). Já foram desenvolvidos diversos inibidores que demonstraram eficácia *in vitro* e *in vivo*, sendo que alguns já se encontram em ensaios clínicos. Outra vertente a considerar, para além da diminuição dos níveis de ATP e conseqüente morte celular, é a capacidade que estes inibidores apresentam de reverter processos de resistência a outros fármacos. Isto acontece porque as células com resistência a múltiplos fármacos expressam nas suas membranas um transportador dependente de ATP, a glicoproteína-P, que retira muitos dos fármacos para o meio extracelular. Assim, ao diminuir os níveis de ATP, diminui-se a atividade deste transportador e, conseqüentemente, a resistência¹⁰³.

A via glicolítica está interligada com outras vias, uma vez que as enzimas desta via parecem ser proteínas multifuncionais, com funções na regulação da transcrição¹⁰⁴ ou na apoptose¹⁰⁵. Existem estudos que reportam aumentos nos níveis de transquetolase nas células de cancro e que estes aumentos podem levar a um aumento da atividade da via da pentose fosfato e, conseqüentemente, um aumento dos níveis de gliceraldeído-3-fosfato, que será utilizado na via glicolítica¹⁰⁶. Assim, afetando estas vias, pode provocar-se a morte a células tumorais, ou potenciar outras terapias (Figura 1.13). Existem diversas moléculas em estudo para se tornarem fármacos com alvos na via glicolítica, entre elas a 2-deoxiglucose (Figura 1.13.A), o 3-bromopiruvato (Figura 1.13.B), a oxitiamina (Figura 1.13.C), a lonidamina (Figura 1.13.D) ou o imatinib (Figura 1.13.E)¹⁰⁷. Vamos focar-nos apenas nos três primeiros exemplos, uma vez que são o alvo do estudo.

As células que tenham alterações na mitocôndria estarão mais sujeitas à morte por inibição da glicólise, uma vez que as vias alternativas de produção de energia também estão comprometidas.

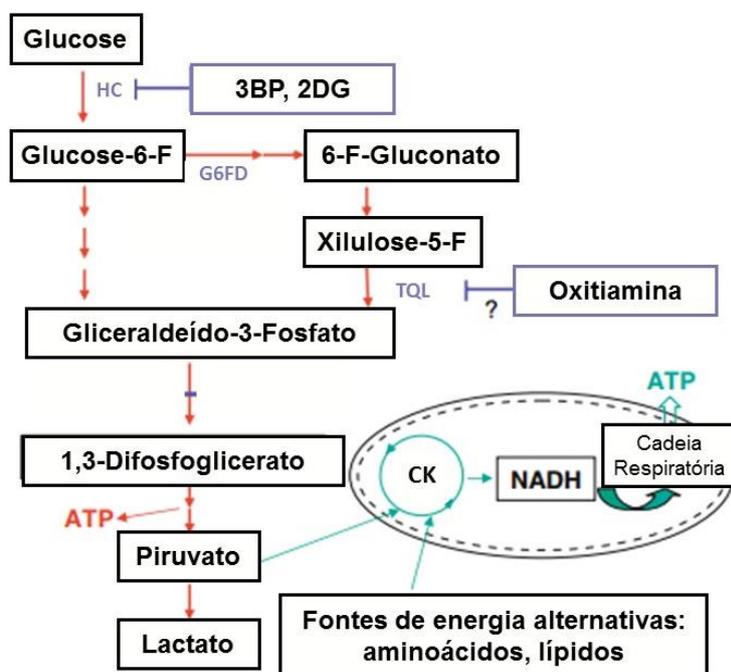


Figura 1.12. Via glicolítica, via da pentose fosfato e seus inibidores. Adaptado de¹⁰².

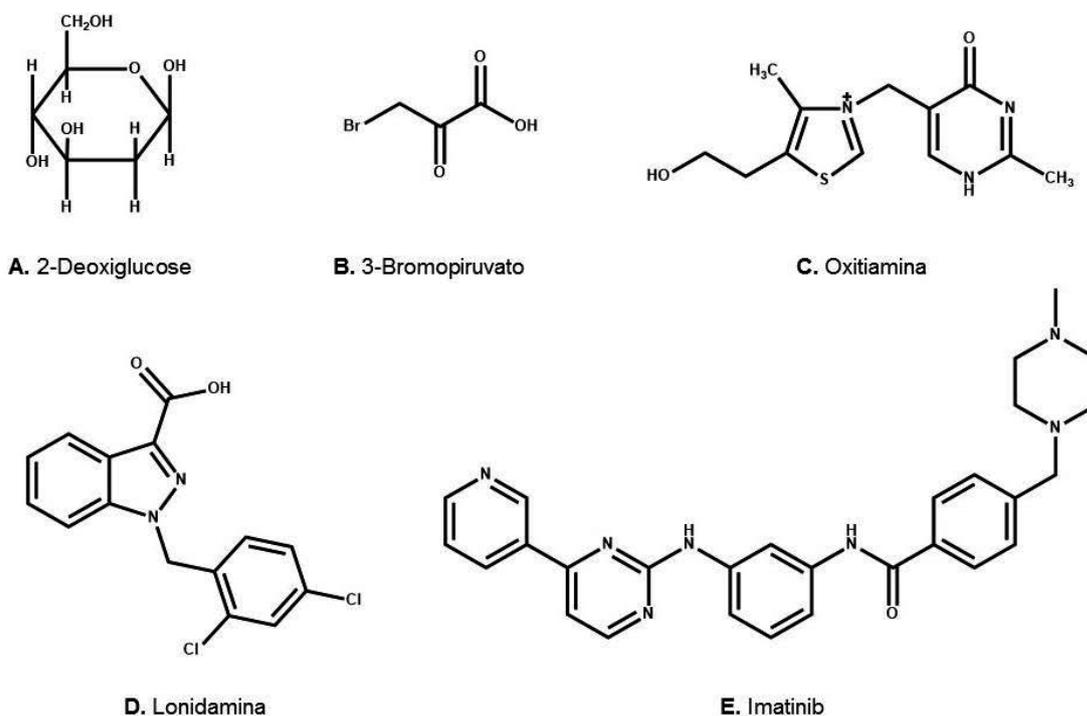


Figura 1.13. Representação esquemática de diferentes inibidores de glicólise. A. 2-Deoxiglucose; B. 3-Bromopiruvato; C. Oxitiamina; D. Lonidamina; E. Imatinib

3.4.1. 2-Deoxiglucose

A 2-deoxiglucose (2DG) é um análogo da glucose e atua como um inibidor competitivo do metabolismo da glucose. Uma vez dentro da célula, este composto é

fosforilado pela hexocinase em 2-deoxiglucofosfato (2DG-P) e, ao contrário da glicose-6-fosfato, não pode ser metabolizado pela fosfohexose isomerase, que é a enzima seguinte da via glicolítica. 2DG-P fica retida e acumula-se no interior das células, levando à inibição da glicólise maioritariamente no passo da fosforilação da glicose pela hexocinase. A inibição deste passo da glicólise, com a 2DG numa concentração na ordem dos milimolar, leva a uma depleção dos níveis de ATP celular, levando a um bloqueio da progressão do ciclo celular e morte celular, principalmente em células com alterações na respiração celular ou em ambientes de hipoxia^{108,109}.

No entanto, a eficácia da 2DG é muito afetada pela presença de glicose no meio, parecendo apenas diminuir a disponibilidade da glicose para a glicólise. Para além disto, a 2DG afeta a glicosilação de proteínas e induz a acumulação destas proteínas no retículo endoplasmático, levando a uma resposta de stress¹¹⁰. A incubação de células com 2DG parece levar a uma diminuição da quantidade de hexocinase associada à mitocôndria, levando a crer que este composto pode afetar o metabolismo da glicose neste organelo¹¹¹.

Os efeitos da 2DG são mais significativos em células que tenham defeitos nas mitocôndrias ou estejam num ambiente de hipoxia¹⁰⁸. Dado a baixa toxicidade da 2DG em células normais, a sua combinação com outros fármacos é explorada tanto em estudos *in vivo* como clínicos. Em estudos *in vivo*, a 2DG aumenta a eficácia de outros agentes quimioterapêuticos, como é o caso da adriamicina e do paclitaxel, em certos tipos de cancro. No entanto, este estudo demonstrou que a administração de 2DG por si só não exibe uma atividade anti-tumoral significativa *in vivo*¹¹². Um ensaio clínico que combina doses até 250 mg/kg de 2DG com radioterapia mostrou-se seguro no tratamento de pacientes com glioblastoma multiforme¹¹³.

3.4.2. 3-Bromopiruvato

O 3-bromopiruvato (3BP) é um piruvato halogenado e é um agente alquilante forte de grupos SH de resíduos de cisteínas, podendo interagir com diversos tipos de proteínas. Para além disso, é um inibidor da hexocinase e afeta a respiração na mitocôndria, levando a uma depleção elevada dos níveis celulares de ATP e, conseqüentemente, morte celular^{114,115}.

O 3BP é eficaz a concentrações de 100 mM, sendo mais potente que a 2DG, e, tal como a 2DG, o 3BP tem uma elevada citotoxicidade contra células que têm defeitos nas mitocôndrias ou estão em ambientes de hipoxia. Em simultâneo com uma depleção dos níveis de ATP, o 3BP causa alterações em proteínas associadas à apoptose e à mitocôndria, levando a morte celular. A depleção de ATP causada pelo 3BP induz a apoptose mesmo em células que apresentam resistência a outros fármacos, levando a crer

que a utilização de fármacos que diminuam os níveis de energia celular pode ser útil para ultrapassar a resistência a outros fármacos quimioterapêuticos⁹⁸.

O 3BP, *in vivo*, mostrou uma atividade promissora num modelo de carcinoma hepatocelular de coelho, não sendo tóxico para as células normais¹¹⁶. A combinação de 3BP com inibidores do mTOR parece ter efeitos sinérgicos no tratamento de leucemia e células de linfoma¹¹⁷. O 3BP, para além das funções na via glicolítica, é um agente alquilante, podendo interagir com outras moléculas na célula e, por isso, a sua atividade pode não ser só devida a uma inibição da hexocinase¹⁰². Estudos em animais mostram que o 3BP tem atividade anti tumoral contra cancro no fígado quando o composto é dado por infusão local e parece inibir a metastização se for aplicado por via intravenosa¹¹⁴.

3.4.3. Oxitiamina

A oxitiamina (OXY) é um antagonista da tiamina e inibe a transquetolase e a piruvato desidrogenase, enzimas que requerem a tiamina pirofosfato como um cofator para exercerem a sua atividade enzimática. A OXY é fosforilada formando-se o seu éster difosfato que atua como um inibidor competitivo potente contra o cofator normal, a tiamina pirofosfato.

Como a transquetolase é uma enzima essencial na via da pentose fosfato, a inibição desta enzima causa uma supressão desta via e priva a célula de intermediários metabólicos, como o gliceraldeído-3-fosfato, para a geração de ATP e de outros substratos, como NADPH ou ribose-5-fosfato, para a síntese de biomoléculas^{118,119}. Uma das isoenzimas da transquetolase está aumentada em células cancerígenas sendo, por isso, considerada um fator importante para o efeito de Warburg, sendo um alvo útil para terapia anti tumoral¹⁰⁶. Existem estudos *in vitro* e *in vivo* que provaram os efeitos anti tumorais e anti metastáticos da OXY¹¹⁹⁻¹²².

4. Terapia Fotodinâmica e Metabolismo

A combinação da terapia fotodinâmica com outros fármacos pode potenciar os seus efeitos, permitindo a utilização de doses mais baixas e diminuindo possíveis efeitos secundários. As alterações metabólicas que ocorrem nas células tumorais promovem um aumento da internalização de glucose³⁶, permitindo-lhes ultrapassar condições de hipoxia e de aumento de ROS¹²³, resistir à apoptose¹²⁴ e promover a metastização¹²⁵. Devido a estes fatores, utilizar terapias direcionadas para o metabolismo celular em combinação com outras terapias de cancro pode ser útil¹²⁶⁻¹²⁸.

Os inibidores levam a uma depleção de diversos metabolitos envolvidos nas vias metabólicas, como é o caso do NADPH, do piruvato e do ATP. Isto leva a uma desregulação das defesas antioxidantes dependentes do metabolismo provocando um aumento das espécies reativas de oxigênio¹²⁹⁻¹³¹. Para além disso, os inibidores de glicólise condicionam a reparação de DNA que depende de energia e os processos de recuperação da célula¹³², levando a uma paragem do ciclo celular¹³³ e início da apoptose, através da inibição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2¹³⁴.

A PDT já foi combinada com diversos fármacos quimioterapêuticos, agentes pró-oxidantes, inibidores da angiogénese ou moléculas para imunoterapia, apresentando resultados melhores que a terapia singular¹³⁵⁻¹³⁷. A PDT pode provocar danos na mitocôndria, por isso, a utilização de inibidores de glicólise é uma escolha lógica para potenciar a terapia fotodinâmica¹³⁸.

Diversos estudos foram realizados com o decorrer dos anos, utilizando diversos inibidores da glicólise, nomeadamente a 2DG, lonidamina ou 3BP.

A combinação entre 2DG e PDT provoca diversas alterações, nomeadamente, danos a nível da mitocôndria, alterações nos níveis de proteínas, um aumento dos níveis de ROS e uma diminuição nos níveis de ATP. Os estudos mostram seletividade para as células tumorais, uma vez que estas têm alterações mais marcadas no seu metabolismo¹³⁹⁻¹⁴¹.

O 3BP em combinação com a PDT leva a alterações nas proteínas relacionadas com a apoptose, um aumento dos níveis de ROS e uma diminuição dos níveis de ATP e danos a nível da mitocôndria e no retículo endoplasmático, aumentando a eficácia da PDT e a seletividade para as células tumorais^{138,140,141}.

A lonidamina, um inibidor da glicólise que não vai ser abordado neste estudo, também já foi utilizado para estudos de combinação com PDT. Este composto leva a uma diminuição dos níveis de ATP, com consequente aumento dos níveis de ADP, uma diminuição de GTP, e alterações na razão NAD⁺/NAD¹⁴².

5. Proposta de Trabalho

O objetivo principal deste estudo é avaliar a combinação entre a terapia fotodinâmica com redaporfin e três inibidores da glicólise, com o intuito de melhorar a eficácia e seletividade do tratamento e diminuir as doses de fármaco utilizadas, diminuindo a probabilidade de ocorrência de efeitos secundários. Foram escolhidos três inibidores da glicólise com características diferentes, a 2-deoxiglucose, o 3-bromopiruvato e a oxitiamina, para avaliar que vias podem ter um maior efeito na potenciação da terapia.

Para concretizar estes estudos, utilizaram-se duas linhas celulares diferentes, as CT26, que representam um modelo tumoral, e as NIH/3T3, que representam um modelo não tumoral, uma vez que são constituídas por células do carcinoma do cólon e por fibroblastos de murganho, respetivamente. A escolha da linha celular CT26 deve-se ao facto de ser uma das linhas celulares mais utilizada no estudo da redaporfin e, para além disso, é uma das mais difíceis de tratar, comparativamente com outras linhas celulares, tornando-se um maior desafio. Outro fator a considerar é que as linhas celulares escolhidas são de murganho, permitindo uma translação mais fácil para estudos *in vivo* neste modelo animal. A utilização de duas linhas diferentes permite inferir sobre a seletividade do tratamento para células cancerígenas, com o mínimo de efeitos nas células normais. Com o objetivo de verificar se há um sinergismo entre a combinação de PDT-redaporfin e os diferentes inibidores da glicólise, é necessário calcular o IC50 da redaporfin, avaliar as doses não tóxicas de inibidores da glicólise e, por fim, avaliar a combinação de ambos.

Capítulo 2:

Materiais e Métodos

1. Reagentes:

O meio de cultura utilizado foi o Dubbelco's Modified Eagle's Medium (DMEM, adquirido na Sigma-Aldrich) para as culturas celulares de CT26 e NIH/3T3. O DMEM é composto por glucose e L-glutamina numa concentração de 4500 mg/L, vermelho de fenol, e foi suplementado com tampão de ácido de 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES, adquirido na Sigma-Aldrich) numa concentração de 10 mM, com bicarbonato de sódio numa concentração de 10 mM (adquirido na Sigma-Aldrich), com 10% de soro fetal de bovino (FBS, adquirido na Biowest) e com 1% de penicilina-estreptomicina (PenStrep, adquirido na Sigma Aldrich). A água Milli-Q utilizada para a preparação das soluções foi desionizada através de um sistema Millipore MilliQ de purificação de água.

Para a preparação da solução de tampão fosfato-salino (PBS) utilizou-se fosfato de potássio dibásico (0,14 mM), cloreto de potássio (0,27 mM), fosfato de sódio dibásico (0,43 mM) e cloreto de sódio (13,7 mM) (adquiridos na Sigma-Aldrich) e acertou-se o pH nos 7,4.

As soluções de Tripsina-EDTA (10x) e de Trypan Blue foram adquiridas na Sigma-Aldrich.

A redaporfin (5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil) bacterioclorina) foi gentilmente fornecida pela Luzitin num vial de vidro, na forma de pó e em atmosfera de N₂. Preparou-se uma solução stock de redaporfin, utilizando DMSO (sulfóxido de dimetilo – Sigma Aldrich). A partir deste stock preparam-se as soluções para aplicar nas células, utilizando meio de cultura, com uma percentagem de solvente orgânico (DMSO) inferior a 2%.

A 2-deoxiglicose, a oxitiamina e o 3-bromopiruvato, inibidores da glicólise, foram adquiridos na Sigma Aldrich. As soluções dos diferentes compostos para aplicar nas células foram dissolvidas em meio de cultura.

A resazurina foi adquirida na Sigma Aldrich e foi preparada uma solução stock em PBS, com uma concentração de 0,1 mg/ml. A partir desta solução stock preparou-se a solução a aplicar nas células, com meio de cultura e com uma diluição de 1:10.

2. Equipamento

Todos os procedimentos relacionados com culturas celulares, preparação do meio de cultura, da solução de PBS e de outros reagentes para aplicar nas células foram executados na câmara de fluxo laminar Thermo Scientific MSCAdvantage.

As pesagens foram realizadas à temperatura ambiente numa balança analítica Kern ALJ 220-5DNM, previamente calibrada.

Os frascos de cultura, tubos de centrifuga cónicos, placas de 96-poços, micropipetadores utilizados foram adquiridos na Orange Scientific. As pipetas de Pasteur de vidro e as pontas para os micropipetadores foram adquiridas na Frilabo. O autoclave utilizado para esterilizar todo o material necessário para as culturas celulares é da marca AJC Uniclave 88.

O microscópio utilizado para a observação das células foi um microscópio invertido Olympus CKX41 acoplado a uma lâmpada de fluorescência. O espectro de absorção do stock de redaporfin foi obtido num espectrofotómetro UV-visível (Shimadzu). As amostras foram analisadas em cuvettes de quartzo com um percurso ótico de 1cm.

A fonte de luz utilizada para irradiar as células foi um LED (do inglês, light-emitting diode) da Marubeni (modelo L740-66-60-550), com uma potência de 410 μ W e um máximo de emissão a 740 nm com um FWHM (do inglês, *Full width at half maximum*) de 25 nm. A fluência do LED foi medida em cada experiência com um medidor de potência Coherent LaserCheck, escolhendo o comprimento de onda de 749 nm para fazer a medição.

O leitor de microplacas, utilizado para o ensaio da resazurina, é um Synergy HT BioTek, EUA, com um conjunto de filtros para uma excitação a 560 nm e emissão a 590 nm.

3. Preparação da solução stock de redaporfin

A solução stock de redaporfin foi preparada em DMSO com uma concentração de aproximadamente 500 μM , que depois foi aferida recorrendo ao espectro de absorção. Para evitar a formação de agregados de moléculas, a solução foi sujeita a uma frequência de 35 kHz num banho ultrassónico Bandelin Sonorex TK52. A concentração da solução stock foi calculada através do seu espectro de absorção (Figura 2.1), utilizando a lei de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon l c \quad (\text{Equação 2.1.})$$

onde A é a absorvância no pico desejado, ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) é o coeficiente de absorvidade molar, l (cm) é o percurso ótico e c (M) é a concentração da amostra de redaporfin. O coeficiente de absorvidade molar da redaporfin é $\epsilon_{749} = 1,21 * 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

A solução stock foi armazenada a 4 °C, protegida da exposição à luz, e foram feitas medições da absorvância regularmente para verificar a concentração e analisar a possível degradação do composto. As soluções para aplicar nas células foram preparadas recorrendo ao stock e a meio de cultura para se obterem as concentrações desejadas para o estudo.

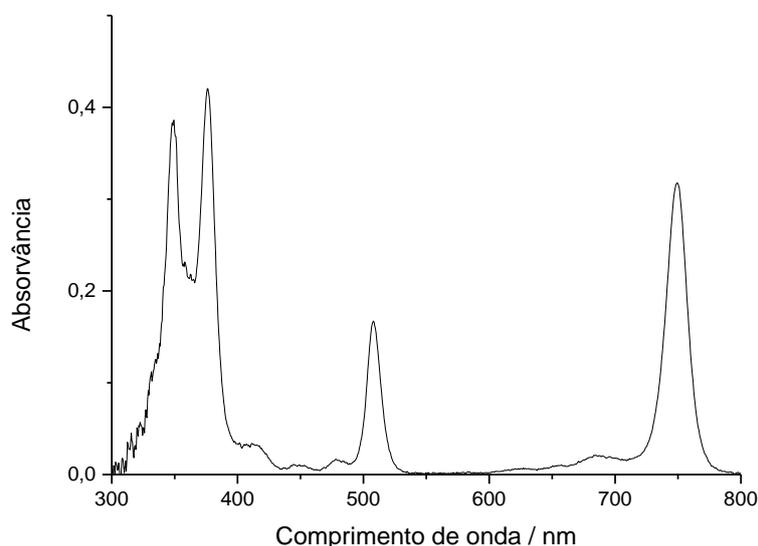


Figura 2.1. Espectro de absorção UV/visível da redaporfin

4. Cultura de células

As linhas celulares utilizadas foram CT26 (células do carcinoma do colon de murganho) e NIH/3T3 (fibroblastos de murganho). A cultura de células foi mantida em DMEM, suplementado com 10% de FBS e 1% de PenStrep. As células foram mantidas em frascos T75 estéreis com uma tampa com filtro, adquiridos na Thermo Scientific. A incubadora BB15 esteve à temperatura de 37°C, num ambiente humidificado, contendo 5% de CO₂. A cultura foi mantida durante 2 a 3 dias e, após este período, verificada uma confluência de mais de 80% no frasco, foi feita uma passagem onde as células foram destacadas com tripsina, descartando-se uma parte para permitir o crescimento de novas células.

5. Estudos de PDT *in vitro*

Os estudos de PDT foram realizados com o intuito de descobrir qual o IC50 para cada uma das linhas celulares utilizadas. Cada estudo tem uma duração de quatro dias e utiliza placas de 96-poços. Para a linha celular CT26 foram plaqueadas 8000 células/poço e para as NIH/3T3 plaquearam-se 7000 células/poço. Passadas 24 h do plaqueamento foi adicionada redaporfin em concentrações crescentes, desde 20 a 400 nM. Após um período de incubação de 20 h, as células foram lavadas duas vezes com PBS, no caso das NIH/3T3, ou DMEM, no caso das CT26, para retirar o excesso de fotossensibilizador que não foi internalizado pelas células. De seguida, colocou-se novamente meio de cultura nas células e estas foram irradiadas com o LED descrito acima, com uma dose de luz de 1 J/cm². A fluência é obtida com o medidor de potência e o tempo de irradiação é calculado através da equação 2.2..

$$\text{Dose de luz (J/cm}^2\text{)} = \text{Fluência (W/cm}^2\text{)} * \Delta t \text{ (s)} \quad (\text{Equação 2.2.})$$

Para a avaliação da viabilidade celular, 24h após a irradiação, utilizou-se o ensaio da resazurina. Este ensaio consiste na utilização de um composto azul escuro, a resazurina, que permeia as membranas celulares e é um indicador redox. As células viáveis metabolizam a redução da resazurina a resorufina, um produto cor de rosa e fluorescente. Assim, a quantidade de resofurina produzida é proporcional ao número de células viáveis em cultura e pode ser quantificada utilizando um leitor de microplacas. Este ensaio tem uma duração entre 2 h a 3 h, que depende da atividade metabólica das células utilizadas, da densidade de células por poço ou do meio de cultura¹⁴³.

Simultaneamente às experiências de fototoxicidade da redaporfin, foi avaliada a citotoxicidade do composto nas concentrações utilizadas. O procedimento é igual ao descrito para a fototoxicidade, mas as células não são irradiadas.

6. Estudos de citotoxicidade dos inibidores da glicólise

Os estudos de citotoxicidade para os três inibidores de glicólise escolhidos serviram para descobrir quais as doses não tóxicas, isto é, que não provocam morte celular, nas linhas celulares utilizadas nos estudos. A citotoxicidade dos inibidores de glicólise foi avaliada para incubações de 24 h e 48 h. A densidade celular utilizada para as CT26 foi 9000 células/poço e 8000 células/poço para os estudos de 24 h e 48 h, respectivamente. Para as NIH/3T3, foi utilizada uma densidade de 8000 células/poço e 7000 células/poço para 24 h e 48 h, respectivamente. Um dia após o plaqueamento, foram administradas soluções de cada um dos inibidores da glicólise, com concentrações crescentes (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Intervalos de concentrações avaliados para os diferentes inibidores de glicólise.

Inibidor da glicólise	Intervalo de concentrações
2-Deoxiglucose	100 μ M a 4mM
Oxitiamina	1 a 6 mM
3-Bromopiruvato	2,5 a 50 μ M

Passadas 24 h da administração do composto, foram realizados dois procedimentos diferentes. No caso dos estudos de incubação de 24 h, foi feito o ensaio da resazurina para avaliar a viabilidade celular. No caso das incubações de 48 h, os poços foram lavados duas vezes com PBS ou DMEM e tornou-se a aplicar as soluções de inibidor, com as mesmas concentrações que tinham sido utilizadas anteriormente. Neste caso, o ensaio de resazurina foi realizado 24 h após a segunda administração do composto, para avaliar a viabilidade celular com incubações de 48 h.

7. Estudos de combinação

Os estudos de combinação consistem na avaliação de diferenças significativas na viabilidade celular quando se combina a terapia fotodinâmica com um inibidor de glicólise

em concentrações não tóxicas. Para a realização destes estudos utilizam-se diferentes grupos controlo. Em primeiro lugar um grupo apenas com células plaqueadas, sem adição de nenhum composto, que serve de referência, depois três grupos que correspondem às diferentes concentrações de inibidor escolhidas para o ensaio e, por último, um grupo onde as células foram expostas apenas ao IC50 da redaporfin. Um esquema da placa de 96 poços característica dos estudos de combinação está representado na Figura 2.2.

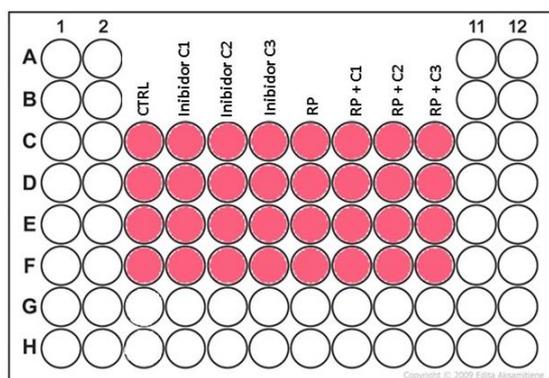


Figura 2.2. Representação esquemática das condições utilizadas para os estudos de combinação.

Foram estudados três tipos de combinações diferentes: incubação do inibidor 24 h antes da irradiação do fotossensibilizador; 24 h antes e 24 h depois da irradiação; 48 h antes da irradiação.

No caso da incubação 24 h antes da irradiação, os estudos decorrem durante quatro dias e para a linha celular CT26 foram plaqueadas 8000 células/poço e para as NIH/3T3 plaquearam-se 7000 células/poço. No dia seguinte ao plaqueamento, adiciona-se redaporfin (dose correspondente ao IC50 calculado para a linha celular em estudo) e o inibidor de glicólise (doses não tóxicas obtidas anteriormente). Após incubar durante 24 h, as células são lavadas com PBS ou DMEM para retirar o excesso de fotossensibilizador e de inibidor. Torna-se a colocar meio de cultura nos poços e procede-se à irradiação das células, com uma dose de luz de 1 J/cm². No dia seguinte, efetua-se o ensaio da resazurina para avaliar a viabilidade celular (Figura 2.3).

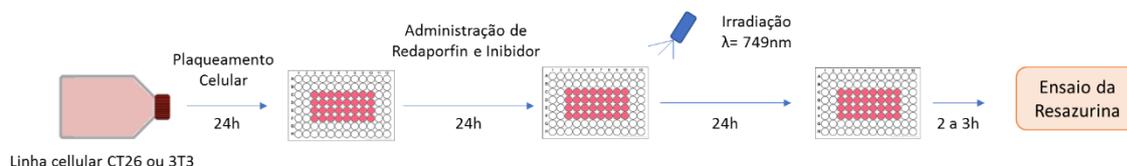


Figura 2.3. Representação esquemática da combinação de inibidor por 24 h antes da irradiação.

Para a incubação 24 h antes e 24 h após a irradiação, os estudos decorrem também durante quatro dias e as densidades celulares de plaqueamento são iguais ao estudo explicado acima, para ambas as linhas celulares. No dia após o plaqueamento administra-se redaporfin e o inibidor e passado 24 h as células são lavadas com PBS ou DMEM. Mas, ao contrário do estudo anterior, torna-se a administrar o inibidor da glicólise e não apenas meio de cultura e procede-se à irradiação das células com a mesma dose de luz. No último dia, realiza-se o ensaio da resazurina (Figura 2.4).

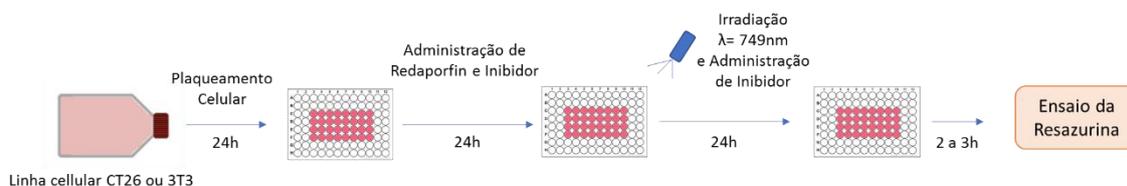


Figura 2.4. Representação esquemática da combinação de inibidor por 24 h antes da irradiação e 24 h depois da irradiação.

Na incubação 48 h antes da irradiação, os estudos já decorrem ao longo de cinco dias e as densidades celulares utilizadas são diferentes. Para a linha celular CT26 e NIH/3T3 foram plaqueadas 5500 células/poço. No dia a seguir ao plaqueamento aplica-se apenas o inibidor da glicólise e 24 h depois lava-se e aplica-se novamente o inibidor e também a redaporfin. No dia seguinte retira-se o meio, lava-se com PBS ou DMEM duas vezes, coloca-se novamente meio e procede-se à irradiação das células com a mesma dose de luz dos outros estudos. No quinto dia de estudo, faz-se o ensaio da resazurina para obter a viabilidade celular (Figura 2.5).

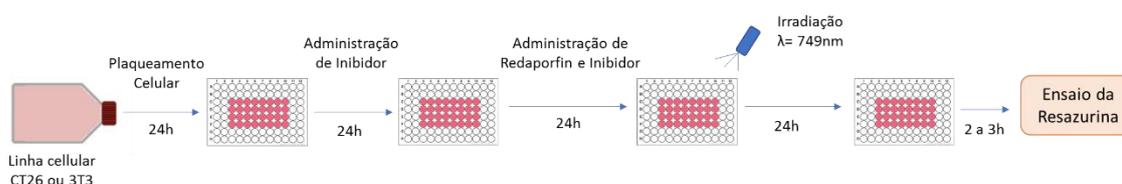


Figura 2.5. Representação esquemática da combinação de inibidor por 48 h antes da irradiação.

8. Análise estatística

Os valores medidos nas diferentes experiências são apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada com o software Prism v.5 (Software GraphPad). A informação foi analisada com o teste t de Student bilateral

desemparelhado e os detalhes da análise estatística são apresentados nos Materiais Suplementares. O ajuste aos gráficos de IC50 foi realizado no programa Origin v.9. Cada condição tem um mínimo de três ensaios biológicos ($n=3$ a 5), sendo que cada um dos ensaios corresponde à média de quatro poços concordantes.

Capítulo 3:

Resultados e Discussão

1. Estudos *in vitro*

A terapia combinada para cancro baseia-se na utilização de tratamentos com mecanismos de ação diferentes para potenciar os efeitos terapêuticos. A utilização de combinações pode afetar vias diferentes, destruindo com maior eficácia as células cancerígenas e diminuindo os mecanismos de resistência das células. A combinação pode ser um efeito de sinergismo ou de adição, reduzindo as doses de fármaco necessárias para que ocorra o efeito desejado e diminuindo os possíveis efeitos secundários ⁸¹.

A combinação de PDT-redaporfin com outros fármacos, nomeadamente inibidores da glicólise, pode potenciar o efeito da terapia fotodinâmica, por isso, é essencial analisar a diferença entre a utilização de PDT-redaporfin como uma monoterapia e a sua combinação com diferentes inibidores da glicólise. A PDT tem como mecanismo de ação o aumento de ROS na célula, provocando morte celular. A escolha de inibir a glicólise prende-se com o facto de as células tumorais aumentarem a utilização desta via metabólica, com o objetivo de aumentar a produção de energia⁸⁹, mas a sua inibição pode levar a processos de morte celular, diminuição dos níveis de ATP, e outras moléculas essenciais para a célula, e aumento dos níveis de ROS nas células¹⁰². Assim, a combinação das duas terapias, pode potenciar a PDT (Figura 3.1). Os inibidores escolhidos

para este estudo foram a 2-deoxiglucose, o 3-bromopiruvato e a oxitiamina, apresentando, cada um, características diferentes.

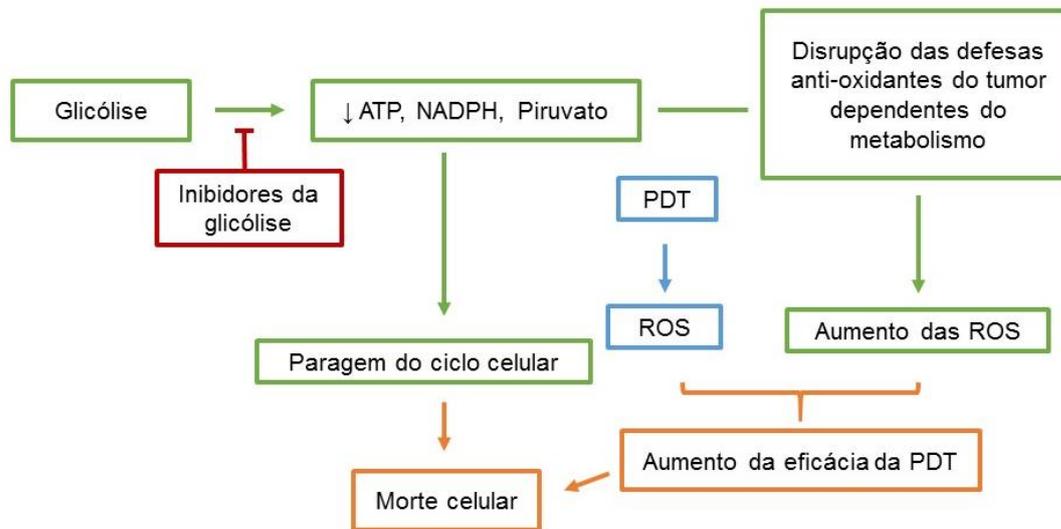


Figura 3.1. Representação esquemática das vias afetadas pela terapia combinacional

Os estudos apresentados foram realizados em duas linhas celulares com características diferentes, NIH/3T3 e CT26. A linha celular NIH/3T3 é constituída por fibroblastos, o que permite ter um modelo não tumoral, já as CT26 são células do carcinoma do cólon, representando um modelo tumoral. O objetivo de utilizar duas linhas celulares com estas características passa por poder comparar os efeitos que as modalidades terapêuticas possam ter sobre as células normais em comparação com as tumorais e avaliar se combinação permite uma maior seletividade da terapia e, provavelmente, diminuir as doses de fármaco que são administradas. Note-se que as células NIH/3T3 não são exatamente células “normais” pois evoluíram espontaneamente para uma imortalização, mas quando inoculadas em murganhos não induzem tumores.

O estudo inicia-se com a avaliação da fototoxicidade da redaporfin e cálculo do IC50 para as duas linhas celulares utilizadas e, de seguida, é realizada uma avaliação da citotoxicidade para cada um dos inibidores, para que se utilizem concentrações não tóxicas para as células nos estudos de combinação.

O protocolo idealizado para as experiências de combinação permite comparar diretamente a eficácia de tratamento das combinações pretendidas com controlos de PDT e das doses de inibidores de glicólise. Desta forma, cada experiência é realizada na presença de vários grupos controlo, nomeadamente, um grupo apenas com células plaqueadas, sem adição de nenhum composto, que serve de referência, três grupos que correspondem à administração das diferentes concentrações de inibidor e, por último, um grupo onde as células foram expostas apenas ao IC50 da redaporfin. Para cada inibidor e

para cada linha celular realizaram-se três tipos de incubações de inibidor diferentes: (i) Incubação do inibidor 24h antes da irradiação; (ii) Incubação do inibidor 24h antes da irradiação e também 24h após a irradiação; (iii) Incubação 48h antes da irradiação.

1.1. Avaliação do IC50 da PDT-redaporfin

A redaporfin é um fotossensibilizador de terceira geração que, intracelularmente, se localiza, maioritariamente, no retículo endoplasmático, mas também na mitocôndria. Estudos anteriores com este PS na linha celular CT26 demonstraram que incubações de 20 h de redaporfin não são citotóxicas até doses de 200 μM ⁶². O valor de IC50 também foi calculado em estudos anteriores para uma dose de luz de 1 J/cm², situando-se nos 880 nM. Para a linha celular NIH/3T3, não existem estudos publicados. No nosso estudo, para a avaliação da fototoxicidade da redaporfin (RP), o tempo de incubação foi de 20h e a dose de luz 1 J/cm², sendo que a fluência aplicada às células foi medida em cada experiência. Utilizaram-se concentrações entre os 25 e os 400 nM e, como se pode ver na Figura 3.2, estas concentrações incluem as condições onde a viabilidade celular varia entre os 100% e os 0%, permitindo o cálculo do IC50 da redaporfin.

Os ensaios de citotoxicidade da redaporfin consistem na utilização do PS, sem que esta seja irradiado. A citotoxicidade foi avaliada em simultâneo com a fototoxicidade para garantir que as concentrações de PS utilizadas não eram tóxicas para as células. Como se pode ver na Figura 3.2.A e Figura 3.2.C, em ambas as linhas celulares, as concentrações de redaporfin utilizadas, não foram citotóxicas, apresentando viabilidades na ordem dos 100% para todas as condições utilizadas. Já no caso da fototoxicidade, tanto na Figura 3.2B como na Figura 3.2.D podemos ver um perfil típico de diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração de redaporfin, para uma dose de luz constante de 1 J/cm². A diminuição inicial da viabilidade celular ocorre em concentrações mais baixas de redaporfin para a linha celular NIH/3T3 em comparação com a CT26, atingindo valores próximos de 0% para concentrações de 200 nM, enquanto que nas CT26 isso só ocorre próximo dos 400 nM, como se pode ver na Figura 3.2.B e Figura 3.2.D. Por isso, o valor de IC50 para a linha celular NIH/3T3 é menor, comparado com o valor para as CT26, como pode ser visto no gráfico da Figura 3.3.A e Figura 3.3.B. O valor de IC50 foi calculado recorrendo a um ajuste a uma função sigmoide, utilizado em experiências de Dose-Resposta, do programa Origin:

$$y = A1 + (A2 - A1)/(1 + 10^{(\log(x_0 - x)) * p}) \quad (\text{Equação 3.1.})$$

Onde A1 e A2 correspondem à assíntota mais alta e mais baixa do gráfico, respetivamente, e o p se relaciona com o declive da zona de decréscimo mais acentuada dos valores de viabilidade (Fator de *hill slope*). Através deste ajuste foi possível calcular o valor de IC50

da redaporfin para cada uma das linhas celulares, apresentados na Tabela 3.1. Os valores de IC50 obtidos neste estudo são as concentrações de PS escolhidas para prosseguir em cada linha celular, nos estudos de combinação com os inibidores, garantindo uma viabilidade celular na zona dos 50%, que nos permita ver alterações no tratamento.

O valor de IC50 calculado neste estudo é menor do que o calculado anteriormente para a mesma dose de luz e linha celular (880 nM). Isto pode ser explicado porque neste estudo utilizou-se como fonte de luz um LED e no estudo anterior laser. A utilização de LED implica uma fluência menor e um tempo de irradiação maior, por isso, as células podem renovar mais vezes o oxigénio que entra nas células, podendo gerar-se mais espécies reativas de oxigénio. Para além disso, a pureza do PS também não é constante de lote para lote, por isso, caso o lote utilizado no estudo fosse mais puro, pode influenciar na quantidade de ROS formado e, conseqüentemente, no valor de IC50.

A linha celular NIH/3T3 tem um valor de IC50 ligeiramente menor do que as CT26. A diferença entre os valores é pequena e pode dever-se a erros experimentais ou ao facto de estarmos a lidar com linhas celulares imortalizadas (com características diferentes das células normais, uma vez que têm um número ilimitado de divisões). Como se tratam de linhas celulares, não há razões para que a internalização do composto seja diferente entre a linha celular normal e tumoral, uma vez que esta internalização ocorre por transporte passivo, por isso, de forma semelhante em ambos os casos. Para além disso, um dos possíveis fatores responsáveis por esta diferença são as diferenças nas defesas antioxidantes de uma linha celular para a outra, mas isso não foi avaliado, nem é o objeto de estudo. Ainda assim, a seletividade não é facilmente avaliada *in vitro*, porque não estamos na presença do microambiente característico dos tumores, composto por diversos tipos de células, que podem influenciar a internalização do PS através de, por exemplo, anomalias na vasculatura (que podem levar a uma maior retenção do PS nos vasos) ou a presença de transportadores nas membranas celulares.

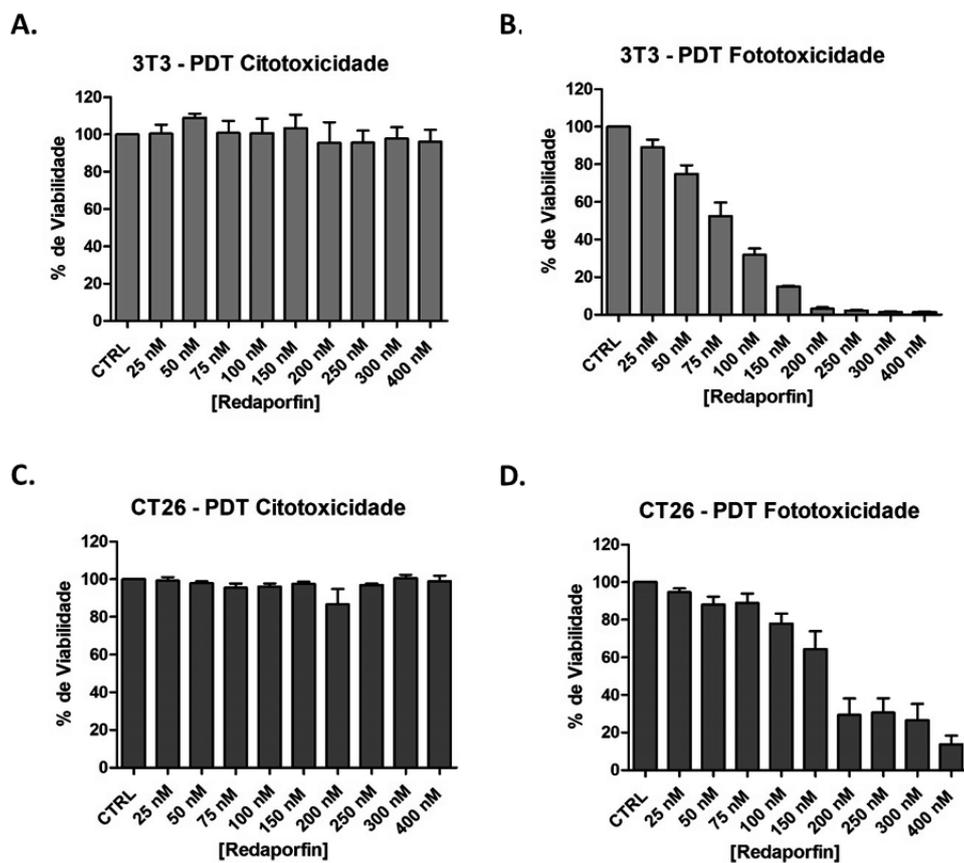


Figura 3.2. Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade da redaporfin na linha celular NIH/3T3 (A e B) e na linha celular CT26 (C e D). As concentrações de RP que variam entre 25 e 400nM e a dose de luz é 1J/cm² para a experiência de fototoxicidade.

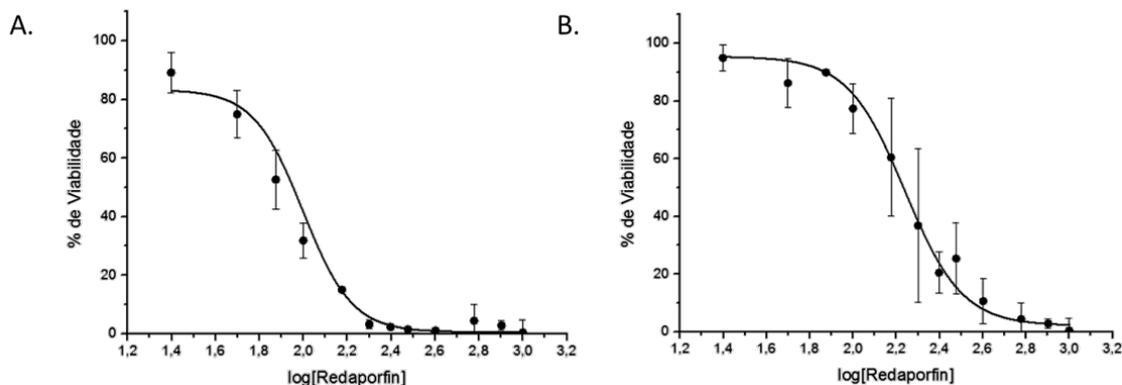


Figura 3.3. Gráfico do IC₅₀ da redaporfin na linha celular NIH/3T3 (A) e CT26 (B)

Tabela 3.1. Valores de IC₅₀ da redaporfin para as duas linhas celulares

	IC ₅₀ (nM)	Doses Escolhidas (nM)
NIH/3T3	99,552 ± 7,3594	100
CT26	173,86 ± 10,087	175

1.2. Combinação PDT-redaporfin e 2-deoxiglucose

A 2DG é um inibidor de glicólise, análogo da glucose, que inibe a hexocinase e interfere com a conformação de determinadas proteínas, mas os seus mecanismos de ação ainda não são completamente conhecidos¹³⁴. De qualquer forma, este inibidor encontra-se em mais de 100 ensaios clínicos, como monoterapia ou como terapia combinada¹⁴⁴.

Para analisar, posteriormente, a combinação da PDT com os inibidores de glicólise foram realizados estudos de citotoxicidade com concentrações crescentes de 2DG, que variaram entre 100 μ M e 4 mM, e com tempos de incubação de 24 h e 48 h, para se conhecerem as concentrações não tóxicas de inibidor. Como mostrado na Figura 3.4, há um decréscimo da viabilidade com o aumento da concentração de 2DG em todas as condições e linhas celulares. A diferença de viabilidade celular em relação ao controlo só começa a ser significativa para concentrações superiores a 1 mM, como se pode ver nas Figura 3.4A, Figura 3.4B e Figura 3.4C. No caso da Figura 3.4D, incubação da linha celular CT26 com 2DG por 48 h, a diferença estatística surge a partir da concentração de 500 μ M. Assim, as concentrações escolhidas para os estudos de combinação foram 100 μ M, 200 μ M e 500 μ M, uma vez que não mostraram citotoxicidade.

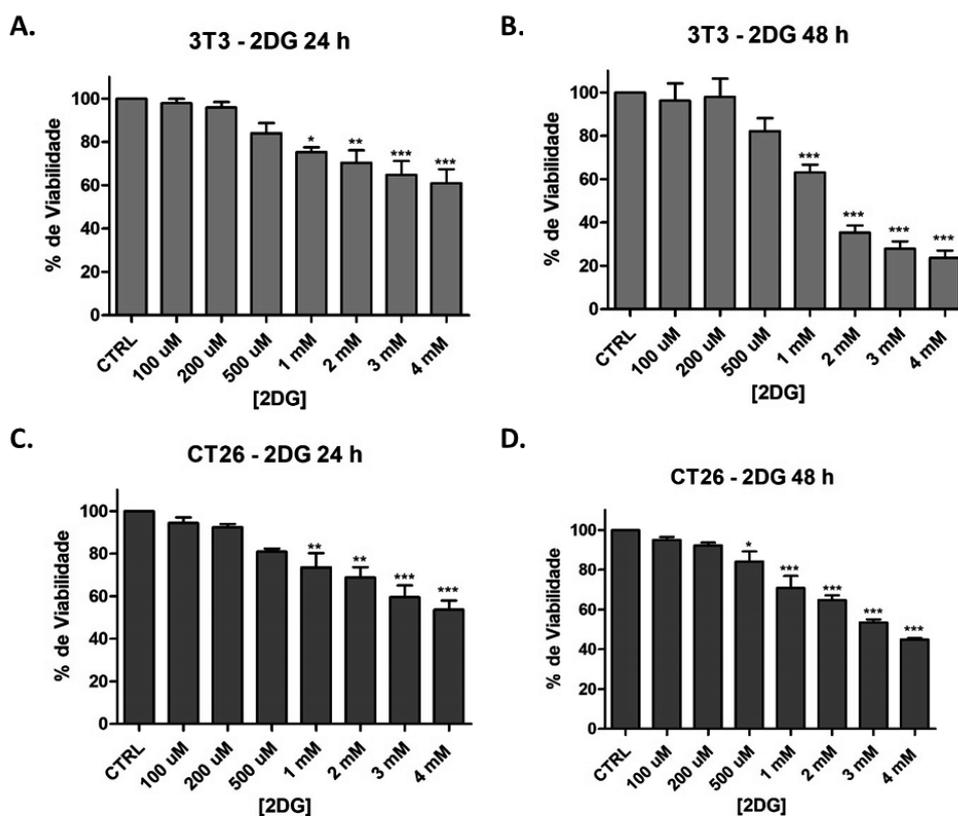


Figura 3.4. Avaliação da citotoxicidade do inibidor 2DG na linha celular NIH/3T3 (A e B) e na linha celular CT26 (C e D). As concentrações de 2DG variam entre 100 μ M e 4mM e os tempos de incubação do inibidor foram 24h ou 48h. * corresponde a p < 0.05, ** corresponde a p < 0.01, *** corresponde a p < 0.001

Na literatura surgem diversos estudos com a 2DG, tanto como monoterapia, como combinada com outros fármacos quimioterapêuticos ou radiação. Um dos estudos reporta um aumento da citotoxicidade, do stress oxidativo e da sensibilidade para radiação em células de cancro pancreático, com doses de 2DG entre 4 e 20 mM¹²⁶. Outro estudo relaciona a toxicidade da 2DG, em doses de 5 a 20 mM, com a família de proteínas Bcl-2, provando que este inibidor potencia a via mitocondrial da apoptose, provavelmente por uma diminuição da energia celular, devido a uma desregulação da mitocôndria, e que também provoca stress no retículo endoplasmático¹³⁴. A 2DG aumenta também a eficácia de agentes quimioterapêuticos, como é o caso da adriamicina ou do paclitaxel, tendo sido comprovado em modelos animais¹¹². No caso do nosso estudo, as concentrações de 2DG não se pretendem tóxicas, para que seja possível avaliar a diferença entre a PDT como monoterapia e a combinação com o inibidor, por isso, as concentrações utilizadas ficam abaixo do 1 mM, mas espera-se que, ainda assim, provoquem algum impacto no metabolismo celular.

Na Figura 3.5 são apresentados os gráficos das diferentes combinações de 2DG com PDT-redaporfin. Em todos os gráficos é possível verificar que as concentrações de 2DG selecionadas não provocam morte celular, apresentando viabilidades na ordem dos 100%. Já o controlo de redaporfin e as combinações com a 2DG apresentam valores de viabilidade próximos de 40%, no caso da linha celular NIH/3T3, e de 60%, no caso das CT26. Na Figura 3.5A e Figura 3.5B temos a incubação de 2DG durante 24 h antes irradiação da redaporfin para a linha celular NIH/3T3 e CT26, respetivamente, surgindo diferenças estatisticamente significativas entre o controlo de redaporfin e a combinação com a dose de 500 µM de 2DG tanto nas NIH/3T3 como nas CT26. No caso da incubação de 2DG 24 h antes e 24 h após a irradiação, temos novamente diferenças estatisticamente significativas para a combinação com a dose de 2DG de 500 µM em ambas as linhas celulares (Figura 3.5C e Figura 3.5D) e também para a combinação com a dose de 200 µM no caso das NIH/3T3 (Figura 3.5C). Para a incubação de 2DG 48 h antes da irradiação, não existem dados estatisticamente significativos em nenhuma das linhas celulares (Figura 3.5E e Figura 3.5F).

A utilização de 2DG em simultâneo com a PDT-redaporfin potencia a eficácia do tratamento de uma forma dependente da dose, uma vez que temos uma diminuição da viabilidade celular das combinações, em relação à monoterapia, para doses de 2DG mais altas, como se pode ver nos gráficos da Figura 3.5.

A combinação entre 2DG e PDT com outros PSs, já foi estudada, tal como os possíveis mecanismos associados ao aumento da eficácia da terapia combinada. Nestes estudos são reportadas diversas alterações, nomeadamente, danos a nível da mitocôndria, alterações nos níveis de proteínas associadas à apoptose (como é o caso da família das

caspases e da família Bcl-2), um aumento dos níveis de ROS e uma diminuição nos níveis de ATP ou um aumento do stress do retículo endoplasmático (uma vez que a 2DG afeta a glicosilação de proteínas). Os estudos indicam que, com as linhas celulares que utilizaram como modelo não tumoral (HUVEC e HMEC), há evidências de seletividade para as células tumorais, possivelmente, porque estas têm alterações mais marcadas no seu metabolismo^{138–140}. Assim, os resultados obtidos neste estudo poderão estar relacionados com os parâmetros apresentados na literatura, para outros PSs, uma vez que verificamos melhorias na terapia combinada. Apesar disso, não se verifica seletividade para células tumorais, ao contrário do que se encontra na literatura.

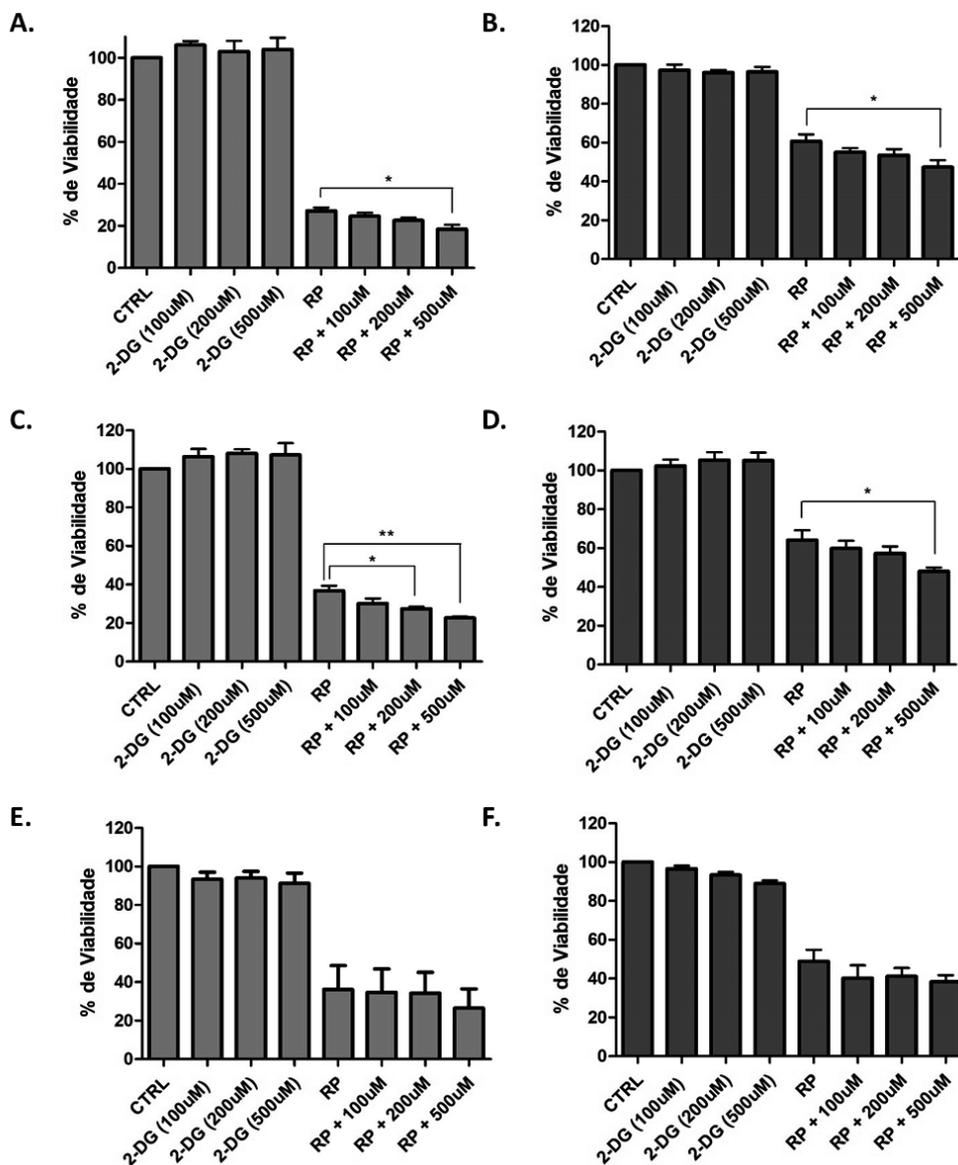


Figura 3.5. Estudos de combinação entre PDT-redaporfin e 2DG. Gráficos A, C e E correspondem à linha celular NIH/3T3 e os gráficos B, D e F à linha celular CT26. Gráficos A e B correspondem a incubações de 2DG 24h antes da irradiação da redaporfin; Gráficos C e D correspondem a incubações de 2DG 24h antes e 24h após a irradiação da redaporfin; Gráficos E e F correspondem a incubações de 2DG 48h antes da irradiação da redaporfin. * corresponde a $p < 0.05$, ** corresponde a $p < 0.01$, *** corresponde a $p < 0.001$

1.3. Combinação PDT-redaporfin e 3-bromopiruvato

O 3BP é um análogo do piruvato e um agente alquilante que inibe a hexocinase, a lactato desidrogenase e a fosforilação oxidativa na mitocôndria, levando a uma depleção da produção de ATP e, conseqüentemente, à morte celular¹³¹. O 3BP ainda se encontra numa fase pré-clínica, mas já existem casos clínicos onde se descreve o tratamento de alguns pacientes com este composto^{145,146}.

A citotoxicidade do 3BP foi avaliada com o intuito de se conhecerem as concentrações não tóxicas do inibidor para serem utilizadas no estudo de combinação. Foram utilizadas concentrações crescentes de 3BP, variando neste caso entre 2,5 μ M e 50 μ M, e com tempos de incubação de 24 h e 48 h. O perfil da viabilidade celular em função da concentração de inibidor mostra uma diminuição da viabilidade com o aumento da concentração de inibidor, em ambas as linhas celulares e tempos de incubação. No caso das CT26, a partir de 20 μ M, para o tempo de incubação de 24 h, e 25 μ M, para uma incubação de 48 h, começa a haver uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo (Figura 3.6C e Figura 3.6D). Já na linha celular NIH/3T3, esta diferença só surge para concentrações de 50 μ M (Figura 3.6A e Figura 3.6B). Assim, as concentrações escolhidas para os estudos de combinação foram 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M, por não apresentarem citotoxicidade em nenhuma das linhas celulares.

O 3BP é estudado como monoterapia ou em combinação com outros fármacos quimioterapêuticos. Um estudo em células de cancro de fígado, aplicando-se doses de 3BP entre 50 e 200 μ M, mostrou um aumento das ROS, levando a alterações na mitocôndria e a processos de morte celular, tanto apoptose como necrose¹³¹. Outro estudo, que combina a utilização de 3BP (em concentrações de 25 a 100 μ M) com fármacos quimioterapêuticos com platina (cisplatina e oxaliplatina), levando a diminuições nos níveis de ATP e de moléculas redutoras, como o NADPH, e potenciando a ação da quimioterapia através de um aumento das ROS e de alterações na mitocôndria, para além dos efeitos na glicólise, aumentando a necrose das células¹⁴⁷. Neste estudo, não se pretende utilizar doses tóxicas de 3BP, por isso, como se pode ver na figura 5, as doses não tóxicas são inferiores a 10 μ M, doses mais baixas do que as usadas nos dois estudos referidos anteriormente.

O 3BP é um agente alquilante que reage, através do seu grupo nucleofílico, com grupos tióis presentes nas cisteínas de diversas proteínas, levando à destruição de pontes de disulfeto. Dado que o bromo é um grupo com uma elevada eletronegatividade, o 3BP torna-se extremamente reativo e alquila diversas proteínas. Apesar de ser um agente alquilante, a literatura mostra que é um fármaco eficaz e seletivo para células tumorais¹⁴⁸.

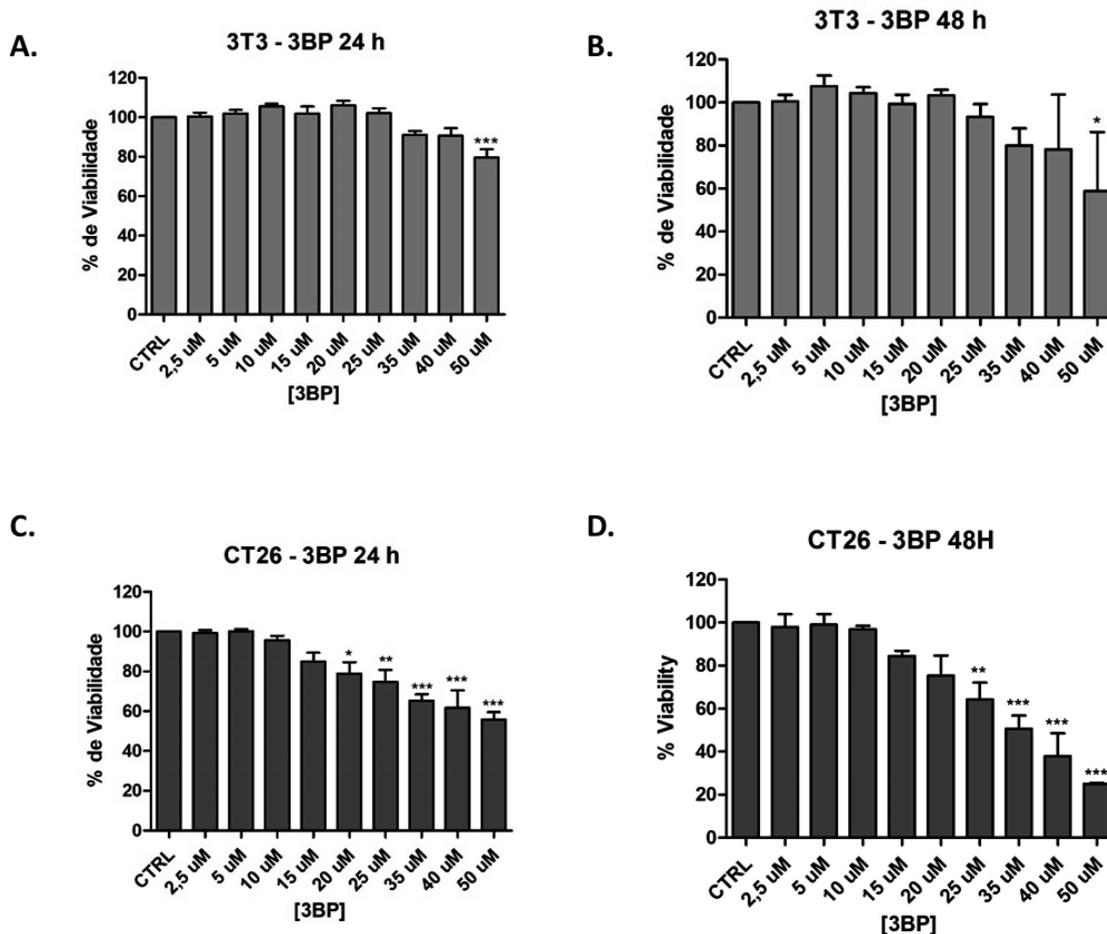


Figura 3.6. Avaliação da citotoxicidade do inibidor 3BP na linha celular NIH/3T3 (A e B) e na linha celular CT26 (C e D). As concentrações de 3BP variam entre 2,5μM e 50μM e os tempos de incubação do inibidor foram 24h ou 48h. * corresponde a $p < 0.05$, ** corresponde a $p < 0.01$, *** corresponde a $p < 0.001$

O 3BP difere do lactato em apenas um átomo, por isso, pode entrar nas células pelos mesmos transportadores que retiram o lactato do seu interior, os transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT, do inglês monocarboxylic acid transporters). Uma vez dentro das células, o 3BP afeta a glicólise, inibindo a hexocinase, e a fosforilação oxidativa mitocondrial, inibindo os transportadores de fosfato¹⁴⁹.

O conceito de catástrofe metabólica corresponde a uma ruptura do metabolismo celular, com uma elevada severidade, que leva a uma paragem da produção de energia, na forma de ATP, levando a morte celular¹⁵⁰. O 3BP provoca alterações em diversos passos da produção de energia da célula, tanto na glicólise como na fosforilação oxidativa, e, por isso, leva a uma rápida depleção de ATP e a uma possível catástrofe metabólica¹⁵¹.

O 3BP tem diversos alvos terapêuticos, sendo que um dos principais, e que leva à catástrofe metabólica, é a hexocinase¹⁵². O 3BP induz uma alteração covalente na hexocinase, muito possivelmente nos seus resíduos de cisteína, e a enzima dissocia-se da

mitocôndria. Esta alteração provoca uma libertação de fatores que induzem a apoptose¹⁵³. No entanto, concentrações baixas de 3BP não inibem a hexocinase, por isso, o inibidor tem outros alvos nas células. Outra enzima afetada por este inibidor e essencial no processo glicolítico é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que está sobre expressa em células de cancro. Existem diversos estudos na literatura que provam que o 3BP inibe a atividade desta enzima, levando a uma inibição da produção de ATP nos passos seguintes da via da glicólise¹⁵⁴. O 3BP também pode afetar outras enzimas da via glicolítica, nomeadamente a fosfoglicerato cinase e a piruvato cinase¹⁵⁵.

As células tumorais sobre expressam MCTs, que são responsáveis por retirar o lactato da célula para evitar a acidificação intracelular e, conseqüentemente, a apoptose. Para além disso, a acidificação do microambiente tumoral, provocada pelo aumento de lactato no meio extracelular, favorece a proliferação e invasão celular¹⁵⁶. Estes transportadores conduzem o 3BP para o interior das células, por isso, o aumento da expressão destes transportadores em células tumorais, em comparação com as células normais, pode estar diretamente relacionado com a seletividade deste inibidor para estas células¹⁴⁹.

O 3BP também parece afetar várias enzimas essenciais na fosforilação oxidativa na mitocôndria, e uma inibição do ciclo de Krebs leva a uma depleção de ATP, mas também a alterações noutros processos que fornecem moléculas essenciais à sobrevivência da célula¹⁵⁷. Para além disso, também foram observadas alterações nos níveis de ROS com a utilização de 3BP, devido a um aumento do stress no retículo endoplasmático¹⁵⁸. A concentração de 3BP utilizada no tratamento influencia o tipo de morte celular que ocorre, sendo que, para concentrações mais baixas, é favorecida a apoptose, enquanto que para concentrações mais altas, favorece-se a necrose¹⁵⁹.

Assim, pode concluir-se que esta molécula não afeta apenas um alvo, sendo também significativa a contribuição dos transportadores MCTs para que haja uma elevada eficácia deste fármaco e também uma elevada seletividade para células tumorais. Portanto, este fármaco também pode ser muito útil combinado com outras terapias ¹⁴⁹.

Este composto ainda não se encontra em ensaios clínicos e a sua natureza alquilante pode ser um impedimento para a sua aplicação clínica. No entanto, existem muitas evidências de que este inibidor é seletivo para células tumorais, possivelmente devido a dois mecanismos. Em primeiro lugar, a relação com os MCTs e o pH extracelular ácido junto aos tumores, que promovem uma maior internalização do composto¹⁶⁰. Em segundo, o facto do 3BP atuar em diversos alvos, levando a um depleção dos níveis de ATP, a uma catástrofe metabólica e, conseqüentemente, à morte celular. Assim, é necessário reunir diversas condições para que a internalização de 3BP seja maior e os efeitos mais

significativos. Para além disso, as células normais não têm tantos danos a nível da respiração celular, podendo compensar, por outras vias, os efeitos do 3BP.¹⁶¹

Apesar deste inibidor não se encontrar em ensaios clínicos, foram identificados dois casos publicados onde se utilizou este inibidor para o tratamento de doentes oncológicos. O primeiro caso trata-se de um jovem de 16 anos que tinha um carcinoma hepatocelular fibrolamelar em fase terminal. Neste caso, o 3BP foi administrado durante vários meses, não apresentando uma toxicidade significativa no paciente. O paciente morreu dois anos depois, por complicações no funcionamento do fígado, que não se relacionam com a utilização do composto, mas sim com a incapacidade de eliminar o tecido tumoral morto formado após o tratamento. De qualquer das formas, a qualidade de vida do paciente melhorou significativamente durante os dois anos seguintes ao diagnóstico da doença¹⁴⁵. Outro caso retrata um paciente com 28 anos que tinha sido diagnosticado com um melanoma metastático de fase IV, que também tinha afetado os pulmões. Numa fase inicial do tratamento, a eficácia do 3BP parecia reduzida, mas após a utilização de paracetamol para diminuir os níveis de glutathione no tumor, a eficácia aumentou. Infelizmente o paciente morreu poucos meses após o início da terapia, não devido ao inibidor, mas sim a complicações relacionadas com o estado avançado da doença¹⁴⁶.

Por todas estas razões, o 3BP parece uma molécula promissora para o tratamento do cancro, sendo necessário realizar mais estudos para comprovar a sua eficácia. Neste estudo, combina-se o 3BP com terapia fotodinâmica para se avaliar se é possível potenciar esta terapia sensibilizando as células com este inibidor.

A Figura 3.7 reúne os gráficos das diferentes combinações de 3BP com PDT-redaporfin. Mais uma vez é possível ver que as doses de 3BP selecionadas não provocam morte celular em nenhuma das linhas celulares, como pode ser notado pelas viabilidades na ordem dos 100%. Por outro lado, os valores de viabilidade para os tratamentos com PDT apresentam valores na ordem dos 30 a 40% no caso das NIH/3T3 e na ordem dos 50 a 60% no caso das CT26. Tanto na Figura 3.7.A e Figura 3.7.B, que correspondem a incubações de 3BP 24 h antes da irradiação, como na Figura 3.7.C e Figura 3.7.D, que correspondem a incubações de 3BP 24 h antes e 24 h após a irradiação, não temos diferenças estatisticamente significativas entre o controlo de redaporfin e as diferentes combinações de redaporfin com 3BP. No entanto, no caso da incubação de 3BP 48 h antes da irradiação, que está apresentada na Figura 3.7.E e Figura 3.7.E, podemos ver que existe uma diferença estatisticamente significativa na linha celular CT26 para a combinação de redaporfin com a dose mais alta de 3BP (10 μ M), e não existe qualquer dado estatisticamente significativo na linha celular NIH/3T3.

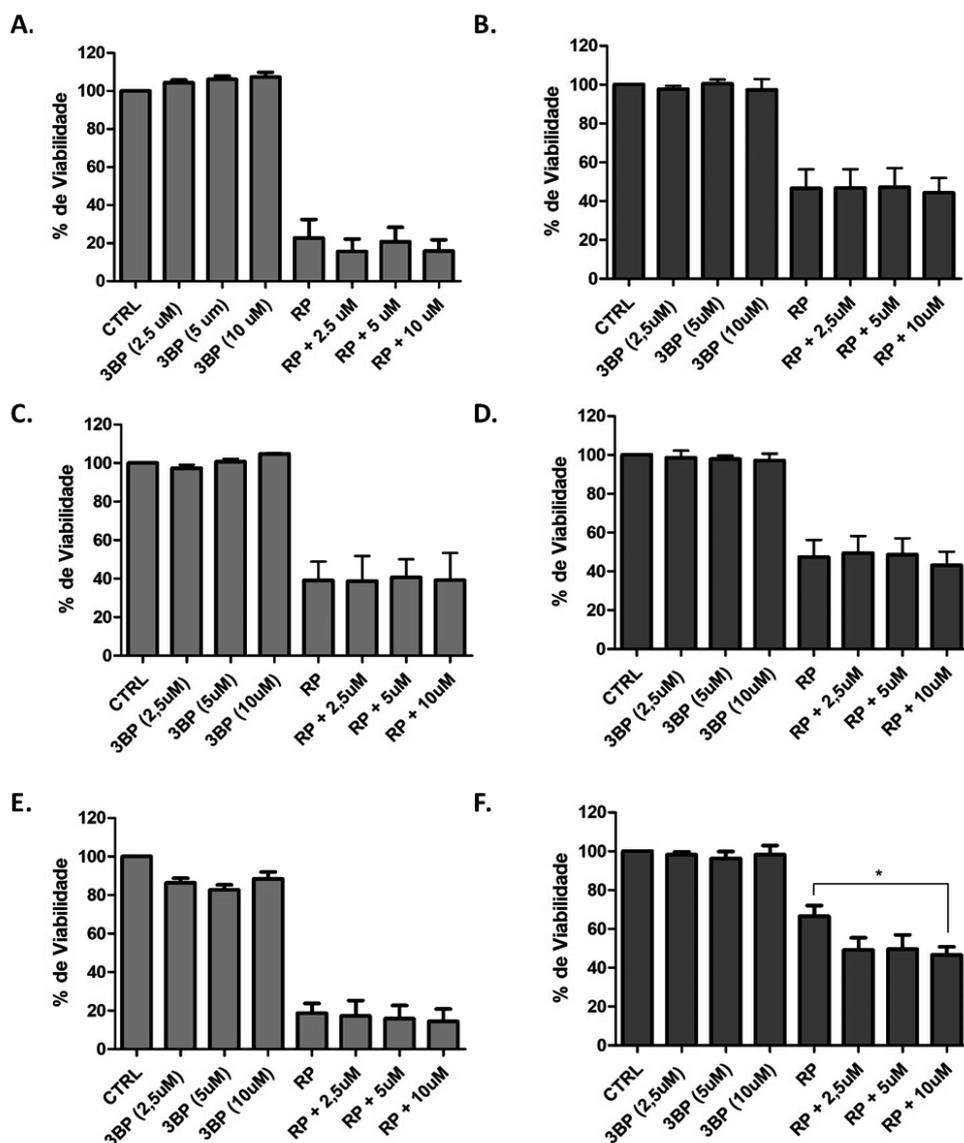


Figura 3.7. Estudos de combinação entre PDT-redaporfin e 3BP. Gráficos A, C e E correspondem à linha celular NIH/3T3 e os gráficos B, D e F à linha celular CT26. Gráficos A e B correspondem a incubações de 3BP 24h antes da irradiação da RP; Gráficos C e D correspondem a incubações de 3BP 24h antes e 24h após a irradiação da RP; Gráficos E e F correspondem a incubações de 3BP 48h antes da irradiação da RP. * corresponde a $p < 0.05$, ** corresponde a $p < 0.01$, *** corresponde a $p < 0.001$

No caso da combinação de 3BP com PDT-redaporfin com uma incubação do inibidor 48 h antes da irradiação surgem dados muito interessantes a nível terapêutico, uma vez que não se verifica uma toxicidade significativa nas células NIH/3T3, mas na linha celular CT26 temos uma diferença acentuada na percentagem de viabilidade celular da combinação, quando comparada com a monoterapia, indicando que este composto pode levar a um aumento da seletividade da terapia para células tumorais. Nas restantes combinações não parece haver melhorias significativas do tratamento com a utilização de 3BP.

Já existem alguns estudos que combinam 3BP e PDT com outros PSs. A utilização de 3BP em simultâneo com a PDT leva a alterações nas proteínas relacionadas com a apoptose, um aumento dos níveis de ROS e uma diminuição dos níveis de ATP e danos a nível da mitocôndria, aumentando a eficácia da PDT e a seletividade para as células tumorais^{138,140}.

Estudos demonstram que o 3BP provoca stress no retículo endoplasmático, que pode ativar processos de autofagia úteis para resistir à agressão que é provocada à célula, por exemplo, aumento a produção de compostos essenciais para a sobrevivência da célula¹⁶². De qualquer forma, foi mostrado que são necessários dois ou mais agentes quimioterapêuticos para induzir um stress no retículo endoplasmático suficiente para provocar morte celular¹⁶³. Dado que a redaporfin é um fotossensibilizador que se localiza maioritariamente no retículo endoplasmático, a combinação destes dois agentes pode potenciar o stress oxidativo neste organelo e levar a um aumento mais significativo das ROS e a uma maior eficácia no tratamento.

1.4. Combinação PDT-redaporfin e oxitiamina

A oxitiamina é um antagonista da tiamina e inibe a transquetolase, que é uma enzima da via da pentose fosfato. Apesar dos mecanismos de ação da OXY ainda não serem totalmente conhecidos, há evidências de uma diminuição da síntese de macromoléculas biológicas, que pode levar a uma inibição da proliferação celular e indução da apoptose¹²². Os ensaios com a OXY ainda se encontram numa fase pré-clínica.

O inibidor OXY foi também avaliado em relação à sua citotoxicidade, para se obterem as concentrações não tóxicas para o estudo combinatorial. As concentrações de oxitiamina variaram entre 1 mM e 6 mM e os tempos de incubação foram de 24 h e 48 h, como nos estudos anteriores. No caso deste inibidor, não ocorreu um decréscimo da viabilidade com a concentração de OXY, mantendo-se sempre na ordem dos 100%, em ambas as linhas celulares e tempos de incubação (Figura 3.8). As concentrações escolhidas para os estudos de combinação foram 1 mM, 2 mM e 3 mM, uma vez que não existia diferença na viabilidade celular em relação a doses mais elevadas, podendo optar-se por doses mais adequadas para uma translação para a clínica e, ainda assim, provocar uma maior sensibilização das células tumorais para o tratamento com PDT-redaporfin.

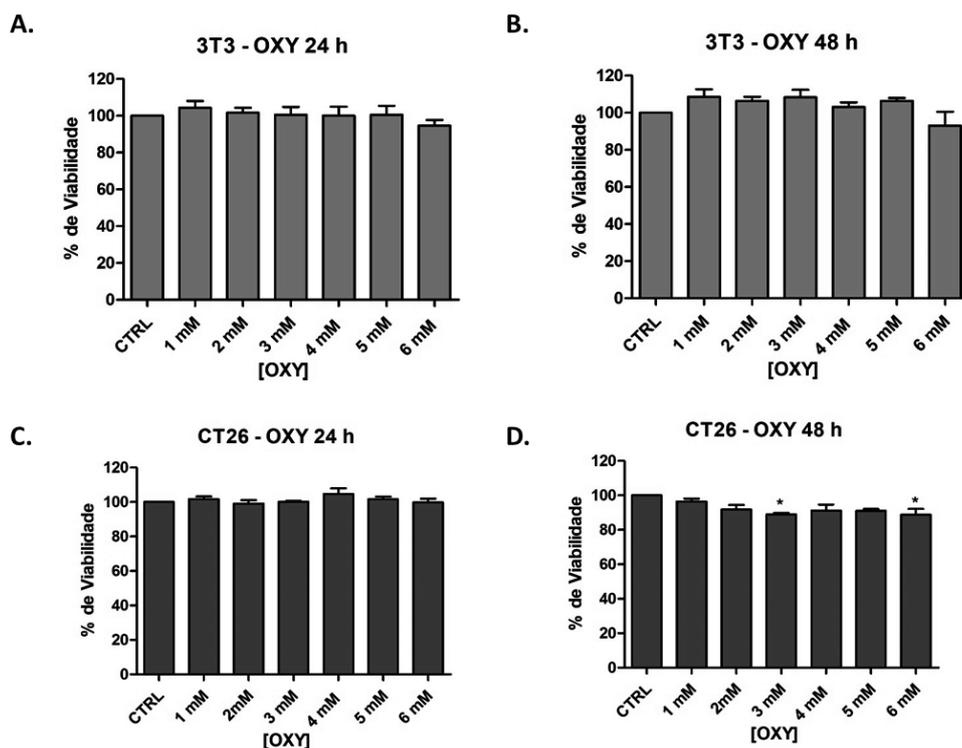


Figura 3.8. Avaliação da citotoxicidade do inibidor OXY na linha celular NIH/3T3 (A e B) e na linha celular CT26 (C e D). As concentrações de OXY variam entre 1mM e 6mM e os tempos de incubação do inibidor foram 24h ou 48h. * corresponde a $p < 0.05$, ** corresponde a $p < 0.01$, *** corresponde a $p < 0.001$

A oxitiamina já foi utilizada em diversos estudos. Um dos estudos utiliza células de cancro no pâncreas, e concentrações de OXY entre 5 e 500 μM , e demonstra que este inibidor provoca alterações na expressão de diversas proteínas da célula, tal como na sua fosforilação, e que as proteínas afetadas estão, maioritariamente, envolvidas em processos de sinalização para a morte celular, expressão genética ou modificações pós-translacionais¹²². Num estudo *in vivo* em murganhos, onde se utilizaram doses de OXY entre 100 e 500 mg/kg, verificaram-se diminuições no crescimento do tumor e foram apresentadas evidências de que as células tumorais permaneciam na fase G1 do ciclo celular, devido à inibição da produção de macromoléculas essenciais para a passagem para a fase S¹¹⁹. Outro estudo, onde se aplica uma concentração de OXY de 0,5 μM , relaciona a inativação da síntese de ribose com a inibição da proliferação das células tumorais, um vez que os metabolitos formados na via da pentose fosfato são essenciais para a formação de ácidos nucleicos e para a progressão celular¹²⁰. Neste estudo, não é evidente uma diminuição da viabilidade celular dependente da dose, por isso, foram escolhidas doses com maior utilidade a nível terapêutico (1 a 3 mM).

A Figura 3.9 contém os gráficos que correspondem às combinações das diferentes concentrações de OXY com a PDT-redaporfin. Os valores de viabilidade das concentrações de OXY aplicadas rondam os 100%, mostrando que as doses escolhidas

não são citotóxicas. Já os valores de viabilidade para a PDT-redaporfin e para as diferentes combinações estão entre os 30 e 40%, no caso das NIH/3T3, e os 50 e 60% no caso das CT26. Na Figura 3.9.A e Figura 3.9.B, onde a incubação com OXY foi feita durante 24 h, temos uma combinação estatisticamente diferente do controlo de redaporfin, que corresponde à combinação com a dose mais elevada de OXY, 3 mM, mas na linha celular NIH/3T3, não existem dados estatisticamente significativos. Na Figura 3.9.C e Figura 3.9.D, onde a incubação com OXY foi feita 24 h antes e 24 h após a irradiação, e nas Figura 3.9.E e Figura 3.9.F, onde a incubação ocorreu 48 h antes da irradiação, não temos dados estatisticamente significativos em nenhuma das linhas celulares.

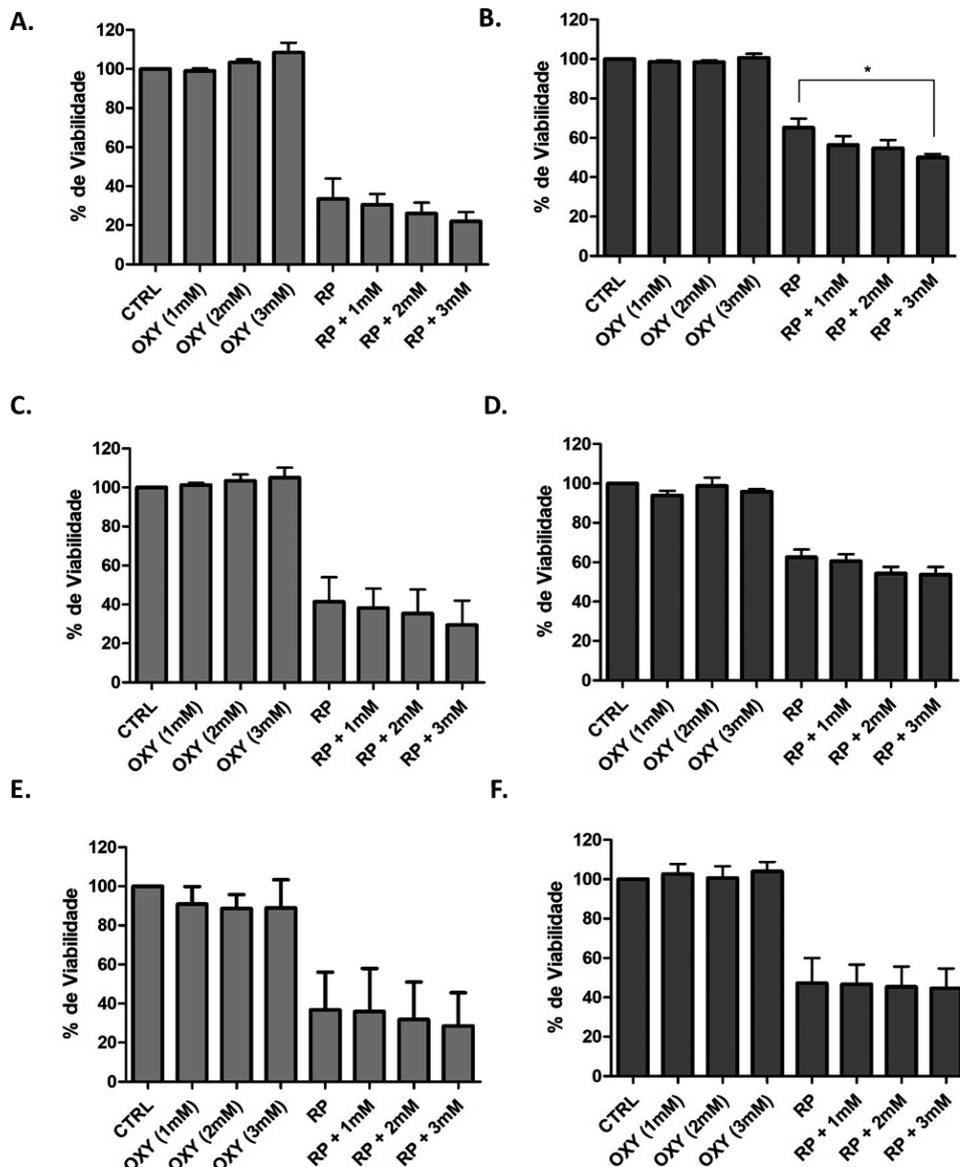


Figura 3.9. Estudos de combinação entre PDT-redaporfin e OXY. Gráficos A, C e E correspondem à linha celular NIH/3T3 e os gráficos B, D e F à linha celular CT26. Gráficos A e B correspondem a incubações de OXY 24h antes da irradiação da redaporfin; Gráficos C e D correspondem a incubações de OXY 24h antes e 24h após a irradiação da redaporfin; Gráficos E e F correspondem a incubações de OXY 48h antes da irradiação da redaporfin. * corresponde a $p < 0.05$, ** corresponde a $p < 0.01$, *** corresponde a $p < 0.001$

A combinação de OXY com PDT-redaporfin não parece provocar alterações significativas nas células não tumorais em relação à monoterapia. No caso da incubação 24 h antes da irradiação, para a linha celular CT26, temos valores significativos para a utilização de uma combinação com uma dose de OXY de 3 mM, podendo, possivelmente, ser seletiva para células tumorais. Esta combinação pode ter utilidade terapêutica, uma vez que só há um aumento da sensibilidade das células tumorais, e não das não tumorais, à terapia fotodinâmica.

Os mecanismos de ação da oxitiamina não são bem conhecidos, mas a inibição da transquetolase leva a uma diminuição da síntese de diversas biomacromoléculas essenciais para a proliferação das células tumorais. Assim, acredita-se que os mecanismos de ação associados à utilização deste inibidor passem por uma diminuição da síntese de ácidos nucleicos e de diversos metabolitos essenciais para a síntese de outras biomacromoléculas, que vão levar a uma paragem da proliferação celular e alterações nas proteínas, levando a morte celular ^{119,120,122}. A sensibilização verificada no nosso estudo deve-se, possivelmente, a estes mecanismos.

Capítulo 4:

Conclusão

O estudo apresentado nesta dissertação permitiu analisar a importância que a modulação do metabolismo celular alterado das células cancerígenas pode ter na potenciação da terapia fotodinâmica no tratamento do cancro. Para tal, foram realizadas combinações de terapia fotodinâmica, com o fotossensibilizador redaporfin, e diferentes inibidores da glicólise, a 2-deoxiglucose, o 3-bromopiruvato e a oxitiamina, para melhorar a eficácia e seletividade desta terapia. Numa primeira fase, foi avaliada a fototoxicidade e o IC50 da redaporfin na linha celular CT26 e NIH/3T3, obtendo-se valores de 175 nM e 100 nM, respetivamente. A pequena diferença entre o valor de IC50 para a linha celular CT26 e NIH/3T3 pode dever-se ao facto de as condições experimentais não simularem o microambiente tumoral e também por se utilizar um modelo não tumoral com linhas imortalizadas, com características diferentes das células normais.

O passo seguinte do estudo foi avaliar a citotoxicidade dos diferentes inibidores da glicólise para que se utilizem concentrações não tóxicas nos estudos de combinação. Os valores não tóxicos obtidos para a 2DG foram iguais ou inferiores a 500 μ M, para o 3BP foram iguais ou inferiores a 10 μ M e para a OXY não se encontrou toxicidade até 3 mM, que foi o valor máximo testado. No caso da OXY, foram escolhidas estas concentrações porque, apesar de não se encontrar uma dose tóxica de inibidor, utilizar doses mais elevadas diminuiria a relevância da combinação a nível clínico.

A combinação entre a PDT-redaporfin e a 2DG mostra uma melhoria da eficácia do tratamento dependente da dose para as diferentes condições utilizadas. No caso da incubação de 2DG durante 24 h antes irradiação da redaporfin, como para a incubação de 2DG 24 h antes e 24 h após a irradiação, temos resultados estatisticamente significativos, tanto na linha celular CT26 como na NIH/3T3, indicando uma melhoria da eficácia para a combinação entre PDT-redaporfin e uma concentração de 2DG de 500 μ M. Este aumento de eficácia pode dever-se a uma sensibilização das células por mecanismos de diminuição de ATP, alterações nos níveis de proteínas apoptóticas, aumento dos níveis de ROS ou stress do retículo endoplasmático. Neste estudo não foi encontrada uma maior seletividade para as células tumorais em comparação com o modelo não tumoral, ainda assim, esta observação pode estar relacionada com as diferenças entre as células que se encontram *in vivo* e não se conseguem mimetizar *in vitro*.

A combinação de PDT-redaporfin com o inibidor oxitiamina também foi avaliada. Este inibidor atua noutra via metabólica das células, a via da pentose fosfato, inibindo a enzima transquetolase, levando a uma diminuição da síntese de moléculas essenciais às células, mas também alterando diversos níveis de proteínas associadas a processos de sinalização e morte celular. No caso da incubação com OXY durante 24 h antes da irradiação, a combinação entre PDT-redaporfin e OXY 3 mM leva a uma melhoria da eficácia do tratamento nas CT26. As células não tumorais não parecem ter melhorias no tratamento com PDT-redaporfin e OXY, por isso, a combinação referida pode ser útil a nível terapêutico, podendo aumentar a seletividade do tratamento

O 3BP tem vários alvos, nomeadamente a inibição da hexocinase, que afeta a glicólise e a apoptose, da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, da fosfoglicerato cinase e da piruvato cinase, levando a uma diminuição dos níveis de ATP. Este inibidor pode entrar na célula por transportadores MCTs, que estão sobre expressos em células tumorais, permitindo uma maior seletividade do tratamento. Pode também provocar alterações na fosforilação oxidativa na mitocôndria, levando a uma depleção do ATP, ou aumentar os níveis de ROS e o stress no retículo endoplasmático. A combinação entre PDT-redaporfin e uma dose de 10 μ M de 3BP, com incubação do inibidor 48h antes da irradiação, mostrou ser a mais promissora, uma vez que tem uma melhoria significativa da terapia e, para além disso, há ainda seletividade para células tumorais, uma vez que não se verificam alterações significativas para as células não tumorais. Assim, esta combinação torna-se muito interessante a nível terapêutico, podendo aumentar a eficácia e seletividade do tratamento.

Concluindo, a combinação mais promissora com a PDT-redaporfin é com uma dose de 10 μ M de 3BP, uma vez que há uma diferença marcada na eficácia e é também seletivo para as células tumorais, sendo que será a combinação escolhida para os estudos que se seguirão.

1.1. Perspetivas Futuras:

As perspetivas futuras deste trabalho passam por realizar estudos que permitam avaliar os diversos parâmetros que estão envolvidos na inibição da glicólise e suas consequências, nomeadamente os níveis de ATP, ROS ou proteínas relacionadas com a apoptose.

O conceito de índice de combinação foi estudado por Chou e Talalay, e consiste na utilização de uma fórmula matemática que, através de diversos parâmetros sobre os fármacos utilizados na combinação, permite avaliar se estamos na presença de um sinergismo ou apenas de uma adição. Durante este estudo não foram avaliados todos os parâmetros necessários para o cálculo deste índice pois o objetivo principal era encontrar uma combinação promissora. Agora que foi encontrada uma boa combinação entre PDT-redaporfin e 3BP, é necessário obter os parâmetros em falta para esta combinação de forma a demonstrar se a combinação se trata de um sinergismo ou de uma adição.

Para além disso, é necessário avaliar as combinações mais promissoras *in vivo*, permitindo analisar com maior pormenor a seletividade para as células tumorais no microambiente do tumor, potenciando ainda mais a terapia fotodinâmica. Neste trabalho, a combinação mais promissora mostrou ser entre PDT-redaporfin e 3BP, por isso, no trabalho futuro, poderá realizar-se um estudo com murinhos imunocompetentes com inoculação de tumores de CT26 e um escalonamento da dose de 3BP, para analisar as melhorias na terapia fotodinâmica.

Capítulo 5:

Bibliografía

- (1) *Am. Cancer Soc.* **2017**.
- (2) Stewart, B. W.; Wild, C. P. *Int. Agency Res. Cancer* **2014**.
- (3) Torre, L.; Siegel, R.; Jemal, A. *Am. Cancer Soc.* **2015**.
- (4) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- (5) Luo, J.; Solimini, N. L.; Elledge, S. J. *Cell* **2009**, *136*, 823–837.
- (6) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- (7) Witsch, E.; Sela, M.; Yarden, Y. *Physiology* **2010**, *25*, 85–101.
- (8) Cheng, N.; Chytil, A.; Shyr, Y.; Joly, A.; Moses, H. L. *Mol Cancer Res* **2008**, *6*, 1521–1534.
- (9) Bhowmick, N. A.; Neilson, E. G.; Moses, H. L. *Nature* **2004**, *432*, 332–337.
- (10) Amit, I.; Citri, A.; Shay, T.; Lu, Y.; Katz, M.; Zhang, F.; Tarcic, G.; Siwak, D.; Lahad, J.; Jacob-Hirsch, J.; Amariglio, N.; Vaisman, N.; Segal, E.; Rechavi, G.; Alon, U.; Mills, G. B.; Domany, E.; Yarden, Y. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 503–512.
- (11) Sherr, C. J.; McCormick, F. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 103–112.
- (12) Burkhardt, D. L.; Sage, J. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 671–682.
- (13) Plati, J.; Bucur, O.; Khosravi-Far, R. *Integr. Biol.* **2011**, *3*, 279–296.
- (14) Adams, J. M.; Cory, S. *Oncogene* **2007**, *26*, 1324–1337.
- (15) Blasco, M. A. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 611–622.

- (16) Passos, J. F.; Saretzki, G.; Zglinicki, T. von. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7505–7513.
- (17) Artandi, S. E.; DePinho, R. A. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 9–18.
- (18) Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* **1996**, *86*, 353–364.
- (19) Baeriswyl, V.; Christofori, G. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 329–337.
- (20) Raica, M.; Cimpan, A. M.; Ribatti, D. *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 1924–1934.
- (21) Baluk, P.; Hashizume, H.; McDonald, D. M. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 102–111.
- (22) Nagy, J. A.; Chang, S.-H.; Shih, S.-C.; Dvorak, A. M.; Dvorak, H. F. *Semin Thromb Hemost* **2010**, *36*, 321–331.
- (23) Cavallaro, U.; Christofori, G. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 118–132.
- (24) Berx, G.; Roy, F. van. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2009**, *1*, 1–27.
- (25) Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 220–228.
- (26) Salk, J. J.; Fox, E. J.; Loeb, L. A. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2010**, *5*, 51–75.
- (27) Kastan, M. B. *Mol Cancer Res* **2008**, *6*, 517–525.
- (28) Liu, D. P.; Song, H.; Xu, Y. *Oncogene* **2010**, *29*, 949–956.
- (29) DeNardo, D. G.; Andreu, P.; Coussens, L. M. *Cancer Metastasis Rev* **2010**, *29*, 309–316.
- (30) Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. *Cell* **2010**, *140*, 883–899.
- (31) Colotta, F.; Allavena, P.; Sica, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1073–1081.
- (32) Warburg, O. *Science (80-)*. **1956**, *123*, 309–314.
- (33) House, S. W.; Warburg, O.; Burk, D.; Schade, A. L. *Science (80-)*. **1956**, *124*, 267–272.
- (34) Jones, R. G.; Thompson, C. B. *Genes and Development* **2009**, *23*, 537–548.
- (35) DeBerardinis, R. J.; Lum, J. J.; Hatzivassiliou, G.; Thompson, C. B. *Cell Metab.* **2008**, *7*, 11–20.
- (36) Heiden, M. G. Vander; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. *Science (80-)*. **2009**, *324*, 1029–1033.
- (37) Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K. *Immunology* **2007**, *121*, 1–14.
- (38) Teng, M. W. L.; Swann, J. B.; Koebel, C. M.; Schreiber, R. D.; Smyth, M. J. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *84*, 988–993.
- (39) Sudhakar, A. *J Cancer Sci Ther.* **2009**, *1*, 1–4.
- (40) Connell, P. P.; Hellman, S. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 383–392.
- (41) Chabner, B. A.; Roberts Jr, T. G. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65–72.
- (42) Fridman, W. H.; Zitvogel, L.; Sautès-Fridman, C.; Kroemer, G. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, 1–18.

- (43) Padma, V. V. *BioMedicine* **2015**, *5*, 1–6.
- (44) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. a; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowiz, D.; Piette, J.; Willson, B. C.; Golab, J. *Am. Cancer Soc.* **2011**, 250–281.
- (45) Maisch, T.; Baier, J.; Franz, B.; Maier, M.; Landthaler, M.; Szeimies, R.-M.; Bäumlner, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7223–7228.
- (46) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1765–1780.
- (47) Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24*, 259–268.
- (48) Santosa, V.; Limantara, L. *Indo. J. Chem.* **2008**, *8*, 279–291.
- (49) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279–293.
- (50) Prasad, P. N. *Introduction to biophotonics*; 2003.
- (51) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; WILEY-VCH, 2001.
- (52) Ochsner, M. J. *Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**, *39*, 1–18.
- (53) Juarranz, Á.; Jaén, P.; Sanz-Rodríguez, F.; Cuevas, J.; González, S. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 148–154.
- (54) Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 3347–3364.
- (55) Foot, C. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 659.
- (56) Bergamini, C. M.; Gambetti, S.; Dondi, A.; Cervellati, C. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1611–1626.
- (57) Silva, E. F. F.; Serpa, C.; Dąbrowski, J. M.; Monteiro, C. J. P.; Formosinho, S. J.; Stochel, G.; Urbanska, K.; Simões, S.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (30), 9273–9286.
- (58) Kanofsky, J. R. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 14–17.
- (59) Rocha, L. B.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Almeida, L.; Simões, S. In *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados*; 2015; pp 637–674.
- (60) Triesscheijn, M.; Baas, P.; Schellens, J. H. M.; Stewart, F. *Oncologist* **2006**, *11*, 1034–1044.
- (61) Allison, R. R.; Sibata, C. H. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, *7*, 61–75.
- (62) Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M. A. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 1–13.
- (63) Allison, R. R. *Futur. Oncol.* **2014**, *10*, 123–142.
- (64) Ashur, I.; Goldschmidt, R.; Pinkas, I.; Salomon, Y.; Szweczyk, G.; Sarna, T.; Scherz, A. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 8027–8037.
- (65) Saavedra, R.; Rocha, L. B.; Dabrowski, J. M.; Arnaut, L. G. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 390–398.

- (66) Oliveira, J.; Monteiro, E.; Santos, J.; Silva, J. D.; Almeida, L.; Santos, L. L. In *ASCO Annual Meeting*; 2017.
- (67) Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1543–1560.
- (68) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Urbańska, K.; Simões, S.; Stochel, G.; Cortes, L. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 1188–1200.
- (69) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2*, 91–106.
- (70) Korbelik, M.; Krosł, G. *Br. J. Cancer* **1994**, *70*, 604–610.
- (71) Foster, T. H.; Murant, R. S.; Bryant, R. G.; Knox, R. S.; Gibson, S. L.; Hilf, R. *Radiat. Res.* **1991**, *126*, 296–303.
- (72) Yoo, J.-O.; Ha, K.-S. *New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2012; Vol. 295.
- (73) Abels, C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 765–771.
- (74) Mellish, K. J.; Brown, S. B. *Expert Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 351–361.
- (75) Gollnick, S. O.; Evans, S. S.; Baumann, H.; Owczarczak, B.; Maier, P.; Vaughan, L.; Wang, W. C.; Unger, E.; Henderson, B. W. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 1772–1779.
- (76) Henderson, B. W.; Busch, T. M.; Snyder, J. W. *Lasers Surg. Med.* **2006**, *38*, 489–493.
- (77) Gollnick, S. O.; Vaughan, L.; Henderson, B. W. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1604–1608.
- (78) Garg, A. D.; Nowis, D.; Golab, J.; Agostinis, P. *Apoptosis* **2010**, *15*, 1050–1071.
- (79) de Visser, K. E.; Eichten, A.; Coussens, L. M. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 24–37.
- (80) Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I. *Lancet Oncol.* **2004**, *5*, 497–508.
- (81) Postiglione, I.; Chiaviello, A.; Palumbo, G. *Cancers (Basel)*. **2011**, *3*, 2597–2629.
- (82) Krosł, G.; Korbelik, M. *Cancer Lett.* **1994**, *84*, 43–49.
- (83) St Denis, T. G.; Aziz, K.; Waheed, A. A.; Huang, Y.-Y.; Sharma, S. K.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 792–801.
- (84) Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 535–545.
- (85) Mazor, O.; Brandis, A.; Plaks, V.; Neumark, E.; Rosenbach-Belkin, V.; Salomon, Y.; Scherz, A. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 342–351.
- (86) Weersink, R. A.; Forbes, J.; Bisland, S.; Trachtenberg, J.; Elhilali, M.; Brun, P. H.; Wilson, B. C. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 106–113.
- (87) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger - Principles of Biochemistry*, 5th Editio.; W. H. Freeman and Company, 2008; Vol. 17.
- (88) Li, X.-B.; Gu, J.-D.; Zhou, Q.-H. *Thorac. cancer* **2015**, *6*, 17–24.
- (89) Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 891–899.
- (90) Racker, E. *Mol. Cell. Biochem.* **1974**, *5*, 17–23.

- (91) Nakashima, R. A.; Paggi, M. G.; Pedersen, P. L. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 5702–5706.
- (92) Chen, Z.; Lu, W.; Garcia-Prieto, C.; Huang, P. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*, 267–274.
- (93) Weber, W. A.; Avril, N.; Schwaiger, M. *Strahlenther Onkol* **1999**, *175*, 356–373.
- (94) Burt, B. M.; Humm, J. L.; Kooby, D. A.; Squire, O. D.; Mastorides, S.; Larson, S. M.; Fong, Y. *Neoplasia* **2001**, *3*, 189–195.
- (95) Schornack, P. A.; Gillies, R. J. *Neoplasia* **2003**, *5*, 135–145.
- (96) Kim, J.-W.; Dang, C. V. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8927–8930.
- (97) Hatzivassiliou, G.; Zhao, F.; Bauer, D. E.; Andreadis, C.; Shaw, A. N.; Dhanak, D.; Hingorani, S. R.; Tuveson, D. A.; Thompson, C. B. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 311–321.
- (98) Xu, R.; Pelicano, H.; Zhou, Y.; Carew, J. S.; Feng, L.; Bhalla, K. N.; Keating, M. J.; Huang, P. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 613–621.
- (99) Patra, K. C.; Hay, N. *Trends Biochem Sci* **2014**, *39*, 347–354.
- (100) Jiang, P.; Du, W.; Wu, M. *Protein Cell* **2014**, *5*, 592–602.
- (101) Stanton, R. C. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 362–369.
- (102) Pelicano, H.; Martin, D. S.; Xu, R.-H.; Huang, P. *Oncogene* **2006**, *25*, 4633–4646.
- (103) Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 219–234.
- (104) Rodríguez, A.; De La Cera, T.; Herrero, P.; Moreno, F. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 625–631.
- (105) Majewski, N.; Nogueira, V.; Robey, R. B.; Hay, N. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 730–740.
- (106) Coy, J. F.; Dressler, D.; Wilde, J.; Schubert, P. *Clin. Lab.* **2005**, *51*, 257–273.
- (107) Porporato, P. E.; Dhup, S.; Dadhich, R. K.; Copetti, T.; Sonveaux, P. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 1–18.
- (108) Maher, J. C.; Krishan, A.; Lampidis, T. J. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *53*, 116–122.
- (109) Liu, H.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Lampidis, T. J. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 1745–1751.
- (110) Kang, H. T.; Hwang, E. S. *Life Sci.* **2006**, *78*, 1392–1399.
- (111) Lynch, R. M.; Fogarty, K. E.; Fay, F. S. *J. Cell Biol.* **1991**, *112*, 385–395.
- (112) Maschek, G.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Braunschweiger, P.; Hamilton, K.; Tidmarsh, G. F.; De Young, L. R.; Lampidis, T. J. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 31–34.
- (113) Singh, D.; Banerji, A. K.; Dwarakanath, B. S.; Tripathi, R. P.; Gupta, J. P.; Mathew, T. L.; Ravindranath, T.; Jain, V. *Strahlentherapie und Onkol.* **2005**, *8*, 507–514.
- (114) Geschwind, J.-F.; Georgiades, C. S.; Ko, Y. H.; Pedersen, P. L. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2004**, *4*, 449–457.
- (115) Ko, Y. H.; Pedersen, P. L.; Geschwind, J. F. *Cancer Lett.* **2001**, *173*, 83–91.
- (116) Geschwind, J.-F. H.; Ko, Y. H.; Torbenson, M. S.; Magee, C.; Pedersen, P. L. *Cancer Res.*

2002, 62, 3909–3913.

- (117) Xu, R.-H.; Pelicano, H.; Zhang, H.; Giles, F. J.; Keating, M. J.; Huang, P. *Leukemia* **2005**, *19*, 2153–2158.
- (118) Comín-Anduix, B.; Boren, J.; Martinez, S.; Moro, C.; Centelles, J. J.; Trebukhina, R.; Petushok, N.; Lee, W.-N.; Boros, L. G.; Cascante, M. *Eur. J. Biochem* **2001**, *268*, 4177–4182.
- (119) Raïs, B.; Comin, B.; Puigjaner, J.; Brandes, J. L.; Creppy, E.; Saboureau, D.; Ennamany, R.; Paul Lee, W.-N.; Boros, L. G.; Cascante, M. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 113–118.
- (120) Boros, L. G.; Puigjaner, J.; Cascante, M.; Lee, W. N. P.; Brandes, J. L.; Bassilian, S.; Yusuf, F. I.; Williams, R. D.; Muscarella, P.; Melvin, W. S.; Schirmer, W. J. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4242–4248.
- (121) Yang, C. M.; Liu, Y. Z.; Liao, J. W.; Hu, M. L. *Clin. Exp. Metastasis* **2010**, *27*, 341–349.
- (122) Wang, J.; Zhang, X.; Ma, D.; Lee, W.-N. P.; Xiao, J.; Zhao, Y.; Go, V. L.; Wang, Q.; Yen, Y.; Recker, R.; Xiao, G. G. *Exp. Hematol. Oncol.* **2013**, *2*, 1–14.
- (123) Enns, L.; Ladiges, W. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**, *44*, 635–638.
- (124) Kroemer, G.; Pouyssegur, J. *Cancer Cell* **2008**, *13* (6), 472–482.
- (125) Chen, E. I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**, *44*, 619–622.
- (126) Coleman, M. C.; Asbury, C. R.; Daniels, D.; Du, J.; Aykin-Burns, N.; Smith, B. J.; Li, L.; Spitz, D. R.; Cullen, J. J. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 322–331.
- (127) Hernlund, E.; Ihlund, L. S.; Khan, O.; Ates, Y. O.; Linder, S.; Panaretakis, T.; Shoshan, M. C. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 476–483.
- (128) Calviño, E.; Estañ, M. C.; Simón, G. P.; Sancho, P.; Boyano-Adánez, M. D. C.; De Blas, E.; Bréard, J.; Aller, P. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1619–1629.
- (129) Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 579–591.
- (130) Aykin-Burns, N.; Ahmad, I. M.; Zhu, Y.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37.
- (131) Kim, J. S.; Ahn, K. J.; Kim, J. A.; Kim, H. M.; Lee, J. D.; Lee, J. M.; Kim, S. J.; Park, J. H. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2008**, *40*, 607–618.
- (132) Dwarakanath, B. S. *J. Cancer Res. Ther.* **2009**, *5*, 27–31.
- (133) Qie, S.; Liang, D.; Yin, C.; Gu, W.; Meng, M.; Wang, C.; Sang, N. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3679–3690.
- (134) Zagorodna, O.; Martin, S. M.; Rutkowski, D. T.; Kuwana, T.; Spitz, D. R.; Knudson, C. M. *Oncogene* **2012**, *31*, 2738–2749.
- (135) Zuluaga, M.-F.; Lange, N. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1655–1673.
- (136) Anand, S.; Ortel, B. J.; Pereira, S. P.; Hasan, T.; Maytin, E. V. *Cancer Lett.* **2012**, *326*, 8–16.
- (137) Diez, B.; Ernst, G.; Teijo, M. J.; Battlle, A.; Hajos, S.; Fukuda, H. *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 1179–1184.
- (138) Golding, J. P.; Wardhaugh, T.; Patrick, L.; Turner, M.; Phillips, J. B.; Bruce, J. I.; Kimani, S.

- G. *Br. J. Cancer* **2013**, *109*, 976–982.
- (139) Kirveliėne, V.; Sadauskaite, A.; Kadziauskas, J.; Sasnauskiene, S.; Juodka, B. *FEBS Lett.* **2003**, *553*, 167–172.
- (140) Feng, X.; Zhang, Y.; Wang, P.; Liu, Q.; Wang, X. *Photochem Photobiol Sci* **2014**, *13*, 1793–1803.
- (141) Feng, X.; Wang, P.; Liu, Q.; Zhang, T.; Mai, B.; Wang, X. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2015**, *47*, 189–197.
- (142) Shevchuk, I.; Chekulayev, V.; Moan, J.; Berg, K. *Int. J. Cancer* **1996**, *67*, 791–799.
- (143) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. In *Assay Guidance Manual*; 2013; pp 1–31.
- (144) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer+&term=%222-deoxyglucose%22&cntry1=&state1=&Search=Search>.
- (145) Ko, Y. H.; Verhoeven, H. A.; Lee, M. J.; Corbin, D. J.; Vogl, T. J.; Pedersen, P. L. *J Bioenerg Biomembr* **2012**, *44*, 163–170.
- (146) El Sayed, S. M.; Mohamed, W. G.; Seddik, M.-A. H.; Ahmed, A.-S. A.; Mahmoud, A. G.; Amer, W. H.; Nabo, M. M. H.; Hamed, A. R.; Ahmed, N. S.; Abd-Allah, A. A.-R. *Chinese J. Cancer Case* **2014**, *33*, 356–364.
- (147) Ihrlund, L. S.; Hernlund, E.; Khan, O.; Shoshan, M. C. *Mol. Oncol.* **2008**, *2*, 94–101.
- (148) Galina, A. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *54*, 266–271.
- (149) Azevedo-Silva, J.; Queirós, O.; Baltazar, F.; Ułaszewski, S.; Goffeau, A.; Ko, Y. H.; Pedersen, P. L.; Preto, A.; Casal, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2016**, *48*, 349–362.
- (150) Parks, S. K.; Chiche, J.; Pouysségur, J. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 611–623.
- (151) Ko, Y. H.; Smith, B. L.; Wang, Y.; Pomper, M. G.; Rini, D. A.; Torbenson, M. S.; Hullihen, J.; Pedersen, P. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *324*, 269–275.
- (152) Pedersen, P. L. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*, 211–222.
- (153) Chen, Z.; Zhang, H.; Lu, W.; Huang, P. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1787*, 553–560.
- (154) Ganapathy-Kanniappan, S.; Kunjithapatham, R.; Geschwind, J. F. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 13–20.
- (155) Pereira Da Silva, A. P.; El-Bacha, T.; Kyaw, N.; Dos Santos, R. S.; Da-Silva, W. S.; Almeida, F. C. L.; Da Poian, A. T.; Galina, A. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 717–726.
- (156) Pinheiro, C.; Longatto-Filho, A.; Azevedo-Silva, J.; Casal, M.; Schmitt, F. C.; Baltazar, F. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**, *44*, 127–139.
- (157) Macchioni, L.; Davidescu, M.; Roberti, R.; Corazzi, L. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2014**, *46*, 389–394.
- (158) Ganapathy-Kanniappan, S.; Geschwind, J. F. H.; Kunjithapatham, R.; Buijs, M.; Syed, L. H.; Rao, P. P.; Ota, S.; Kwak, B. K.; Loffroy, R.; Vali, M. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 923–936.
- (159) Calvino, E.; Estan, M. C.; Sanchez-Martin, C.; Brea, R.; de Blas, E.; Boyano-Adanez, M. d. C.; Rial, E.; Aller, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, *348*, 324–335.

- (160) Birsoy, K.; Wang, T.; Possemato, R.; Yilmaz, O. H.; Koch, C. E.; Chen, W. W.; Hutchins, A. W.; Gultekin, Y.; Peterson, T. R.; Carette, J. E.; Brummelkamp, T. R.; Clish, C. B.; Sabatini, D. M. *Nat. Genet.* **2012**, *45*, 104–108.
- (161) Azevedo-Silva, J.; Queirós, O.; Ribeiro, A.; Baltazar, F.; Young, K. H.; Pedersen, P. L.; Preto, A.; Casal, M. *Biochem. J.* **2015**, *467*, 247–258.
- (162) Levine, B.; Klionsky, D. J. *Dev. Cell* **2004**, *6*, 463–477.
- (163) Kardosh, A.; Golden, E. B.; Pyrko, P.; Uddin, J.; Hofman, F. M.; Chen, T. C.; Louie, S. G.; Petasis, N. A.; Schönthal, A. H. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 843–851.

Material Suplementar

Redaporfin

Tabela 1: Média e erro padrão da média para os valores de citotoxicidade da redaporfin para cada linha celular.

Concentração RP (nM)	3T3 – PDT Citotoxicidade		CT26 – PDT Citotoxicidade	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
25	100,4	4,844	99,20	1,960
50	109,1	2,192	97,88	1,046
75	100,9	6,429	95,45	2,260
100	100,8	7,750	96,06	1,715
150	103,4	7,197	97,51	1,247
200	95,54	11,11	86,68	8,136
250	95,61	6,587	96,95	0,824
300	97,81	6,152	100,6	1,855
400	96,19	6,321	98,93	3,019

Tabela 2: Média e erro padrão da média para os valores de fototoxicidade da redaporfin para cada linha celular.

Concentração (nM)	3T3 – PDT Fototoxicidade		CT26 – PDT Fototoxicidade	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
25	89,15	4,019	94,66	2,126
50	74,89	4,700	88,08	4,229
75	52,58	7,193	89,00	4,947
100	31,82	3,382	77,90	5,449
150	14,99	0,314	64,34	9,639
200	3,140	0,805	29,38	8,764
250	2,261	0,317	30,52	7,759
300	1,455	0,398	26,52	8,701
400	1,069	0,245	13,61	4,774

2-Deoxiglucose

Tabela 3: Média e erro padrão da média para os valores de citotoxicidade do inibidor 2DG com incubação de 24 h para cada linha celular.

Concentração 2DG (mM)	3T3 – 2DG 24 h		CT26 – 2DG 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
0,1	97,89	2,015	94,38	2,683
0,2	95,83	2,591	92,38	1,574
0,5	84,01	4,702	80,92	1,457
1	75,26	2,240	73,49	6,767
2	70,32	5,764	68,75	4,875
3	64,78	6,361	59,57	5,584
4	61,03	6,364	53,68	4,312

Tabela 4: Média e erro padrão da média para os valores de citotoxicidade do inibidor 2DG com incubação de 48 h para cada linha celular.

Concentração 2DG (mM)	3T3 – 2DG 48 h		CT26 – 2DG 48 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
0,1	96,16	7,981	95,02	1,498
0,2	97,97	8,422	92,25	1,384
0,5	82,17	5,937	84,17	5,105
1	63,10	3,620	70,84	6,044
2	35,33	3,275	64,77	2,327
3	27,92	3,349	53,58	1,493
4	23,71	3,363	44,98	0,599

Tabela 5: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e 2DG com incubação de 24 h antes da irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – 2DG COMB 24 h		CT26 – 2DG COMB 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
2DG (100 µM)	106,0	1,968	97,31	2,977
2DG (200 µM)	103,0	4,981	96,06	1,365
2DG (500 µM)	103,9	5,600	96,41	2,654
RP	27,18	1,576	60,68	3,531
RP + 100 µM	24,65	1,586	55,06	2,116
RP + 200 µM	22,60	1,291	53,60	3,006
RP + 500 µM	18,47	2,116	47,33	3,582

Tabela 6: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e 2DG com incubação de 24 h antes da irradiação e 24 h após a irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – 2DG COMB 24 h + 24 h		CT26 – 2DG COMB 24 h + 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
2DG (100 µM)	106,3	4,029	102,4	3,285
2DG (200 µM)	108,0	2,122	105,4	3,930
2DG (500 µM)	107,2	6,113	105,2	4,097
RP	36,74	2,586	64,19	4,952
RP + 100 µM	30,16	2,584	59,82	3,964
RP + 200 µM	27,36	1,098	57,28	3,571
RP + 500 µM	22,68	0,670	48,08	1,993

Tabela 7: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e 2DG com incubação de 48 h antes da irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – 2DG COMB 48 h		CT26 – 2DG COMB 48 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
2DG (100 µM)	93,40	3,666	96,59	1,575
2DG (200 µM)	94,08	3,374	93,39	1,591
2DG (500 µM)	91,28	5,271	88,98	1,610
RP	36,15	12,39	48,81	6,077
RP + 100 µM	34,63	12,27	40,22	6,670
RP + 200 µM	34,27	10,75	41,16	4,327
RP + 500 µM	26,57	9,910	38,49	3,307

3-Bromopiruvato

Tabela 8: Média e erro padrão da média para os valores de citotoxicidade do inibidor 3BP com incubação de 24 h para cada linha celular.

Concentração 3BP (μM)	3T3 – 3BP 24 h		CT26 – 3BP 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
2,5	100,4	2,034	99,20	1,582
5	102,0	1,689	100,2	1,157
10	105,4	1,378	95,74	2,213
15	101,9	3,561	84,99	4,380
20	106,0	2,343	78,86	5,742
25	102,1	2,441	74,67	6,064
35	91,06	1,968	65,24	3,170
40	90,56	3,869	61,68	8,782
50	79,54	4,202	55,74	3,759

Tabela 9: Média e erro padrão da média para os valores de citotoxicidade do inibidor 3BP com incubação de 48 h para cada linha celular.

Concentração 3BP (μM)	3T3 – 3BP 48 h		CT26 – 3BP 48 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
2,5	100,6	2,975	97,98	5,879
5	107,5	5,015	99,02	4,892
10	104,4	2,658	96,96	1,443
15	99,36	4,206	84,40	2,422
20	103,2	2,615	75,37	9,256
25	93,21	6,088	64,34	7,724
35	80,04	7,925	50,65	6,077
40	78,26	25,40	37,98	10,59
50	58,79	27,46	25,07	0,422

Tabela 10: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e 3BP com incubação de 24 h antes da irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – 3BP COMB 24 h		CT26 – 3BP COMB 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
3BP (2,5 µM)	104,3	1,261	97,71	1,616
3BP (5 µM)	106,0	1,716	100,5	2,101
3BP (10 µM)	107,2	2,565	97,38	5,501
RP	22,74	9,742	46,59	9,762
RP + 2,5 µM	15,62	6,539	46,83	9,603
RP + 5 µM	20,72	7,509	47,19	9,877
RP + 10 µM	15,81	5,907	44,22	7,663

Tabela 11: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e 3BP com incubação de 24 h antes da irradiação e 24 h após a irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – 3BP COMB 24 h + 24 h		CT26 – 3BP COMB 24 h + 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
3BP (2,5 µM)	97,37	1,693	97,71	1,616
3BP (5 µM)	100,8	1,512	100,5	2,101
3BP (10 µM)	104,8	0,3796	97,38	5,501
RP	39,04	9,777	46,59	9,762
RP + 2,5 µM	38,78	12,92	46,83	9,603
RP + 5 µM	40,66	9,366	47,19	9,877
RP + 10 µM	39,26	14,14	44,22	7,663

Tabela 12: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e 2DG com incubação de 48 h antes da irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – COMB 48 h		CT26 – COMB 48 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
3BP (2,5 µM)	86,36	2,408	98,26	1,451
3BP (5 µM)	82,62	2,619	96,21	3,606
3BP (10 µM)	88,31	3,623	98,30	4,677
RP	18,61	5,138	66,56	5,467
RP + 2,5 µM	17,26	8,007	49,17	6,256
RP + 5 µM	15,88	6,775	49,60	7,375
RP + 10 µM	14,44	6,373	46,64	4,078

Oxitiamina

Tabela 13: Média e erro padrão da média para os valores de citotoxicidade do inibidor OXY com incubação de 24 h para cada linha celular.

Concentração OXY (mM)	3T3 – OXY 24 h		CT26 – OXY 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
1	104,4	3,670	101,7	1,577
2	101,7	2,683	99,15	2,044
3	100,6	4,287	100,2	0,456
4	100,1	4,884	104,8	3,125
5	100,5	4,967	101,6	1,493
6	94,65	3,063	99,84	2,077

Tabela 14: Média e erro padrão da média para os valores de citotoxicidade do inibidor OXY com incubação de 48 h para cada linha celular.

Concentração OXY (mM)	3T3 – OXY 48 h		CT26 – OXY 48 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
1	108,7	3,964	96,51	1,687
2	106,4	2,282	91,72	2,698
3	108,3	4,059	88,96	0,838
4	103,2	2,433	91,23	3,471
5	106,4	1,489	91,02	1,145
6	93,07	7,491	88,77	3,411

Tabela 15: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e OXY com incubação de 24 h antes da irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – COMB 24 h		CT26 – COMB 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
OXY (1 mM)	99,06	1,221	98,52	0,721
OXY (2 mM)	103,3	1,594	98,48	0,869
OXY (3 mM)	108,4	5,107	100,6	2,036
RP	33,54	10,33	65,13	4,604
RP + 1 mM	30,58	5,479	56,31	4,568
RP + 2 mM	26,04	5,535	54,72	4,096
RP + 3 mM	22,03	4,689	50,05	1,768

Tabela 16: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e OXY com incubação de 24 h antes da irradiação e 24 h após a irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – COMB 24 h + 24 h		CT26 – COMB 24 h + 24 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
OXY (1 mM)	101,2	1,150	93,90	2,302
OXY (2 mM)	103,4	3,193	98,73	4,200
OXY (3 mM)	105,0	5,117	95,85	1,256
RP	41,33	12,64	62,55	3,947
RP + 1 mM	38,24	9,842	60,58	3,430
RP + 2 mM	35,38	12,22	54,36	3,309
RP + 3 mM	29,41	12,59	53,74	3,780

Tabela 17: Média e erro padrão da média para os valores da combinação entre PDT-redaporfin e 2DG com incubação de 48 h antes da irradiação para cada linha celular.

Concentração	3T3 – COMB 48 h		CT26 – COMB 48 h	
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média
OXY (1 mM)	90,86	9,000	102,7	5,051
OXY (2 mM)	88,62	7,145	100,6	5,965
OXY (3 mM)	88,94	14,46	104,0	4,881
RP	36,75	19,27	47,19	12,79
RP + 1 mM	35,96	21,97	46,62	10,01
RP + 2 mM	31,89	19,13	45,37	10,24
RP + 3 mM	28,58	16,98	44,66	10,01