



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Determinação do perfil farmacocinético do F₂BMet.
Avaliação da fotossensibilidade cutânea gerada pelo
F₂BMet.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Luís Arnaut (FCTUC, Luzitin, SA) e do Professor Doutor Sérgio Simões (FFUC)

Raquel Saavedra Dias

Setembro 2012



O presente trabalho descrito nesta Tese foi realizado no Departamento de Química, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Luís Arnaut, por me ter recebido no seu grupo, ainda antes de eu ter o intuito de realizar lá a minha tese. Agradeço por todas as diversas experiências que este de estágio me proporcionou, pelos horizontes que me abriu, pela possibilidade de poder trabalhar nesta área tão promissora e relativamente desconhecida para mim. Obrigada por toda a orientação prestada!

Ao Professor Sérgio Simões, quero agradecer por me ter mostrado esta oportunidade de trabalho e por toda a ajuda prestada.

Obviamente não posso deixar de agradecer às pessoas com quem trabalhei com mais proximidade: Luís Rocha, Janusz Dąbrowski e Fábio Schaberle. Obrigada por toda a partilha de conhecimentos e por todo o auxílio prestado. Agradeço também a todas as outras pessoas que de alguma forma estiveram relacionadas com o trabalho que realizei.

Quero agradecer aos meus pais, que me apoiam sempre mesmo tendo dúvidas das minhas decisões! Sem o esforço e apoio deles nunca seria possível ter chegado aqui.

Quero agradecer também ao António Bernardino, que me acompanhou e apoiou sempre. Obrigada por tudo, meu querido!

Agradeço à Helen pela ajuda que me deu e pela companhia em muitos momentos!

E para não correr o risco de me esquecer de alguém, obrigada a todos os que de alguma forma fizeram parte de mais esta etapa!

“20 years from now you will be more disappointed by the things that you didn’t do than by the ones you did do. So throw off the bowlines, sail away from the safe harbor, catch the trade winds in your sails.

EXPLORE, DREAM, DISCOVER.”

Mark Twain

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma terapia emergente não invasiva para o tratamento do cancro e de outras doenças não-neoplásicas, que envolve a administração de um agente fotossensibilizador seguida de irradiação num local específico, levando à produção de espécies reativas de oxigénio que irão conduzir à morte celular. Embora já existam diversos fotossensibilizadores bem sucedidos disponíveis no mercado, todos apresentam algumas limitações e, portanto, continua a existir espaço para o desenvolvimento de novos agentes fotossensibilizadores.

O nosso grupo desenvolveu uma nova classe de bacterioclorinas, que apresentam as características de um fotossensibilizador ideal. Um composto em particular, o F₂BMet, mostrou-se extremamente eficiente *in vitro* e já foi possível verificar a cura total e permanente de tumores CT26 implantados subcutaneamente no flanco de ratinhos BALB/c. Para uma compreensão mais detalhada do comportamento do fotossensibilizador no organismo realizaram-se ensaios de biodistribuição em ratinhos BALB/c.

A maior limitação associada à PDT registada até ao momento é a fotossensibilidade cutânea prolongada após o tratamento, que no caso do Photofrin[®] pode durar 4-6 semanas. Para avaliar a fotossensibilidade cutânea que o F₂BMet pode causar realizou-se um estudo em ratos Wistar. Os resultados obtidos, ainda que preliminares são bastante satisfatórios, principalmente quando comparados com os resultados obtidos num estudo similar efetuado com o Foscan[®], que mostram que a fotossensibilidade cutânea produzida pelo Foscan[®] uma semana após a sua administração é comparável com a reação obtida com a nossa bacterioclorina três dias depois da sua administração. Considerando que o uso do Foscan[®] requer proteção da luz solar e de luzes artificiais fortes durante 15 dias após a administração do fármaco, estimamos que com o F₂BMet este período possa ser reduzida para cerca de metade do tempo.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an emerging non invasive treatment for cancer and other non-malignant diseases, which involves the administration of a photosensitizing compound followed by light irradiation on a specific site, generating reactive oxygen species that will lead to cell death. Although there are already some well-succeeded photosensitizers in the market, they all show some limitations. So there is still space for the development of new photosensitizing agents.

Our group developed a new class of bacteriochlorin molecules, which present the ideal properties of a photosensitizer. A particular compound, F₂BMet, proved to be highly efficient *in vivo* and it was also possible to verify the complete and permanent cure of BALB/c mice with subcutaneously implanted CT26 colon tumors in a single PDT session. To achieve a better comprehension of this photosensitizer behavior in the organism, we performed some biodistribution tests using BALB/c mice.

The major problem associated to PDT identified until now is the prolonged skin photosensitivity that can last 4 to 6 weeks, just as it happens in the case of Photofrin[®]. To see the cutaneous photosensitivity that F₂BMet can produce, we realized a study using Wistar rats. Our preliminary results are quite satisfactory when comparing them with the results from a similar study performed with Foscan[®]. This latter study results showed that the level of skin photosensitivity produced by Foscan[®], one week after the administration, is comparable to the skin photosensitivity elicited by our bacteriochlorin 3 days after its administration. And considering that the use of Foscan[®] requires direct sunlight or bright indoor light protection for 15 days after injection, we estimate that with our bacteriochlorin this period can be reduced up to half of the time.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Cancro	1
1.1.1. Tratamento do Cancro	2
1.2. Terapia Fotodinâmica	2
1.2.1. Terapia Fotodinâmica <i>versus</i> Tratamentos Convencionais	4
1.3. Fotossensibilizadores	5
1.3.1. Bacterioclorinas	7
1.3.1.1. F ₂ BMet	8
1.4. Objectivos da tese	9
CAPÍTULO 2: METODOLOGIA	11
2.1. Determinação do perfil farmacocinético do F ₂ BMet em ratinhos BALB/c	11
2.2. Avaliação da fotossensibilidade cutânea do F ₂ BMet em ratos Wistar	14
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	17
3.1. Determinação do perfil farmacocinético do F ₂ BMet em ratinhos BALB/c	17
3.2. Avaliação da fotossensibilidade cutânea do F ₂ BMet em ratos Wistar	20
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO	25
4.1. Determinação do perfil farmacocinético do F ₂ BMet em ratinhos BALB/c	25
4.2. Avaliação da fotossensibilidade cutânea do F ₂ BMet em ratos Wistar	27
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama representativo do crescimento celular descontrolado que conduz à formação de um tumor (adaptado de CancerHelp UK, 2011)	1
Figura 2 – Conceito geral da terapia fotodinâmica	3
Figura 3 – Administração tópica ou sistémica de um fotossensibilizador, biodistribuição do composto pelo organismo e acumulação seletiva no tumor. Após o período de acumulação inicia-se a irradiação (adaptado de Agostinis <i>et al.</i> , 2011)	3
Figura 4 – Estrutura geral das porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas (Ethirajan <i>et al.</i> , 2011)	5
Figura 5 – Estrutura do F ₂ BMet	8
Figura 6 – Representação esquemática do dorso do animal com os locais e duração da irradiação devidamente assinalados (à esquerda). Demonstração real do processo de irradiação (à direita)	15
Figura 7 – Biodistribuição de F ₂ BMet em ratinhos com tumores CT26 implantados subcutaneamente no flanco direito. Os ratinhos foram eutanasiados em diferentes tempos após a administração i.v. de F ₂ BMet (1 mg/kg) e a quantidade deste nos respetivos tecidos foi determinada por fluorescência e apresentada em função da razão entre a fluorescência emitida e a massa da amostra. Os dados apresentados representam média ± desvio-padrão, n=4	18
Figura 8 – Razões tumor/pele e tumor/músculo, em determinados <i>timepoints</i> , após administração i.v. de 1 mg/kg de F ₂ BMet. Os dados apresentados representam média ± desvio-padrão, n=4	19
Figura 9 – Grupos de ratos Wistar foram expostos a 0 min, 5 min, 15 min e 30 min de ~100 mW/cm ² de luz proveniente de um simulador solar, em intervalos de 12 h, 24 h, 72 h e 168 h após a administração intravenosa de 1 mg/kg de F ₂ BMet. As observações foram efetuadas 24 h após a exposição e a classificação foi realizada de acordo com a escala visual previamente definida por Weersink <i>et al.</i> , 2005. Os resultados foram representados em diagramas de extremos e quartis nas figuras B, C e D	21

Figura 10 – Aspecto do dorso de ratos Wistar expostos a luz proveniente de um simulador solar (~100 mW/cm²), após administração i.v. de 1 mg/kg de F₂BMet. A: exposição 12 h após a administração do fotossensibilizador. B: exposição 24 h após a administração do fotossensibilizador. Os valores apresentados na figura correspondem à duração dos períodos de irradiação em cada um dos locais. Ambas as imagens reportam o aspecto do dorso dos animais 24 h após a exposição à luz 22

Figura 11 – Aspecto do dorso de ratos Wistar expostos a luz proveniente de um simulador solar (~100 mW/cm²), após administração i.v. de 1 mg/kg de F₂BMet. A: exposição 72 h após a administração do fotossensibilizador. B: exposição 168 h após a administração do fotossensibilizador. Os valores apresentados na figura correspondem à duração dos períodos de irradiação em cada um dos locais. A fotografia A reporta o aspecto do dorso do animal 72 h após a exposição à luz, enquanto que a fotografia B reporta o aspecto do dorso do animal logo após 24 h da exposição à luz 22

Figura 12 – Aspecto do dorso de ratos Wistar expostos a luz proveniente de um simulador solar (~100 mW/cm²), sem que lhes tenha sido administrado qualquer tipo de agente fotossensibilizador (grupo controlo). A fotografia reporta o aspecto do dorso 24 h após a sua exposição à luz 23

Figura 13 - Grupos de ratos Wistar foram expostos a 0 min, 5 min, 15 min e 30 min de ~100 mW/cm² de luz proveniente de um simulador solar, em intervalos de 12 h, 24 h, 72 h e 168 h após a administração intravenosa de 1 mg/kg de F₂BMet, e acompanhados durante 30 dias. As observações foram efetuadas periodicamente após a exposição e a classificação foi realizada de acordo com a escala visual previamente definida por Weersink *et al.*, 2005. Os resultados representam média±desvio-padrão 24

Figura 14 – Comparação dos resultados obtidos num ensaio de avaliação da fotossensibilidade cutânea por exposição de ratos Wistar a 0 min, 5 min, 15 min e 30 min de 100 mW/cm² de luz proveniente de um simulador solar, 96 h e 168 h após a administração de 0,3 mg/kg de Foscan® e 72 h e 168 h após a administração de 1 mg/kg de F₂BMet. Os resultados foram observados 24 h após a irradiação e representam a média das observações. Os resultados relativos ao Foscan® foram adaptados de Bovis *et al.*, 2012 29

Figura 15 – Comparação entre os resultados obtidos num ensaio de avaliação da fotossensibilidade cutânea em ratinhos DBA/2J administrados com 4 mg/kg de Photofrin® e ratos Wistar administrados com 1 mg/kg de F₂BMet, após exposição a 15 min de ~100mW/cm² de luz proveniente de um simulador solar, em vários DLIs. Os dados relativos ao Photofrin® foram adaptados de Richter *et al.*, 1991 30

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Escala para a classificação dos efeitos provenientes da exposição à luz solar (Weersink <i>et al.</i> , 2005)	15
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BRCA1	<i>Breast cancer susceptibility gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer susceptibility gene 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPD	Derivado da hematoporfirina, do inglês <i>Hematoporphyrin Derivative</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
Min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
PBS	Tampão fostato-salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDT	Terapia fotodinâmica, do inglês <i>Photodynamic Therapy</i>
PS	Fotossensibilizador, do inglês <i>Photosensitizer</i>
PVC	Policloreto de vinilo
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotações por minuto
DLI	Intervalo entre a administração do F ₂ BMet e a exposição à luz proveniente do simulador solar
µL	Microlitro

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1. Cancro

O termo “cancro” é o nome genérico dado a um grupo de doenças, que se caracterizam por um crescimento e divisão celular descontrolados (Figura I) podendo, eventualmente, passar por um processo de metastização, isto é, o alastramento do tumor a outros órgãos. O processo de desenvolvimento do cancro desencadeia-se através da transformação de uma única célula, geralmente através de alterações causadas no seu ADN, quer através da exposição a agentes carcinogénicos, como o tabaco, o álcool, as radiações ultravioleta, quer através de uma infecção por algum tipo de vírus, bactéria ou parasita (American Cancer Society, 2012; WHO, 2012). Embora a maioria dos cancros sejam esporádicos existe uma percentagem que resulta de causas hereditárias; sabe-se, por exemplo, que mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 estão associados a um elevado risco de desenvolvimento de cancro da mama e de ovário (Ford *et al.*, 1998; Risch *et al.*, 2001; NCI, 2009).

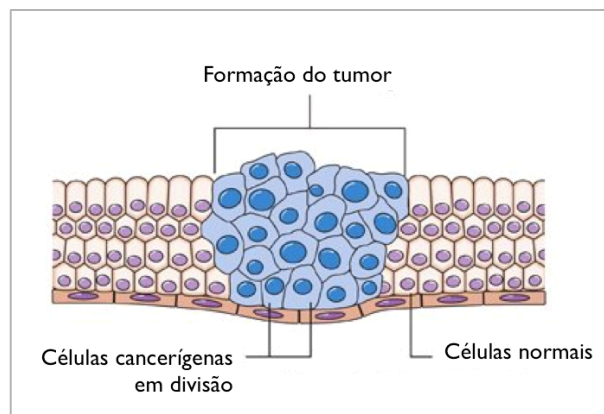


Figura I – Diagrama representativo do crescimento celular descontrolado que conduz à formação de um tumor (adaptado de CancerHelp UK, 2011).

O cancro é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2011) e, segundo o projeto GLOBOCAN 2008 desenvolvido pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, durante o ano de 2008, cerca de 12,7 milhões de novos casos de cancro foram diagnosticados e 7,6 milhões de mortes derivaram do cancro, o que representa aproximadamente 13% de todas as mortes ocorridas nesse ano. Embora sendo já um valor extremamente elevado, baseado nas taxas de crescimento populacional, no envelhecimento e no aumento da adopção de comportamentos de risco, a IARC projeta que em 2030 o número de novos casos diagnosticados anualmente aumente para aproximadamente 21,4 milhões e que o número de mortes como consequência do cancro aumente para 13,1 milhões, o que representará um aumento de aproximadamente 72% relativamente a 2008 (Ferlay *et al.*, 2010).

1.1.1. Tratamento do cancro

Atualmente existem várias terapias disponíveis para o tratamento do cancro, como a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, a imunoterapia, ou ainda combinações destas. Embora o progresso científico tenha propiciado mais conhecimento na área da oncologia, proporcionando o desenvolvimento de novas terapias mais direcionadas, a maioria destas apenas demonstraram ligeiras diferenças comparativamente aos tratamentos existentes, e a taxa de sobrevivência dos doentes com cancro, exceptuando nos casos de detecção precoce da doença, continua a ser baixa (Ferlay *et al.*, 2010; Agostinis *et al.*, 2011).

1.2. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma terapia pouco invasiva e muito promissora, especialmente indicada para o tratamento de vários tipos de cancro e de outras doenças não neoplásicas (Castano, Demidova & Hamblin, 2005; Nowis *et al.*, 2005a; Robertson, Hawkins & Abrahamse, 2009). Esta terapia baseia-se em três componentes essenciais (Figura 2): um fotossensibilizador (PS), luz e oxigénio molecular (O_2), sendo que nenhum deles é tóxico isoladamente.

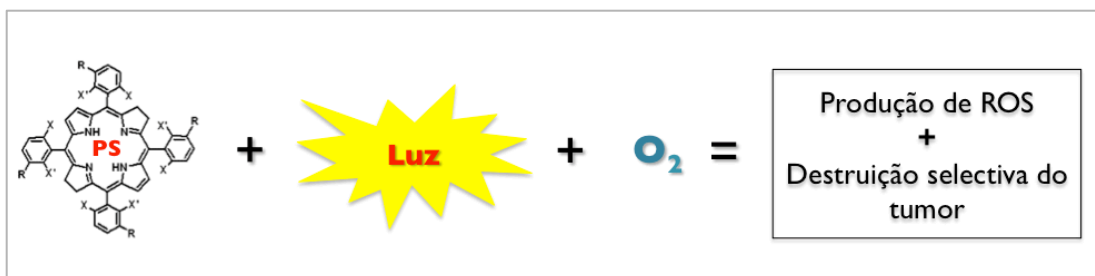


Figura 2 – Conceito geral da terapia fotodinâmica.

A PDT pode ser considerada um procedimento de três etapas (Figura 3): após a administração tópica ou sistémica do agente fotossensibilizador, segue-se um período de distribuição e acumulação no tecido alvo e posterior irradiação com luz de intensidade e comprimento de onda adequados (Hooper, 2000; Cramers *et al.*, 2003; Allison & Sibata, 2010); na presença de oxigénio dá-se a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), altamente tóxicas, e que induzem à morte celular (Agostinis *et al.*, 2011), quer por necrose e/ou apoptose das células tratadas, quer através da danificação da rede vascular tumoral (Krammer, 2001) e estimulação da resposta inflamatória local (Castano, Mroz & Hamblin, 2006).

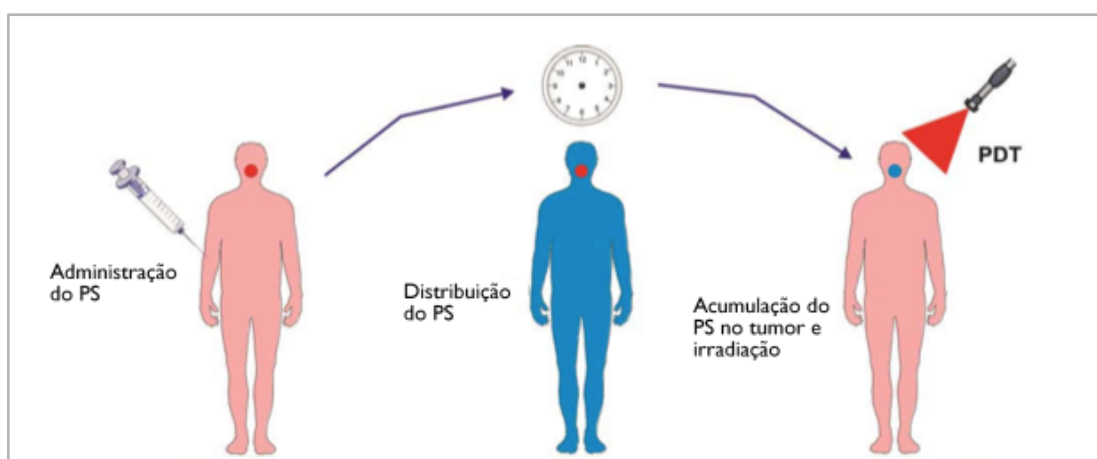


Figura 3 – Administração tópica ou sistémica de um fotossensibilizador, biodistribuição do composto pelo organismo e acumulação seletiva no tumor. Após o período de acumulação inicia-se a irradiação (adaptado de Agostinis *et al.*, 2011).

1.2.1. PDT versus tratamentos convencionais

Os tratamentos oncológicos convencionais – a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, apesar de se terem mostrado eficazes em inúmeros casos, apresentam muitos efeitos secundários e, por vezes, não permitem uma recuperação total. Portanto, é evidente a necessidade de desenvolver terapias mais eficazes. A terapia fotodinâmica tem o potencial de responder a algumas destas necessidades. Embora sendo ainda uma terapia a emergir, é já uma modalidade clínica aprovada para o tratamento de vários tipos de cancro.

A PDT trata-se de um tratamento especialmente atrativo pela elevada seletividade que apresenta, devido à localização preferencial do fotossensibilizador no tumor e ao facto da irradiação ser condicionada a um local específico. Embora esta característica seja extremamente vantajosa nos casos de identificação precoce do tumor, é também uma limitação da técnica, já que esta se torna ineficaz no tratamento de metástases (Robertson, Hawkins & Abrahamse, 2009; Agostinis *et al.*, 2011), a principal causa de morte nos doentes com cancro (WHO, 2012). No entanto, com o intuito de contornar/minimizar esta limitação, há investigação em curso focada em promover a indução da resposta imunitária no organismo afetado (Agostinis *et al.*, 2011). A PDT pode ser usada em conjunto com as terapias convencionais sem comprometer a sua eficácia (Moan & Berg, 1992; Hsi, Rosenthal & Gamlin, 1999). Até ao momento não foram detectados quaisquer tipo de efeitos secundários graves e, verificou-se, ainda, uma óptima capacidade de regeneração dos tecidos tratados, possivelmente devido à não danificação do tecido conjuntivo (Bonnett, 1999; Brown, Brown & Walker, 2004), o que torna a PDT uma terapia ideal para doentes com cancro de pele.

Nenhum dos fotossensibilizadores atualmente aprovados mostraram acumular-se no núcleo da célula e, portanto, há um risco reduzido de danificação do ADN e, conseqüentemente, menor probabilidade de se criar resistência a esta terapia. A PDT tem sido também usada como tratamento paliativo, no qual o principal objectivo é a redução do tamanho do tumor e alívio dos sintomas, de modo a aumentar a esperança e qualidade de vida do doente terminal (Bonnett, 1999; Nowis *et al.*, 2005a). Por fim, outra vantagem significativa desta técnica é o facto de o tratamento poder ser realizado fora do ambiente hospitalar e sem necessidade de equipamentos extra, o que se reflete numa redução de custos quer para o doente quer para o hospital, além de poder vir a ser uma óptima alternativa para o tratamento do cancro nos países em desenvolvimento (Allison, 2005).

A principal limitação registada até ao momento é a prolongada fotossensibilidade cutânea, que inicialmente durava várias semanas mas, atualmente, com o desenvolvimento dos novos fotossensibilizadores e a utilização de veículos para a administração dos mesmos, tem sido reduzida e poderá mesmo, eventualmente, deixar de ser uma limitação da terapia (Hooper, 2000; Cramers *et al.*, 2003; O'Connor, Gallagher & Byrne, 2009; Paszko *et al.*, 2011).

Obviamente a terapia fotodinâmica não pode substituir inteiramente todos os tratamentos convencionais mas, em todo o caso, deveria constar como uma opção adicional e não apenas ser considerada como último recurso ou nem sequer ser considerada uma opção.

1.3. Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores mais estudados para aplicação em terapia fotodinâmica são porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas (Nyman & Hynninen, 2004; Dąbrowski *et al.*, 2012).

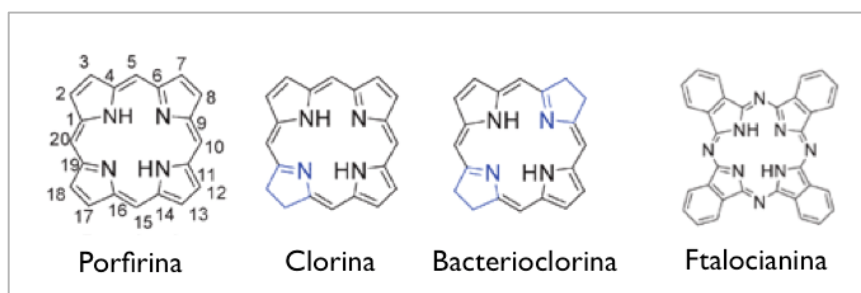


Figura 4 – Estrutura geral das porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas (Ethirajan *et al.*, 2011).

O fotossensibilizador é um elemento crucial na PDT. Este deve apresentar idealmente um conjunto de características importantes; são elas (Pushpan *et al.*, 2002; Allison *et al.*, 2004; Nyman & Hynninen, 2004; Huang, 2005):

- (1) ser, preferencialmente, um composto puro e estável;
- (2) ser solúvel em água ou num solvente inofensivo para o organismo;

- (3) apresentar uma grande absorção entre 700-800 nm, pois os fótons de comprimento de onda inferior a 600 nm penetram pouco profundamente nos tecidos e os fótons de comprimentos de onda superiores a 800 nm não são absorvidos por corantes com energia suficiente para excitar o oxigênio ao seu estado singuleto e gerar um rendimento substancial de ROS;
- (4) não deve causar toxicidade no escuro e deve apresentar uma rápida taxa de eliminação do organismo;
- (5) mostrar seletividade para as células tumorais;
- (6) favorecer um intervalo curto entre a administração e a irradiação.

O uso de um agente fotossensibilizador combinado com a luz foi registado pela primeira vez em 1900, quando Oscar Raab descobriu, acidentalmente, que a acridina era letal para as paramécias na presença de luz. Mais tarde Von Tappeiner e Jesionek descreveram um método de tratamento de cancro de pele através da utilização conjunta de eosina e luz solar (Ackroyd *et al.*, 2001; Dougherty, 2002). No entanto, nessa altura, a falta de fotossensibilizadores e fontes de luz adequados fizeram com que a PDT não adquirisse relevância clínica, mas despertou o interesse de alguns grupos que continuaram a investigar nessa área. A situação começou a mudar de panorama na década de 70 com o isolamento da hematoporfirina (HP) e com a síntese dos seus derivados (HPD). Em 1993, o Photofrin[®], uma mistura de monómeros, dímeros e oligómeros de hematoporfirina, foi aprovado para aplicação em terapia fotodinâmica, pela *Canadian Health Agency*. Esta foi a primeira aprovação conseguida na área da PDT, sendo um marco importantíssimo na sua história. Em 1998, o Photofrin[®] conseguiu aprovação pela FDA para o tratamento de vários tipos de cancros e, atualmente, está aprovado em muitos países e para diversos tipos de lesões tumorais (Dougherty *et al.*, 1998; Castano, Demidova & Hamblin, 2004; Desroches *et al.*, 2006; Agostinis *et al.*, 2011).

Embora o Photofrin[®] continue a ser o fotossensibilizador mais utilizado mundialmente, este apresenta certas desvantagens, como a prolongada fotossensibilidade cutânea e a absorção de radiação relativamente baixa aos 630 nm. Inúmeras tentativas de criar fotossensibilizadores mais eficazes que o Photofrin[®] têm sido feitas. Na década de 90, surgiram aqueles que foram denominados por “fotossensibilizadores de segunda geração”, e que eram quimicamente puros, altamente eficientes, seletivos e seguros, mas ainda geravam fotossensibilidade, ainda que por períodos inferiores ao Photofrin[®]. Alguns conseguiram

aprovação, como são exemplos o Levulan, aprovado em 1999, e o Foscan[®], aprovado em 2001 (Agostinis *et al.*, 2011)

Apesar do notável progresso relativamente à terapia fotodinâmica, a necessidade de fotossensibilizadores mais eficientes que sejam quimicamente puros, menos fototóxicos, com maior especificidade para os tecidos alvo e que absorvam a luz mais intensamente na região próxima do infravermelho, continua por ser preenchida.

1.3.1. Bacterioclorinas

As bacterioclorinas apresentam propriedades que as tornam muito atrativas para aplicação na terapia fotodinâmica, como a grande absorção de luz na zona fototerapêutica (720 - 900 nm), tempos de vida longos no estado de tripleto e a capacidade de gerar ROS em rendimentos elevados. No entanto, o seu uso na fotomedicina tem sido limitado devido à falta de estabilidade que apresentam (Mroz *et al.*, 2010; Dąbrowski *et al.*, 2012). As bacterioclorofilas e as bacteriofeofitinas são exemplos de compostos naturais que apresentam uma excelente absorção acima dos 720 nm, mas a sua instabilidade é bem conhecida. No entanto, compostos sintéticos análogos, como as tetrafenilbacterioclorinas mantêm a capacidade de absorção na zona próxima do infravermelho, mas a sua utilização continua limitada pela elevada susceptibilidade de fotodegradação (Pereira *et al.*, 2010). No entanto, as tetrafenilbacterioclorinas halogenadas apresentam uma fotostabilidade notável e as sulfonamidas correspondentes combinam a estabilidade com uma grande capacidade de acumulação celular (Dąbrowski *et al.*, 2012). Recentemente, surgiu um novo fotossensibilizador derivado de uma bacterioclorofila, o Tookad[®] (*palladium-bacteriopheophorbide*), que apresenta os requisitos de um fotossensibilizador ideal (Vakrat-Haglili *et al.*, 2005) e, atualmente, encontra-se em ensaios clínicos de fase III (US National Institute of Health, 2012).

I.3.1.1. F₂BMet

O nosso grupo desenvolveu uma nova classe de bacterioclorinas que apresentam as características de um fotossensibilizador ideal: pureza, estabilidade, o *scale up* da síntese é possível e economicamente viável, produção de ¹O₂ em rendimentos elevados, inexistência

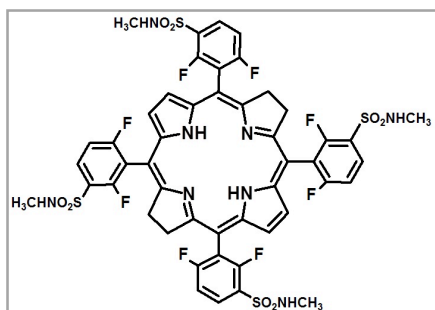


Figura 5 – Estrutura do F₂BMet.

da toxicidade na ausência de luz e em concentrações clinicamente relevantes, absorção de luz a 750 nm, o que permite que a luz chegue a lesões mais profundas, e que se têm mostrado eficientes *in vitro* e *in vivo* (Pereira *et al.*, 2010).

O F₂BMet (*5,10,15,20-tetrakis(2,6-fluoro-3-N-methylsulfamoylphenyl)bacteriochlorin*) (Figura 5) é o composto principal, tendo-se mostrado extremamente eficiente *in vitro* e *in vivo* foi possível registrar a cura total e permanente de tumores CT26 implantados subcutaneamente do flanco de ratinhos BALB/c, em uma única sessão de terapia fotodinâmica.

I.4. Objectivo da Tese

O presente trabalho descrito neste Tese está inserido num projeto que consiste, fundamentalmente, no desenvolvimento de novos compostos fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica, para o tratamento de cancro.

O trabalho desenvolvido foca-se num único composto, o F₂BMet, e divide-se em duas partes:

- a primeira parte teve como objectivo traçar o perfil farmacocinético do F₂BMet em vários órgãos de ratinhos BALB/c, ao longo tempo;
- a segunda parte do trabalho consistiu num ensaio para a avaliação da fotossensibilidade cutânea, a principal limitação da terapia fotodinâmica, causada por exposição a luz proveniente de um simulador solar, em ratos Wistar.

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA

2.1. Determinação do perfil farmacocinético do F₂BMet em ratinhos BALB/c

2.1.1. Modelo animal

Todos os procedimentos, desde o manuseamento à eutanásia, foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Federação Europeia de Associação de Ciências em Animais de Laboratório (FELASA).

Ratinhos da estirpe BALB/c, fêmeas, foram adquiridos com 8 semanas de idade (Charles River Laboratories[®], Barcelona, Espanha) e mantidos num regime de 12 h de luz e 12 h de escuro, com acesso a comida e água *ad libidum*.

2.1.2. Inoculação do tumor

Células tumorais CT26 foram cultivadas em monocamada em meio de cultura DMEM, e suplementadas com 10 mM de tampão HEPES, 10% (v/v) de soro fetal bovino, 25 U/mL de penicilina e 25 mg/mL de estreptomicina; cresceram a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂. As células CT26 (~1x10⁶) foram colocadas em 0,1 mL de PBS e implantadas subcutaneamente no flanco direito de cada ratinho BALB/c. Todos os reagentes foram adquiridos à empresa Lonza (Basileia, Suíça).

2.1.3. Fármaco

O composto foi sintetizado pelo Departamento de Investigação Química da Luzitin, S.A. (Coimbra, Portugal).

2.1.4. Administração do fármaco

O composto (1 mg/kg) foi administrado intravenosamente (i.v.) através da veia caudal.

2.1.5. Intervalos entre a administração do fotossensibilizador e a necrópsia

Previamente foram estabelecidos determinados intervalos entre a administração do fotossensibilizador e o momento da necrópsia. Assim, foram organizados os seguintes grupos:

G1: necrópsia 15 min depois da administração;

G2: necrópsia 3 h depois da administração;

G3: necrópsia 6 h depois da administração;

G4: necrópsia 12 h depois da administração;

G5: necrópsia 72 h depois da administração;

G6: necrópsia 96 h depois da administração;

Após decorridos cada um destes intervalos, grupos de quatro animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina e eutanasiados por deslocamento cervical. Por cada animal recolheram-se as seguintes amostras: baço, coração, fígado, intestino, músculo, pele, pulmão, rim, tumor e sangue, as quais foram pesadas e armazenadas a -20 °C até serem utilizadas.

2.1.6. Extração do fármaco

Para proceder à extração do composto, cada amostra foi homogeneizada durante 1 min com 900 µL de uma solução de etanol:DMSO, numa proporção de 75:25 (v/v) (Fischer Chemicals, Zurique, Suíça; Merck, Darmstadt, Alemanha), com o auxílio de um homogeneizador apropriado (Ystral Microshaft 6G). Após cada homogeneização, procedeu-

se à centrifugação das amostras durante 1 min a 3.500 rpm e o sobrenadante foi recolhido. Ao *pellet* voltaram a juntar-se 900 µL da solução de etanol:DMSO e o procedimento repetiu-se, num total de cinco vezes. Depois de recolhidos os sobrenadantes resultantes das cinco homogeneizações, ajustou-se o volume com a solução de etanol:DMSO de modo a perfazer um volume final de 5 mL. As amostras foram mantidas sob refrigeração até ao momento da sua utilização.

2.1.7. Quantificação do fármaco

A quantificação do fármaco foi efetuada por fluorimetria (Horiba-Jovin-Yvon Spex Fluorog 3-2.2), usando uma *cuvette* de quartzo. As amostras foram excitadas a 517 nm e o espectro de fluorescência foi registado entre 700 – 800 nm.

2.2. Avaliação da fotossensibilidade cutânea provocada pelo F₂BMet em ratos Wistar

2.2.1. Modelo animal

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Federação Europeia de Associação de Ciências em Animais de Laboratório (FELASA).

O modelo animal escolhido foi o rato Wistar, fêmeas, (Charles River Laboratories[®], Barcelona, Espanha) por ser o modelo mais frequentemente utilizado neste tipo de estudos e, desta forma, permitir uma melhor comparação de resultados. Os animais foram mantidos num regime de 12 h de luz e 12 h de escuro, com acesso a comida e água *ad libidum*.

2.2.2. Fármaco e formulação

O composto foi sintetizado pelo Departamento de Investigação Química da Luzitin, S.A. (Coimbra, Portugal).

2.2.3. Administração do fármaco

Os animais foram anestesiados com um mistura de quetamina e xilazina e o composto (1 mg/kg) foi administrado intravenosamente (i.v.) através da veia caudal.

2.2.4. Exposição à luz solar

O dorso dos animais foi previamente depilado usando creme Veet[®], sob anestesia. Em cada animal foram escolhidos quatro locais de 1 cm de diâmetro, afastados 1 cm entre eles, como se encontra representado na Figura 6, que foram expostos a luz proveniente de um simulador solar (~100 mW/cm², Simulador Solar Oriel 150 W com filtro global AM 1.5) por períodos de 0 min, 5 min, 15 min e 30 min, respectivamente. Foram também definidos quatro intervalos distintos entre a administração do composto e a exposição à luz solar (DLI): 12 h, 24 h, 72 h e 168 h. Além destes grupos, existe um grupo controlo que foi

exposto à luz solar mas no qual não foi administrado o composto. Este procedimento foi adaptado a partir de Weersink *et al.* (2005) e Bovis *et al.* (2012).

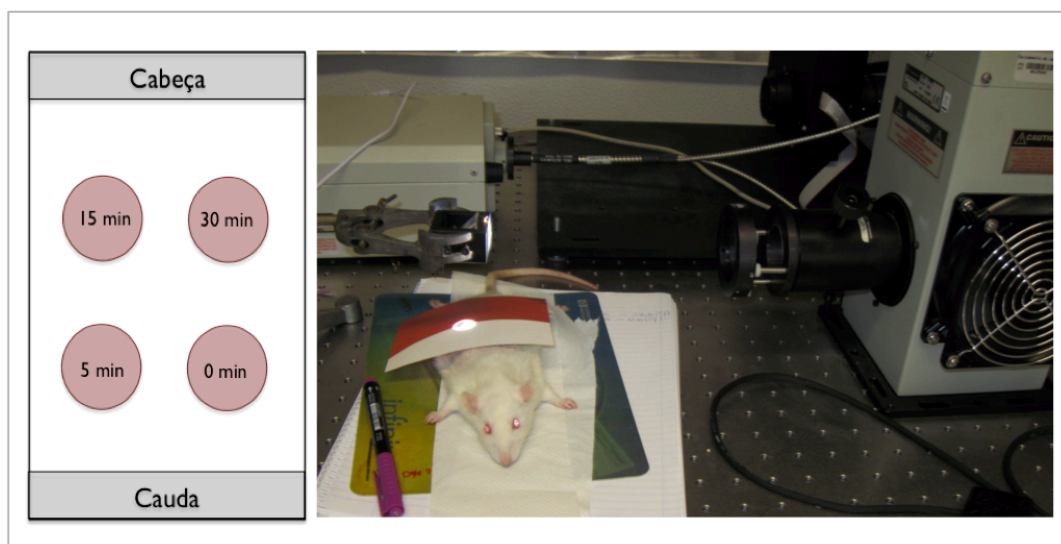


Figura 6 – Representação esquemática do dorso do animal com os locais e duração da irradiação devidamente assinalados (à esquerda). Demonstração real do processo de irradiação (à direita).

2.2.5. Registo e avaliação de resultados

A avaliação dos resultados foi efetuada por observação, tendo em conta uma escala previamente definida por Weersink *et al.* (2005), e que se encontra exposta na Tabela I. Os animais foram acompanhados até à sua recuperação total.

Tabela I – Escala para a classificação dos efeitos provenientes da exposição à luz solar (Weersink *et al.*, 2005).

Pontuação	Observação
0	Não observável
1	Eritema ligeiro
2	Eritema moderado
3	Eritema severo
4	Edema ligeiro
5	Edema moderado
6	Edema severo
7	Edema + vesiculação
8	Necrose

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Determinação do perfil farmacocinético do F₂BMet em ratinhos BALB/c

Com o intuito de averiguar a farmacocinética e acumulação do fotossensibilizador nos diferentes tecidos de ratinhos BALB/c, foi determinada a concentração do fotossensibilizador em 10 tecidos diferentes, ao longo do tempo. Esta quantificação foi efetuada através da extração do composto das amostras recolhidas e posterior quantificação através da medição da fluorescência emitida. Os dados encontram-se expostos na Figura 7, mostrando a concentração relativa do composto em cada órgão, nos vários *timepoints* analisados.

As concentrações mais elevadas de F₂BMet foram medidas no fígado, baço e pulmão. As menores concentrações foram observadas em tecidos localizados na periferia, como a pele e músculo.

A concentração de F₂BMet encontrada no sangue atinge o seu auge logo 15 minutos após a administração i.v. do mesmo. Após esse momento a sua quantidade vai diminuindo gradualmente, sendo que 6 h após a sua administração cerca de 80% do composto já foi eliminado da corrente sanguínea. Às 72 h observa-se um ligeiro aumento da quantidade do composto no sangue. Estudos futuros poderão esclarecer se este aumento se deve a erros experimental ou se é resultado da circulação entero-hepática.

Relativamente ao tumor, a concentração mais elevada de F₂BMet registou-se 3 h após o momento da sua administração e, após atingir este máximo, é lentamente eliminado do tecido, como se verifica nos outros tecidos analisados.

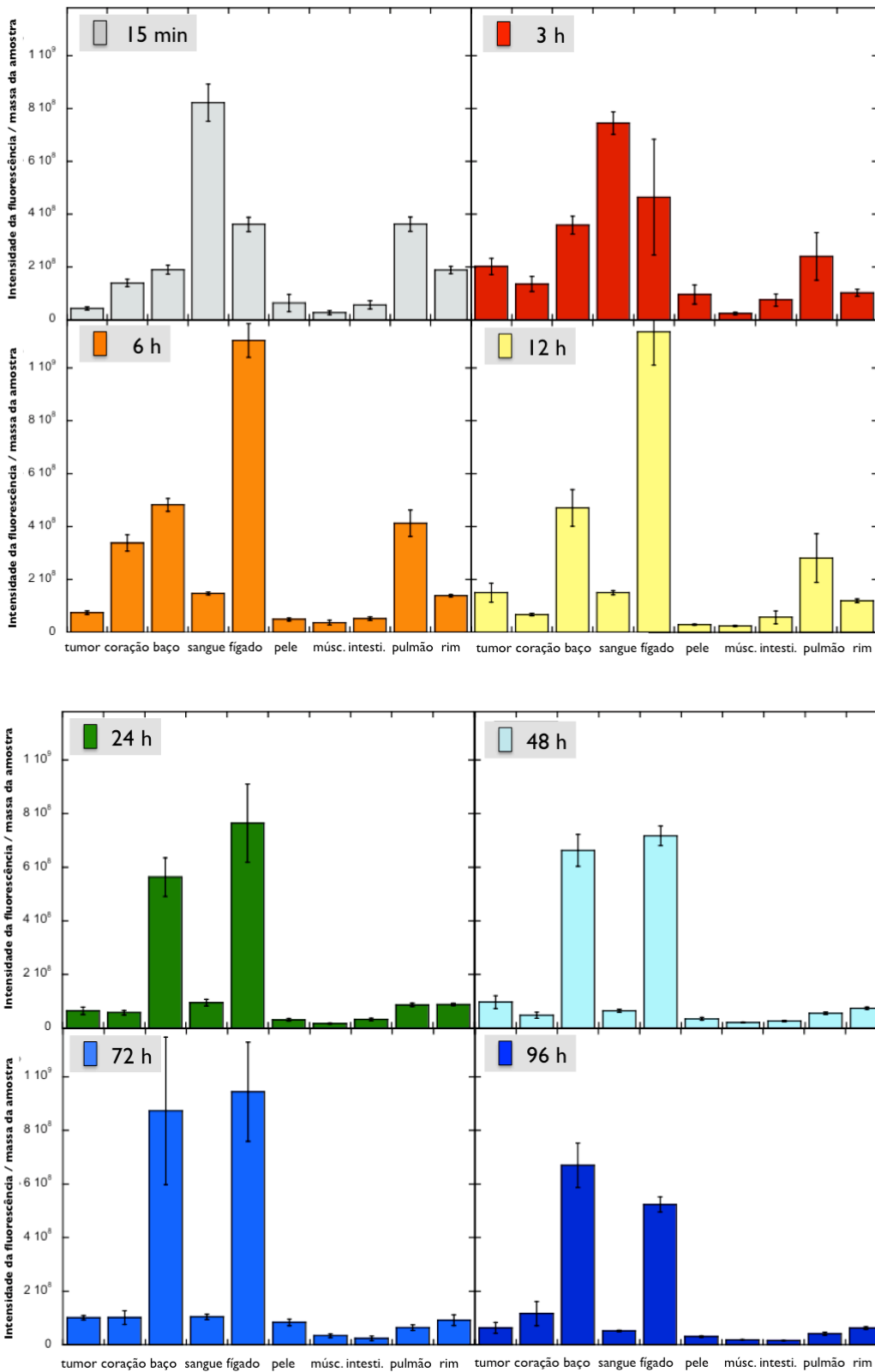


Figura 7 – Biodistribuição do F₂BMet em ratinhos BALB/c com tumores CT26 implantados subcutaneamente no flanco direito. Os ratinhos foram eutanasiados em diferentes tempos após a administração i.v. do F₂BMet (1 mg/kg) e a quantidade deste nos respetivos tecidos foi determinada por fluorescência e apresentada em função da razão entre a fluorescência emitida e a massa da amostra. Os dados apresentados representam média ± desvio-padrão, n=4.

Após obtenção das concentrações relativas de cada amostra, calcularam-se as razões tumor/pele e tumor/músculo, para os *timepoints* definidos, as quais de encontram expostas na Figura 8. Em ambos os casos verificou-se uma maior afinidade do fotossensibilizador para o tecido tumoral do que para a pele ou o músculo.

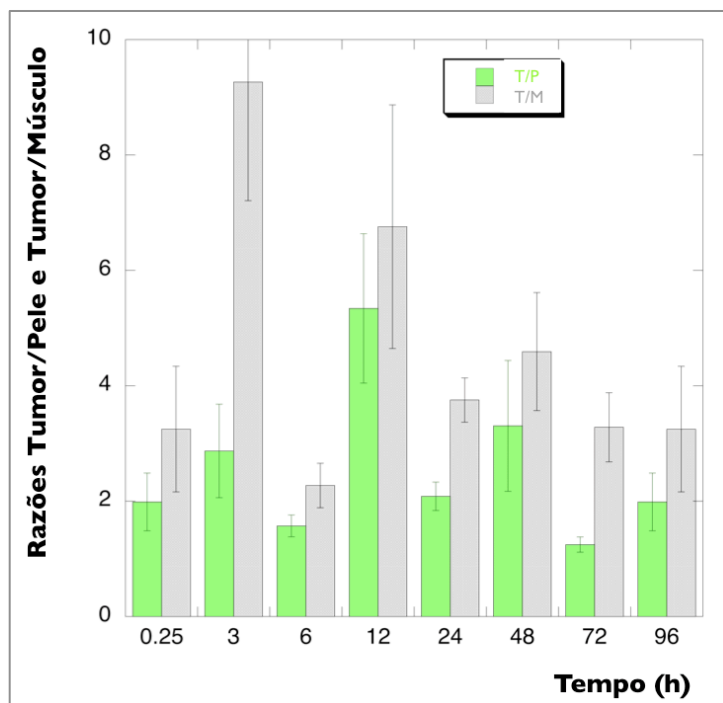


Figura 8 – Razões tumor/pele e tumor/músculo, em determinados *timepoints*, após administração i.v. de 1 mg/kg de F₂BMet. Os dados apresentados representam média ± desvio-padrão, n=4.

3.2. Avaliação da fotossensibilidade cutânea provocada pelo F₂BMet em ratos Wistar

Grupos de ratos Wistar foram injetados com 1 mg/kg de F₂BMet e expostos a luz proveniente de um simulador solar 12 h, 24 h, 72 h e 168 h após a administração do fotossensibilizador. Os animais foram observados diariamente até à sua recuperação total. As alterações na pele foram classificadas de 0 a 8, através de uma escala previamente definida, tendo em conta a intensidade da reação.

Os resultados obtidos 24 h após a irradiação estão sumarizados na Figura 9, na qual é possível visualizar que o F₂BMet é susceptível de causar fotossensibilidade na pele após exposição à luz, em todos os períodos analisados. A reação mais intensa foi observada no período de irradiação mais longo (30 min) e 12 h após a administração do fotossensibilizador, resultando em edemas moderados (6), como se pode observar na Figura 10A. Nos locais que não foram irradiados diretamente não se verificou nenhuma alteração na pele (0), à semelhança do que foi possível observar no grupo controlo (Figura 12), onde também não se observou qualquer tipo de alteração após exposição dos animais à luz do simulador solar.

Para os DLIs mais curtos (12 h, 24 h e 72 h), pode verificar-se que existe uma relação entre a intensidade da reação provocada na pele e a duração da irradiação (0 min a 30 min), sendo que à medida que o período de irradiação aumenta, a reação provocada também se torna mais intensa. No entanto, este facto já não é válido para o intervalo de 168 h, uma vez que para este período não se registaram diferenças significativas entre as reações provocadas nos diferentes tempos de irradiação.

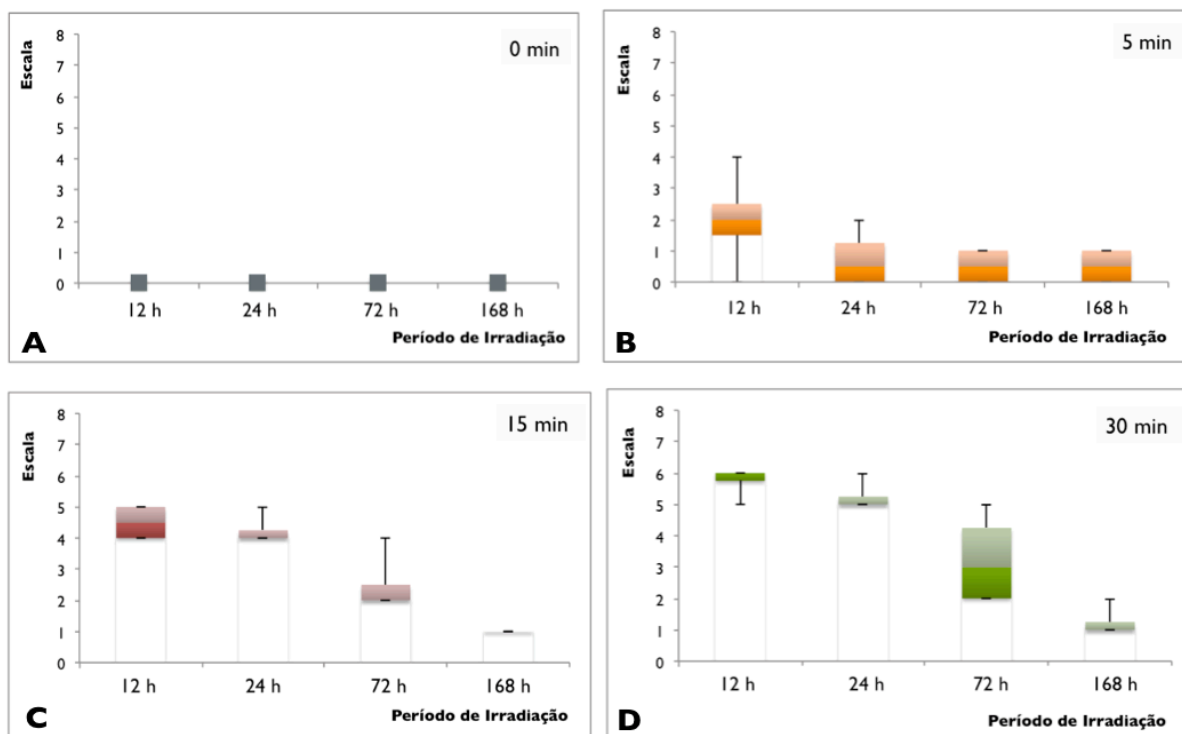


Figura 9 – Grupos de ratos Wistar foram expostos a 0 min, 5 min, 15 min e 30 min de $\sim 100 \text{ mW/cm}^2$ de luz proveniente de um simulador solar, em intervalos de 12 h, 24 h, 72 h e 168 h após a administração intravenosa de 1 mg/kg de F_2BMet . As observações foram efetuadas 24 h após a exposição e a classificação foi realizada de acordo com a escala visual previamente definida por Weersink *et al.*, 2005. Os resultados foram representados em diagramas de extremos e quartis nas figura B, C e D.

Nas Figuras 10 e 11 é possível visualizar o aspecto do dorso dos ratos Wistar 24 h após a exposição à luz do simulador solar, à exceção da Figura 11A, que traduz o aspecto do dorso do animal após 72 h da sua exposição à luz.

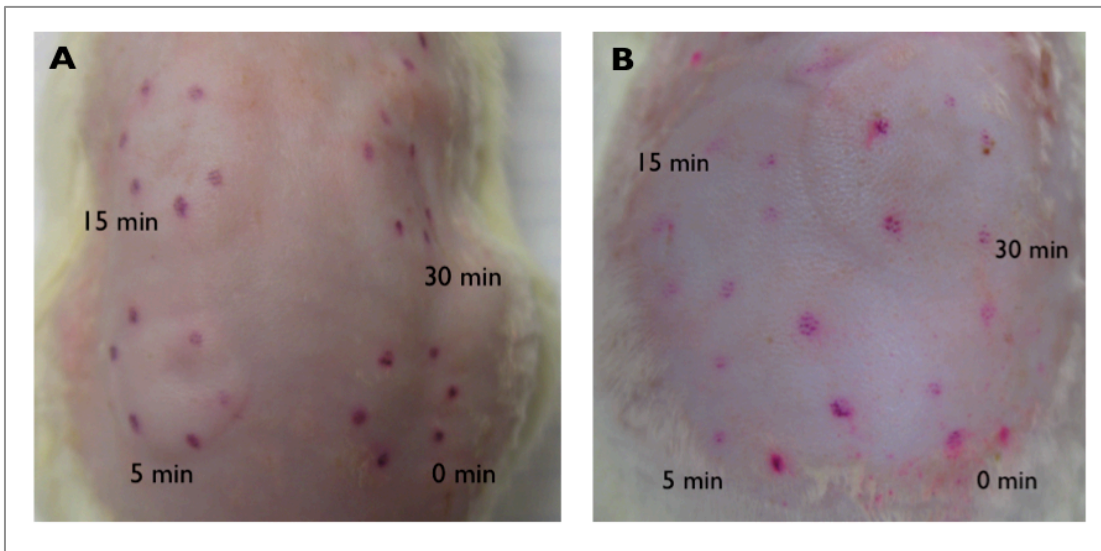


Figura 10 – Aspecto do dorso de ratos Wistar expostos a luz proveniente de um simulador solar ($\sim 100 \text{ mW/cm}^2$), após administração i.v. de 1 mg/kg de F_2BMet . A: exposição 12 h após a administração do fotossensibilizador. B: exposição 24 h após a administração do fotossensibilizador. Os valores apresentados na figura correspondem à duração dos períodos de irradiação em cada um dos locais. Ambas as imagens reportam o aspecto do dorso dos animais 24 h após a exposição à luz.

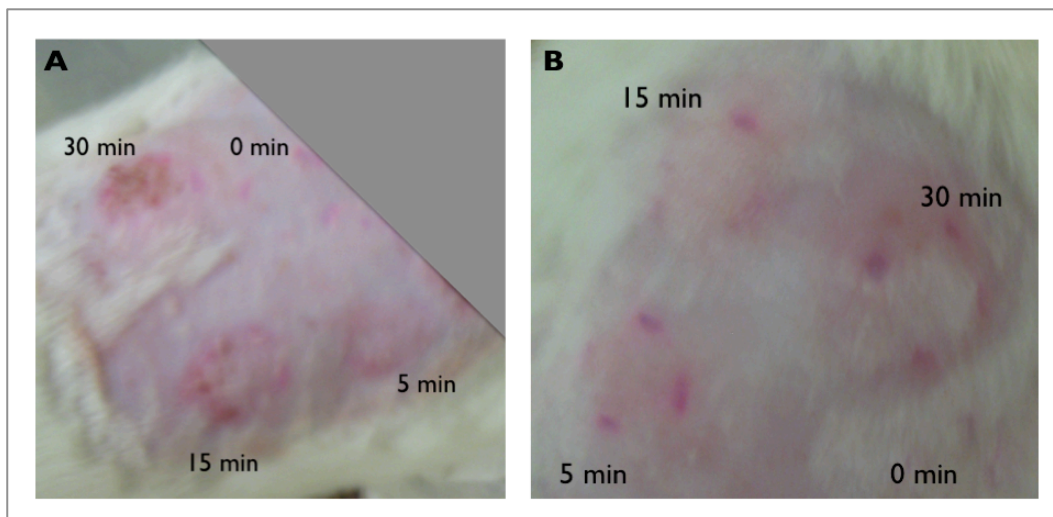


Figura 11 – Aspecto do dorso de ratos Wistar expostos a luz proveniente de um simulador solar ($\sim 100 \text{ mW/cm}^2$), após administração i.v. de 1 mg/kg de F_2BMet . A: exposição 72 h após a administração do fotossensibilizador. B: exposição 168 h após a administração do fotossensibilizador. Os valores apresentados na figura correspondem à duração dos períodos de irradiação em cada um dos locais. A fotografia A reporta o aspecto do dorso do animal 72 h após a exposição à luz, enquanto que a fotografia B reporta o aspecto do dorso do animal logo após 24 h da exposição à luz.

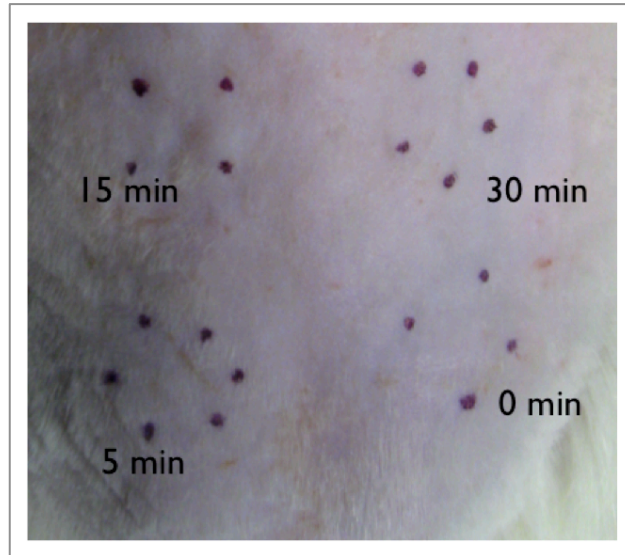


Figura 12 – Aspecto do dorso de ratos Wistar expostos a luz proveniente de um simulador solar ($\sim 100 \text{ mW/cm}^2$), sem que lhes tenha sido administrado qualquer tipo de agente fotossensibilizador (grupo controlo). A fotografia reporta o aspecto do dorso 24 h após a sua exposição à luz.

Na Figura 13 encontram-se reunidos os dados relativos à progressão da reação observada nos animais, agrupados em função da duração do período de irradiação, durante os 30 dias de acompanhamento. Para os DLIs de 12 h e 24 h a reação máxima observada não é alcançada logo 24 h após a irradiação, verificando-se uma progressão gradual da intensidade da reação, chegando a haver necrose dos tecidos (8), nos casos de exposição durante 15 min e 30 min. No caso dos DLIs de 72 h e 168 h, as reações mais intensas foram obtidas 24 h após o período de irradiação. Os animais foram acompanhados durante 1 mês, após o qual todos tinham recuperado a sua pelagem normal. Durante este procedimento não se verificaram alterações significativas no peso dos animais.

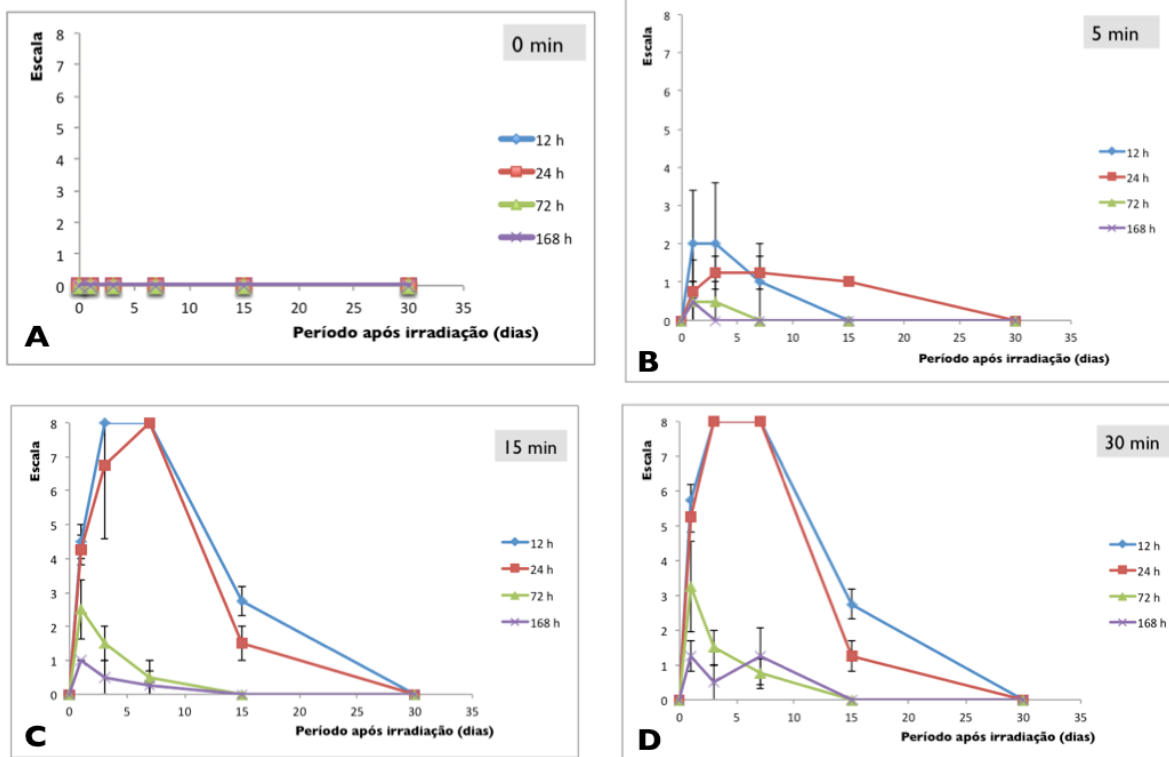


Figura 13 - Grupos de ratos Wistar foram expostos a 0 min, 5 min, 15 min e 30 min de $\sim 100 \text{ mW/cm}^2$ de luz proveniente de um simulador solar, em intervalos de 12 h, 24 h, 72 h e 168 h após a administração intravenosa de 1 mg/kg de F_2BMet , e acompanhados durante 30 dias. As observações foram efetuadas periodicamente após a exposição e a classificação foi realizada de acordo com a escala visual previamente definida por Weersink *et al.*, 2005. Os resultados representam média \pm desvio-padrão.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO

4.1. Determinação do perfil farmacocinético do F₂BMet em ratinhos BALB/c

Os ensaios de farmacocinética são importantes para fornecer informações acerca da absorção, distribuição, metabolização e eliminação de fármacos e outros agentes. Estes dados permitem modular o procedimento envolvido na terapia, de modo a conseguir uma optimização do mesmo e, assim, conseguir obter uma maior eficácia.

Todos os tecidos analisados mostraram presença de F₂BMet, com as concentrações mais elevadas registadas no fígado e no baço, e as concentrações mínimas observadas nos tecidos periféricos, como é o caso da pele e do músculo.

Os resultados mostram que a maior concentração registada no sangue se verificou logo 15 min após a sua administração no organismo e que, 6 h depois aproximadamente 80 % desta quantidade já foi eliminada da corrente sanguínea. O facto de se verificar uma elevada taxa de eliminação do fotossensibilizador permite-nos esperar que a reação de fotossensibilidade cutânea que este fotossensibilizador é susceptível de causar não seja muito severa durante longos períodos após a sua administração no organismo.

A concentração de fotossensibilizador no tumor rapidamente atinge o seu máximo (3 h após a administração), iniciando, a partir desse momento, uma diminuição gradual. O facto deste valor ser detectado tão cedo significa que a acumulação no tumor ocorre mais rapidamente no tecido tumoral do que nos outros órgãos, o que pode ser um dado importante no momento de optar pelo *timepoint* ideal para a irradiação do local a tratar, já que este momento deve ser escolhido em equilíbrio entre vários parâmetros.

A medição das concentrações do fotossensibilizador nos outros órgãos também é importante para a terapia fotodinâmica, na medida que permite prever a exposição dos tecidos sãos. Neste estudo, as maiores concentrações de F₂BMet, ao longo do tempo, foram encontradas no fígado, estando este facto intimamente ligado com o seu papel na eliminação e/ou metabolismo de fármacos do organismo. No entanto, o baço, os pulmões e o coração também apresentaram concentrações relativamente elevadas, ainda que bastante inferiores às registadas no fígado. Estes dados vêm corroborar os dados que mostram que os órgãos pertencentes ao sistema reticuloendotelial acumulam maiores concentrações de compostos fotossensibilizadores, uma vez que estes órgãos têm um papel ativo nas vias de eliminação de substâncias externas ao organismo, agindo como filtro imunológico do sangue (Gomer & Dougherty, 1979; Peng *et al.*, 1995; Desroches *et al.*, 2006; Bovis *et al.*, 2012).

A pele e o músculo mostraram uma cinética semelhante, embora os valores de F₂BMet no músculo sejam, geralmente, aproximadamente metade dos valores registados para a pele. Embora nunca atingindo concentrações muito elevadas, a concentração de fotossensibilizador nestes tecidos mantêm-se relativamente estável ao longo do tempo, sugerindo que uma vez nestes tecidos o composto se difunde mais lentamente, dificultando a sua eliminação.

As razões tumor/pele e tumor/músculo são elevadas, atingindo valores máximos em *timepoints* próximos do momento de administração do composto. No entanto, ao longo do tempo, estas razões mantêm-se sempre elevadas, ou seja, acima de 1. Uma razão tumor/músculo elevada é particularmente importante na PDT, para minimizar os danos causados nos tecidos sãos presentes no campo de iluminação durante a terapia fotodinâmica. Já a razão tumor/pele também deve ser alta, já que, à partida, isso refletir-se-á positivamente na redução da fotossensibilidade cutânea.

4.2. Avaliação da fotossensibilidade cutânea provocada pelo F₂BMet em ratos Wistar

A fotossensibilidade cutânea que surge após o tratamento através da terapia fotodinâmica é a maior limitação da técnica registada até ao momento. Embora esta reacção seja facilmente contornada evitando a exposição direta à luz solar e a luzes artificiais muito brilhantes, esta não se trata da melhor opção para o doente, que vê a sua vida diária condicionada durante algumas semanas, o que no caso específico do Photofrin[®], o fotossensibilizador mais usado mundialmente, se traduz entre 4 a 8 semanas de fotossensibilidade (Richter *et al*, 1991; Wolford, Novicki & Kelly, 1994). A melhor solução passa, obviamente, pelo desenvolvimento de fotossensibilizadores cuja fotossensibilidade cutânea produzida se reflita por períodos mais reduzidos ou, idealmente, que não produzam qualquer tipo de reacção.

Para avaliar a capacidade do F₂BMet produzir fotossensibilidade cutânea realizou-se um estudo utilizando ratos Wistar. Este estudo mostrou que o composto em estudo, à semelhança dos outros fotossensibilizadores, é susceptível de produzir uma reacção cutânea como consequência da exposição à luz.

Dos quatro DLLs avaliados (12 h, 24 h, 72 h e 168 h), verificou-se que as reacções mais intensas ocorreram nos intervalos em que a diferença entre o momento da administração do fotossensibilizador e a exposição à luz era menor (12 h e 24 h). Este resultado era expectável uma vez que, embora a acumulação do fotossensibilizador na pele nunca chegue a atingir concentrações muito elevadas, a concentração de F₂BMet no sangue após este período ainda é elevada e, portanto, capaz de gerar esta reacção de fotossensibilidade. Nestes mesmos intervalos (12 h e 24 h) é possível observar uma relação entre a duração do período de iluminação e a intensidade da reacção produzida, sendo que quanto mais longo é o período de exposição mais severa é a reacção produzida. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto de haver mais tempo para absorção de fótons por parte do fotossensibilizador, mas também ao facto de ao irradiar uma determinada área se promover um aumento da temperatura e, conseqüentemente, um aumento do fluxo sanguíneo, que neste caso reflete um aumento do afluxo de moléculas do fotossensibilizador ao local da irradiação.

Como foi possível constatar durante os ensaios de biodistribuição, o fotossensibilizador nunca chega a atingir concentrações muito elevadas na pele e no sangue, e a sua concentração começa a diminuir gradualmente 15 min após a sua administração. No entanto, às 72 h verifica-se um ligeiro aumento de ambas as concentrações, sendo que a concentração do PS no sangue volta a atingir valores similares aos registados por volta das 24 h e, no caso da pele, as quantidades de fotossensibilizador encontradas nesta altura são idênticas às registadas logo após 15 min da sua administração. Tendo em conta estes valores, seria de esperar que a intensidade cutânea ainda se mantivesse severa, no entanto verifica-se uma diminuição da intensidade da reação infligida, sendo que a reação máxima reportada corresponde a um edema ligeiro (4), e só foi verificada num único animal. Estudos futuros sobre a circulação entero-hepática poderão esclarecer as razões para as observações às 72 h não seguirem o padrão das outras observações.

Após um DLI de 168h, a concentração de F₂BMet no organismo é extremamente reduzida, facto que se reflete visivelmente na reação cutânea formada que, no máximo, se traduz na formação de um eritema moderado (3) mas, em média apenas causa um eritema ligeiro (1), independentemente da duração do período de irradiação.

Comparando os resultados obtidos neste ensaio com outro realizado para o Foscan[®], em condições semelhantes e usando o mesmo sistema de classificação, ainda que este seja um pouco subjetivo, pode-se afirmar que os resultados obtidos após um DLI de 72 h são perfeitamente comparáveis aos obtidos para o Foscan[®] após um DLI de 168 h, como é possível observar na Figura 14, para o qual se verifica, para o período mais longo de exposição (30 min), uma reação que se traduz em média, num edema moderado (5), enquanto que no caso do F₂BMet, em média, verifica-se um edema ligeiro (4). O Foscan[®] requer ausência de exposição à luz, por cerca de 4 semanas, tendo em conta os resultados alcançados pelo F₂BMet é possível prever que com este composto a proteção contra a exposição solar direta deva ser mantida por uma semana.

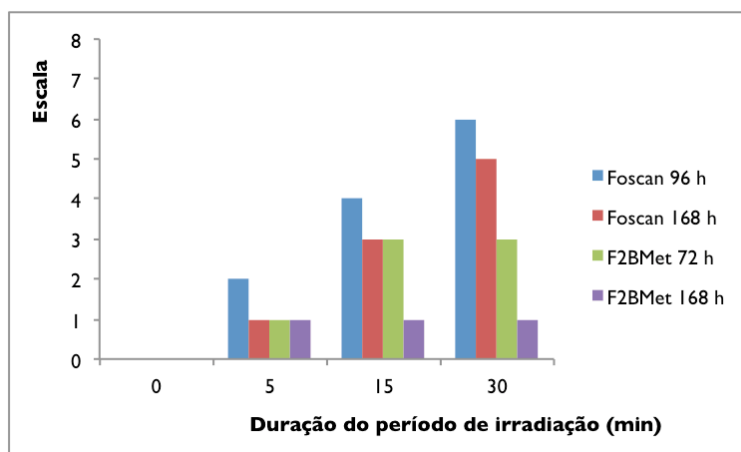


Figura 14 – Comparação dos resultados obtidos num ensaio de avaliação da fotossensibilidade cutânea por exposição de ratos Wistar a 0 min, 5 min, 15 min e 30 min de 100 mW/cm² de luz proveniente de um simulador solar, 96 h e 168 h após a administração de 0,3 mg/kg de Foscan® e 72 h e 168 h após a administração de 1 mg/kg de F₂BMet. Os resultados foram observados 24 h após a irradiação e representam a média das observações. Os resultados relativos ao Foscan® foram adaptados de Bovis *et al.*, 2012.

Um facto extremamente relevante com que me deparei durante este estudo e que raramente se encontra relatado na literatura, prende-se com o facto da reação gerada pela irradiação ser lenta e, conseqüentemente, poder não se verificar o máximo de intensidade da reação logo após as 24 h, que muitas vezes é o único tempo de observação relatado. Este fenómeno leva-me a questionar alguns resultados encontrados, já que o desencadeamento de uma resposta inflamatória não é um processo linear, que ocorre sempre da mesma forma, podendo variar com vários factores, entre indivíduos e até o mesmo indivíduo pode não reagir sempre da mesma forma. Assim, seria de recomendar que o acompanhamento dos animais fosse feito durante mais tempo, de modo a garantir que se tem conhecimento exato do máximo de intensidade que uma reação pode alcançar.

Na Figura 15 estão representados os resultados de outro estudo de fotossensibilidade cutânea obtidos para o Photofrin® comparativamente com os resultados obtidos para o F₂BMet. Obviamente é difícil fazer uma comparação precisa, já que as condições de experimentação não foram as mesmas e a escala utilizada também é diferente; no entanto, de modo a permitir uma melhor comparação, os resultados obtidos para o F₂BMet foram adaptados à escala utilizada no ensaio com o Photofrin®. O gráfico representa a intensidade máxima da reação obtida através de uma irradiação durante 15 min, observada

num período de 96 h, para diferentes DLIs. Embora havendo apenas dois DLIs coincidentes, o gráfico permite ter uma noção da evolução da intensidade da reação para ambos os compostos. Às 24 h, o primeiro DLI comum, as reações observadas são semelhantes, atingindo o máximo da escala utilizada (5), mas, às 72 h é notória a diferença observada, a reação obtida para o F₂BMet diminui drasticamente, passando a ¼ da reação observada com o Photofrin®. Este dado permite claramente ver a diferença na fotossensibilidade gerada, que no caso do Photofrin® se pode manifestar até 8 semanas após a administração do composto.

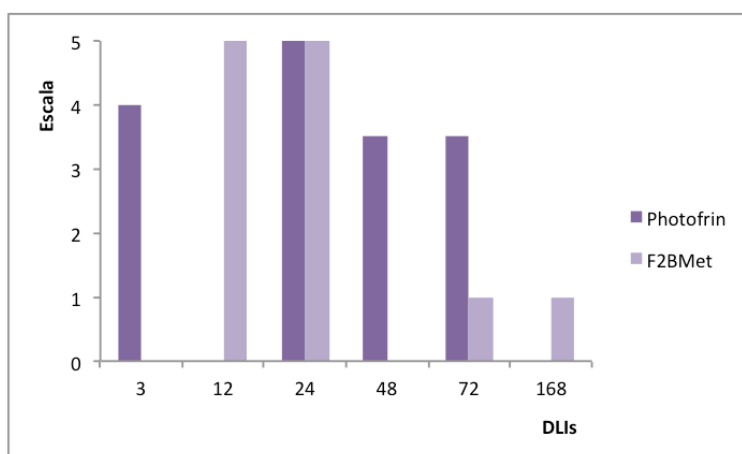


Figura 15 – Comparação entre os resultados obtidos num ensaio de avaliação da fotossensibilidade cutânea em ratinhos DBA/2J administrados com 4 mg/kg de Photofrin® e ratos Wistar administrados com 1 mg/kg de F₂BMet, após exposição a 15 min de ~100mW/cm² de luz proveniente de um simulador solar, em vários DLIs. Os dados relativos ao Photofrin® foram adaptados de Richter *et al.*, 1991.

Além do Photofrin® e do Foscan®, existem muitos outros potenciais fotossensibilizadores a serem testados, no entanto, até ao momento, nenhum mostrou não provocar fotossensibilidade cutânea mas têm demonstrado uma redução significativa do período de proteção da luz solar. Na literatura é possível encontrar alguns estudos comparativos entre vários fotossensibilizadores, ainda que, por vezes, não muito detalhados e/ou conclusivos. Estudos com BPD-MA (*Benzoporphyrin derivative monoacid ring A*), nos quais se avaliou a capacidade deste gerar fotossensibilidade cutânea em ratinhos quando expostos à luz 3 h, 24 h e 48 h após a administração de 2, 10 e 20 mg/kg, mostraram que para a concentração de 2 mg/kg nenhuma reação significativa foi detectada, independentemente do DLI. Para o DLI de 3 h todos os ratinhos administrados com 20 mg/kg e a maioria dos ratinhos administrados com 10 mg/kg morreram, e os ratinhos sobreviventes mostraram alterações na cor da pele, alopecia e perda de visão. No entanto, ao aumentar o DLI para

24 h os efeitos verificados reduziram significativamente de intensidade e, 48 h após a administração do BPD-MA não se verificou qualquer tipo de reação. Estes resultados são consequência de um período de irradiação de apenas 5 min (Richter *et al.*, 1988; Wolford, Novicki & Kelly, 1995), que é um período extremamente reduzido. O Photochlor (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a) é outro composto fotossensibilizador que se encontra em ensaios clínicos de fase I/II e os testes relativos à sensibilidade cutânea por ele provocada mostraram resultados ténues, com uma reação mínima para as doses máximas de luz e composto testadas (133,2 J/cm² e 6 mg/kg, respectivamente). O DLI máximo para o qual se observaram reações na pele corresponde a 3 dias. Contudo, durante este estudo não foi possível identificar uma relação específica entre a intensidade da reação formada e a dose ou tempo de exposição, e supõe-se que essa reação possa resultar de uma complexa interação entre a dose de Photochlor administrada, o tipo de pele, género do indivíduo e outros factores ainda não identificados (Bellnier *et al.*, 2006; Allison & Sibata, 2010). Isto indica que é difícil inferir acerca da potencial reação que se formará. O AISPC (*aluminum sulphonated phthalocyanine*) é outro composto fotossensibilizador que também mostrou gerar fotossensibilidade cutânea quando administrado na dose de 5 mg/kg e os animais irradiados durante 5 min num DLI de 2 h; a reação gerada surgiu após 1 h e manteve-se durante 1 semana (Tralau *et al.*, 1989). O TOOKAD, que se encontra atualmente em ensaios clínicos de fase III, é um composto que se elimina rapidamente do organismo e, portanto, é um dos compostos que tem registado menores reações de fotossensibilidade cutânea, sendo que para se verificar alguma reação cutânea este tem que ser administrado em doses muito superiores às usadas na clínica e, ainda neste caso, a reação só é visível durante algumas horas (Weersink *et al.*, 2005).

Embora se tratem de ensaios distintos e que não seguem as mesmas condições experimentais, ainda assim é possível verificar o avanço que se tem feito relativamente à diminuição da fotossensibilidade cutânea, uma vez que todos os compostos mencionados, incluindo o F₂BMet, mostraram provocar reações menos intensas e durante menos tempo que o Photofrin[®], e até do que o Foscan[®].

Considerando todos os resultados obtidos para os diversos compostos posso afirmar que o F₂BMet se revela um composto promissor para a terapia fotodinâmica.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

O presente estudo proporciona um perfil farmacocinético detalhado, permitindo racionalizar e prever observações tais como os danos nos tecidos sãos. Estas informações são importantes para uma melhor conjugação dos parâmetros que condicionam a eficácia desta terapia e, desta forma, potenciar a eficácia da mesma.

Os resultados obtidos relativamente à fotossensibilidade cutânea, ainda que preliminares, permitem-nos inferir acerca da extensão desta reação e propor um período de uma semana de proteção da exposição direta ao sol, o que se torna bastante satisfatório quando comparado com os fotossensibilizadores que já se encontram aprovados e disponíveis para utilização.

A busca por melhores agentes fotossensibilizadores, com melhores propriedades farmacocinéticas e físico-químicas, tem levado ao desenvolvimento de inúmeras moléculas, ainda que muitas acabem por não se verificar assim tão eficazes ou vantajosas, uma vez testadas *in vivo*. De acordo com as características ideais que um fotossensibilizador deve possuir e tendo em consideração estudos prévios, quer *in vitro* quer *in vivo*, o F₂BMet revela um grande potencial para se vir a tornar, brevemente, um fotossensibilizador aprovado para aplicação na terapia fotodinâmica, para o tratamento do cancro.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- ACKROYD, R., *et al.* – The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. ISSN 1751-1097. 74:5 (Nov 2001), p. 656-669.
- AGOSTINIS, P., *et al.* – Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. ISSN 1542-4863. 61:4 (Jul 2011), p. 250-281.
- ALLISON, R. R., *et al.* – Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. ISSN 1572-1000. 1 (2004), p. 27-42.
- ALLISON, R. R., *et al.* - Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers - A review of applications and outcomes. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. ISSN 1572-1000. 2. (2005), p. 205-222.
- ALLISON, R. R., SIBATA, C. H. – Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. ISSN 1572-1000. 7 (Abr 2010), p. 61-75.
- American Cancer Society – Learn About Cancer. [Em linha], 2012. [Consult. 24 Abr 2012]. Disponível em: <http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/what-is-cancer>
- BELLNIER, D. A., *et al.* – Mild skin phototoxicity in cancer patients following injection of Photochlor (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a; HPPH) for photodynamic therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* ISSN 1432-0843. 57 (2006), p. 40-45.
- BOVIS, M. J., *et al.* – Improved *in vitro* delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*. ISSN 0168-3659. 157 (2012), p. 196-205.

- BROWN, S. B., BROWN, E. A., WALKER, I. – The present role and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*. ISSN 1470-2045. 5 (Ago 2004), p. 497-508.
- CancerHelp UK – The Cancer Cell. [Em linha], actual. 3 Nov. 2011. [Consult. 24 Abr 2012]. Disponível em: <http://cancerhelp.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/cells/the-cancer-cell>
- CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R. – Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localizations and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. ISSN 1572-1000. 2 (Fev 2005), p. 91-106.
- CASTANO, A., MROZ, P., HAMBLIN, M. R. - Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*. ISSN 1474-175X. 6:7 (Jul 2006), p. 535-545.
- CRAMERS, P., *et al.* – Foscan[®] uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *British Journal of Cancer*. ISSN 1532-1827. 88:2 (2003), p. 1532-1827.
- DĄBROWSKI, J. M., *et al.* – New Halogenated Water-Soluble Chlorin and Bacteriochlorin as Photostable PDT Sensitizers: Synthesis, Spectroscopy, Photophysics, and in vitro Photosensitizing Efficacy. *Chem. Med. Chem.* ISSN 1860-7187. 5 (Ago 2010), p. 1770-1780.
- DĄBROWSKI, J. M., *et al.* – Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: Evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy *in vitro*. *Free Radicals Biology & Medicine*. ISSN 0891-5849. 62 (2012), p. 1188-1200.
- DANIELL, M. D., HILL, J. S. – A History of Photodynamic Therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*. ISSN 1445-2197. 61:5 (Maio 1991), p. 340-348.
- DESROCHES, M. C., *et al.* – Pharmacokinetics of a tri-glucoconjugated 5,10,15-(*meta*)-trihydroxyphenyl-20-phenyl porphyrin photosensitizer for PDT. A single dose study in the rat. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. ISSN 1011-1344. 85:1 (2006), p. 56-64.
- DOUGHERTY, T. J., *et al.* – Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. ISSN 0027-8874. 90:12 (1998), p. 889-905.

- DOUGHERTY, T. J. – An update on photodynamic therapy applications. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*. ISSN 1044-5471. 20:1 (Fev 2002), p. 3-7.
- ETHIRAJAN, M., et al. – The Role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev*. ISSN 1460-4744. 40 (2011), p. 340-362.
- FERLAY, J., et al. – GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10 [Em Linha]. Lión, França: International Agency for Research on Cancer (2010). [Consult. 25 Abr 2012]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>
- FORD, D., et al. – Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *The American Journal of Human Genetics*. ISSN 0002-9297. 62 (1998), p. 676-689.
- GOMER, C. C., DOUGHERTY, T. J. – Determination of [³H] and [¹⁴C] hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.* ISSN 1538-7445. 39 (1979), p. 596-602.
- HOOPEL, C. – Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *The Lancet Oncology*. ISSN 1470-2045. 1 (2000), p. 212-219.
- HUANG, Z. – A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat*. ISSN 1533-0338. 4:3 (2005), p. 283-293.
- JEMAL, A., et al. – Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. ISSN 1542-4863. 61 (2011), p.69-90.
- KRAMMER, B. - Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer research*. ISSN 0250-7005. 21:6B (2001), p. 4271-4277.
- KUDINOVA, N. V., BEREZOV, T. T. – Photodynamic Therapy of Cancer: Search For Ideal Photosensitizer. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. ISSN 1990-7508. 4:1 (2010), p. 95-103.
- MROZ, P., et al. – Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy. *The FASEB Journal*. ISSN 1530-6860. 24:9 (2010), p. 3160-3170.
- NOWIS, D., et al. – The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. ISSN 1572-1000. 2 (2005a), p. 283-298.

- NOWIS, D., *et al.* – Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*. ISSN 0001-527X. 52:2 (2005b), p. 339-352.
- National Cancer Institute (NCI) - BRCA1 and BRCA2: Cancer Risk and Genetic Testing. [Em linha], 2009. [Consult. 24 Abr 2012]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/BRCA>
- NYMAN, E. S., HYNNINEN, P. H. – Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. ISSN 1011-1344. 73 (2004), p. 1-28.
- O'CONNOR, A. E., GALLAGHER, W. M., BYRNE, A. T. – Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*. ISSN 1751-1097. 85:5 (2009), p. 1053-1074.
- PASZKO, E., *et al.* – Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. ISSN 1572-1000. 8:1 (2011), p. 14-29.
- PENG, Q., *et al.* – Uptake, localization and photodynamic effect of meso-tetra(hydroxyphenyl) porphine and its corresponding chlorin in normal and tumour tissue of mice bearing mammary carcinoma. *Cancer Res.* ISSN 1538-7445. 55 (1995), p. 2620-2626.
- PEREIRA, M. M., *et al.* – Synthesis and photophysical characterization of a library of Photostable halogenated bacteriochlorins: an access to near infrared chemistry. *Tetrahedron*. ISSN 0040-4020. 60 (2010), p. 9545-9551.
- PUSHPAN, S. K., *et al.* - Porphyrins in Photodynamic Therapy - A Search for Ideal Photosensitizers. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*. ISSN 1568-0118. 2:2 (2002), p. 187-207.
- RISCH, H., *et al.* – Prevalence and Penetrance of Germline BRCA1 and BRCA2 Mutations in a Population Series of 649 Women with Ovarian Cancer. *The American Journal of Human Genetics*. ISSN 0002-9297. 68 (2001), p. 700-710.
- RICHTER, A., *et al.* – Characterization of benzoporphyrin derivative, a new photosensitizer. *Advances in Photochemotherapy*. (1989). Vol. 997. ISBN 9780819400321. P.132-301.

- RICHTER, A. M., *et al* – Mouse skin photosensitization with benzoporphyrin derivatives and Photofrin® macroscopic and microscopic evaluation. *Photochemistry and Photobiology*. ISSN 1751-1097. 53:2 (1991), p. 281-286.
- ROBERTSON, C. A., HAWKINS, D., ABRAHAMSE, E. H. – Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications of PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. ISSN 1011-1344. 96 (Abr 2009), p. 1-8.
- TRALAU, C. J., *et al*. – Mouse skin photosensitivity with dihaematoporphyrin ether (DHE) and aluminium sulphonated phthalocyanine (AISPc): a comparative study. *Photochemistry and Photobiology*. ISSN 1751-1097. 49:3 (1989), p. 305-312.
- US National Institute of Health - Efficacy and Safety Study of TOOKAD® Soluble for Localised Prostate Cancer Compared to Active Surveillance. (PCM301). [Em linha], actual. 5 Jul 2012. [Consult. 20 Ago 2012]. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01310894>
- VAKRAT-HAGLILI, Y., *et al*. – The microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by Pd-bacteriopheophorbide. *J. Am. Chem. Soc.*. ISSN 0002-7863. 127:17 (2005), p. 6487-6497.
- WEERSINK, R. A., *et al*. – Assessment of cutaneous photosensitivity of TOOKAD (WST09) in preclinical animal models and in patients. *Photochemistry and Photobiology*. ISSN 1751-1097. 81 (2005), p. 106-113.
- WOLFORD, S. T., NOVICKI, D. L., KELLY, B. – Comparative Skin Phototoxicity in Mice with Two Photosensitizing Drugs: Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A and Porfimer Sodium (Photofrin). *Fundamental and Applied Toxicology*. ISSN 0272-0590. 24 (1995), p. 52-56.
- World Health Organization (WHO) – Cancer Fact Sheet N° 297. [Em linha], 2012. [Consult. 14 Mar 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>