



EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL CÁNCER COLORECTAL BASADA EN FOTOTERAPIA: CARACTERIZACIÓN Y EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE UN DERIVADO DE LAS FTALOCIANINAS

Trabajo de Fin de Máster en Investigación Biomédica

Cristina Andrés Ledesma

Tutores: Maria Dolores Ganfornina y Diego Sánchez

Julio 2016

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	Página 3
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	Página 9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	Página 10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Página 14
CONCLUSIONES.....	Página 21
BIBLIOGRAFÍA.....	Página 22

INTRODUCCIÓN

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad fotoquímica aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y enfermedades que cursan con neovascularización ^{1,2}. La terapia fotodinámica (TFD) tiene el potencial para satisfacer muchas necesidades médicas no cubiertas actualmente. Aunque todavía emergente, ya es una modalidad terapéutica con éxito utilizada para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas.

COMPONENTES BÁSICOS DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA

La TFD es un procedimiento de dos etapas que consta de tres componentes esenciales que son: el fotosensibilizador (PS), la luz y el oxígeno ^{3,1,4}. Ninguno de estos componentes es tóxico por separado, pero combinados inician una reacción fotoquímica que termina en la generación de un producto altamente reactivo denominado oxígeno singlete (1O_2) ^{4,5}. La contribución relativa de los diferentes mecanismos depende del tipo y dosis de PS utilizada, el tiempo entre la administración del PS y la exposición a la luz, la dosis de luz total, la concentración de oxígeno tumoral y otras variables que actualmente no son conocidas. Por lo tanto, la determinación de las condiciones óptimas para el uso de TFD requiere un esfuerzo interdisciplinario coordinado ⁵.

¿En qué se basa?

Consiste en la inyección de una molécula fotosensibilizadora que se acumula selectivamente en el sitio de la lesión, seguida de la irradiación con luz localmente en el tumor a una longitud de onda adecuada que active el medicamento específico ⁶. La irradiación conlleva la generación de oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno ⁷ que pueden provocar una toxicidad significativa que conduce a la muerte celular por apoptosis o necrosis ^{5,6}.

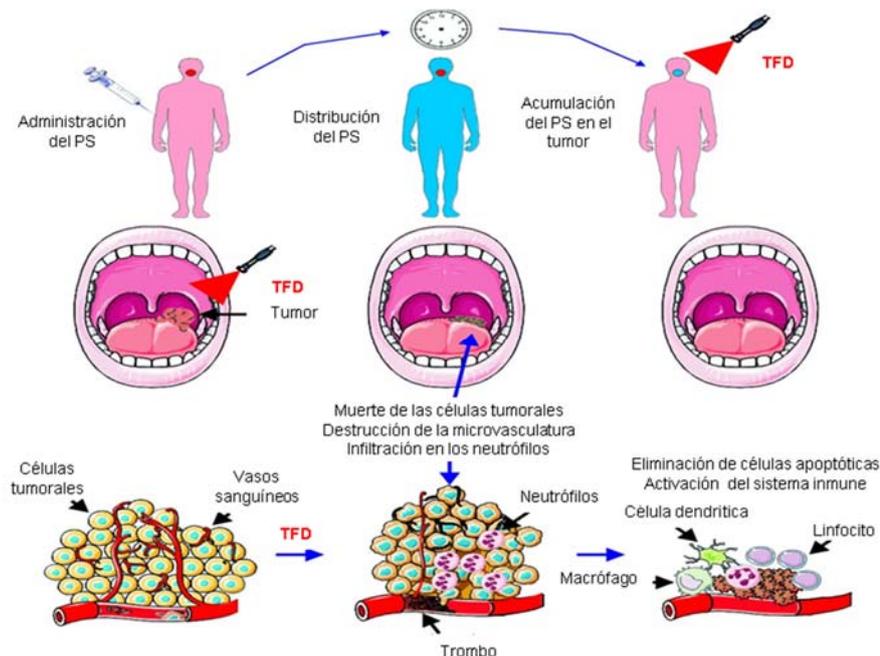


Figura 1. Principios de la TFD

Un diagrama simplificado de los niveles de energía de las posibles vías para la energía de absorción y emisión se muestra en la Figura 2 ².

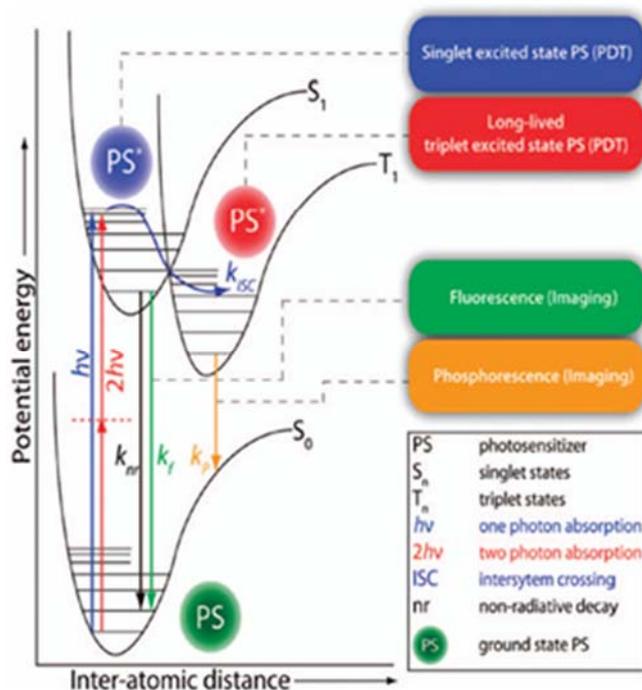


Figura 2. Diagrama de energía para una molécula fotosensibilizadora ².

La selectividad del compuesto depende de la capacidad de los fotosensibilizadores para localizar lesiones neoplásicas y de la cantidad de luz precisa irradiada en los sitios tratados. Una de las limitaciones actuales de esta terapia es su ineficacia contra las lesiones metastásicas que son la causa más frecuente de mortalidad en los pacientes con cáncer. En el caso de tumores inoperables, una vez agotadas otras opciones de tratamiento, esta terapia puede conseguir una mejora en la calidad de vida. Los únicos efectos adversos de la TFD se relacionan con el dolor durante algunos protocolos de tratamiento y una fotosensibilización persistente de la piel que se ha conseguido eliminar en los fotosensibilizantes más modernos ⁵.

Fotosensibilizadores

Un agente fotosensibilizador ideal debería ser un único compuesto puro que permitiera el análisis con bajos costes de fabricación y una buena estabilidad en almacenamiento. Debe presentar un pico de alta absorción entre 600 y 800 nm ya que la absorción de los fotones con longitudes de onda superiores a 800 nm no proporciona suficiente energía para excitar el oxígeno a su estado singlete, y por lo tanto no se formarán especies reactivas de oxígeno tras la irradiación ⁵.

Las propiedades fotofísicas del PS y el lugar de acción intracelular son claves para determinar una dosis eficaz y el tipo de muerte celular. Desafortunadamente para que el tratamiento sea eficaz se requieren dosis altas o potentes radiaciones ⁸.

Hasta hace poco se creía que era más útil un intervalo amplio entre la administración de las drogas y la radiación, de manera que al sensibilizador le da tiempo suficiente para difundirse desde los tejidos normales. Algunos informes ahora sugieren que la respuesta del tumor podría ser mejor cuando el intervalo entre la administración de las drogas es más corto, de modo que el PS todavía esté presente en los vasos sanguíneos, ocasionando un marcado daño vascular ⁹.

El primer PS que se ha empleado clínicamente para la terapia del cáncer ha sido una mezcla de porfirinas soluble en agua denominada derivado de hematoporfirina (DHP). La forma purificada se conoce como Fotofrina. Aunque sigue siendo el PS más empleado, tiene algunos inconvenientes como absorbancia relativamente baja a 630 nm y una fotosensibilidad de larga duración en la piel (incluso hasta 12 días). Para evitar esta reacción, los pacientes deben permanecer fuera de la luz del sol durante aproximadamente 1 mes ¹⁰. Estos efectos se podrían mejorar, pero gracias a los esfuerzos de numerosos químicos medicinales se han descubierto fotosensibilizadores de segunda generación, llegando a proponerse como potencialmente útiles para el cáncer un centenar de ellos.

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es un precursor biosintético de la protoporfirina IX ¹¹ y ha dado lugar a muchas aplicaciones en las que el ALA o ésteres de ALA se han aplicado por vía tópica o administrado por vía oral. Estos se han considerado como "pro-fármacos"; moléculas inactivas que para activarse necesitan ser convertidos a protoporfirina ^{5,12}.

Para mejorar la eficacia de la TFD se han desarrollado fotosensibilizadores de segunda generación. Una de las clases más prometedoras son las ftalocianinas y derivados de las mismas ¹³, debido a un alto rendimiento en la producción de ¹O₂, un amplio rango fototerapéutico (600 a 900 nm) y una excelente actividad fotodinámica in vitro e in vivo ^{1,14,15}. Junto con las familias de las clorinas (como purpurinas y bacterioclorinas) y con las porfirinas constituyen los tres grupos típicos de PS ⁴.

Desde el punto de vista estructural las ftalocianinas son macromoléculas de polímeros químicos de color azul, verde o púrpura con una estructura plana extendida (tetraporfirinas con cuatro anillos benzo fusionados adicionalmente) y con cuatro puntos de simetría, lo que le confiere estabilidad química y térmica (Figura 3). Las dos zonas con deslocalización de electrones π son las que le confieren las propiedades físicas tan particulares ^{16,17}. Además son capaces de incorporar hasta 70 cationes metálicos y no metálicos diferentes en su anillo central, y una amplia variedad de sustituyentes en el macrociclo. Esta flexibilidad química facilita el procesamiento de estas sustancias ^{17,18}.

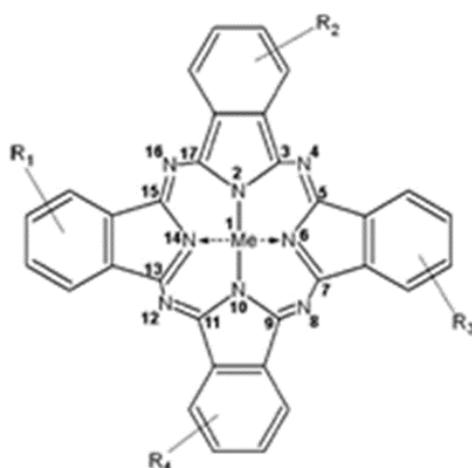


Figura 3. Estructura química de las ftalocianinas

Respecto a sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas los espectros electrónicos se caracterizan especialmente por la presencia de dos bandas de absorción fuertes,

denominadas bandas B y Q. La banda B en la región UV (300-400 nm) y la banda Q en la parte visible del espectro, alrededor de 600 a 700 nm ¹⁹.

Se trata de moléculas fluorescentes, que se activan a 100 J/cm² y se acumulan en la mitocondria induciendo apoptosis. Presentan un aclaramiento de unas 24 horas, lo cual minimiza la fotosensibilización ⁹. Se caracterizan por su baja toxicidad ¹⁶ y elevada hidrofobicidad, por lo que favorecen la formación de agregados inactivos, que explica la preparación de formulaciones para facilitar la penetración celular llegando a alcanzar los 10 mm ^{20,21}. Por ejemplo se ha estudiado que la incorporación de ftalocianinas de zinc en liposomas mejora la eficacia terapéutica, aunque conlleva un aumento en el coste del tratamiento ²².

Hace dos años se estudió que la combinación de la espectroscopía de Raman y fluorescencia servía para estudiar la distribución y la agregación de las ftalocianinas tetrasulfonadas con aluminio en tejido canceroso y tejido sano de mama, y que resultaban ser un buen fotosensibilizador en la TFD ²³.

MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR LA TFD

El tiempo de vida del oxígeno singlete (¹O₂) es muy corto (~ 10-320 ns), lo que limita su difusión a 10-55 nm en las células ²⁴. Por esta razón el daño fotodinámico se produce muy cerca de la ubicación intracelular del PS. De los otros agentes fotosensibilizantes en uso, la clorina NPe6 actúa en los lisosomas, el derivado de benzoporfirina (DBP) actúa en las mitocondrias y la m-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC) actúa en las mitocondrias o en el retículo endoplasmático (RE) o en ambos. Los mecanismos de acción de la TFD en los tumores se muestran en la figura 4 ^{25,26}.

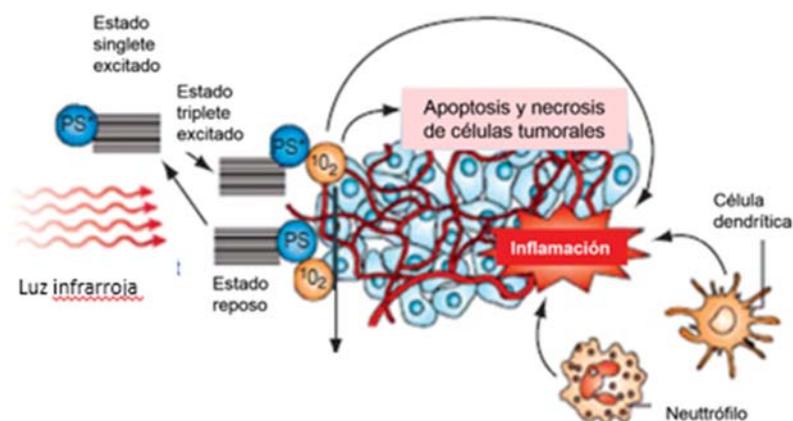


Figura 4. Mecanismos de acción de TFD en los tumores ²⁶.

La TFD puede ocasionar tres principales vías de muerte celular: apoptosis, necrosis y muerte celular asociada a la autofagia. Generalmente es la apoptosis el tipo de muerte celular que sufren las células tras la TFD. La membrana mitocondrial externa se permeabiliza después del daño fotodinámico, donde participan proteínas de la familia Bcl-2 (provocando la liberación de moléculas que activarán a las caspasas) ²⁷ y mayoritariamente la proteína supresora de tumores p53 ⁷.

La fototoxicidad es un proceso en el que participan varias proteasas como las caspasas y calpaínas además de vías no apoptóticas ⁷. Típicamente la inhibición o la deficiencia genética de las caspasas provoca un retraso en la fototoxicidad o modifica el tipo de muerte celular hacia formas de necrosis ²⁸.

Las evidencias sugieren que cierta forma de necrosis se puede propagar a través de cascadas transductoras de señales ²⁹. Los mecanismos moleculares que conllevan al proceso de necrosis programada son todavía difíciles de alcanzar, aunque se sabe que están implicados: la activación de RIP1 quinasa (Receptor de proteína de interacción 1), la producción excesiva de ROS mitocondrial, el daño lisosomal y el aumento de Ca²⁺ intracelular ^{29,30}.

El daño que sufre la membrana mitocondrial interna (debido a la luz) y la elevada concentración de calcio intracelular pueden alterar la transición de la permeabilidad mitocondrial, un fenómeno que favorece a la necrosis en lugar de a la fototoxicidad apoptótica ^{7,31}.

El daño causado por la luz en las células también puede conllevar a la estimulación de la autofagia ^{32,33}. Esta es una vía lisosomal de la degradación y el reciclaje de proteínas y orgánulos intracelulares. La autofagia puede ser estimulada por varias señales de estrés incluyendo el estrés oxidativo. Este proceso puede tener un efecto citoprotector y un efecto tras la quimioterapia, incluyendo aquellos que involucran ROS como agentes de daño primario ³⁴.

Puede considerarse a la autofagia un mecanismo para mantener la viabilidad celular posterior al daño fotodinámico ³³. El PS que daña los compartimentos lisosomales puede comprometer la finalización del proceso de autofagia, causando el aclaramiento incompleto de la carga autofagia. La acumulación de las ROS (liberadas de los componentes citoplasmáticos dañados) potencia la fototoxicidad en las células apoptóticas ³³.

Una mejor comprensión de la interacción entre la autofagia, la apoptosis y la necrosis, y de cómo estos procesos conducen a la mejora de la respuesta del tumor es un requisito para diseñar mejores estrategias terapéuticas en la TFD.

MECANISMOS CRIOPROTECTORES

Existen diferentes mecanismos citoprotectores que desarrollan las células cancerosas para evitar el efecto citotóxico de TFD ⁷.

El primer mecanismo identificado se basa en la variación de los niveles de las moléculas antioxidantes expresadas por las células cancerígenas ³⁵. Algunos antioxidantes solubles en agua, por ejemplo- aminoácidos, glutatión (GSH) o la vitamina C y antioxidantes solubles en lípidos como la vitamina E pueden presentar variaciones en diferentes tipos celulares que explican la sensibilidad a esta terapia ³⁶.

El segundo mecanismo está asociado a la expresión de enzimas (por parte de las células cancerosas) que eliminan las ROS. Aunque no existe una enzima celular específica que elimine directamente ¹O₂, diferentes enzimas están implicadas en el metabolismo de ROS y pueden influir en el efecto citotóxico de la TFD. Por ejemplo, la sobre-expresión de la superóxido dismutasa (SOD), o el tratamiento con análogos de esta enzima contrarrestan el efecto citotóxico de TFD ³⁷.

También se ha observado un aumento de la actividad SOD en varios tipos de células tras la TFD, y esto se asocia con una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa y de la catalasa ³⁸.

El tercer mecanismo citoprotector involucra proteínas que codifican genes que a la vez son inducidos por TFD. Aunque existen diferentes categorías, la mayor parte de ellas son vías que regulan la TFD induciendo apoptosis ³⁹ o participando en la reparación de las lesiones inducidas por el estrés oxidativo. La inhibición de NF-κB, por la sobre-expresión del represor IκBα o por el uso de inhibidores farmacológicos, sensibiliza a

las células cancerosas a la apoptosis. Otros factores de transcripción relacionados con el estrés inducido por TFD incluyen AP-1, Nrf2 y el factor inducible por hipoxia (HIF) ⁵.

La hipoxia es el estímulo más importante de la angiogénesis. Esta vía es regulada por el factor de transcripción inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α) ^{40,41}. HIF-1 es un complejo heterodimérico formado por dos proteínas hélice-lazo-hélice HIF-1 α y HIF-1 β (ARNT = aryl hidrocarbon receptor nuclear traslocator). La expresión de ARNT es constitutiva, mientras que HIF-1 α se degrada rápidamente en condiciones de normoxia. La hipoxia induce la estabilización de la subunidad HIF-1 α , que a su vez permite la formación del complejo proteico transcripcionalmente activo. Se han identificado una serie de genes sensibles al HIF-1 como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la eritropoyetina y el transportador 1 de la glucosa ²⁶.

La TFD induce la expresión de diversas proteínas Hsp (proteínas de shock térmico) que presentan un papel protector. Por ejemplo, la transfección de células tumorales con el gen Hsp 27 aumenta la supervivencia de las células tumorales después de la TFD ⁴². Del mismo modo, el aumento de los niveles de Hsp 60 y Hsp 70 están inversamente correlacionado con la sensibilidad a la terapia fotodinámica ^{43,44}. La explicación más sencilla es la capacidad que tienen estas proteínas Hsp para unirse a las proteínas dañadas por oxidación. Por otra parte, la función intracelular de Hsp no sólo se limita a desplegar estas proteínas con importancia a nivel intracelular para inhibir la muerte celular por apoptosis, sino que también promueven la formación de complejos estables con los antígenos tumorales citoplasmáticos ²⁶.

Muchas de las proteínas Hsp juegan un papel crítico en la regulación de las vías de supervivencia. La TFD también conduce a un incremento de la ubiquitinación de proteínas carbonadas marcadas para su degradación en el proteasoma, de forma que previene la formación de agregados de la proteína tóxica ⁴⁵.

APLICACIONES

El uso clínico de la terapia fotodinámica para tratar el cáncer comenzó a finales de 1970, cuando se hizo un estudio sobre los efectos de un derivado de hematoporfirina (DHP) en presencia de luz en cinco pacientes diagnosticados de cáncer de vejiga ⁴. En 1978, Dougherty informó de los primeros pacientes tratados con éxito con TFD con el derivado de hematoporfirina ⁴⁶. Se observaron respuestas parciales o completas en 111 de 113 lesiones malignas. De la gran variedad de tumores examinados, en todos se observó respuesta. Desde estos primeros trabajos, se han llevado a cabo más de 200 ensayos clínicos para TFD.

La TFD, además de presentar utilidad paliativa, puede ser un posible tratamiento en los estadios iniciales de diferentes tumores como cáncer de piel, pulmón, tumores digestivos (ftalocianinas de zinc glucoconjugadas en células HT-29) ¹⁶ y cervical como en carcinomas de células basales ^{11,47,48}. También se ha comprobado que es útil para enfermedades y lesiones precancerosas como los glioblastomas, tumores hipofisarios, cáncer de vejiga y cuello de útero ^{3,49,50}. Las aplicaciones de esta técnica están creciendo en la actualidad, que pretende ser una terapia curativa en algunos tumores, englobando tumores de la piel ¹¹, adenocarcinoma hepático ⁵¹, así como en la degeneración macular asociada a la edad y otras enfermedades infecciosas ⁵².

Numerosos estudios han sido diseñados para optimizar las condiciones de la TFD, siendo aprobada en diferentes países. Sin embargo una consecuencia inherente a este tratamiento es la hipoxia local que puede producirse de manera directa por el consumo de oxígeno durante el tratamiento ⁵³⁻⁵⁵, o indirectamente ocasionada por la destrucción de la vasculatura tumoral como resultado del tratamiento ^{56,57}.

COMBINACIÓN CON OTRAS TERAPIAS

Las combinaciones de diferentes modalidades terapéuticas, sin efectos tóxicos, son algunas de las estrategias utilizadas comúnmente para mejorar el índice terapéutico de los tratamientos empleados en la oncología moderna. Dos enfoques generales que pueden aumentar la eficacia antitumoral de la terapia fotodinámica son:

1. La sensibilización de las células tumorales a TFD.
2. La interferencia con respuestas moleculares citoprotectoras desencadenadas por la TFD en las células tumorales supervivientes.

Cualquier interacción entre los agentes de la TFD y los sensibilizantes a esta terapia limitan la zona iluminada. Por lo tanto, la toxicidad potenciada por estas combinaciones no se produce a nivel sistémico. Esto es de especial importancia en pacientes de edad avanzada o inmunodeprimidos que toleran con mayor dificultad tratamientos complejos. Por otra parte, teniendo en cuenta únicamente los efectos citotóxicos dependientes del $^1\text{O}_2$, la TFD sería más segura al combinarse con otros tratamientos antitumorales sin el riesgo de inducir reacciones cruzadas ^{5,58}.

Se han realizado pocos estudios sobre la combinación de la TFD con tratamientos estándar antitumorales. La TFD se puede utilizar en combinación con la cirugía como un neoadyuvante, adyuvante o tratamiento adyuvante repetitivo, guiada por imágenes de fluorescencia para iluminar las lesiones más sospechosas. Un gran beneficio de la TFD comparado con la quimioterapia o radioterapia es que no parece ser carcinogénica, ya que no daña al ADN, actúa a nivel de la membrana celular y reduce la morbilidad a largo plazo. De modo que esta terapia puede ser curativa o complementaria a la intervención quirúrgica, a la quimioterapia o radioterapia ⁵.

Otro enfoque para aumentar la eficacia de la TFD implica aumentar la liberación del PS o incrementar la pérdida de las células tumorales afectadas. El primer caso implica que el PS actúe sobre diversas moléculas dirigidas al tumor. Esto puede ser importante para el tratamiento de tumores en los que grandes áreas superficiales serán iluminadas y por lo tanto se desea una mayor selectividad del tumor ⁵⁹, por ejemplo, en cáncer de vejiga de extensión superficial o metástasis en el peritoneo y en la cavidad pleural.

El uso de compuestos que alteran el flujo de salida del PS también se ha demostrado que es eficaz para sensibilizar las células tumorales a TFD, aunque estos enfoques presentan mayores limitaciones en cuanto a los sustratos de los sistemas de transporte de salida ^{60,61}.

El desarrollo de nuevos fármacos antitumorales específicos diana ha permitido examinar una serie de combinaciones basadas en el siguiente concepto: varios mecanismos moleculares sensibilizan las células tumorales a los efectos citotóxicos de la TFD. Por ejemplo: el Bortezomib es un inhibidor del proteasoma utilizado con éxito en el tratamiento de trastornos hematológicos y potencia los efectos citotóxicos de TFD por agravar el estrés del RE (por acumulación de proteínas dañadas o mal plegadas dentro del RE) ⁴⁵.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que la terapia fotodinámica constituye un método eficaz de tratamiento del carcinoma colorectal hipotetizamos que un nuevo derivado sintético de las ftalocianinas es capaz de conseguir una mortalidad controlada de células tumorales mediante la irradiación con luz UV.

Para ello hemos diseñado unos estudios de caracterización de la sustancia previos a los experimentos en cultivo celular.

En nuestro trabajo hemos utilizado tres compuestos derivados de las ftalocianinas, que han sido químicamente modificados para facilitar la penetración celular y así aumentar la eficiencia del posible tratamiento. Para estudiarlos en detalle hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1) Caracterización espectroscópica de nuevos derivados de las ftalocianinas.
- 2) Estimación de la dosis adecuada de producto mediante la creación de curvas dosis-respuesta sin irradiación lumínica.
- 3) Evaluación de la mortalidad mediante curvas tiempo de irradiación-mortalidad sin periodo de incubación post-iluminación.
- 4) Evaluación de la mortalidad a 60 min de irradiación lumínica con tiempos variables de periodos post-iluminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos derivados de las ftalocianinas:

Este conjunto de compuestos se vienen estudiando con profusión en el campo de la medicina. A pesar de la intensa coloración y fotosensibilidad que muestra la molécula de ftalocianina, su insolubilidad en agua y su capacidad de apilamiento molecular provoca la formación de microgránulos que impiden su acción a escala molecular. Las moléculas que usaremos en este trabajo han sido sintetizadas y donadas por el Dr Fernando Zamora y la Dra M. Carmen González de la Universidad del País Vasco. La complejidad de las reacciones químicas en su síntesis hace que la purificación de un determinado compuesto puro sea compleja sin que se destruya el potencial químico. Se han aislado tres productos principales, que a falta de una caracterización precisa, corresponden a:

- Fe (III)-ftalocianina tetraamidada polisódica que denominamos Pz1.
- Compuesto oligomérico con carácter de polímero amarillo, soluble en agua y de bajo peso molecular que denominamos Pz2.
- Compuesto que incluye a los dos anteriores y un glucóxido incorporado que denominamos Pz3.

1. ESPECTROSCOPIA

Los espectros de absorción en la región UV-Vis se midieron en un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu usando un volumen de 300 μ L, en cubetas de vidrio 10 mmQs (1100-190). Los espectros de fluorescencia fueron medidos en un espectrofluorímetro RF-5301 PC usando cubetas de cuarzo 3 mmQs de 100 μ L. Para comprobar que el espectrofluorímetro está en buenas condiciones para trabajar realicé el espectro de Raman. Se realizan tres mediciones por triplicado para cada experimento, esperando entre cada medición un intervalo de tiempo de 5 min.

La estimación de la eficiencia cuántica de las ftalocianinas, se calculó utilizando una guía validada⁶², realizando los espectros de absorción UV-Vis y emisión del disolvente

base. A continuación se realizaron los espectros de absorción y emisión de cinco soluciones (0,4 μM , 0,8 μM , 1,0 μM , 1,6 μM , 2,0 μM) con concentraciones crecientes de triptófano (la muestra de referencia).

2. CULTIVO CELULAR

SUBCULTIVO DE CÉLULAS EN MONOCAPA MEDIANTE TRIPSINIZACIÓN

Materiales

-Medio de cultivo:

DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco)
Suero bovino fetal 10% (v/v)
Penicilina (10.000 U/mL) + Estreptomicina (10.000 U/mL)
1% L-glutamina (200 mM en 0,85% de solución NaCl)

VOLUMEN TOTAL (0.2% suero)		
Composición	100 ml	250 ml
Suero 0.2%	0.2	0.5
Gln 1%	1	2.5
P/S 1%	1	2.5
DMEM	97.8	244.5

Tabla 1.

- Tampón Fosfato (PBS) estéril
- Solución de tripsina estéril (Tripsina-EDTA 500 mg/L)
- Frascos de cultivo de 25 cm²
- Pipetas estériles
- Tubos de centrífuga (o eppendorf si se trabaja a pequeña escala)
- Cámara de Neubauer

Procedimiento

Condiciones de cultivo

Se ha utilizado la línea de adenocarcinoma de colon humano (HT-29). Las células se han cultivado en un incubador a 37°C y 5% de CO₂ en el medio de cultivo anteriormente indicado. Son células que crecen adheridas al fondo de las placas y frascos de cultivo.

Método de subcultivo

Con el fin de preservar el cultivo en condiciones óptimas se procede a subcultivar las células cuando éstas llegan a sobrepasar el grado de confluencia. De esta forma las células siguen proliferando en los nuevos frascos.

- 1- Observamos las células al microscopio.
- 2- Retiramos el medio de cultivo con una pipeta Pasteur acoplada al sistema de vacío y lavamos la monocapa celular dos veces con PBS a 37°C (añadimos 1 mL con la pipeta serológica y se retira con la pipeta Pasteur).
- 3- Añadimos 1 mL (para frasco de 25 cm²) de solución de tripsina atemperada a 37°C, lo repartimos suavemente por el fondo del frasco y colocamos en el incubador durante 3 min a 37°C.

- 4- Ayudamos a las células a despegarse mediante agitación mecánica (1-2 golpes secos).
- 5- Añadimos 3 mL de medio completo (para frasco de 25 cm²).
- 6- Mezclamos el medio de cultivo con las células en el propio frasco con una pipeta serológica para enjuagar la superficie del frasco.
- 7- Transferimos el medio con las células a un tubo cónico de centrifuga de 10 mL.
- 8- Centrifugamos 4 min a 1200 rpm.
- 9- Eliminamos el sobrenadante cuidadosamente por decantación o mediante una pipeta Pasteur acoplada al sistema de vacío y resuspendemos el pellet en 1 mL de medio completo a 37°C evitando formar burbujas con las células.
- 10- Separamos "10 µL" en un eppendorf para el conteo con trypan blue. Usamos con una dilución a 1/10 (45 µL de PBS, 45 µL trypan y 10 µL de células) según la experiencia adquirida.
- 11- Distribuimos el volumen deseado entre las nuevas placas de cultivo a subcultivar, que contendrán medio de cultivo fresco (hasta 5 mL para frascos de 25 cm²).

Desechamos las células tras un pase 14-16.

Técnica de conteo

En los experimentos hemos realizado el conteo celular en una cámara de Neubauer.

MEDIDAS DE VIABILIDAD CELULAR

Ensayo de viabilidad por MTT

Se basa en la medida de células vivas cuantificando la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales.

La clave se encuentra en la reacción del (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) o MTT de color amarillento, con las deshidrogenasas mitocondriales que rompen el anillo tetrazolio. La rotura del anillo del MTT lleva a la formación de cristales de formazán insolubles de color púrpura. Dichos cristales se solubilizan con la adición de isopropanol ácido y es esta solución púrpura la que se mide espectrofotométricamente (Figura 5). Por tanto, una disminución de la cantidad de formazán indicará una mayor cantidad de citotoxicidad.

Si el ensayo se realiza a tiempos cortos (15 min de tratamiento con MTT) refleja disfunción mitocondrial. A tiempos largos indica viabilidad que es la aplicación para nuestros estudios.

Procedimiento

- 1- Incubamos las células (20.000 células/pocillo) en medio completo MTT (0,5 mg/mL) a 37°C durante 3 h.
- 2- Tras la incubación disolvemos los cristales de formazán añadiendo una mezcla de isopropanol ácido, HCl (37%) y TritonX-100 (50%).
- 3- Añadimos la solución ácida y mezclamos en cada pocillo para disolver los cristales.
- 4- Transferimos a una placa de 96 pocillos un triplicado por cada condición (300 µL por cada pocillo).

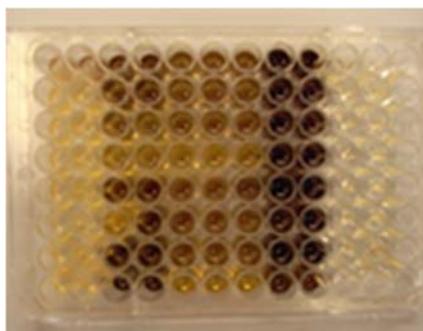


Figura 5. Placa con MTT tras la lectura de varios experimentos.

- 5- Realizamos una lectura de la placa a 570 nm y restamos el fondo medido a 690 nm. El lector de placa que hemos utilizado es VersaMax™ ELISA usando el software SoftMax®Pro.

En los experimentos en los que hemos irradiado con luz UV, los cultivos celulares los hemos colocado en una incubadora a 37°C (Figura 6). La lámpara que hemos utilizado es Typ Netz- Handlampe (Figura 6).



Figura 6. Incubador y lámpara Typ Netz..

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Las diferencias en viabilidad celular en función de la dosis de tratamiento se evaluaron mediante ANOVA por rangos (no paramétrico o test de Kruskal-Wallis), con método de Dunn de comparaciones múltiples post-hoc.

Para detectar la dependencia del tratamiento en función del tiempo utilizando como medida la viabilidad celular, utilizamos el ANOVA con corrección de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

La normalidad se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad mediante el test de Levenne. En todos los casos, los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para los análisis estadísticos se utilizó el software Sigmaplot®11.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Espectrofotométrica

Realizamos los espectros de absorción y emisión de los diferentes Pzs en medio ácido (tampón MES), en medio neutro (agua milli-Q) y en medio básico (tampón Tris) para estudiar la variación de las propiedades espectrofotométricas en función de la variación de pH. El Pz1 presenta un pico de absorción a una longitud de onda de 674 nm en los diferentes pHs. En los espectros de emisión se observan dos picos a una longitud de onda de 450 nm y a 715 nm (Figura 7).

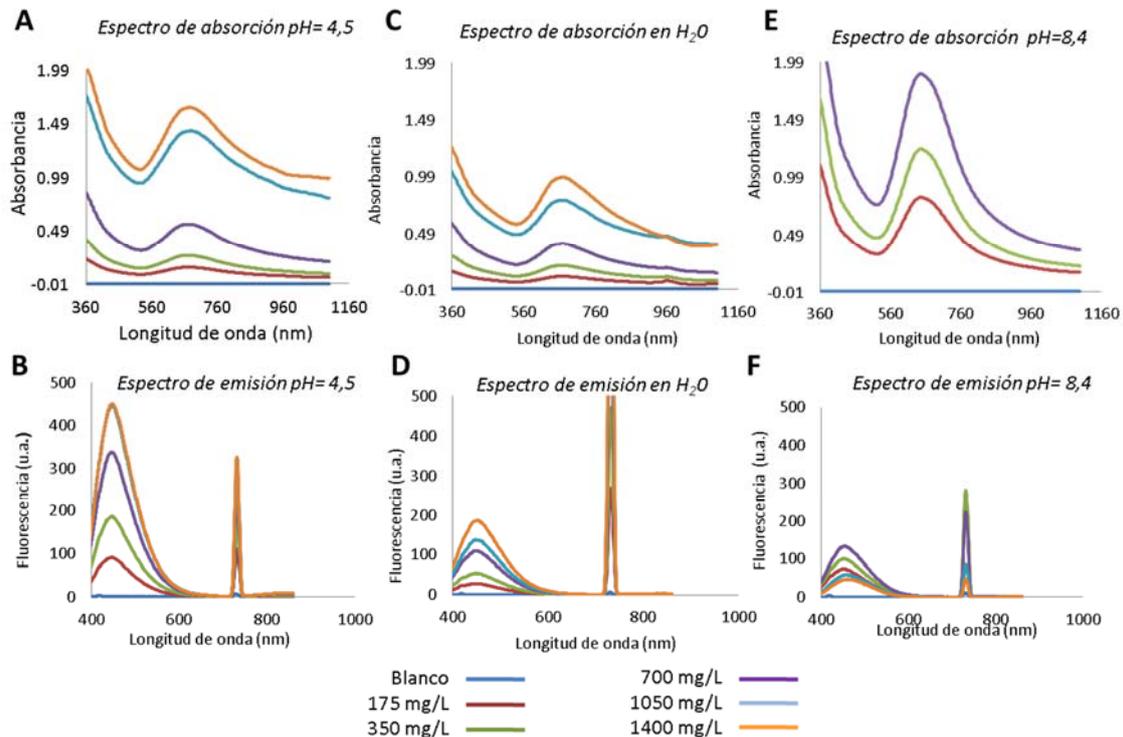


Figura 7. Caracterización espectrofotométrica del Pz1 a cinco dosis diferentes medidas a pH ácido, neutro y básico. Datos expresados como medias ($n=3$ experimentos independientes).

El Pz2 presenta dos picos de absorción uno a 736 nm y a 964 nm en los tres pHs y un pico en los espectros de emisión a 450 nm y a 730 nm independiente del pH (Figura 8).

En los espectros de absorción para el Pz3 observamos dos picos uno a 618 nm y otro a 962 nm y en los espectros de emisión aparecen dos picos a 450 nm y a 730 nm (Figura 9). Con estos resultados nos aseguramos de que el pH no modifica el comportamiento espectrofotométrico de Pz1. Sin embargo, sí se ve un cambio en Pz2 y Pz3 que se corresponde a la ftalocianina con modificaciones en sus cadenas laterales. Por lo tanto, el pH puede influir en la unión de los fotosensibilizadores estudiados con la célula, como describen *Doane et al.*⁶³. Estos cambios pueden deberse a las modificaciones moleculares de las especies monoméricas tras la solvatación, con una fuerte influencia del pH en la agregación molecular demostrada por *Suchan et al.*⁶⁴, *Jancula et al.*¹⁸, *Pan et al.*⁶⁵ y *Saleh et al.*⁶⁶.

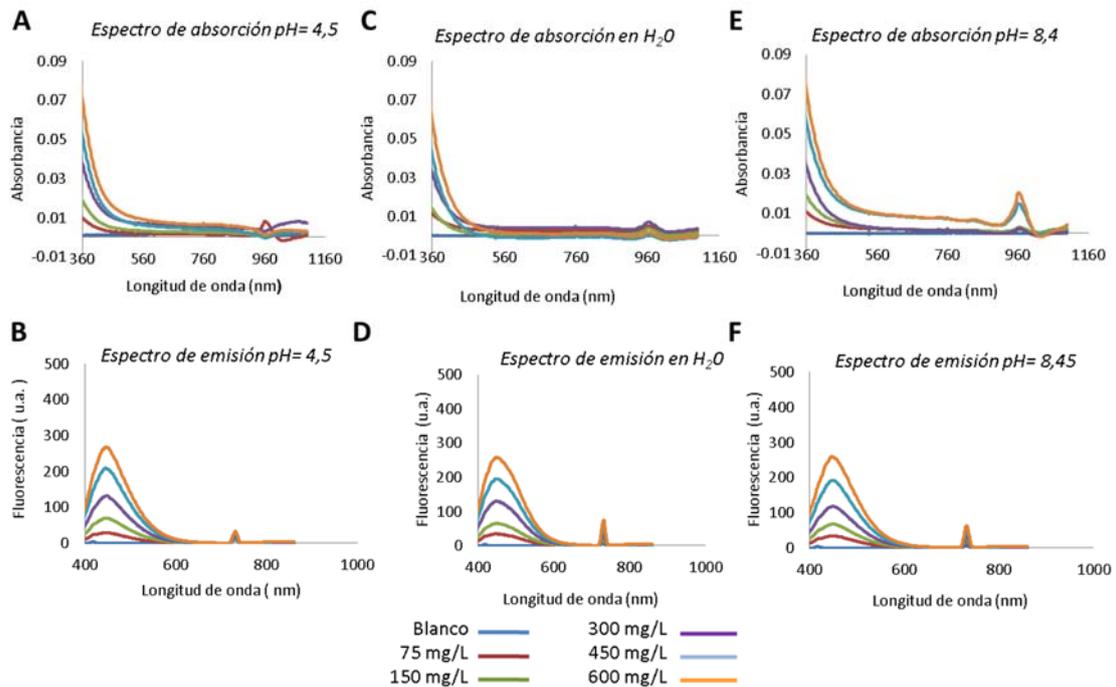


Figura 8. Caracterización espectrofotométrica del Pz2 a cinco dosis diferentes medidas a pH ácido, neutro y básico. Datos expresados como medias ($n=3$ experimentos independientes).

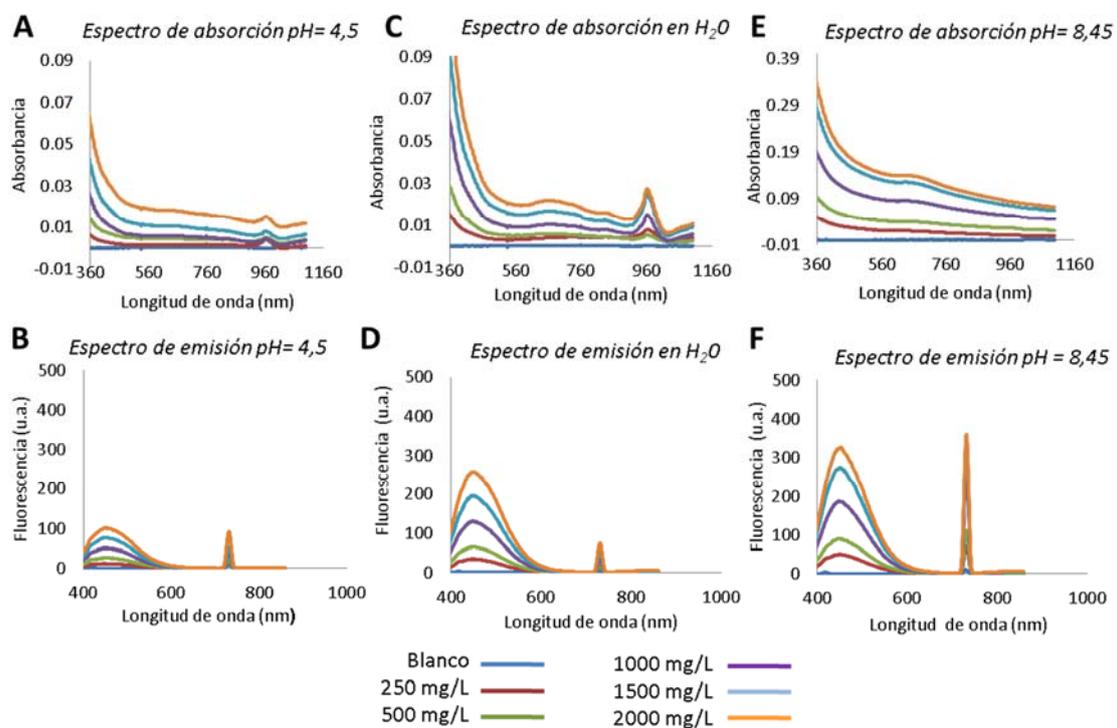


Figura 9. Caracterización espectrofotométrica del Pz3 a cinco dosis diferentes medidas a pH ácido, neutro y básico. Datos expresados como medias ($n=3$ experimentos independientes).

En un segundo grupo de experimentos estudiamos la estabilidad de los fotosensibilizadores comparando el comportamiento espectroscópico en función de la temperatura, probando los compuestos recién preparados y tras su almacenamiento a -20°C . El Pz1 (350 mg/L) preparado en fresco muestra una absorbancia a 648 nm de 0.052 y de 0.070 tras almacenarse a -20°C (Fig 10A). El Pz2 (150 mg/L; Fig 10C) se observa un pico a 962 nm de absorbancia 0.00836 (fresco) y 0.0098 (-20°C). El Pz3 (500 mg/L), con un pico a 654 nm presenta una absorbancia de 0.030 (fresco) y 0.025 (-20°C). Los espectros de emisión para los tres Pzs en las dos condiciones fueron iguales (Fig. 10B,D,F). Esto sugiere que la temperatura de almacenamiento tampoco afecta significativamente al comportamiento de estos fotosensibilizadores ⁶³.

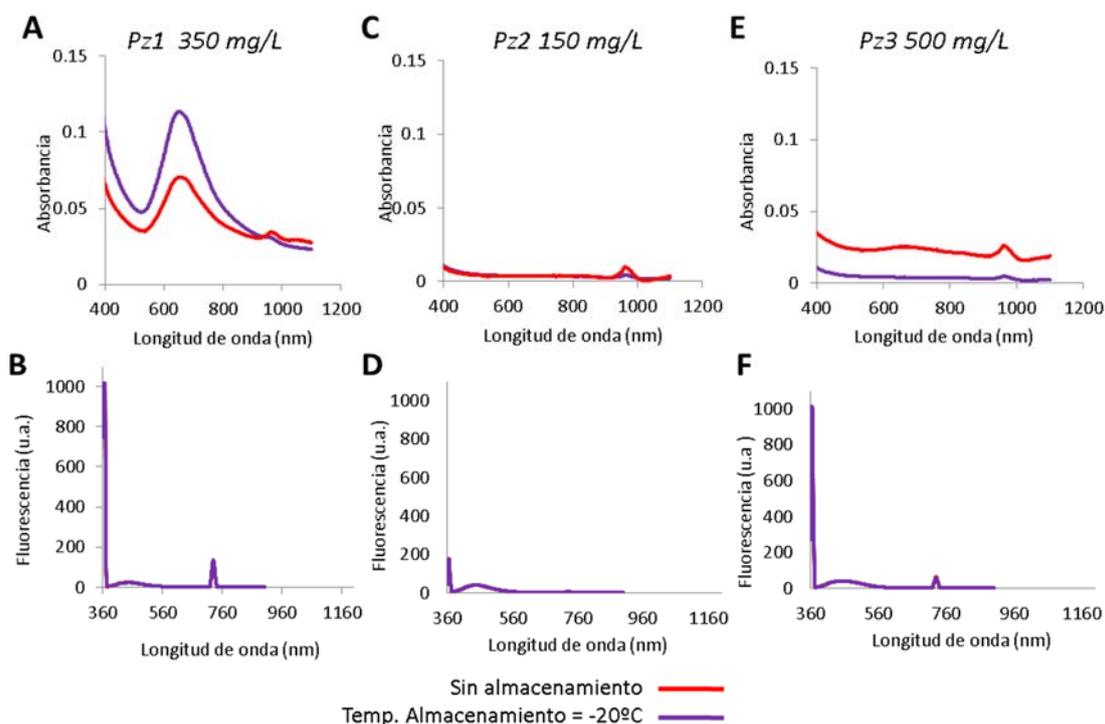


Figura 10. Estudio de estabilidad de los tres Pzs medidos a temperatura ambiente, recién preparados y tras almacenamiento (-20°C). (A) Espectros de absorción del Pz1 350 mg/L. (C) Espectros de absorción del Pz2 150 mg/L. (E) Espectros de absorción del Pz3 500 mg/L. (B) Espectros de emisión del Pz1 350 mg/L. (D) Espectros de emisión del Pz2 150 mg/L. (F) Espectros de emisión del Pz3 500 mg/L. Los datos se expresaron como medias ($n=3$ experimentos independientes).

Para complementar el estudio de los derivados de ftalocianinas estimamos la eficiencia cuántica del Pz3 frente al triptófano (Figura 11). Estimamos sólo la eficiencia de este derivado porque es el que finalmente va a unirse a las células y a funcionar como tratamiento. Para ello se ha representado la fluorescencia frente a la absorbancia del triptófano (un estándar conocido) obteniendo una recta cuya pendiente es 77.89 ($y= 77,89x-3617$). El valor estimado de la eficiencia cuántica Pz3 en el rango 375-600 nm es 1028. Con el Pz3 seleccionamos un punto en este rango porque el compuesto no se ajusta a la ley de Lambert–Beer. Los compuestos como las ftalocianinas presentan la propiedad de agruparse entre sí o interactuar entre ellos, por lo que probablemente no cumplan la ley de Lambert–Beer a estas concentraciones. Calculamos la razón fluorescencia-absorbancia y obtenemos un resultado para el Pz3 de 13 veces superior al del triptófano ($1028/77.89=13$). Con este experimento comprobamos la fotosensibilidad de nuestra droga. En la caracterización de las ftalocianinas la eficiencia cuántica sólo se ha calculado utilizando compuestos orgánicos como muestras de referencia, lo que explica que no podamos compararlo

con lo descrito por otros autores, pero es de especial interés para estudiarlo en experimentos posteriores ⁶⁶⁻⁷¹.

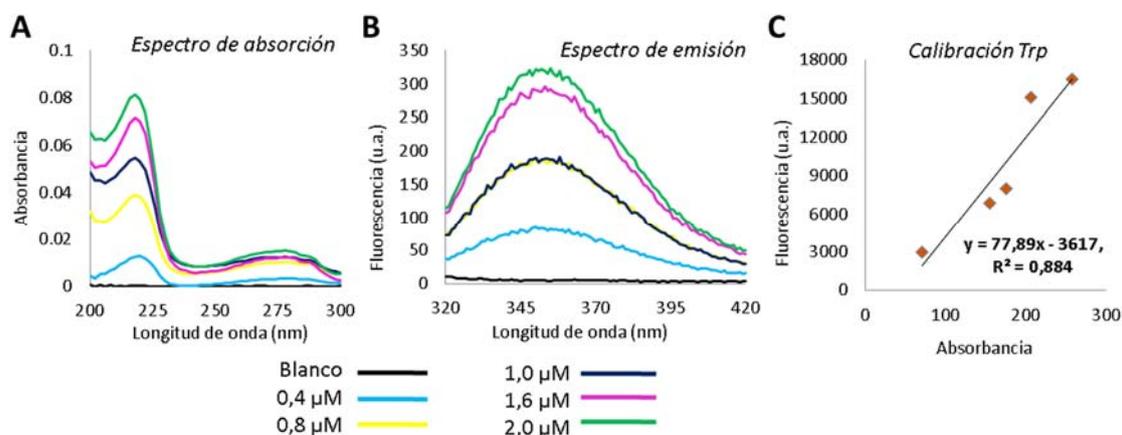


Figura 11. Calibración con triptófano a diferentes dosis. (A) Espectro de absorción del triptófano. (B) Espectro de emisión. (C) Eficiencia cuántica.

Picos de Pz3	FLUORESCENCIA (U.A.)	EFICIENCIA †
375-600 nm	2683,19	1028,24
700-750 nm	73,99	28,35

Tabla 2. Estimación de la eficiencia cuántica del Pz3. †La eficiencia fue calculada como $\text{Fluorescencia} \cdot 5 / \text{Absorbancia}$. Se obtiene una absorbancia de 13,05 estimada como AUC en un intervalo lineal (240-300 nm).

Estimación de la dosis adecuada mediante curvas dosis-respuesta sin irradiación lumínica

Conocer la dosis con la que conseguimos el mayor efecto de viabilidad es clave para nuestro proyecto. La intención es no dañar los tejidos sanos con el tratamiento, por lo que tenemos que administrar una dosis no tóxica. Con la irradiación conseguiremos una toxicidad controlada en la zona del tumor. Para ello estudiamos el efecto de la viabilidad del compuesto activo Pz3 en función de la dosis (Figura 12). Utilizamos cinco dosis diferentes en función de lo ya descrito en la bibliografía ^{72,73,18,65}: 0,6, 1, 6, 60 y 600 mg/L y evaluamos la viabilidad de los cultivos celulares mediante el ensayo de MTT. Obtenemos los siguientes resultados: 96%, 99%, 95%, 82% y 62% de viabilidad para las respectivas dosis de Pz3. Como se aprecia en la figura, alcanzamos el mayor efecto de viabilidad del Pz3 con la dosis de 1 mg/L. El análisis estadístico muestra que sólo encontramos diferencias significativas entre el grupo control y la dosis de 600 mg/L ($p = 0,024$), y decidimos seguir los experimentos con la dosis de 1 mg/L para asegurar la mínima toxicidad. Estos valores son comparables a otros estudios con dosis de 4,7 μg/mL de ftalocianinas de aluminio (92% de viabilidad celular) en el estudio de *Pan et al.* ⁶⁵ y un 99% con 1,25 μM de ftalocianinas de zinc (*Lui et al* ⁷⁴).

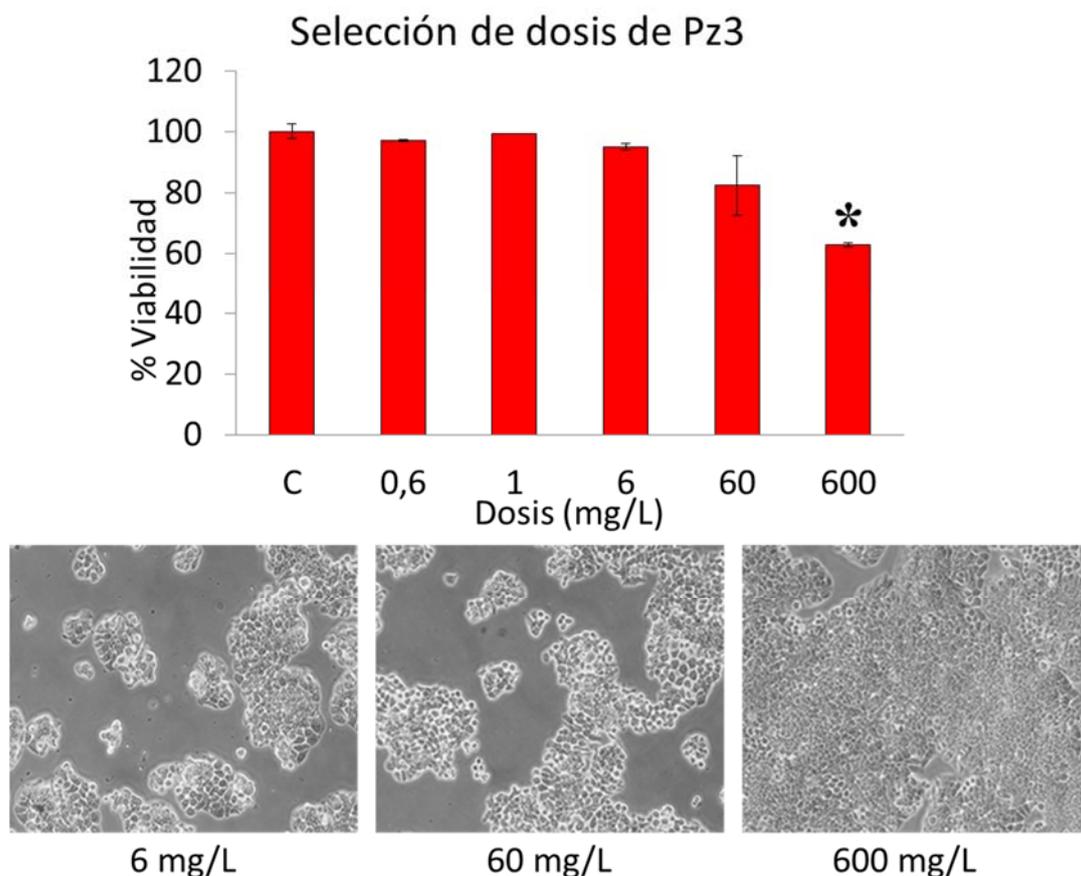


Figura 12. Resultados del efecto de la viabilidad del Pz3 en función de la dosis. Las dosis estudiadas fueron: 0,6 mg/L, 1 mg/L, 6 mg/L, 60 mg/L y 600 mg/L. Los datos se expresaron como medias \pm desviación estándar ($n=3$ experimentos independientes); * $p<0.05$.

Evaluación de la mortalidad mediante curvas tiempo de irradiación-viabilidad sin periodo de incubación post-iluminación

Una vez que hemos seleccionado la dosis de 1 mg/L como óptima, pasamos a estudiar la influencia del tiempo de iluminación con luz UV (365 nm) en la viabilidad celular utilizando diferentes tratamientos (Pz1, Pz2 y Pz3) a la misma dosis. Realizamos un total de cuatro experimentos, en uno de ellos medimos la viabilidad celular tras un periodo de irradiación de luz UV cada 10 min, dos experimentos irradiando cada 20 min y un experimento irradiando cada 30 min. De cada experimento tenemos un total de cuatro placas (cada una corresponde a un tiempo) sembrando 20.000 células por pocillo. Como mostramos en la figura 13, no se obtuvieron resultados concluyentes con ninguno de los fotosensibilizadores, con valores de viabilidad muy variables independientemente del tratamiento y tiempo de iluminación. El análisis estadístico muestra que las diferencias entre los valores medios de viabilidad en función del tiempo no son estadísticamente significativas ($p= 0.567$) ni tampoco lo son las diferencias entre los valores medios de viabilidad en función del tratamiento ($p= 0.471$). Al realizar la comparación múltiple de las tres variables tampoco obtenemos diferencias significativas ($p= 0.879$).

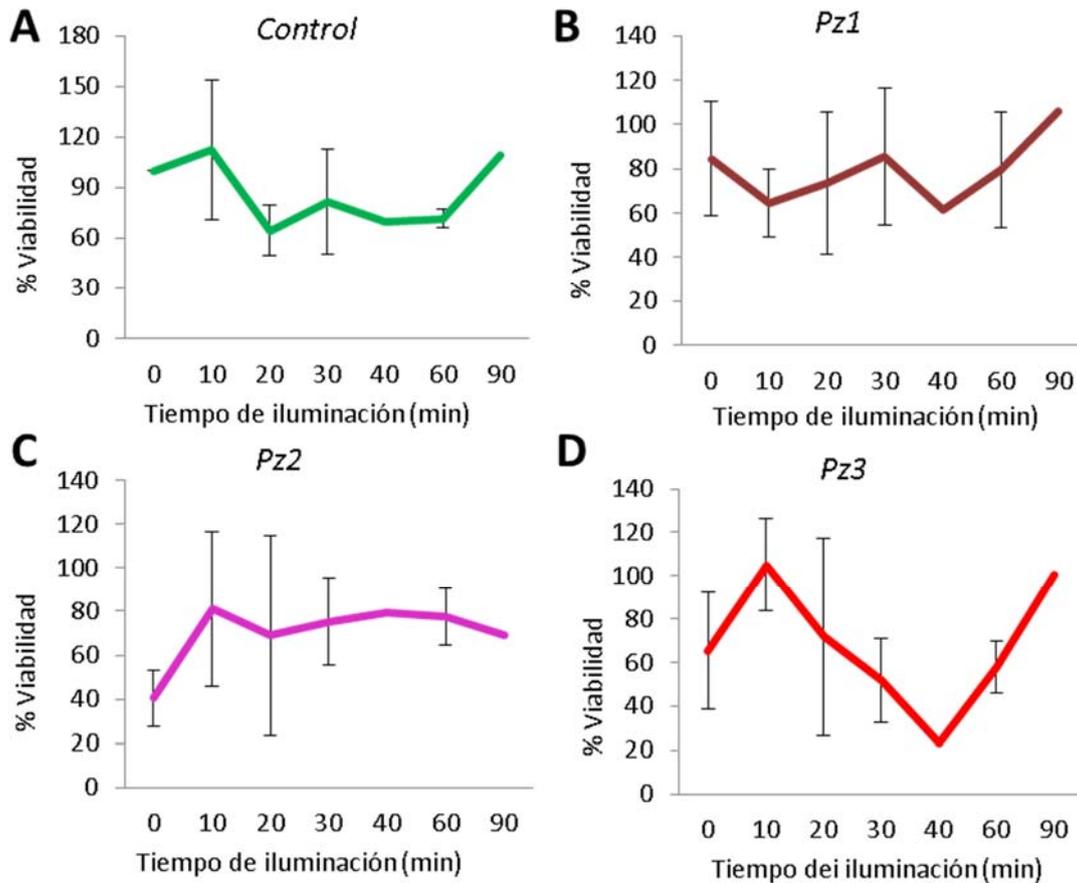


Figura 13. Resultados de viabilidad de los Pzs en función del tiempo de iluminación (intervalos de 10 min, 20 min y 30 min). (A) Efecto de la viabilidad del control. (B) Efecto de la viabilidad del Pz1 0,7 mg/L. (C) Efecto de la viabilidad del Pz2 0,3 mg/L. (D) Efecto de la viabilidad del Pz3 1 mg/L. Los datos se expresaron como medias \pm desviación estándar ($n=3$ experimentos independientes, menos los tiempos de 40 y 90 min que se realizaron una sola vez); $p>0.05$.

Estos resultados nos hacen plantearnos diferentes hipótesis: ¿La siembra no ha sido homogénea en todos los pocillos?, ¿El tiempo de irradiación no es el adecuado?, ¿La dosis elegida no es la correcta?

Para confirmar de nuevo que la dosis es correcta realizamos un nuevo experimento aumentando a dosis de 2,1 mg/L de Pz1, 0,9 mg/L de Pz2 y 3 mg/L de Pz3. Medimos la viabilidad celular tras irradiar con luz UV cada 10 min y los resultados se repiten: no hay resultados concluyentes, lo que nos confirma que aumentar la dosis no es la solución (los resultados de este experimento no se muestran en figura).

Cada vez que realizamos un experimento comprobamos al microscopio óptico que hemos sembrado homogéneamente, lo que también nos sirve para verificar el estado de salud de nuestros cultivos. Por lo tanto descartamos la hipótesis de siembra no homogénea, y deducimos que el problema debe ser el tiempo de iluminación, ya que este compuesto en las células necesitaba un tiempo hasta la activación de los mecanismos de estrés oxidativo que producen ROS ocasionando la muerte celular. Como describe *Jancula et al*¹⁸, este efecto explica la acumulación de los fotosensibilizadores en las células durante un largo periodo de incubación (60 min) que produce altos niveles de ROS en la célula^{65,72}.

Evaluación de la mortalidad a 60 min de irradiación lumínica con tiempos variables de periodos post-iluminación

En los experimentos anteriores, una vez que las células presentaban la confluencia adecuada, irradiábamos con luz UV durante un determinado tiempo y realizábamos de inmediato la medida de viabilidad mediante el ensayo MTT. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios y decidimos incluir un tiempo de incubación tras irradiar, siempre durante un periodo de tiempo de 60 min, incubamos los cultivos durante diferentes tiempos post-iluminación (24 h, 48 h, 72 h y 96 h), y una vez transcurrido medimos la viabilidad mediante MTT. Como observamos en la figura 14, con este protocolo de tratamiento sí obtenemos diferencias de viabilidad.

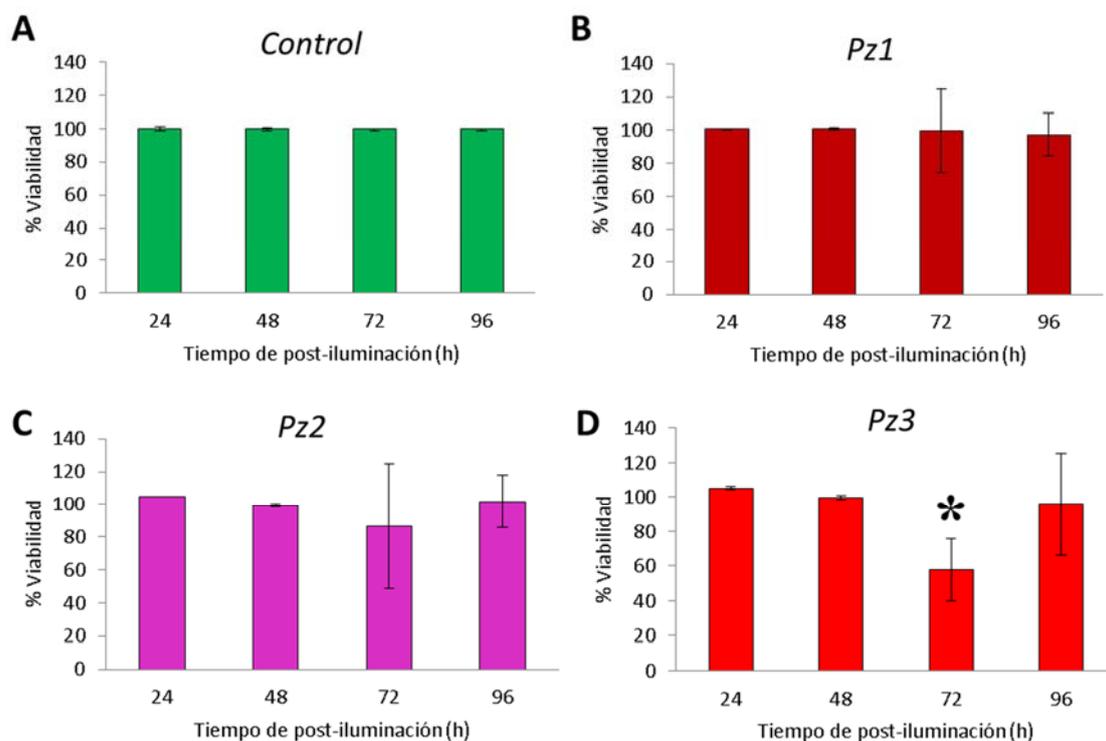


Figura 14. Resultados de viabilidad de cada tratamiento en función del tiempo de post-iluminación. (A) Experimento de viabilidad del control a los diferentes tiempos de iluminación. (B) Experimento de viabilidad del Pz1 0.7 mg/L a los diferentes tiempos de iluminación (C) Experimento de viabilidad del Pz2 0.3 mg/L a los diferentes tiempos de iluminación (D) Experimento de viabilidad del Pz3 1 mg/L a los diferentes tiempos de iluminación. La variable tiempo es dependiente del tratamiento * $p=0.03$.

Con un tiempo post-iluminación de 24 h ó 48 h los resultados de viabilidad son similares con los tres tratamientos. Sin embargo, con 72 h obtenemos valores medios de viabilidad en cuatro experimentos del 57% para el Pz3 y 86% con Pz2, mientras que con el Pz1 se mantiene la viabilidad en el 99%. Curiosamente, con un tiempo de post-iluminación de 96 h obtenemos unas medidas de viabilidad de 97% con Pz1, 101% con Pz2 y 95% con Pz3. El análisis estadístico nos muestra que el tiempo de iluminación es dependiente del tratamiento, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.03$). La viabilidad observada a las 96 h de post-iluminación puede ser explicada por un efecto rebote en la proliferación de esta línea celular tumoral debido a la existencia de mecanismos de control del estrés oxidativo.

Los mejores resultados se obtienen con Pz3. Este producto es el que contiene cadenas laterales glicosiladas que favorecen la interacción con la membrana

plasmática celular. Mediante este experimento podemos ver que funciona correctamente y que por tanto el mecanismo de muerte está en relación con su unión ó penetración en la célula.

Los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores, aunque es preciso validarlos con más estudios. El Pz3 se podría utilizar en el futuro como agente terapéutico. Nos planteamos diferentes mejoras de cara a un posible tratamiento para el adenocarcinoma de colon.

Por un lado, pensando en el paciente se debe intentar reducir la exposición de luz UV por los efectos adversos que le pueden ocasionar. Para ello intentaríamos realizar una localización precisa mediante endoscopia de la zona tumoral y marcaríamos el tejido a irradiar mediante trazadores. Aunque quedan muchos experimentos por realizar, lo siguiente que nos gustaría estudiar sería el efecto de viabilidad celular de la sustancia de interés probando irradiación con luz visible, ya que nuestra sustancia absorbe a 618 nm. Esto supondría no tener que depender de la luz UV con la consiguiente disminución de los efectos secundarios.

Además de valorar los resultados obtenidos en la aplicación de estos compuestos fotosensibilizadores a cultivos celulares, nos gustaría determinar a qué nivel celular actúa; qué proteínas varían su expresión y qué mecanismo de muerte produce. En definitiva, construir un modelo de su mecanismo de acción a nivel celular que nos permita dar el siguiente paso hacia modelos animales.

CONCLUSIONES

- 1.- El pH y la temperatura provocan cambios en las características espectrofotométricas de los fotosensibilizadores en estudio.
- 2.- La eficiencia cuántica estimada para el Pz3 es 13 veces superior a la del triptófano, lo que implica un mejor aprovechamiento de la irradiación.
- 3.- Nuestro compuesto fotosensibilizador Pz3 es potencialmente útil para inducir muerte celular en células cancerosas in vitro tras irradiación UV.
- 4.- Con dosis de 0,7 mg/L (Pz1), 0.2 mg/L (Pz2) y 1,0 mg/L (Pz3) se alcanza el mayor efecto de mortalidad siempre que se irradie con luz UV (365 nm) durante 60 min.
- 5.- El Pz3 es el compuesto más eficaz, previsiblemente por su mayor facilidad de interacción con la membrana celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):380–7.
2. Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, et al. Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization. *Chem Rev* 2010;110(5):2795–838.
3. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(12):889–905.
4. Kotulska M, Kulbacka J, Saczko J. Advances in photodynamic therapy assisted by electroporation. *Curr Drug Metab* 2013;14(3):309–18.
5. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. *CA Cancer J Clin* 2011;61(4):250–81.
6. Verma S, Watt GM, Mai Z, Hasan T. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. *Photochem Photobiol* 2007;83(5):996–1005.
7. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1776(1):86–107.
8. Okunaka T, Kato H, Konaka C, Furukawa K, Harada M, Yamamoto Y. Photodynamic therapy of lung cancer with bronchial artery infusion of photofrin. *Diagn Ther Endosc* 1996;2(4):203–6.
9. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2010;7(2):61–75.
10. Roberts WG, Smith KM, McCullough JL, Berns MW. Skin photosensitivity and photodestruction of several potential photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1989;49(4):431–8.
11. De Rosa FS, Bentley MV. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharm Res* 2000;17(12):1447–55.
12. Hamblin MR, Newman EL. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 1994;23(1):3–8.
13. Wang T, Wang A, Zhou L, et al. Synthesis of a novel water-soluble zinc phthalocyanine and its CT DNA-damaging studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013;115:445–51.
14. Tang W, Xu H, Kopelman R, Philbert MA. Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochem Photobiol* 2005;81(2):242–9.

15. Esenpınar AA, Durmuş M, Bulut M. Photophysical, photochemical and BSA binding/BQ quenching properties of quaternizable coumarin containing water soluble zinc phthalocyanine complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011;79(3):608–17.
16. Cheng Y, Samia AC, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B, Burda C. Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer. *J Am Chem Soc* 2008;130(32):10643–7.
17. Özçelik Ş, Gül A. Different phenylboronic acid azaester formation modes in a substituted zinc phthalocyanine and its precursor. *Polyhedron* 2013;50(1):461–6.
18. Jančula D, Maršálek B, Babica P. Photodynamic effects of 31 different phthalocyanines on a human keratinocyte cell line. *Chemosphere* 2013;93(6):870–4.
19. Atmaca GY, Dizman C, Eren T, Erdoğan A. Novel axially carborane-cage substituted silicon phthalocyanine photosensitizer; synthesis, characterization and photophysicochemical properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2015;137:244–9.
20. Brasseur N, Ouellet R, Madeleine CL, Lier JE van. Water-soluble aluminium phthalocyanine–polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour-bearing mice. *Br J Cancer* 1999;80(10):1533–41.
21. Guo H, Qian H, Idris NM, Zhang Y. Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2010;6(3):486–95.
22. Yslas EI, Prucca C, Romanini S, Durantini EN, Bertuzzi M, Rivarola V. Biodistribution and phototherapeutic properties of Zinc (II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine in vivo. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009;6(1):62–70.
23. Abramczyk H, Brozek-Pluska B, Surmacki J, Musial J, Kordek R. Oncologic photodynamic diagnosis and therapy: confocal Raman/fluorescence imaging of metal phthalocyanines in human breast cancer tissue in vitro. *The Analyst* 2014;139(21):5547–59.
24. Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys Med Biol* 2005;50(11):2597–616.
25. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2004;1(4):279–93.
26. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Responses of cancer cells induced by photodynamic therapy. *J Healthc Eng* 2013;4(1):87–108.
27. Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule J-Y, Habraken Y, Agostinis P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1651–9.

28. Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 2002;1(11):837–40.
29. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med* 2008;8(3):207–20.
30. Zong W-X, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 2006;20(1):1–15.
31. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434(7033):652–8.
32. Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR, Agostinis P. Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2006;2(3):238–40.
33. Reiners JJ, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* 2010;6(1):7–18.
34. Dewaele M, Martinet W, Rubio N, et al. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *J Cell Mol Med* 2011;15(6):1402–14.
35. Sattler UGA, Mueller-Klieser W. The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *Int J Radiat Biol* 2009;85(11):963–71.
36. Frank J, Flaccus A, Schwarz C, Lambert C, Biesalski HK. Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 2006;40(5):827–36.
37. Āb JG, Nowis D, Skrzycki M, et al. Antitumor Effects of Photodynamic Therapy Are Potentiated by 2-Methoxyestradiol A SUPEROXIDE DISMUTASE INHIBITOR. *J Biol Chem* 2003;278(1):407–14.
38. Hadjur C, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, Favier A. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem Photobiol* 1996;64(2):375–81.
39. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 2002;1(1):1–21.
40. Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 2012;148(3):399–408.
41. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2011;12(1):9–22.

42. Wang HP, Hanlon JG, Rainbow AJ, Espiritu M, Singh G. Up-regulation of Hsp27 plays a role in the resistance of human colon carcinoma HT29 cells to photooxidative stress. *Photochem Photobiol* 2002;76(1):98–104.
43. Nonaka M, Ikeda H, Inokuchi T. Inhibitory effect of heat shock protein 70 on apoptosis induced by photodynamic therapy in vitro. *Photochem Photobiol* 2004;79(1):94–8.
44. Hanlon JG, Adams K, Rainbow AJ, Gupta RS, Singh G. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2001;64(1):55–61.
45. Szokalska A, Makowski M, Nowis D, et al. Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of ER stress and unfolded protein response. *Cancer Res* 2009;69(10):4235–43.
46. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Res* 1978;38(8):2628–35.
47. Wang JB, Liu LX. Use of photodynamic therapy in malignant lesions of stomach, bile duct, pancreas, colon and rectum. *Hepatogastroenterology* 2007;54(75):718–24.
48. Chan CMH, Lo P-C, Yeung S-L, Ng DKP, Fong W-P. Photodynamic activity of a glucoconjugated silicon(IV) phthalocyanine on human colon adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2010;10(2):126–34.
49. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2004;5(8):497–508.
50. Cheng Y, Meyers JD, Agnes RS, et al. Addressing Brain Tumors with Targeted Gold Nanoparticles: A New Gold Standard for Hydrophobic Drug Delivery? *Small Weinh Bergstr Ger [Internet]* 2011 [cited 2016 Jun 26];7(16). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837553/>
51. Ismail AFM, Ali MM, Ismail LFM. Photodynamic therapy mediated antiproliferative activity of some metal-doped ZnO nanoparticles in human liver adenocarcinoma HepG2 cells under UV irradiation. *J Photochem Photobiol B* 2014;138:99–108.
52. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *The Oncologist* 2006;11(9):1034–44.
53. Sitnik TM, Hampton JA, Henderson BW. Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *Br J Cancer* 1998;77(9):1386–94.
54. Henderson BW, Busch TM, Vaughan LA, et al. Photofrin Photodynamic Therapy Can Significantly Deplete or Preserve Oxygenation in Human Basal Cell Carcinomas during Treatment, Depending on Fluence Rate. *Cancer Res* 2000;60(3):525–9.

55. Chen Q, Huang Z, Chen H, Shapiro H, Beckers J, Hetzel FW. Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2002;76(2):197–203.
56. Engbrecht BW, Menon C, Kachur AV, Hahn SM, Fraker DL. Photofrin-mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model. *Cancer Res* 1999;59(17):4334–42.
57. Fingar VH, Kik PK, Haydon PS, et al. Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br J Cancer* 1999;79(11–12):1702–8.
58. Kessel D, Erickson C. Porphyrin photosensitization of multi-drug resistant cell types. *Photochem Photobiol* 1992;55(3):397–9.
59. Sibani SA, McCarron PA, Woolfson AD, Donnelly RF. Photosensitiser delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. *Expert Opin Drug Deliv* 2008;5(11):1241–54.
60. Berg K, Anholt H, Bech O, Moan J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *Br J Cancer* 1996;74(5):688–97.
61. The Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib Mesylate Enhances the Efficacy of Photodynamic Therapy by Inhibiting ABCG2 | *Clinical Cancer Research* [Internet]. [cited 2016 Jun 26]; Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/13/8/2463.long>
62. Fluorescence Quantum Yield Measurements | HORIBA Jobin Yvon - HORIBA [Internet]. [cited 2016 Jun 28]; Available from: <http://www.horiba.com/scientific/products/fluorescence-spectroscopy/application-notes/quantum-yields/>
63. Doane T, Chomas A, Srinivasan S, Burda C. Observation and photophysical characterization of silicon phthalocyanine J-aggregate dimers in aqueous solutions. *Chem Weinh Bergstr Ger* 2014;20(26):8030–9.
64. Suchan A, Nackiewicz J, Hnatejko Z, Waclawek W, Lis S. Spectral studies of zinc octacarboxyphthalocyanine aggregation. *Dyes Pigments* 2009;80(2):239–44.
65. Pan X, Xie J, Li Z, et al. Enhancement of the photokilling effect of aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy by conjugating with nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;130:292–8.
66. Al-Omari S, Algezawi N, Al-Noaimi M, Aqili A, Al-Hamarneh IF, Marashdeh M. Observation on symmetry properties of sodium zinc(II)-2,9,16,23-phthalocyanine tetracarboxylate in water:NaOH solution. *J Fluoresc* 2014;24(3):835–9.
67. Furuyama T, Satoh K, Kushiya T, Kobayashi N. Design, Synthesis, and Properties of Phthalocyanine Complexes with Main-Group Elements Showing Main Absorption and Fluorescence beyond 1000 nm. *J Am Chem Soc* 2014;136(2):765–76.

68. Soldatova AV, Kim J, Rizzoli C, et al. Near-Infrared-Emitting Phthalocyanines. A Combined Experimental and Density Functional Theory Study of the Structural, Optical, and Photophysical Properties of Pd(II) and Pt(II) α -Butoxyphthalocyanines. *Inorg Chem* 2011;50(3):1135–49.
69. Nombona N, Antunes E, Nyokong T. The synthesis and fluorescence behaviour of phthalocyanines unsymmetrically substituted with naphthol and carboxy groups. *Dyes Pigments* 2010;86(1):68–73.
70. Masilela N, Nyokong T. The synthesis and photophysical properties of water soluble tetrasulfonated, octacarboxylated and quaternised 2,(3)-tetra-(2 pyridiloxy) Ga phthalocyanines. *Dyes Pigments* 2010;84(3):242–8.
71. Nombona N, Chidawanyika W, Nyokong T. Spectroscopic and physicochemical behavior of magnesium phthalocyanine derivatives mono-substituted with a carboxylic acid group. *J Mol Struct* 2012;1012:31–6.
72. Liu W, Jensen TJ, Fronczek FR, Hammer RP, Smith KM, Vicente MGH. Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. *J Med Chem* 2005;48(4):1033–41.
73. Master AM, Livingston M, Oleinick NL, Gupta AS. Optimization of a Nanomedicine-based Pc 4-PDT Strategy for Targeted Treatment of EGFR-Overexpressing Cancers. *Mol Pharm* 2012;9(8):2331–8.
74. Wei M-F, Chen M-W, Chen K-C, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* 2014;10(7):1179–92.