



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

RICARDO FILIPE TOIPA RIBEIRO LOPES

O papel das fluoroquinolonas no mecanismo de fotocarcinogénese

ARTIGO DE REVISÃO CIENTÍFICA

ÁREA CIENTÍFICA DE DERMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROF. DOUTORA MARIA MARGARIDA GONÇALO

2022

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

O papel das fluoroquinolonas no mecanismo de fotocarcinogénese

Autor:

Ricardo Filipe Toipa Ribeiro Lopes¹

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

ricardotoipa@gmail.com

Índice

1	Lista de acrónimos/abreviaturas.....	4
2	Resumo.....	6
3	Abstract.....	7
4	Introdução.....	8
5	Metodologia.....	10
6	Discussão.....	11
6.1	Fotocarcinogénese.....	11
6.1.1	Lesão direta da radiação ultravioleta.....	11
6.1.2	Lesão por produção de espécies reativas de oxigénio.....	14
6.2	Fluoroquinolonas e fotocarcinogénese.....	16
6.2.1	Estudos <i>In Vitro</i>	16
6.2.2	Estudos em animais.....	19
6.2.3	Estudos clínicos.....	20
6.2.4	Fotoimunossupressão.....	23
7	Conclusão.....	24
8	Agradecimentos.....	25
9	Referências.....	26
	Anexo I – Licença para uso da Figura 2.....	31

1 Lista de acrónimos/abreviaturas

UV – Ultravioleta

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CPDs – Dímeros de pirimidina de ciclobutano

6-4 PPs – 6-4 pirimidina-pirimidona

ROS – Espécies reativas de oxigénio, em inglês *reactive oxygen species*

T – Timina

C – Citosina

U – Uracilo

NER – Reparação por Excisão de Nucleotídeo, em inglês *nucleotide excision repair*

8-oxoGua – 8-oxo-7,8-dihidroguanina

SSBs – Quebras de ADN de cadeia simples, em inglês *single strand break*

CBC – Carcinoma basocelular

CEC – Carcinoma espinhocelular

PTCH – Gene *Patched*

SMO – Gene *Smoothened*

SHH – Via *Sonic hedgehog*

TP53 – Gene *p53*

EGFR – Gene do recetor do fator de crescimento epidérmico

RAS – Gene *Rat sarcoma*

FYN – Proteínas proto-oncogénicas c-fyn

CDKN2A - Inibidor da quinase dependente da ciclina p18, em inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

MAPK – Via das fosfatases da proteína quinase ativada por mitógenos, em inglês *mitogen-activated protein kinase*

MET – Recetor do fator de crescimento do hepatócito

CDK – Quinases dependentes das ciclinas

NFkB – Fator nuclear kappa B

IκB – Inibidor kappa B

STAT3 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

PGE2 – Prostaglandinas E2

TGF-β – Fator de crescimento transformador beta

1O_2 – Dioxigênio singuleto, em inglês *singlet oxygen*

O_2 – Oxigênio

O_2^- – Anião superóxido

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

$\cdot OH$ – Radical hidroxilo

2'-dGuo – 2'-deoxiguanosina

SOD – Superóxido dismutase

SOD2 – Superóxido dismutase mitocondrial

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

EMA – Agência Europeia do Medicamento

CCNM – Cancro cutâneo não-melanoma

OR – *Odds ratio*

IC – Intervalo de confiança

OR_{adj} – *Odds ratio adjusted*

IRR – *Incident ratio rate*

2 Resumo

As fluoroquinolonas (FQ) atuam como substâncias fotossensibilizantes quando raios ultravioleta (UV) atingem a pele, provocando lesões tanto no ADN como nos restantes organelos celulares. As lesões são desencadeadas por reações de tipo I e tipo II (*major e minor*), cujos produtos de reação altamente reativos são capazes de alterar a composição química das bases de nucleótidos, induzir quebras da cadeia, oxidar macromoléculas e organelos. A resposta celular pode desencadear mecanismos de apoptose, provocando uma reação de fototoxicidade na pele, que pode ser reconhecida clinicamente como eritema, lesões bolhosas ou eczematosas, pseudoporfiria, onicólise ou pústulas subcorneas. Contudo, células cujas lesões no material genético incidam em oncogenes e/ou supressores tumorais podem não ser capazes de promover a apoptose e, desta forma, originar uma célula tumoral. Tem havido uma crescente evidência na literatura de que fármacos fotossensibilizantes aumentam o potencial de fotocarcinogénese da radiação UV. Além de fotocarcinogénica, a radiação UV é imunossupressora, o que pode justificar que células tumorais proliferem sem controlo. O estado de imunossupressão parece ser agravado pelas FQ. Estes fármacos provaram ser fotogenotóxicos e fotocarcinogénicos em estudos *in vitro* e em animais. Os estudos clínicos parecem sugerir um risco aumentado de aparecimento de cancro de pele em doentes a tomar FQ, havendo um aparente incremento do risco em tratamentos mais longos. O presente artigo conclui uma possível associação entre a toma de FQ e risco de cancro cutâneo, mas também evidencia uma lacuna de estudos na literatura. Desta forma, é importante reforçar as medidas preventivas face à exposição solar.

Palavras-chave: Fluoroquinolonas; Fotocarcinogénese; Tumores cutâneos.

3 Abstract

Fluoroquinolones (FQ) are photosensitizing drugs in humans. When UVA radiation reaches the skin, causes lesions to both DNA and other cellular organelles by type I and type II reactions (major and minor). The resulting products are highly reactive and can change the chemical composition of nucleotide bases, induce strand breaks and destroy macromolecules and organelles. The cellular response can trigger apoptosis, causing a phototoxic reaction in the skin, recognized clinically as erythema, bullous or eczematous lesions, pseudoporphyria, oncolysis or subcorneal pustules. However, cells with lesions in oncogenes and/or tumor suppressors may not be able to promote apoptosis and thus give rise to a tumor cell. There has been growing evidence in the literature that photosensitizing drugs increase the photocarcinogenesis potential of UV radiation. In addition to being photocarcinogenic, UV radiation is immunosuppressive, which may explain why tumor cells multiply without control. The immunosuppression seems to be enhanced by FQ. These drugs have proven to be photogenotoxic and photocarcinogenic *in vitro* and in animals. Clinical studies seem to suggest an increased risk of skin cancer in patients taking FQ, with an even higher risk with longer courses of treatment. This article suggests a possible association between FQ and skin cancer, but also highlights a gap in the literature. Thus, it is important to increase preventive measures regarding sun exposure.

Keywords: Fluoroquinolones; Photocarcinogenesis; Skin tumor.

4 Introdução

O sol emite um grande espectro de radiações, incluindo a radiação ultravioleta (UV). A camada de ozônio absorve as radiações UVC (200 – 280 nm) e a maioria das radiações UVB, atingindo a superfície da Terra cerca de 5% de radiação UVB (280 – 320 nm) e aproximadamente 95% de radiação UVA (320 – 400 nm) (1,2).

A radiação UVB, diretamente absorvida pela molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), é potencialmente carcinogénica. Neste processo, formam-se dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos de 6–4 pirimidina–pirimidona (6-4 PPs), precursores de mutações e, conseqüentemente, carcinogénese (3). Por sua vez, a radiação UVA induz lesões no ADN por mecanismos indiretos através da produção de espécies reativas de oxigénio, em inglês *reactive oxygen species* (ROS), por fotoativação de fotossensibilizantes endógenos, como as porfirinas, o triptofano, a riboflavina (4) ou exógenos, onde se incluem as fluoroquinolonas (FQ) (5). Tem havido uma crescente evidência de que fármacos fotossensibilizantes aumentam o potencial de fotocarcinogénese da radiação UV (6–9), onde se incluem alguns diuréticos, anti-inflamatórios não esteroides, fármacos cardiovasculares, tetraciclina e as quinolonas.

As quinolonas (Fig.1) são antibacterianos classificados de acordo com o seu espectro de ação. As quinolonas de primeira geração, que incluem o ácido nalidíxico, atuam sobre os microrganismos Gram-negativo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*). As de segunda geração contêm um flúor na posição 6 e atuam em microrganismos Gram-negativo e Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*). Neste grupo inclui-se a ciprofloxacina, a enoxacina,

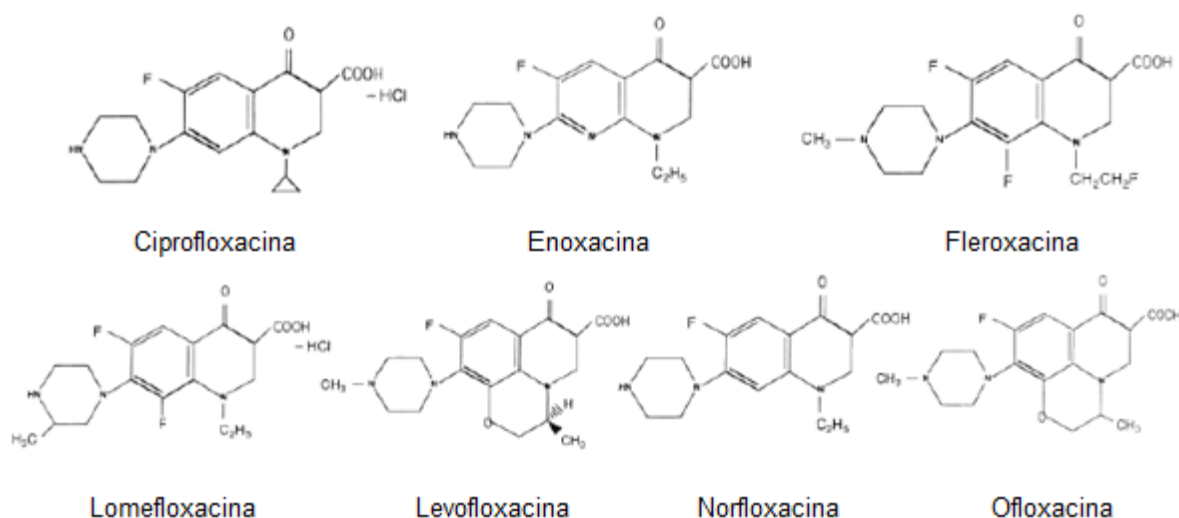


Figura 1. Fórmula estrutural de algumas quinolonas. Adaptado de (17).

a lomefloxacina, a norfloxacina e a ofloxacina. A terceira geração, contendo mais do que um átomo de flúor, incluem a levofloxacina, sparfloxacina e a moxifloxacina. Existe ainda uma quarta geração (10). As FQ, contendo flúor na sua constituição, são fármacos cuja indicação antibacteriana está bem estabelecida e cujo modo de ação se prende com a inibição da topoisomerase bacteriana, tanto a girase do ADN como a topoisomerase IV (11).

O ácido nalidíxico foi uma das primeiras quinolonas a ser usada para o tratamento de infeções e em 1964 foi descrito o primeiro caso de uma reação de fotossensibilidade com uma clínica de pseudoporfiria (12). Desde então, a fototoxicidade das FQ tem sido extensamente estudada (13–19), juntamente com a documentação de outras FQ como a ciprofloxacina (1,20), a lomefloxacina (21), a ofloxacina (22), a levofloxacina (23,24), a moxifloxacina (23), a rufloxacina (25,26) e a pefloxacina (1,27) com o seguinte espectro de clínica: eritema, lesões bolhosas ou eczematosas, pseudoporfiria, onicólise e pústulas subcorneas (13). Além da fototoxicidade, as FQ têm sido analisadas quanto ao seu potencial de fotocarcinogénese (19,28–32). Tendo em vista o benefício do tratamento com FQ em múltiplas infeções, importa esclarecer este potencial fotocarcinogénico e conhecer quais os aconselhamentos a prestar quando se prescreve este tipo de fármaco.

Assim, irá ser feita uma recolha de informação mais recente neste âmbito e resumida no presente artigo com o objetivo de avaliar os dados publicados que permitam concluir se, na vida real, as FQ são responsáveis pelo aparecimento de tumores cutâneos em indivíduos expostos a estes fármacos.

5 Metodologia

A elaboração do presente artigo de revisão narrativa iniciou-se com a pesquisa na base de dados Medline/Pubmed durante o ano de 2021. Foram usados os seguintes termos de pesquisa:

- a. Fluoroquinolones – MeSH; Ciprofloxacin; Fleroxacin; Enoxacin; Enrofloxacin; Gatifloxacin; Gemifloxacin; Moxifloxacin; Norfloxacin; Ofloxacin; Levofloxacin; Pefloxacin;
- b. Photocarcinogenesis; Carcinogenesis – MeSH; Tumorigenesis; Tumorigeneses; Oncogenesis; Oncogeneses;
- c. Skin tumor; Skin cancer; Skin Neoplasms – MeSH; Malignant lesion.

Foram excluídos artigos que não fossem escritos em língua inglesa ou portuguesa e anteriores ao ano de 1964. Foram incluídos artigos de revisão, artigos científicos originais, artigos retrospectivos e prospectivos. Foram ainda incluídos outros artigos a partir das referências bibliográficas dos artigos da pesquisa inicial, que foram considerados de interesse para o tema.

Num total de 731 artigos da pesquisa inicial, os quais foram selecionados em primeiro pela relevância do título, em segundo pela importância do resumo e, em última análise, pela informação do artigo integral, no sentido de recolher a informação mais relevante para o presente artigo. A leitura e seleção dos artigos provenientes da pesquisa na base de dados decorreu durante os meses de setembro, outubro e novembro de 2021, perfazendo um total de 61 artigos selecionados para a realização deste trabalho.

6 Discussão

6.1 Fotocarcinogénese

6.1.1 Lesão direta da radiação ultravioleta

O cancro resulta de uma alteração na homeostase das vias de sinalização que controlam o ciclo celular, a diferenciação e a apoptose. Estas cascatas de sinalização irão ativar ou desativar patologicamente processos celulares (maioritariamente por ativação ou supressão da transcrição de genes) que levarão à formação de uma célula cancerígena. Um dos fatores que pode afetar tais vias é a radiação UV. Os genes implicados diretamente na carcinogénese são os oncogenes (por ativação da transcrição) cujas proteínas contribuem para a proliferação celular e os genes supressores tumorais (por inibição da transcrição) que ao perderem função não impedem a progressão tumoral. Para o aparecimento de cancro é necessário a ativação de, pelo menos, uma via de um oncogene e a inativação de, pelo menos, uma via de um gene supressor tumoral (33).

A radiação UVB é carcinogénica, iniciando o seu processo de tumorogénese através de uma lesão do ADN e mutações nos oncogenes e genes supressores tumorais. O principal mecanismo é a absorção direta da radiação UV até um máximo de 254 nm, formando CPDs e 6-4 PPs num rácio de 2:1. Estes fotoprodutos levam a falhas no emparelhamento das cadeias de ADN durante a sua transcrição, modificando a estrutura da cadeia resultante, impedindo o normal funcionamento das polimerases da transcrição e replicação (34,35). Dentro dos CPDs, os dímeros de TC e CC são os mais mutagénicos. As mutações TC → TT e CC → TT são as mais frequentemente encontradas no gene *p53* em cancros induzidos por radiação UV (4). A reação mais importante é a desaminação, convertendo a citosina num uracilo. Apesar da taxa de desaminação ser baixa no ADN, tem um papel significativo na mutagénese dos CPDs contendo citosina. Desta forma, o processo inicia-se com a formação de CPDs TC, CT CC que se transformam em CPDs TU UT e UU, respetivamente. Durante a replicação, os resíduos U no codão levam à incorporação de uma base adenosina, que na próxima replicação emparelha com codões T. O resultado final são mutações características de fotocarcinogénese, nomeadamente T → C nos locais TC e a mutação CC → TT. Também 6-4 PPs sofrem desaminação, mas apenas na cadeia 5' do ADN, sendo o 6-4 PPs TT o mais mutagénico (35). Em mamíferos, o mecanismo mais importante para a remoção destes erros é a Reparação por Excisão de Nucleotídeo, em inglês *nucleotide excision repair* (NER) (36). Os indivíduos com defeitos neste sistema de reparação irão ter maior propensão para o desenvolvimento de cancro de pele em idades mais jovens, denominando-se esta doença por *xeroderma pigmentosum* (37). A radiação UVA também provoca lesões no ADN através de reações dependentes do oxigénio envolvendo fotossensibilização. Deste processo, resultam

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que levam à formação de 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua) e quebras de ADN de cadeia simples, em inglês *single strand break* (SSBs) (35). A radiação UVB é ainda capaz de formar 8-oxoGua no ADN através dos seguintes mecanismos: a oxidação da base guanina pelo radical $\cdot\text{OH}$, uma vez que é a única ROS capaz de levar a SSBs quando há a extração de um átomo de hidrogênio inicial. Outra possibilidade envolve a molécula de oxigênio gerada por ROS com purinas e pirimidinas num estado excitado do tipo tripleto (38). Os três tipos de fotoprodutos (CPDs, 6-4 PPs e 8-oxoGua) são pré-mutagênicos. O seu grau de carcinogenicidade depende não só do tipo de fotoproduto, mas também da sequência de nucleótidos onde estão inseridos (36).

Os câncros cutâneos mais comuns são o carcinoma basocelular (CBC), o carcinoma espinhocelular (CEC) e o melanoma (ordenados do mais comum para o menos e do menos para o mais agressivo). Dependendo do tipo de tumor, várias vias de sinalização poderão estar afetadas. No CBC, as mutações *Patched* (*PTCH*) e *Smoothed* (*SMO*) influenciam a ativação aberrante da via *Sonic hedgehog* (SHH), via com um importante papel durante a embriogênese, promovendo a proliferação celular e o crescimento tumoral. No caso do CEC estão envolvidas mutações no gene *p53* (*TP53*), no gene do recetor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), o *Rat sarcoma* (*RAS*), proteínas proto-oncogénicas *c-fyn* (*FYN*) e o inibidor da quinase dependente da ciclina p18, em inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A*). O melanoma tem mutações diferentes induzidas por radiação UV incluindo as da *TP53* e do *CDKN2A* (34).

A promoção da proliferação celular provocada por mutações induzidas por radiação UV é, além de outras, mediada pela via das fosfatases da proteína quinase ativada por mitógenos em inglês *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). A proteína RAS representa um dos três oncogenes envolvidos nesta via e cujas mutações podem levar a uma contínua proliferação independente do recetor, promovendo o crescimento do tumor. Estas mutações têm sido detetadas em genes *N-RAS* de melanoma e são provocadas por exposição solar, uma vez que estes genes têm uma grande quantidade de sequências de pirimidina. A proteína RAS é um dos sinais transdutores da inibição do recetor do fator de crescimento do hepatócito (MET). Quando o recetor é excessivamente expresso leva ao aparecimento de melanoma (33,34).

As mutações no *TP53* podem dar início a uma célula cancerígena. O *TP53* na sua forma não mutada, promove a paragem do ciclo celular em G1 através das quinases dependentes das ciclinas (CDK) de modo a reparar o ADN antes do começo da fase S. Após o reconhecimento da lesão nuclear, é iniciada uma cascata de quinases que leva à fosforilação e, conseqüentemente, ativação do *TP53* com a tradução da sua proteína reguladora celular p53T. Esta proteína fosforilada induz a p21 a inibir complexos CDK-ciclina, permitindo a paragem do ciclo celular em G1. A p53 consegue ainda induzir apoptose através da libertação

do citocromo c da mitocôndria, nas células onde a reparação do ADN não é possível (34). Tanto o CBC como o CEC exibem mutações específicas no *TP53*, localizadas em locais específicos, nomeadamente nos dímeros de pirimidina, tanto CPDs como 6–4 PPs. Essas mutações são consideradas características do efeito da radiação UVB (33).

O gene *CDKN2A* codifica dois supressores tumorais envolvidos na regulação do ciclo celular. A proteína p16INK4A impede a progressão da fase G1 para S através da ligação da CDK4/CDK6, inibindo a fosforilação da proteína do retinoblastoma. Esta proteína está muitas vezes inibida em muitos melanomas e a mutação no seu gene pode contribuir para esse tipo de tumor. A proteína p14ARF estabiliza os níveis de p53 prevenindo a transformação oncogénica (33,34).

Além das mutações, ocorrem outros processos que levam a carcinogénese, desencadeados pela radiação UV. O fator nuclear kappa B (NFκB) é um fator de transcrição envolvido na inflamação e na regulação do ciclo celular. Na sua forma inativa, liga-se ao inibidor kappa B (IκB) no citoplasma. Esta ligação pode ser quebrada através de um estímulo que provoque a fosforilação do IκB. Esse estímulo pode ser a radiação UV, levando à translocação do NFκB para o núcleo, estimulando a transcrição de genes efetores de citocinas e prostaglandinas (34,39). O transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) está ativo em vários tipos de cancros e é desencadeado pela radiação UV em queratinócitos através de lesão do ADN, incluindo os CPDs e a formação de ROS (34,36).

A inflamação tem também um papel importante na fotocarcinogénese. Dentro da via MAPK, a JNK e a p38 desempenham uma ação fulcral no aumento da expressão da AP-1 e da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), impulsionado pela radiação UV (39). A radiação UV facilmente induz a transcrição do gene da COX-2. A COX-2, a partir do ácido araquidónico, sintetiza prostaglandinas que iniciam o processo inflamatório. A radiação UV aumenta a quantidade de ácido araquidónico mantendo uma contínua síntese de prostaglandinas na pele, que contribui para o processo de carcinogénese e progressão tumoral (34). A COX-2, assim como as prostaglandinas E2 (PGE2), podem ser desencadeadas por ROS. A radiação UV altera a expressão do fator de crescimento transformador beta (TGF-β), regulador principal das metaloproteínases da matriz, envolvidas no processo da disseminação tumoral (39).

Em síntese, a radiação carcinogénica ao atingir o ADN desencadeia lesões (CPDs, 6 – 4 PPs e 8-oxoGua) que se não forem reparadas e se encontrarem em locais estratégicos, oncogenes ou genes supressores tumorais, levarão a emparelhamentos erráticos que desencadearão um processo de proliferação tumoral. A radiação UV pode potenciar um estado de imunossupressão criando um ambiente favorecedor ao crescimento do tumor.

6.1.2 Lesão por produção de espécies reativas de oxigênio

Os efeitos fototóxicos da radiação UVA são desencadeados pela produção de ROS e pela indução de dímeros de pirimidina. As ROS estão envolvidas em muitas patologias, incluindo o cancro de pele e efeitos adversos induzidos pela radiação UV (20). A fototoxicidade é um tipo de fotossensibilidade que ocorre quando um fármaco ou o seu metabolito atua como fotossensibilizante ou cromóforo, ou seja, tem capacidade de absorver energia de fótons de comprimento de onda seletiva e, conseqüentemente, formar uma molécula num estado excitado (40).

A radiação UVB é absorvida pelo ADN, pelo que provoca diretamente lesões que desencadeiam o processo de carcinogénese, ao contrário da radiação UVA onde uma ínfima parte é absorvida. Contudo, a radiação UVA é também carcinogénica, uma vez que provoca indiretamente lesões no ADN através de fotossensibilizantes (3). Um fotossensibilizante num estado excitado do tipo singuleto reage diretamente com os componentes, provocando lesões em macromoléculas e organelos celulares. Contudo, num estado excitado do tipo tripleto, a molécula fotossensibilizante é mais estável e tem uma semivida maior (40). A radiação UVA induz a formação de CPDs como o resultado de uma transferência de energia do fotossensibilizante num estado excitado do tipo tripleto para as bases de pirimidina (2).

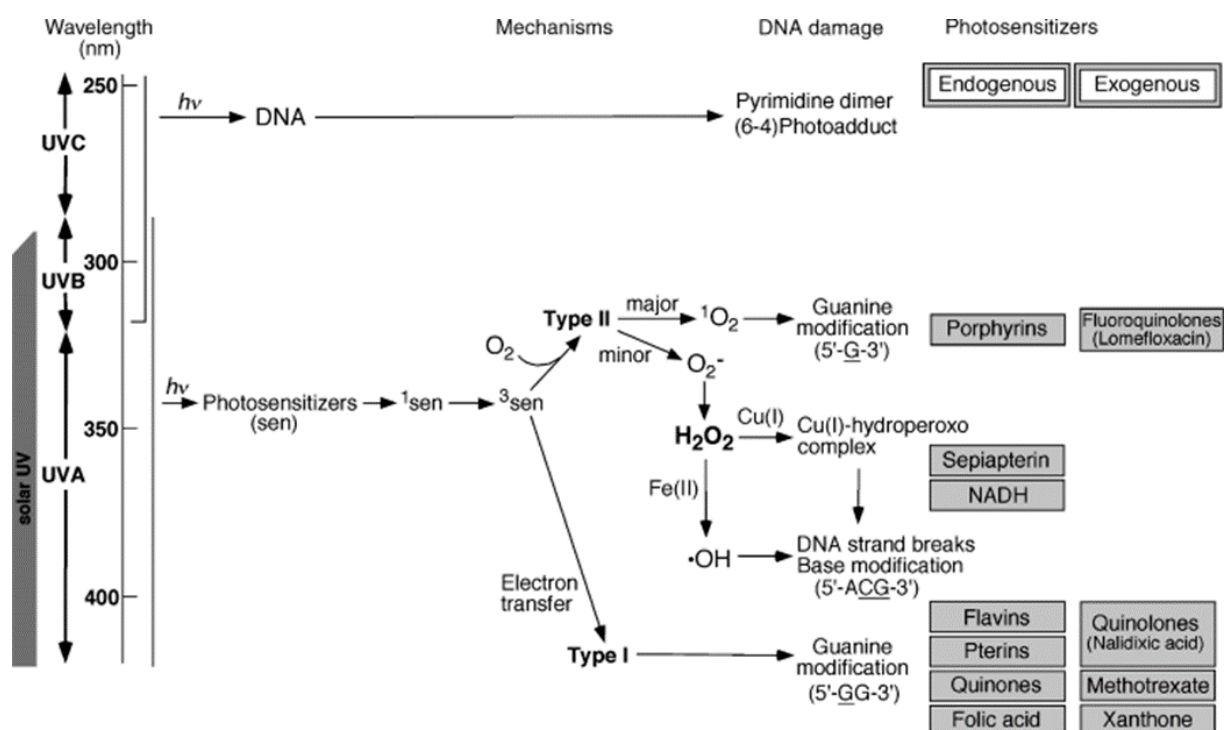


Figura 2. Mecanismos das lesões do ADN induzidas pela radiação UV. Figura retirada de (2), com autorização de John Wiley and Sons. Licença no anexo I.

¹sen, excited singlet state of photosensitizer e ³sen, excited triplet state of photosensitizer.

A radiação UVA provoca lesão do ADN através de dois mecanismos (Fig.2): (i) oxidação de um substrato com perda de um eletrão (mecanismo tipo I) e/ou (ii) produção de ROS (mecanismo tipo II *minor*) ou de dióxigénio singuleto, em inglês *singlet oxygen* 1O_2 (mecanismo tipo II *major*) (41).

O mecanismo de tipo I envolve a transferência de um eletrão através da interação direta do fotossensibilizante excitado e a base do ADN, culminando na formação de um radical intermédio. O passo inicial desta reação de tipo I não necessita de oxigénio O_2 , mas quer O_2 o quer o 1O_2 podem participar nas reações envolvendo os radicais subsequentes. Este mecanismo está dependente do potencial de oxidação da base do ADN e do potencial de redução do fotossensibilizante. De entre as quatro bases do ADN, a guanina tem o menor potencial de oxidação, pelo que é a base com maior probabilidade a ser oxidada. O mecanismo de tipo II *major* implica a transferência de energia de um fotossensibilizante excitado para uma molécula de O_2 para produzir 1O_2 , que é um potente oxidante com uma semivida longa e que reage com várias macromoléculas celulares, incluindo o ADN, especialmente nas bases de guanina. O radical 1O_2 reage diretamente com a guanina e leva à formação de 8-oxoGua. O mecanismo de tipo II *minor* requer a formação do anião superóxido O_2^- , através da transferência de um eletrão do fotossensibilizante para a molécula de oxigénio, seguido pela dismutação em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Tanto o O_2^- como o H_2O_2 não são capazes de lesar o ADN só por si. O H_2O_2 na presença de iões metálicos pode provocar lesão no ADN, reagindo com o Fe(II) formando o radical livre hidroxilo ($\cdot OH$), na designada reação de Fenton. O radical $\cdot OH$ lesa o ADN sem qualquer especificidade para o nucleótido. Ao contrário deste radical, o H_2O_2 , na presença de Cu(II), induz lesões em locais específicos do ADN, nomeadamente nos resíduos de timina e guanina (2,3,41).

No mecanismo de tipo I, a lesão do ADN é especificamente em 5'-G na sequência 5'-GG-3', enquanto o mecanismo tipo II *major* atua num resíduo de guanina sem especificidade para guaninas consecutivas. A lesão 8-oxoGua é contabilizada como o resultado da grande maioria das guaninas lesadas e a sua formação, quer pelo mecanismo tipo I quer tipo II, pode levar a uma incorreta replicação do ADN, resultando em mutações, designadamente transversão $G \rightarrow T$. Estas mutações em guaninas consecutivas presentes em oncogenes *RAS*, como por exemplo GGT \rightarrow TGT e GGC \rightarrow TGC, são encontradas em cancros de pele humana. Estas mutações são precedidas pela formação da lesão 8-oxoGua em 5'-G na sequência 5'-GG-3' através da reação de tipo I (2,3).

Mediante o recurso a estes mecanismos, a radiação UVA induz lesões no ADN na presença de fotossensibilizantes endógenos e exógenos e tem um papel relevante na fotocarcinogénese.

6.2 Fluoroquinolonas e fotocarcinogénese

As FQ são descritas na literatura como fototóxicas (11,17,19), fotogenotóxicas (42–45), fotocarcinogénicas (28,30,45–48) e fotoimunossupressoras (1,27). Vários estudos foram realizados ao longo dos anos com FQ, nomeadamente *in vitro*, em animais e na população.

6.2.1 Estudos *In Vitro*

O ADN genómico é um dos alvos biológicos mais sensíveis a moléculas fotorreativas provocando diferentes lesões como oxidação de purinas e pirimidinas, quebras da cadeia, alteração química de bases dos nucleótidos. As alterações do genoma podem levar a consequências biológicas graves: efeitos negativos na transcrição de genes ativos e/ou a ativação de proteínas cinase específicas por quebras da cadeia do ADN. Quando as lesões do ADN atingem um nível prejudicial para a célula, são desencadeados vários mecanismos, de entre eles, a ativação da proteína p53, que leva a uma paragem no ciclo celular ou a morte celular por apoptose. Se o ataque ao ADN for continuado, os efeitos a longo prazo serão mais nocivos: mutações devido a alterações químicas das purinas e pirimidinas, quebras de cadeia podem levar a recombinação e ainda ocorrer deleções de cromossomas (44). De modo a entender todos estes processos e como as FQ se enquadram nestes mecanismos, desde cedo se utilizaram estudos *in vitro*. A UVA provou não ser capaz de influenciar a viabilidade celular *in vitro* quando usada isoladamente, pelo que os danos celulares têm de advir das FQ (40).

As FQ são fotogenotóxicas *in vitro*: utilizando células de fibroblastos de ratos, *Reavy et al.* (29) observaram que as FQ irradiadas com UVA penetraram nos fibroblastos e conduziram a quebras de cadeias simples do ADN. Estas lesões poderão ser explicadas pela produção de 1O_2 e O_2^- quando as FQ são irradiadas por UVA (49). *Marrot and Agapakis-Causse* (21) ao irradiarem com UVA tanto plasmídeos de ADN superenrolados como cadeias diploides de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* puderam concluir que o potencial de fototoxicidade envolvia diversos fatores: a produção de ROS, a fotoprodução de subprodutos tóxicos, as interações diretas com o ADN com possível impacto na replicação e/ou transcrição.

A lomefloxacin e a fleroxacin são as FQ mais fotomutagénicas e fotocarcinogénicas *in vitro*: ambas contêm um átomo extra de flúor na posição 8 (50). Contudo, as FQ que apenas contêm o átomo de flúor na posição 6 são também capazes de provocar lesões. *Sauvaigo et al.* (51) observaram que a norfloxacin e a ofloxacin foram capazes de induzir quebras de cadeia simples, através da irradiação de ADN de timo de vitela com UVA. A perda do átomo de flúor está associada à produção de um carbeno altamente reativo na posição 8 no caso da lomefloxacin e na posição 6 no caso da enofloxacin, da norfloxacin e da ofloxacin.

Todavia, a velocidade com que as FQ perdem o flúor é muito maior na lomefloxacina do que nas outras. Os catiões arilo resultantes das reações subsequentes são altamente reativos e podem estar envolvidos na degradação de biomoléculas próximas (51). A perda do átomo de flúor parece ser o principal processo envolvido no efeito fototóxico das FQ. Porém, este processo de fotodegradação não é significativo na ciprofloxacina, na moxifloxacina e na rufloxacina. Estas FQ ao serem irradiadas num ambiente aeróbio, sofrem uma N-desmetilação do anel piperazinil via fotoionização de um estado não excitado com formação de eletrões hidratados, assim como produção 1O_2 a partir de um fármaco excitado num estado do tipo tripleto. Na ausência de oxigénio, a rufloxacina sofre descarboxilação. Dos vários processos fotoquímicos sofridos pelas FQ destacam-se a perda do átomo de flúor, a oxidação do substrato amina na posição 7, a descarboxilação e a produção de O_2^- e de 1O_2 (52). A produção de 1O_2 não se correlaciona com a ordem de fototoxicidade das FQ (16). Os fármacos fototóxicos tendem a produzir O_2^- a um ritmo mais elevado, mas não há uma relação entre as taxas de produção e a fototoxicidade (52).

A radiação UVA origina exclusivamente CPDs através de uma transferência de energia de um cromóforo celular excitado num estado do tipo tripleto para uma timina do ADN. As FQ irradiadas com UVA podem atingir níveis suficientes de energia passando a um estado do tipo tripleto, tornando-se capazes de mediar a formação de CPDs (41). *Lhiaubet-Vallet et al.* (53) irradiaram com UVA ADN circular superenrolado em conjunto com FQ e observaram que a norfloxacina e a enoxacina foram capazes de originar CPDs. A mesma conclusão foi observada para a lomefloxacina tanto por *Sauvaigo et al.* (51) através da irradiação de ADN de timo de vitelo com UVA, assim como *Marrot et al.* (43) com a utilização de células humanas de fibroblastos e queratinócitos. Também foi observado a formação de CPDs com a pefloxacina (27). A produção de 1O_2 e O_2^- pela reação tipo II e $\cdot OH$ pela reação tipo I irão desencadear a fotodegradação da 2'-deoxiguanosina (2'-dGuo), um marcador da oxidação da guanina (20). *Hiraku and Kawanishi* (54) irradiaram lomefloxacina em conjunto com fragmentos de ADN que continham o proto-oncogene humano *c-Há-ras-1* e o gene supressor tumoral humano *TP53* com UVA e concluíram que a lomefloxacina provoca lesão em cada resíduo de guanina e potencia a formação de 8-oxoGua. Estas lesões podem posteriormente levar a replicações aberrantes do ADN e a mutações (54).

A produção de ROS devido à fotossensibilização das FQ (21,49) não é inócua para a célula nem para os seus componentes. Uma vez que o stress oxidativo está implicado em dano celular e molecular, as células possuem um complexo sistema antioxidante, de entre os quais se destaca a conversão de ROS a compostos inofensivos através de enzimas antioxidantes, como por exemplo a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutatona

(40). De modo a aferir quais os impactos que as FQ têm no sistema antioxidante, *Kowalska et al.* (40) utilizou células de melanócitos epidérmicos humanos expostos a radiação UVA e a moxifloxacina: houve uma redução na atividade da SOD em comparação com o controlo; redução dos níveis de mRNA da superóxido dismutase mitocondrial (SOD2); decréscimo na atividade da catalase em relação ao controlo. A diminuição dos sequestradores de radicais livres que compõem o sistema antioxidante terá consequências nos organelos da célula nomeadamente na membrana celular e na mitocôndria. A lesão na membrana celular pode ser monitorizada pela peroxidação lipídica, cujo importante efeito protetor é exercido pela SOD e a catalase (23). Além dos sequestradores de radicais livres, também a melanina neutraliza as ROS e, portanto, exerce um efeito protetor à célula. Contudo, as FQ são capazes de se ligar à melanina formando complexos que se acumulam na célula e desempenham um papel contrário ao da melanina, ao aumentarem a toxicidade das FQ (40). Em conjunto com o sistema antioxidante, a célula contém também no seu material genético genes que são expressos em situações de stress. É o caso do gene *HO-1*, cuja expressão é desencadeada pela presença de FQ na célula (43).

As FQ são capazes de interromper o ciclo celular e são potentes indutores da morte celular programada (24,27,43). *Dwivedi et al.* (24) usaram nos seus estudos uma linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT), submetida a radiação UVA e levofloxacina: observaram que em células expostas à fluoroquinolona, o gene *p21* regulou a interrupção do ciclo celular em G2 devido às lesões no ADN, ao impedir a ativação do complexo ciclina B1 – cdc2 ou bloqueando as fosforilações inibitórias de proteínas pelas CDKs; a levofloxacina não provocou alterações na expressão do gene *Bax*, mas aumentou o rácio *Bax/Bcl-2*, uma vez que levou a uma inibição da expressão do gene *Bcl-2*. A atividade da *Bcl-2* é essencialmente de supressora tumoral e é regulada pela *Bax*, que promove a morte celular. *Singh et al.* (27) usaram a mesma linha celular para estudar a pefloxacina: observaram que na presença da fluoroquinolona e UVA havia ativação da proteína pro-apoptótica *Bax*, inibição das anti-apoptóticas *Bcl-2* e procaspase-3, além de lesão dos demais organelos como a mitocôndria e o lisossoma, essenciais para a apoptose. Um outro mecanismo de apoptose que pode ser desencadeado pela toxicidade das FQ é a indução do Fas-L. O Fas-L pode servir de sensor externo pro-apoptóticos de células com lesões no seu ADN. As FQ são capazes de induzir a expressão de Fas-L via ativação de AP1, um fator de transcrição de vários genes de stress celular (43).

Apesar do principal mecanismo de fotogenotoxicidade das FQ ser através da formação de CPDs, estes fármacos podem associar-se com as topoimerases de mamíferos, podendo esta interação ser potenciada pela radiação UV (55). Para avaliar esta hipótese, *Perrone et al.* (55) usaram um plasmídeo de *Escherichia coli* que foi exposto a diversas FQ em conjunto

com UVA e chegaram à conclusão que algumas FQ podem exercer o seu efeito fotogenotóxico através inibição da enzima topoisomerase II α .

Um mecanismo de Reparação por Excisão de Nucleotídeo (NER) errático é muitas vezes associado a fotossensibilidade e a uma alta incidência de cancro cutâneo. Este sistema repara o ADN potencialmente mutagénico ao remover as lesões CPDs e 6-4 PPs. A proteína de replicação humana A é um dos componentes essenciais da NER, sendo extremamente sensível à oxidação. As FQ são capazes de gerar um stress oxidativo na célula, que conduz inevitavelmente à oxidação da proteína de replicação humana A. Esta proteína oxidada está associada a uma diminuição da capacidade de reparação da NER. A vulnerabilidade da NER pode levar a uma conexão entre a fotossensibilidade cutânea e a um aumento do risco de cancro de pele (56).

Os resultados *in vitro* fornecem uma pista de que a exposição das FQ à luz solar pode contribuir para a sua fototoxicidade/fotogenotoxicidade *in vivo*.

6.2.2 Estudos em animais

O potencial fotogenotóxico, já documentado *in vitro*, foi estudado em ratos por *Reus et al.* (19), sujeitos a radiação UVA e a lomefloxacina: observaram um aumento da caspase-3 ativada e um aumento da histona H2A fosforilada. A caspase-3 é um componente na cascata da sinalização da apoptose enquanto a histona H2A é um biomarcador de quebras de cadeias duplas do ADN. Estes dois biomarcadores de fotogenotoxicidade evidenciam um efeito fotogenotóxico *in vivo*. Puderam concluir ainda que a fotogenotoxicidade não era reprodutível na ausência de fototoxicidade e que generalizadamente se correlacionava com o potencial de fotocarcinogénese (19). As FQ além de exercerem um efeito fotogenotóxico na pele, podem ainda provocar lesões no olho, nomeadamente na córnea e na retina, uma vez que estas estruturas estão sujeitas a exposição de radiação (42).

Durante uma exposição inicial curta à radiação UV, a reação cutânea inclui a apoptose de alguns queratinócitos e inflamação, seguido de hiperplasia epidérmica. Em animais expostos a radiação UV, este estágio regride se a irradiação for descontinuada. Se a exposição for prolongada, é observada hiperplasia epidérmica antes do aparecimento da neoplasia. A hiperplasia combinada com displasia citológica é classificada em humanos como queratose solar, lesão comum por exposição a radiação UV (48). *Mäkinen et al.* (48) irradiaram com UVA ratos Skh-1 ligeiramente pigmentados a tomar FQ e detetaram lesões em células escamosas com mudanças severas no tamanho do núcleo e da célula e, ocasionalmente, observaram células com aparência de carcinoma *in situ*. Dos ratos observados por *Mäkinen et al.* (48) foram identificadas as seguintes lesões: papilomas, queratoacantomas, queratose

solar e carcinoma de célula escamosas. Os papilomas são tumores benignos mais comuns quer em humanos quer em ratos experimentais. Os queratoacantomas são uma categoria de tumores benignos, remanescentes de papilomas e que, por vezes, regredem espontaneamente. O carcinoma de células escamosas é já considerado um cancro cutâneo, marcador definitivo de carcinogénese, tanto de químicos como de radiação UV (48). *Mäkien et al.* (48) concluíram que as FQ foram fotocarcinogénicas: os animais expostos a fleroxacina+UVA, ciprofloxacina+UVA e ofloxacina+UVA exibiram um aumento de tumores benignos quando comparados com animais expostos apenas a UVA; o número de tumores benignos e malignos foi superior nos ratos expostos a lomefloxacina+UVA. *Klecak et al.* (28) realizaram estudos em ratos Skh-1 ligeiramente pigmentados, os quais foram expostos a diversas FQ e UVA: observaram o aparecimento dos mesmos tipos de tumores benignos (papilomas, queratoacantomas) e tumores malignos (CEC) quando expostos à lomefloxacina. Estudos posteriores (30,47) reforçam a evidência de que as FQ são capazes de induzir *in vivo* quer tumores benignos quer malignos.

A ausência de um mecanismo de Reparação por Excisão de Nucleotídeo (NER) funcional está associado a um aumento do potencial fotocarcinogénico das FQ, uma vez que deixa de haver uma correção de lesões no ADN. Se estas lesões ocorrerem em lugares estratégicos como genes supressores tumorais ou oncogenes, poderá ocorrer o aparecimento de uma célula tumoral. *Itoh et al.* (46) usaram ratos com defeito na reparação de dímeros de pirimidina, homozigóticos para a ausência do gene *XPA* que codifica uma proteína da NER: os ratos desenvolveram um grande número de carcinomas de células escamosas, quando expostos a lomefloxacina e UVA.

6.2.3 Estudos clínicos

Os fármacos fotossensibilizantes têm sido extensamente estudados e tem havido uma crescente evidência de que há um aumento do risco fotocarcinogénico durante a sua toma (57). A hidroclorotiazida é um dos fármacos em que está estabelecido uma correlação, mesmo que modesta, entre o seu uso e o aparecimento de cancro cutâneo não-melanoma (CCNM: CEC e CBC) (58). Por esse motivo, o Infarmed, em articulação com a Agência Europeia do Medicamento (EMA), efetuou uma comunicação dirigida aos profissionais de saúde, datada de 10 de outubro de 2018: além de serem reforçadas as medidas de proteção solar, seria aconselhável repensar a utilização do fármaco em doentes com antecedentes de cancro de pele (59).

As FQ provaram ser fotocarcinogénicas *in vitro* e em animais, o que permite induzir que possam ter algum desse efeito quando prescritas a doentes. Nos últimos anos, foi desenvolvido um conjunto de trabalhos que avaliaram a associação entre a terapêutica com

FQ e o risco de cancro cutâneo. Na Tabela 1 são apresentados alguns dos seus elementos metodológicos e os seus principais resultados.

Tabela 1. Estudos que avaliaram a associação da terapêutica com FQ e o risco de cancro de pele: principais resultados

Estudo	Tipo de estudo	População em estudo	CBC	CEC	Melanoma
<i>Karagas et al.</i> (9)	Caso-controlo	582 CBC 281 CEC 532 controlos	Fármacos fotossensibilizantes associados OR 1,5; IC 95%, 1,0-2,4	Fármacos fotossensibilizantes associados OR 1,8 IC 95%, 1,1-3,2	Não avaliado
<i>Robinson et al.</i> (7)	Caso-controlo	1 637 CBC 1 605 CEC 1 952 controlos	Antimicrobianos associados OR 1,9; 95% CI 1,3 – 2,8 Antimicrobianos associados, com tratamento superior a 1 ano OR 1,9; 95% CI 1,0 – 3,7	Antimicrobianos associados OR 1,4; IC 95%, 0,9 – 2,1	Não avaliado
<i>Siiskonen et al.</i> (60)	Caso-controlo	1 318 melanoma 6 786 controlos	Não avaliado	Não avaliado	Quinolonas associadas OR _{adj} 1,33; 95 % IC 1,01–1,76
<i>Kaae et al.</i> (8)	Estudo de cohort	4 761 749 indivíduos	Ciprofloxacina associada IRR 1,2; 95% IC 1,1–1,2 Levofloxacina associada IRR 1,5; 95% IC 1,1 – 2,1) Levofloxacina associada, quando prolongado o curso de tratamento IRR 1,7; 95% IC 0,7–3,9	Ciprofloxacina associada IRR 1,3; 95% IC 1,2–1,4 Levofloxacina Associada IRR 1,0; 95% IC 0,4 – 2,3 Levofloxacina associada, quando prolongado o curso de tratamento IRR 1,5; 95% IC 0,1 – 29	Levofloxacina associada, quando prolongado o curso de tratamento IRR 1,5; 95% IC 0,03 – 84

CBC: carcinoma basocelular; CEC: carcinoma espinhocelular; OR: *odds ratio*; OR_{adj}: *odds ratio* ajustado; IRR: *incidente ratio rate*.

Os estudos realizados nos Estados Unidos da América parecem demonstrar uma associação entre a terapêutica com fármacos fotossensibilizantes e o risco de CCNM. Em 2007, *Karagas et al.* (9) observaram uma associação significativa com uma taxa de probabilidade (OR – *odds ratio*) de 1,5 [intervalo de confiança (IC) 95%, 1,0-2,4] para o CBC e uma taxa de 1,8 (IC 95%, 1,1-3,2) para o CEC. Verificou-se ainda um claro incremento do risco com o prolongamento do tratamento superior a um ano (CBC: OR 1,9; IC 95%, 1,1-3,3 e CEC: OR 2,3; IC 95%, 1,1-4,5). Em 2013, *Robinson et al.* (7) estudaram uma população constituída por indivíduos com o diagnóstico de CCNM (1 637 de CBC e 1 605 de CEC) emparelhada com um conjunto de 1 952 casos-controlo. Os indivíduos que estavam sob tratamento de um antimicrobiano, nos quais se incluíam FQ, tiveram um risco aumentado para CEC (OR 1,4; IC 95%, 0,9 – 2,1) e para CBC (OR 1,9; 95% CI 1,3 – 2,8). O risco foi consideravelmente superior com o tratamento prolongado superior a um ano para CBC (OR 1,9; 95% CI 1,0 – 3,7) (7).

Na Holanda, foi realizado um estudo que incluiu 1 318 indivíduos com o diagnóstico histológico de melanoma com uma amostra formada por 6 786 casos-controlo. Os indivíduos que cumpriam terapêutica com quinolonas tinham uma taxa de probabilidade ajustada de 1,33 [*odds ratio* ajustado (OR_{adj}) 1,33; 95 % IC 1,01–1,76]. A toma de quinolonas parece estar relacionada com um risco aumentado de desenvolver melanoma, mesmo quando usadas por um pequeno período de tempo correspondendo a um tratamento *standard* (60).

Em 2010, na Dinamarca foi desenhado um estudo de cohort para inferir a associação de fármacos fotossensibilizantes e o risco de aparecimento de cancro de pele, tanto CEC, CBC como melanoma. Foram incluídos 4 761 749 indivíduos, dos quais 3 407 099 foi lhes prescrito, pelo menos, um fármaco fotossensibilizante. Foram observados 35 328 casos de CBC, 7 254 casos de melanoma e 6 550 casos de CEC. O estudo foi dividido em fármacos de longo tratamento e curto, onde se incluíam a ciprofloxacina e a levofloxacina. Puderam concluir que havia um aumento do risco de cancro de pele de mais de 20% em doentes com fármacos de curta duração comparado com não utilizadores. Foi ainda possível observar que o tratamento de curta duração com as FQ associava-se a um aumento do risco de CBC (ciprofloxacina *incidente ratio rate* (IRR) 1,2; 95% IC 1,1–1,2 e levofloxacina IRR 1,5; 95% IC 1,1 – 2,1) e de CEC (ciprofloxacina IRR 1,3; 95% IC 1,2–1,4 e levofloxacina IRR 1,0; 95% IC 0,4 – 2,3). Foram também estudados fármacos considerados de curta duração terapêutica, mas aumentou-se o curso de tratamento. O risco para o desenvolvimento de um tumor num esquema prolongado de terapêutica foi significativamente aumentado, especialmente para a levofloxacina: CBC (IRR 1,7; 95% IC 0,7–3,9); melanoma (IRR 1,5; 95% IC 0,03 – 84) e CEC (IRR 1,5; 95% IC 0,1 – 29) (8).

Apesar de os estudos clínicos com FQ puderem fornecer alguma evidência de que há um papel significativo na fotossensibilização e, posteriormente, no aparecimento de tumores, estes fármacos continuam a ser amplamente prescritos, uma vez que o esquema terapêutico é, na maioria das vezes, curto. Contudo, há uma gama de doentes que necessita de longos cursos de tratamento, nomeadamente em algaliados para profilaxia de infeções urinárias ou no tratamento da lepra e da tuberculose. Há uma clara falta de evidência, por falta de estudos, no efeito de um tratamento prolongado com FQ. Por outro lado, há evidências de que a hidroclotiazida, um fármaco fotossensibilizante com longos cursos de tratamento, está associada ao aparecimento de tumores cutâneos não melanoma (58). Por essa razão, tem sido recomendada a sua substituição (59). É, por isso, aconselhável o desenvolvimento de estudos clínicos cujo tema central averigue os efeitos fotossensibilizantes a longo prazo em doentes cuja toma de FQ é prolongada.

6.2.4 Fotoimunossupressão

Os tumores causados pela radiação UV são altamente antigénicos e, portanto, podem ser facilmente reconhecidos pelo sistema imunitário. É o caso de tumores induzidos por radiação UV, altamente antigénicos, que foram transplantados para ratos normais não UV irradiados e que foram completamente rejeitados. Apesar deste aparente controlo imunológico, o cancro de pele tem uma alta prevalência na população, principalmente aquela com mais exposição solar. Estudos têm evidenciado que a radiação UV tanto induz uma imunossupressão local como inibe uma resposta imune sistémica aos antigénios das células mutadas. Desta forma, as células tumorais proliferam sem que haja uma resposta imunológica (61). A toma de FQ pode agravar a imunossupressão contribuindo para a falta de controlo das células mutadas, que vão multiplicando sem vigilância. *Singh et al.* (27) estudaram o efeito da pefloxacina numa linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT) quando era exposta a radiação UVA: houve promoção da supressão imune com doses não tóxicas em macrófagos peritoneais através da modulação de citocinas, nomeadamente observaram uma redução significativa de interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa. *Sun et al.* (1) demonstraram que a pefloxacina e a ciprofloxacina diminuía localmente o número de células de *Langerhans*, cuja função é a apresentação de antigénios às células do sistema imune, iniciando a resposta imunológica.

7 Conclusão

As FQ podem atuar como fármacos fotossensibilizantes sob a radiação UVA e provocar lesões no ADN. Estas lesões se ocorrerem em oncogenes e/ou supressores tumorais e não forem reparadas, podem desencadear o aparecimento de uma célula tumoral. A imunossupressão provocada pela radiação UV pode ser potenciada pelas FQ, agravando o quadro de proliferação de células cancerígenas sem controlo.

Estes fármacos são comprovadamente fotogenotóxicos e fotocarcinogénicos tanto *in vitro* como em animais. Estudos clínicos parecem sugerir um risco aumentado de aparecimento de cancro de pele em doentes a tomar FQ.

Dadas as evidências existentes na literatura, apesar de não serem completamente esclarecedoras, é sempre de boa prática clínica aconselhar os doentes. Com o objetivo de prevenir o surgimento de cancro cutâneo, as recomendações passarão por:

- Evicção da exposição à luz solar entre as 11h00 e as 16h00;
- Utilização de vestuário adequado como roupa de algodão com uma malha mais apertada ou com maior densidade;
- Uso de chapéu;
- Utilização de protetor solar com um índice de proteção igual ou superior a 50;
- Educação para o reconhecimento de sinais de alarme de lesões pigmentadas ou queratosas/crostas ou ulcerações cutâneas;

O médico pode ainda optar por uma ação mais preventiva ao prescrever o fármaco para o fim do dia de modo a reduzir a dose circulante durante as horas de sol.

Este artigo reforça a associação entre a toma de FQ e o risco de aparecimento de cancro de pele, mas também evidencia uma carência de estudos no tema. Parece-me necessário que mais estudos sejam propostos com um desenho metodológico robusto, que controlem potenciais modificadores, como a exposição solar, o fototipo, os longos cursos de tratamento, de forma a identificar a verdadeira magnitude das relações entre a terapêutica com FQ e o cancro de pele.

8 Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Maria Margarida Gonçalo a simpatia e amabilidade com que sempre me ajudou, pela pronta disponibilidade, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos.

9 Referências

1. Sun YW, Heo EP, Cho YH, Bark K-M, Yoon TJ, Kim TH. Pefloxacin and ciprofloxacin increase UVA-induced edema and immune suppression. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* [Internet]. 2001 Aug;17(4):172–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0781.2001.170406.x>
2. Hiraku Y, Ito K, Hirakawa K, Kawanishi S. Photosensitized DNA Damage and its Protection via a Novel Mechanism†. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2007 Feb 26;83(1):205–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1562/2006-03-09-IR-840>
3. Kawanishi S, Hiraku Y. Sequence-Specific DNA Damage Induced by UVA Radiation in the Presence of Endogenous and Exogenous Photosensitizers. In: *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology* [Internet]. Basel: KARGER; 2000 [cited 2021 Sep 21]. p. 74–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11225203/>
4. Marrot L, Meunier J-R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2008 May;58(5):S139–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962207024176>
5. Moore DE. Drug-induced cutaneous photosensitivity: Incidence, mechanism, prevention and management [Internet]. Vol. 25, *Drug Safety. Drug Saf*; 2002 [cited 2021 Sep 21]. p. 345–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12020173/>
6. Ibbotson S. Drug and chemical induced photosensitivity from a clinical perspective. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2018 Dec 5;17(12):1885–903. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30283959>
7. Robinson SN, Zens MS, Perry AE, Spencer SK, Duell EJ, Karagas MR. Photosensitizing Agents and the Risk of Non-Melanoma Skin Cancer: A Population-Based Case–Control Study. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2013 Aug;133(8):1950–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536351X>
8. Kaae J, Boyd HA, Hansen A V., Wulf HC, Wohlfahrt J, Melbye M. Photosensitizing medication use and risk of skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2010 Nov [cited 2021 Oct 10];19(11):2942–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20861398/>
9. Karagas MR, Stukel TA, Umland V, Tsoukas MM, Mott LA, Sorensen HT, et al. Reported Use of Photosensitizing Medications and Basal Cell and Squamous Cell Carcinoma of the Skin: Results of a Population-Based Case–Control Study. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2007 Dec;127(12):2901–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15332073>
10. Sánchez G, Hidalgo ME, Vivanco JM, Escobar J. Induced and Photoinduced DNA Damage by Quinolones: Ciprofloxacin, Ofloxacin and Nalidixic Acid determined by Comet Assay. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2005 [cited 2021 Oct 10];81(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15691228/>
11. Lhiaubet-Vallet V, Bosca F, Miranda MA. Photosensitized DNA damage: The case of fluoroquinolones [Internet]. Vol. 85, *Photochemistry and Photobiology. Photochem Photobiol*; 2009 [cited 2021 Sep 22]. p. 861–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19320842/>
12. ZELICKSON AS. PHOTOTOXIC REACTION WITH NALIDIXIC ACID. *JAMA* [Internet]. 1964 Nov 9;190:556–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14198018>

13. Oliveira HS, Gonçalo M, Figueiredo AC. Photosensitivity to lomefloxacin. A clinical and photobiological study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* [Internet]. 2000 [cited 2021 Sep 29];16(3):116–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10885440/>
14. Moore DE. Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs. In: *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [Internet]. *Mutat Res*; 1998 [cited 2021 Sep 29]. p. 165–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9920442/>
15. Shimoda K. Mechanisms of quinolone phototoxicity. In: *Toxicology Letters* [Internet]. *Toxicol Lett*; 1998 [cited 2021 Oct 10]. p. 369–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10022281/>
16. Martínez LJ, Sik RH, Chignell CF. Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. *Photochem Photobiol* [Internet]. 1998 Apr;67(4):399–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9559584>
17. Kawada A, Hatanaka K, Gomi H, Matsuo I. In vitro phototoxicity of new quinolones: Production of active oxygen species and photosensitized lipid peroxidation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* [Internet]. 1999 [cited 2021 Sep 22];15(6):226–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10599972/>
18. Spratt TE, Schultz SS, Levy DE, Chen D, Schlüter G, Williams GM. Different mechanisms for the photoinduced production of oxidative dna damage by fluoroquinolones differing in photostability. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Sep 22];12(9):809–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10490502/>
19. Reus AA, Usta M, Kenny JD, Clements PJ, Pruiimboom-Brees I, Aylott M, et al. The in vivo rat skin photomicronucleus assay: phototoxicity and photogenotoxicity evaluation of six fluoroquinolones. *Mutagenesis* [Internet]. 2012 Nov;27(6):721–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935223>
20. Agrawal N, Ray RS, Farooq M, Pant AB, Hans RK. Photosensitizing Potential of Ciprofloxacin at Ambient Level of UV Radiation. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2007 Jul 5 [cited 2021 Oct 10];83(5):1226–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17880519/>
21. Marrot L, Agapakis-Causse C. Differences in the photogenotoxic potential of two fluoroquinolones as shown in diploid yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*) and supercoiled plasmid DNA. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2000 Jun 22 [cited 2021 Sep 21];468(1):1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10863152/>
22. SCHEIFE RT, CRAMER WR, DECKER EL. PHOTSENSITIZING POTENTIAL OF OFLOXACIN. *Int J Dermatol* [Internet]. 1993 [cited 2021 Oct 10];32(6):413–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8320021/>
23. Viola G, Facciolo L, Canton M, Vedaldi D, Dall'Acqua F, Aloisi GG, et al. Photophysical and phototoxic properties of the antibacterial fluoroquinolones levofloxacin and moxifloxacin [Internet]. Vol. 1, *Chemistry and Biodiversity*. *Chem Biodivers*; 2004 [cited 2021 Sep 22]. p. 782–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17191880/>
24. Dwivedi A, Mujtaba SF, Kushwaha HN, Ali D, Yadav N, Singh SK, et al. Photosensitizing mechanism and identification of levofloxacin photoproducts at ambient UV radiation. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Oct 10];88(2):344–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22211524/>
25. Catalfo A, Calandra ML, Renis M, Serrentino ME, De Guidi G. Rufloxacin-induced photosensitization in yeast. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2007 Feb 2 [cited 2021 Sep

- 29];6(2):181–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17277842/>
26. Serrentino M-E, Catalfo A, Angelin A-R, de Guidi G, Sage E. Photosensitization induced by the antibacterial fluoroquinolone Rofloxacin leads to mutagenesis in yeast. *Mutat Res* [Internet]. 2010 Oct 13;692(1–2):34–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696178>
 27. Singh J, Srivastva AK, Mandal P, Chandra S, Dubey D, Dwivedi A, et al. Under ambient UVA exposure, pefloxacin exhibits both immunomodulatory and genotoxic effects via multiple mechanisms. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Sep 21];178:593–605. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29275239/>
 28. Klecak G, Urbach F, Urwyler H. Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 1997 Feb;37(3):174–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134496074246>
 29. Reavy HJ, Traynor NJ, Gibbs NK. Photogenotoxicity of Skin Phototumorigenic Fluoroquinolone Antibiotics Detected Using the Comet Assay. *Photochem Photobiol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Sep 22];66(3):368–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9297980/>
 30. Wirnitzer U, Gross-Tholl N, Herbold B, von Keutz E. Photo-chemically induced DNA effects in the comet assay with epidermal cells of SKH-1 mice after a single oral administration of different fluoroquinolones and 8-methoxypsoralen in combination with exposure to UVA. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2006 Oct 10 [cited 2021 Oct 1];609(1):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16824784/>
 31. Rosen JE, Prahalad AK, Schlüter G, Chen D, Williams GM. Quinolone antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cultured liver epithelial cells. *Photochem Photobiol* [Internet]. 1997 Jun;65(6):990–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188278>
 32. Verna LK, Chen D, Schluter G, Williams GM. Inhibition by singlet oxygen quenchers of oxidative damage to DNA produced in cultured cells by exposure to a quinolone antibiotic and ultraviolet A irradiation. *Cell Biol Toxicol* [Internet]. 1998 Jun;14(3):237–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689496>
 33. De Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB Radiation. *Skin Pharmacol Physiol* [Internet]. 2002 [cited 2021 Sep 29];15(5):316–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12239425/>
 34. Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies: An Update. *Anticancer Res* [Internet]. 2018 Jan 20;38(2):1153–8. Available from: <http://ar.iijournals.org/content/38/2/1153.abstract>
 35. Cadet J, Douki T. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2018 [cited 2021 Nov 24];17(12):1816–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29405222/>
 36. Vink AA, Roza L. Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2001 Dec;65(2–3):101–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134401002457>
 37. Black JO. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2016 Jun 14;10(2):139–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12105-016-0707-8>
 38. Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA [Internet]. Vol. 571, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. *Mutat Res*;

- 2005 [cited 2021 Sep 29]. p. 3–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748634/>
39. Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez J, Juarranz A, Devmurari A, Chalensouk-Khaosaat J, et al. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants* [Internet]. 2015 Mar 26;4(2):248–68. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/4/2/248>
 40. Kowalska J, Banach K, Rok J, Beberok A, Rzepka Z, Wrześniok D. Molecular and biochemical basis of fluoroquinolones-induced phototoxicity—the study of antioxidant system in human melanocytes exposed to UV-a radiation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Dec 2 [cited 2021 Sep 22];21(24):1–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33352719/>
 41. Brem R, Guven M, Karran P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA [Internet]. Vol. 107, *Free Radical Biology and Medicine*. *Free Radic Biol Med*; 2017 [cited 2021 Sep 21]. p. 101–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27989755/>
 42. Struwe M, Greulich KO, Junker U, Jean C, Zimmer D, Suter W, et al. Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo comet assay. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2008 [cited 2021 Oct 1];7(2):240–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18264593/>
 43. Marrot L, Belaïdi JP, Jones C, Perez P, Meunier JR, Riou L, et al. Molecular Responses to Photogenotoxic Stress Induced by the Antibiotic Lomefloxacin in Human Skin Cells: From DNA Damage to Apoptosis. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2003 Sep;121(3):596–606. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15303961>
 44. Marrot L, Belaidi JP, Chaubo C, Meunier JR, Perez P, Agapakis-Cause C. Fluoroquinolones as chemical tools to define a strategy for photogenotoxicity in vitro assessment. *Toxicol Vitr* [Internet]. 2001 [cited 2021 Sep 22];15(2):131–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11287172/>
 45. Müller L, Kasper P, Kersten B, Zhang J. Photochemical genotoxicity and photochemical carcinogenesis — Two sides of a Coin? *Toxicol Lett* [Internet]. 1998 Dec;102–103:383–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427498002367>
 46. Itoh T, Miyauchi-Hashimoto H, Sugihara A, Tanaka K, Horio T. The Photocarcinogenesis of Antibiotic Lomefloxacin and UVA Radiation Is Enhanced in Xeroderma Pigmentosum Group A Gene-Deficient Mice. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2005 Sep;125(3):554–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15324398>
 47. Bulera SJ, Theiss JC, Festerling TA, De La Iglesia FA. In vitro photogenotoxic activity of clinafloxacin: A paradigm predicting photocarcinogenicity. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2021 Oct 1];156(3):222–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10222314/>
 48. Mäkinen M, Forbes PD, Stenbäck F. Quinolone antibacterials: A new class of photochemical carcinogens. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 1997 Feb [cited 2021 Sep 22];37(3):182–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9085565/>
 49. Umezawa N, Arakane K, Ryu A, Mashiko S, Hirobe M, Nagano T. Participation of reactive oxygen species in phototoxicity induced by quinolone antibacterial agents. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1997 Jun 15 [cited 2021 Sep 22];342(2):275–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9186488/>
 50. Martinez LJ, Li G, Chignell CF. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial

- agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochem Photobiol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Sep 22];65(3):599–602. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9077147/>
51. Sauvaigo S, Douki T, Odin F, Caillat S, Ravanat J-L, Cadet J. Analysis of Fluoroquinolone-mediated Photosensitization of 2'-Deoxyguanosine, Calf Thymus and Cellular DNA: Determination of Type-I, Type-II and Triplet-Triplet Energy Transfer Mechanism Contribution¶. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2001 Mar;73(3):230. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11281018>
 52. De Guidi G, Bracchitta G, Catalfo A. Photosensitization Reactions of Fluoroquinolones and Their Biological Consequences. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2011 Nov;87(6):1214–29. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.2011.00978.x>
 53. Lhiaubet-Vallet V, Cuquerella MC, Castell J V., Bosca F, Miranda MA. Triplet excited fluoroquinolones as mediators for thymine cyclobutane dimer formation in DNA. *J Phys Chem B* [Internet]. 2007 Jun 28 [cited 2021 Sep 29];111(25):7409–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17523621/>
 54. Hiraku Y, Kawanishi S. Distinct mechanisms of guanine-specific DNA photodamage induced by nalidixic acid and fluoroquinolone antibacterials. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2000 Oct 15 [cited 2021 Sep 29];382(2):211–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11068871/>
 55. Perrone CE, Takahashi KC, Williams GM. Inhibition of human topoisomerase II α by fluoroquinolones and ultraviolet A irradiation. *Toxicol Sci* [Internet]. 2002 Sep [cited 2021 Oct 10];69(1):16–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12215656/>
 56. Guven M, Brem R, Macpherson P, Peacock M, Karran P. Oxidative Damage to RPA Limits the Nucleotide Excision Repair Capacity of Human Cells. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 Sep 21];135(11):2834–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26134950/>
 57. O’Gorman SM, Murphy GM. Photosensitizing medications and photocarcinogenesis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* [Internet]. 2014 Feb;30(1):8–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393207>
 58. Garrido PM, Borges-Costa J. Terapêutica com hidroclorotiazida e risco de cancro cutâneo não melanoma: revisão da literatura. *Rev Port Cardiol* [Internet]. 2020 Mar;39(3):163–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0870255120301311>
 59. Infarmed. Comunicação dirigida aos profissionais de saúde. Hidroclorotiazida – risco de cancro da pele não melanoma (carcinoma basocelular ou basalioma, carcinoma espinocelular ou pavimentocelular). 2018;
 60. Siiskonen SJ, Koomen ER, Visser LE, Herings RMC, Guchelaar HJ, Stricker BHC, et al. Exposure to phototoxic NSAIDs and quinolones is associated with an increased risk of melanoma. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Sep 22];69(7):1437–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23471440/>
 61. Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2006 Feb;5(2):208–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16465307>

Anexo I – Licença para uso da Figura 2

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 13, 2022

This Agreement between FMUC -- Ricardo Lopes ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5227300560388
License date	Jan 13, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Photochemistry and Photobiology
Licensed Content Title	Photosensitized DNA Damage and its Protection via a Novel Mechanism†
Licensed Content Author	Shosuke Kawanishi, Kazutaka Hirakawa, Kimiko Ito, et al
Licensed Content Date	Feb 26, 2007
Licensed Content Volume	83
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	8
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

Format	Electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	THE ROLE OF FLUOROQUINOLONES IN THE PHOTOCARCINOGENESIS' MECHANISM:
Institution name	Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal
Expected presentation date	Feb 2022
Order reference number	123456789
Portions	Figure 1
Requestor Location	FMUC Avenida Afonso Henriques 27 Coimbra, Coimbra 3000-010 Portugal Attn: FMUC
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing

transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE

MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

