



2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Terapia Fotodinâmica:  
Uma Abordagem no Retinoblastoma

Ricardo Jorge Marques Teixeira

2013



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

### Terapia Fotodinâmica: Uma Abordagem no Retinoblastoma

**Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Carmen Alpoim (Universidade de Coimbra)**

Ricardo Jorge Marques Teixeira

2013

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

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



*Para ser grande, sê inteiro:  
Nada teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és no mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.*

*Ricardo Reis*



## **Agradecimentos**



Após a finalização desta dissertação e, apesar do seu caráter de trabalho individual, este não seria possível sem a contribuição de várias pessoas, às quais não poderia deixar de expressar o meu profundo agradecimento:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação científica, disponibilidade e apoio totais prestados durante o desenvolvimento desta dissertação. Um agradecimento em especial por toda a revisão e críticas construtivas ao manuscrito, bem como pela partilha de conhecimento e experiência científica.

À Professora Doutora Maria Carmen Alpoim, Professora da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, orientadora interna desta dissertação, pela sua total disponibilidade, partilha de conhecimento e experiência científica.

À Mestre Mafalda Laranjo, co-orientadora desta dissertação, todas as palavras serão insuficientes para demonstrar a minha gratidão. Por toda a confiança depositada em mim, por todo o apoio e disponibilidade, pela amizade e paciência que teve comigo durante todo este ano e por ter sido sempre um exemplo de pessoa dedicada, trabalhadora e profissional. Acima de tudo, o meu obrigado por ter sempre exigido o máximo de mim, de modo a que pudesse sempre superar-me a cada dia e a cada desafio.

Ao Doutor Arménio Coimbra Serra, em primeiro lugar pelo apoio imprescindível na preparação e síntese dos compostos estudados neste trabalho de investigação e à Professora Doutora Marta Piñeiro, pelo apoio nos estudos de captação.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua disponibilidade e apoio indispensável para a elaboração deste trabalho científico, e à Mestre Ana Cristina Gonçalves pela amizade, pela disponibilidade constante e empenho sempre demonstrados, nomeadamente no auxílio

prestado aos estudos de citometria de fluxo e pela partilha de conhecimento na interpretação dos resultados.

À Mestre Margarida Abrantes, pelo exemplo de dedicação, trabalho e de alegria que sempre demonstrou, dia após dia neste ano de trabalho. Um agradecimento pela partilha de conhecimento e por todo o tempo dedicado a este trabalho.

Ao Mestre João Casalta por toda a disponibilidade e ajuda preciosa no tratamento estatístico dos resultados desta dissertação, por todo o apoio e amizade demonstrada.

Aos Mestres Catarina Mamede, Ana Brito, Salomé Pires, Sara Ferreira e Fernando Mendes, por toda a ajuda e apoio diários, por toda a partilha de conhecimento e por todos os momentos de boa disposição que proporcionaram no laboratório.

À Patrícia, um agradecimento muito especial. Por toda a ajuda e apoio na adaptação no início deste ano de trabalho, pela partilha dos ensinamentos de trabalho na sala de cultura. Acima de tudo, pela amizade e todas as palavras de incentivo e apoio nos dias de maior dificuldade em ver o lado positivo das coisas.

Aos Mestres Pedro Santos e Marta Braga, um agradecimento por toda a ajuda e apoio, pela partilha de ensinamentos e pelos momentos de diversão.

À Mestre Kathleen Santos, um muito obrigado por toda a amizade, companheirismo e ajuda que demonstrou durante todo este longo ano de trabalho. Por todo o apoio nas diversas tarefas, o meu agradecimento.

Às Mestres Cláudia Marques e Marina Ribeiro pela amizade, ajuda e apoios prestados, pela partilha de gabinete e por todos os momentos de descontração.

À Vera Silva, por toda a amizade que, passo a passo fomos construindo. Por todas as palavras de apoio e incentivo que partilhaste nos momentos em que mais precisei.

Ao João e ao Telmo, para além de colegas de laboratório, amigos desde o início da licenciatura, um muito obrigado por toda a amizade incondicional, pela ajuda, apoio e

todas as conversas quando as dificuldades pareciam ser inultrapassáveis, mas que vocês e o vosso apoio tornaram possível de ultrapassar de forma muito mais fácil. Ao Telmo, agradecer ainda todos os jantares quando a hora de saída era já tardia.

Ao Gonçalo e à Tânia, o meu agradecimento especial por serem os colegas de casa e amigos que são, por toda a paciência e compreensão que tiveram para comigo ao longo deste ano.

Ao Mário e ao Ricardo, um agradecimento especial por toda a amizade demonstrada ao longo deste meu percurso académico, por todas as conversas e momentos de diversão que tornaram o desenvolvimento deste projeto mais animado.

À Marisa e à Rita, um obrigado muito especial por toda a amizade e carinho que me deram desde o primeiro ano de licenciatura, amizade essa que não esquecerei.

Um agradecimento em especial à Mafalda, primeira pessoa que conheci na licenciatura e que até hoje se mantém uma grande amiga e que, sem o seu apoio, seria muito mais difícil ultrapassar os momentos mais complicados.

À Miki, Sara e Sales, um obrigado pela vossa amizade e pelas palavras certas nas horas certas.

Como é óbvio, não poderia deixar de agradecer aos meus pais, acima de tudo os meus exemplos de vida e a quem devo tudo aquilo que sou. Sem eles, sem o seu exemplo de trabalho, luta e sacrifícios diários, nunca me seria possível chegar a este momento.

À minha avó, que partiu cedo demais e que, como uma segunda mãe para mim, muito me entristece que não esteja comigo neste momento, mas sei que a deixaria orgulhosa.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento muito especial à minha namorada, Cátia. Um obrigado por todo o amor, carinho e amizade que me deste ao longo destes cinco anos. Acima de tudo, por toda a paciência, por muitas vezes ter estado mais ausente e, mesmo assim, poder contar sempre com o teu apoio e palavras de incentivo.



## Índice



# Índice

Resumo .....	15
<i>Abstract</i> .....	19
Lista de Abreviaturas, Fórmulas e Símbolos .....	23
I - Introdução.....	31
1 - Retinoblastoma .....	33
2 – Terapia Fotodinâmica.....	45
2.1 Perspetiva histórica .....	45
2.2 PDT: Princípios, fontes luminosas, fotossensibilizadores e citotoxicidade.....	46
3 – Terapia fotodinâmica e tratamento de retinoblastoma .....	59
4 – Características Estruturais dos fotossensibilizadores.....	64
II – Objetivos .....	67
III – Materiais e Métodos .....	71
1 – Culturas celulares .....	74
1.1 – Propagação .....	74
1.2 – Revestimento de placas com poli-D-lisina.....	74
1.3 – Avaliação da viabilidade celular em cultura aderente.....	75
1.4 – Tratamento fotodinâmico .....	76
2– Estudos de captação .....	77
3 – Avaliação da atividade metabólica .....	77
3.1 - Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de <i>alamar blue</i> .....	78
3.2 - Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2),5-diphenyltetrazolium bromide) .....	80
3.3 - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de sulforodamina B (SRB) .....	81
4 – Avaliação da citotoxicidade celular.....	83
4.1 – Avaliação da viabilidade celular.....	83
4.2 - Avaliação do ciclo celular .....	85
4.3 – Avaliação de danos no DNA pelo ensaio cometa .....	86
4.4 – Avaliação da expressão da proteína p53.....	88
5 – Avaliação do stresse oxidativo e das defesas antioxidantes.....	91
5.1 – Avaliação da produção intracelular de peróxidos .....	92
5.2 – Avaliação da produção intracelular do radical superóxido .....	93
5.3 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	94
5.4 – Avaliação da expressão do glutatião reduzido .....	96

5.5 – Determinação da atividade da superóxido dismutase .....	96
6. Análise estatística .....	97
IV – Resultados .....	101
1 – Determinação da viabilidade celular pelo método de azul de tripano .....	103
2 – Estudos de captação.....	104
3 – Estudos de citotoxicidade .....	105
3.1 - Ensaio de <i>alamar blue</i> .....	106
3.2 - Ensaio de MTT.....	108
3.3 - Ensaio de sulforrodamina B .....	110
4 - Avaliação dos efeitos celulares .....	111
4.1 – Vias de morte celular .....	111
4.2 – Avaliação do ciclo celular.....	113
4.3 – Avaliação de danos no DNA pelo ensaio cometa .....	114
4.4 – Expressão da proteína p53 .....	116
5 - Stresse oxidativo e defesas antioxidantes .....	118
5.1 - Produção intracelular de peróxidos .....	118
5.2 - Avaliação da produção intracelular do radical superóxido .....	119
5.3 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	120
5.4 – Avaliação da expressão do glutatião reduzido .....	121
5.5 – Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD) .....	122
V – Discussão.....	123
VI – Conclusões .....	141
Bibliografia .....	147

**Resumo**



A terapia fotodinâmica apresenta-se como uma abordagem terapêutica emergente no tratamento de cancro, podendo induzir morte celular através de um mecanismo que envolva stresse oxidativo por ativação luminosa de moléculas fotossensibilizadoras.

Esta dissertação permitiu avaliar a ação fotodinâmica dos fotossensibilizadores BBr<sub>2</sub>HPP, BBr<sub>2</sub>HPC, BBr<sub>2</sub>HPP-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH e BBr<sub>2</sub>HPPGluc-OAC em retinoblastoma humano *in vitro*. Os estudos de captação não demonstraram diferenças de captação entre os diferentes fotossensibilizadores. Os estudos de proliferação celular demonstraram que os quatro fotossensibilizadores têm efeitos semelhantes, apresentando valores de IC<sub>50</sub> dentro da mesma ordem de grandeza. Foi também verificado que o tratamento fotodinâmico induz um decréscimo do conteúdo proteico na linha celular de retinoblastoma, compatível com diminuição da viabilidade celular. A morte celular ocorre preferencialmente por apoptose, corroborada pelo surgimento de um pico pré-G<sub>1</sub>, na análise do ciclo celular e paragem na fase G<sub>2</sub>/M. Neste trabalho foi também possível verificar que o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados não induz danos significativos no DNA. Verificou-se que induz um aumento dos níveis intracelulares de peróxidos, sem alteração dos níveis do radical superóxido. Verificou-se existir uma tendência para que os quatro compostos estudados neste trabalho promovam a disrupção do potencial de membrana mitocondrial, após ativação luminosa. O tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores referidos não leva à ativação das defesas antioxidantes, nomeadamente da enzima superóxido dismutase e do glutatião reduzido.

Este trabalho revela o potencial do tratamento fotodinâmico aplicado ao retinoblastoma. Os compostos fotossensibilizadores estudados são de grande interesse e a avaliação dos mesmos em modelos *in vivo* hetero e ortotópicos constitui perspetiva futura.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; retinoblastoma; apoptose; ROS; p53.



*Abstract*



Photodynamic therapy is presented as an emerging therapeutic modality for the treatment of cancer by inducing cell death through a mechanism involving oxidative stress after activation of photosensitizing molecules by light.

This work allowed us to evaluate the photodynamic action of photosensitizers BBr<sub>2</sub>HPP, BBr<sub>2</sub>HPC, BBr<sub>2</sub>HPP-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH) and BBr<sub>2</sub>HPPGluc-OAC in human retinoblastoma *in vitro*. The uptake studies showed no differences in uptake between different photosensitizers. Cell proliferation studies demonstrated that all four photosensitizers have a very similar effect in the retinoblastoma cells, showing IC<sub>50</sub> values in the same order of magnitude. It was also found that the photodynamic treatment induces a decrease in protein content in retinoblastoma cell line compatible with decreased cell viability. Cell death occurs preferentially by apoptosis, supported by the appearance of a pre-G1 peak and cell cycle arrest at G2/M phase. In this work it was also possible to verify that photodynamic treatment with the four photosensitizers studied did not induce significant damage to DNA. It was found that treatment with the four photosensitizers induces an increase in intracellular levels of peroxides, exhibiting no ability to alter the levels of superoxide radical. It has been found that there is a tendency for the four compounds studied in this work to promote the disruption of the mitochondrial membrane potential after light activation. The photodynamic treatment with four referred photosensitizers does not lead to the activation of antioxidant defenses, including superoxide dismutase and reduced glutathione.

This work presents great potential in photodynamic treatment of retinoblastoma based on the presented porphyrin and chlorin compounds being of great interest to evaluate the therapeutic potential of these in hetero and orthotopic models *in vivo*.

Keywords: photodynamic therapy; retinoblastoma; apoptosis; ROS; p53.



## **Lista de Abreviaturas, Fórmulas e Símbolos**



<sup>106</sup>Ru - ruténio-106

<sup>125</sup>I - iodo-125

<sup>198</sup>Au - ouro-198

<sup>1</sup>FS - fotossensibilizador no estado fundamental

<sup>1</sup>FS\* - fotossensibilizador no estado excitado

2-DG - 2-deoxi-D-glicose

<sup>3</sup>FS\* - fotossensibilizador no estado excitado tripleto

<sup>86</sup>RbCl - cloreto de rubídio-86

ACS 500 -

ACS 971 - meso bis 5,15-[(2-bromo-5-pentaacetilgliconilcarboniloxi)fenil] porfirina

ACS 1102 - meso bis 5,15-[(2-bromo-5-(2-hidroxietiloxi)fenil] porfirina

ACS 881F1

ALA - *5-aminolevulenic acid*

ALAS - ácido aminolevulínico sintase

ANOVA - *Analysis of variance*

AnV - anexina V

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - adenosina trifosfato

BCA - *bicinchoninic acid*

BpD - *benzoporphyrin derivatives*

BSA - albumina do soro bovino

CAPS - *N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*

Ce6 - clorina e6

DCF - 2'-7'-diclorofluoresceína

DFCH<sub>2</sub>-DA - 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

DHE - *dihydroethidium*

DMRI - degeneração macular relacionada à idade

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

EBR - *External beam radiotherapy*

EDTA - ácido etilenodiaminatetraacético

EtOH - etanol

EUA - Estados Unidos da América

FBS - *Fetal Bovine Serum*

FITC - fluorocromo isotiocianato de fluoresceína

FS - fotossensibilizador

G1 - *gap-1*

G2 - *gap-2*

GLUT 1 - transportador de glicose tipo 1

GLUT 4 - transportador de glicose tipo 4

GSH - glutatião reduzido

GVL - *gold vapor laser*

Gy - Grays

H<sup>+</sup> - Protão

H<sub>2</sub>O - água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogénio

HCl - ácido clorídrico

Hp - *hematoporphyrin*

HpD - derivado de hematoporfirina

HpD - *hematoporphyrin derivatives*

IC50 - concentração de um composto ou fármaco que inibe a proliferação celular em 50%

ICRB - *International classification of retinoblastoma*

IgG - imunoglobulinas G

IL-10 - interleucina 10

IL-2 - interleucina 2

IL-6 - interleucina 6

IP - iodeto de propídeo

JC-1 - *5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

LMPA - *low melting point agarose*

Lutex - lutécio texafirina

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*

MIF - média de intensidade de fluorescência

MRI - *magnetic resonance imaging*

mRNA - RNA mensageiro

MSN - *mesoporous silica nanoparticles*

m-THPC - meta-tetrahidroxifenilclorina

MTS - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium*

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NaCl - cloreto de sódio

NADH - *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NaOH - hidróxido de sódio

NF-kB - *nuclear factor kappa beta*

NMPA - *normal melting point agarose*

Npe6 - mono-l-aspartilclorina e6

O<sub>2</sub> - oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - radical superóxido

OPE-PDT - *one photon excitation photodynamic therapy*

PBS - *Phosphate Buffer Saline*

PDT - terapia fotodinâmica

PEG 400 - polietilenoglicol 400

PpIX - protoporfirina IX

PPIX - *protoporphyrin IX*

PPOX - protoporfirinogênio oxidase

PVDF - *polyvinylidene difluoride*

RB1 - Gene retinoblastoma

RIP1 - *receptor interacting protein 1*

RIPA - radioimunoprecipitação

RNase - ribonuclease

ROS - espécies reativas de oxigênio

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

RU - Reino Unido

SCGE - *single cell gel electrophoresis*

SCID - *severe combined immunodeficient*

SDS - *Sodium dodecyl sulfate*

SnET2 - etiletiopurina de estanho

SOD - superóxido dismutase

SPSS - *Statistical Package for Social Sciences*

SRB - sulforodamina B

TBST - *Tris-Buffered Saline Tween-20*

TC - Tomografia computadorizada

TNF - *tumor necrosis factor*

TPE-PDT - *two photon excitation photodynamic therapy*

UROS - uroporfirinogénio sintase

US - ultra-sonografia

UV - ultravioleta

WB - *western blot*

WTS-1 - *2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt*

$\Delta\Psi_m$  - potencial da membrana mitocondrial



## **I - Introdução**



## 1 - Retinoblastoma

O cancro é uma doença que se caracteriza pelo crescimento desregulado de uma população celular, desrespeitando os limites do tecido onde se encontra, podendo ocorrer em diversos tipos de tecidos (Laranjo 2010).

O retinoblastoma é a neoplasia ocular mais comum nas crianças (Mahajan *et al.* 2011). Esta doença surge maioritariamente antes dos cinco anos de idade, sendo que a forma bilateral é normalmente diagnosticada mais precocemente (14-16 meses de vida), enquanto a forma unilateral é diagnosticada entre os 29-30 meses de vida. Este tumor apresenta uma incidência de 1 em cada 20000 nascimentos, não havendo diferenças significativas entre raças, localização geográfica e desenvolvimento industrial (países desenvolvidos *vs.* países em desenvolvimento) (DiCiommo *et al.* 2000).

A taxa de sobrevivência nos Estados Unidos da América (EUA) aproxima-se dos 100%, contudo, em outros países, nomeadamente países em vias de desenvolvimento, esta taxa apresenta valores significativamente mais baixos, tais como os verificados em países da América Latina (80-89%), Irão (83%), China (81%), Índia (48%) e em países africanos (20-46%), por exemplo (Houston *et al.* 2011). Na Tabela 1 encontram-se representados dados relativos a outros países pertencentes aos diferentes continentes.

O retinoblastoma pode ser classificado de acordo com três critérios: familiar ou esporádico, bilateral ou unilateral e hereditário ou não hereditário. O gene retinoblastoma (RB1) está localizado no braço longo do cromossoma 13 (13q14). Este gene demonstra ser um supressor de genes tumorais e desempenha um papel no crescimento e desenvolvimento celular. Para que haja desenvolvimento de tumor, é necessário que haja perda, deleção, inativação ou mutação dos dois alelos correspondentes a este gene (Shields *et al.* 2004).

**Tabela 1 – Distribuição geográfica da idade de diagnóstico, mortalidade e primeira apresentação de sintomas** (Adaptado de Dimaras *et al.* 2012).

	<i>Média de idades ao diagnóstico (meses)</i>		<i>Mortalidade (%)</i>	<i>Casos com diferentes sintomas iniciais</i>	
	<b>Unilateral</b>	<b>Bilateral</b>		<b>Leucocoria</b>	<b>Estrabismo</b>
<b>Europa</b> Todos os países	----	----	5-11%	----	----
<b>Ásia</b>					
Malásia	----	----	----	----	----
Taiwan	27	16	36%	78%	13%
<b>África</b>					
Mali	----	----	----	----	----
Nigéria	31	15	----	62%	----
África Oriental	36	24	----	56%	11%
Quênia	36	25	73%	----	----
<b>América do Norte</b>					
México	31	30	11%	----	----
EUA	25	13	----	56%	24%
Canadá	27	15	1%	80%	----
<b>América Central</b>					
Honduras	----	----	35-73%	54-83%	----
<b>América do Sul</b>					
Brasil	----	----	5-22%	79%	11%

Esta perda de função do gene RB1 pode acontecer mediante uma mutação nas células germinativas e posterior mutação nas células somáticas da retina, dando assim origem ao retinoblastoma hereditário. Por outro lado, as duas mutações podem ocorrer nas células somáticas da retina em momentos distintos, dando origem a retinoblastoma esporádico. Estas duas formas distintas de se formar um retinoblastoma inserem-se na hipótese “Two hit”, apresentada por Knudson e colaboradores (Chintagumpala *et al.* 2007). Anos mais tarde, foi demonstrado que a perda de função do gene RB1 iniciava o retinoma e causava instabilidade genómica, contudo, este evento seria insuficiente para causar retinoblastoma, pelo que esta instabilidade genómica poderia levar a alterações noutros genes. David Comings estabeleceu a hipótese de que o gene causador de retinoblastoma seria específico da retina, contudo, a perda de função do gene RB1 em vários cancros humanos pode

promover a progressão tumoral, provavelmente devido à perda do controlo do ciclo celular e da instabilidade genómica (Dimaras *et al.* 2012).

Como o retinoblastoma é característico de crianças muito jovens, os seus portadores não têm a capacidade de descrever os seus sintomas, pelo que a identificação de um problema na retina surge apenas com o aparecimento de sinais como a leucocoria ou o estrabismo. A leucocoria, como se pode ver no exemplo da figura 1, é caracterizada pelo aparecimento de um tumor de coloração branca, o qual produz um reflexo da luz na pupila.



**Figura 1 – Fotografia de um olho com uma lesão característica de leucocoria devido a retinoblastoma.** Retirado de Mahajan *et al.* 2011.

A identificação de leucocoria pode ser difícil, particularmente por ser mais fácil de observar em ambientes com pouca luz. De facto, um estudo realizado no Reino Unido demonstrou que 1 em cada 4 crianças esperaram mais de 4 meses para referência a um oftalmologista, o que pode diminuir as hipóteses de sobrevivência (Dimaras *et al.* 2012).

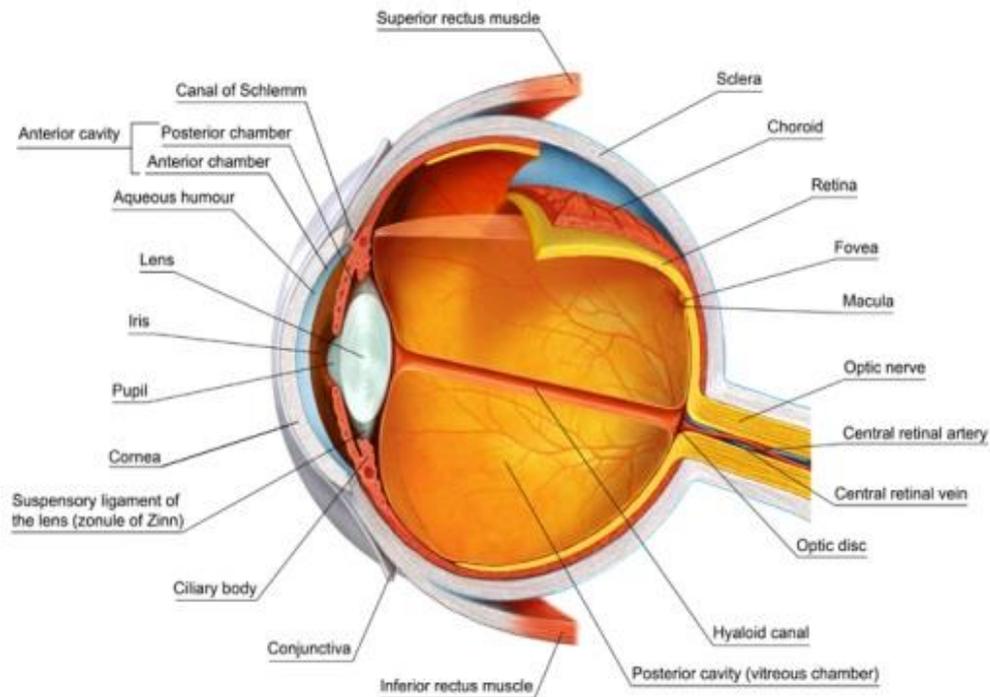
O estrabismo também pode ser sinal deste tipo de tumor e resulta da perda de visão central em um ou ambos os olhos, provocando o desalinhamento ocular, como se pode ver no exemplo da figura 2. Outros sinais tais como heterocromia, hifema, glaucoma,

inflamação e celulite orbital são menos comuns como sintomas de retinoblastoma (Mahajan *et al.* 2011; Chintagumpala *et al.* 2007; Mehta *et al.* 2012).



**Figura 2 – Fotografia dos olhos de uma criança com estrabismo e leucocoria bilateral devido a retinoblastoma.**  
Retirado de Ungaro *et al.* 2002.

O retinoblastoma apresenta três padrões de crescimento característicos: endofítico (crescimento intravítreal); exofítico (subretinal, invadindo a coróide) e difuso (de difícil diagnóstico, já que é semelhante a uma inflamação ou hemorragia). A via mais comum de invasão celular verificada no retinoblastoma é através da retina, atingindo o nervo ótico. A partir daí o tumor continua a sua invasão, afetando o quiasma ótico, ou chegando mesmo à *pia matter* até ao espaço subaracnoideu. Pode também existir extensão do tumor a zonas extraoculares, o que pode levar à sua disseminação até aos vasos linfáticos e, conseqüentemente, a formação de metástases à distância, diminuindo assim as hipóteses de sobrevivência (Mahajan *et al.* 2011). Na figura 3, podemos observar a estrutura interna do olho.



**Figura 3 – Representação esquemática da estrutura interna do olho humano** (adaptado de <http://virtualmedicalcentre.com>)

Na década de 60, foi criado um sistema de classificação do retinoblastoma, por Reese e Ellsworth (Classificação Reese-Ellsworth, 1963), baseado no estadio do tumor intraocular e na previsão de preservação do globo ocular, após tratamento com radiação externa (EBR, do inglês *external beam radiation*). Nesta classificação, os olhos afetados com retinoblastoma são classificados de acordo com a localização e tamanho do tumor, sendo agrupados em cinco grupos (I ao V) e 10 subgrupos (*a* e *b* para cada um dos respectivos grupos). No grupo I estão classificados os olhos com menor risco de serem sujeitos a enucleação, enquanto que no grupo V se encontram os olhos em maior risco de serem removidos cirurgicamente (Kiss *et al.* 2008). Contudo, este tipo de abordagem terapêutica foi caindo em desuso, pelo que houve necessidade de desenvolver um novo sistema de classificação mais adequado à nova realidade de tratamentos. Em 2003, foi finalizado um novo sistema de classificação, o Sistema Internacional de Classificação de

Retinoblastoma (ICRB, do inglês *International Classification of Retinoblastoma*). Este sistema de classificação, representado na Tabela 2, baseia-se sobretudo na disseminação do tumor para o humor vítreo e espaço subretinal, tendo também em consideração a dimensão do tumor e a sua localização (Kiss *et al.* 2008).

**Tabela 2 – Sistema Internacional de Classificação de Retinoblastoma (ICRB).**

<b>Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>	<b>Característica geral</b>	<b>Características específicas</b>
A	A	Tumor pequeno	Retinoblastoma com menos de 3mm
B	B	Tumor maior Mácula	Retinoblastoma com mais de 3mm Retinoblastoma localizado na mácula
		Justapapilar Fluido subretinal	Retinoblastoma localizado na justapapilar
C	C1	Metástases focais (próximas do tumor)	Retinoblastoma com:
	C2		Metástases subretinais
	C3		Metástases vítreas Metástases vítreas
D	D1	Metástases difusas (afastadas do tumor)	Retinoblastoma com:
	D2		Metástases subretinais
	D3		Metástases vítreas Metástases vítreas e subretinais
E	E	Retinoblastoma extenso	Retinoblastoma extenso (mais de 50% do globo ocular) ou glaucoma neovascular. Aspeto opaco devido a hemorragias na câmara anterior, corpo vítreo ou espaço subretinal. Invasão do nervo ótico pós-laminar, coroide, esclera, órbita e câmara anterior.

Para um diagnóstico adequado, os médicos podem recorrer a vários métodos como o exame ocular, estudos de imagem e pesquisa de metástases. O exame ocular deve ser realizado com um microscópio cirúrgico ou binocular sob anestesia geral, e deve incluir a avaliação de córnea, câmara anterior e da íris. Esta observação pode levar à identificação do tipo de crescimento do tumor: retinoblastoma endofítico, que cresce para o vítreo e está associado com metástases vítreas e sub-retinianas; retinoblastoma exofítico, que cresce

para fora, e produz descolamento da retina secundário. Outros fatores que devem ser caracterizados são o número e tamanho do tumor, a lateralidade e a distância a partir do disco ótico e da mácula, bem como a presença de fluido subretinal e metástases tanto subretinais como vítreas (Mehta *et al.* 2012).

O diagnóstico de retinoblastoma através de estudos de imagem é conseguido por ultrassonografia (US), tomografia computadorizada (TC) e imagem de ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*) (Mehta *et al.* 2012; Ray *et al.* 2012). A US é um método barato, facilmente disponível e não-invasivo. Nesta técnica, podemos observar o retinoblastoma como uma massa intraocular mais ecogênica que o vítreo com calcificações que são áreas mais refletivas. A monitorização da dimensão do tumor durante quimiorredução poderia ser feita com este tipo de método de imagem, porém ele é pouco sensível a pequenas calcificações e é ineficaz para a identificação de disseminação extraocular (Mehta *et al.* 2012). Recorrendo à CT, pode-se identificar uma massa intraocular com uma densidade mais elevada do que a do corpo vítreo, a qual se encontra com calcificações em 90% dos casos. Estas estruturas são melhor evidenciadas após a injeção de um agente de contraste iodado. A presença destas calcificações é característica de retinoblastoma em crianças com menos de três anos de idade. O CT é considerado o método melhor para o diagnóstico de retinoblastoma, uma vez que pode ser aplicado sem anestesia geral, e está associado a uma exposição a telerradioterapia com dosimetria aceitável (Mehta *et al.* 2012; Kaufman *et al.* 1998). Os exames de MRI, especialmente quando associados a injeção de gadolínio e supressão do tecido adiposo, permitem avaliar a invasão extraocular ou invasão do nervo ótico, a presença de metástases subaracnoides e o envolvimento intracraniano. Este método é também utilizado para o diagnóstico de retinoblastoma trilateral, que consiste em retinoblastoma bilateral e pinealoblastoma (Mehta *et al.* 2012).

A procura específica por metástases é apenas realizada quando há evidências significativas de extensão extraocular apontando para possível metastização. Neste grupo de métodos podem incluir-se a análise do fluido cefalorraquideo, a biópsia da medula óssea e o MRI ósseo (Mehta *et al* 2012; Ray *et al* 2012).

Atualmente, o retinoblastoma, tal como outras neoplasias, é alvo de diversas abordagens terapêuticas, dependendo do estadio da doença e da reação do doente aos tratamentos. As principais terapêuticas utilizadas no retinoblastoma são a enucleação, a telerradioterapia, a braquiterapia, a termoablação, a quimioterapia, a termoquimioterapia e a crioablação.

A enucleação consiste na remoção do olho afetado. É o tratamento de escolha no caso de crianças portadoras de retinoblastoma unilateral em estado avançado ou no caso do olho que não respondeu a outros tratamentos em casos bilaterais (Chintagumpala *et al.* 2007; Mehta *et al.* 2012). O olho removido é substituído por implante orbital de silicone, de plástico ou de hidroxiapatite, pela técnica mioconjuntival, em que o cirurgião coloca o implante na órbita posterior e anexa músculos do reto ao fórnix da conjuntiva, o que resulta no movimento normal do implante. A enucleação em tempo oportuno reduz o risco de metástases, a morbilidade, os efeitos secundários da quimioterapia e do tratamento com laser focal, e os exames frequentes sob anestesia (Dimaras *et al.* 2012).

A telerradioterapia ou irradiação externa é um meio bastante eficaz para o tratamento do retinoblastoma e foi o primeiro tratamento conservador de retinoblastoma (Gombos *et al.* 2007). É um tratamento aconselhável para crianças que padecem da forma bilateral da doença, quando os tratamentos baseados em quimioterapia falharam, havendo reincidência da doença. As doses totais normalmente usadas variam entre 42 e 46Gy. O controlo da doença através desta abordagem terapêutica permite a conservação do olho numa percentagem de 58-88% (Chintagumpala *et al.* 2007). Contudo, os doentes com a forma

hereditária da doença que receberam este tratamento apresentaram um maior risco de desenvolverem neoplasias secundárias, tendo sido registada uma incidência de 35% de neoplasias secundárias, das quais se destacam os osteosarcomas. Este risco é ainda maior para crianças com menos de um ano de idade (Khetan *et al.* 2011; Chintagumpala *et al.* 2007). Esta terapia pode causar também efeitos indesejáveis, tais como hipoplasia orbital, olho seco e cataratas (Gombos *et al.* 2007).

A braquiterapia consiste na colocação de um implante radioativo, tal como o representado na figura 4, na esclera adjacente à base do tumor. Os agentes radioativos mais utilizados nesta abordagem terapêutica são o iodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ), o ouro-198 ( $^{198}\text{Au}$ ) e, mais recentemente, o ruténio-106 ( $^{106}\text{Ru}$ ). Esta terapia tem como objetivo depositar energia numa dose total de 40 a 45 Gy no tumor durante um período que pode ir dos dois aos quatro dias. Esta abordagem é aconselhada para doentes em que o tratamento inicial falhou, incluindo um primeiro tratamento com EBR (do inglês *external beam radiotherapy* ou telerradioterapia), quimioterapia ineficaz e recorrência do tumor quando a quimioterapia não é aconselhada (Mehta *et al.* 2012). No entanto, não é aconselhado em casos de tumores de grandes dimensões ou em tumores que atinjam a mácula.



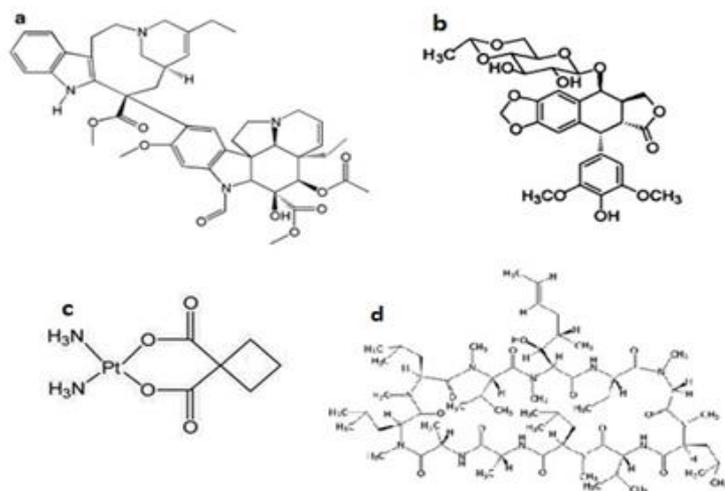
**Figura 4 – Exemplo de uma placa radioativa com iodo-125** (Adaptado de Balmer *et al.* 2006).

Para além disso, os efeitos colaterais deste tratamento revelam ser menos comuns do que os que surgem com a telerradioterapia, destacando-se o aparecimento de neuropatia ótica, retinopatia e formação de cataratas (Chintagumpala *et al.* 2007; Ray *et al.* 2012). Esta terapêutica permite delimitar a extensão da radiação à órbita e à área periorbital, prevenindo problemas associados à telerradioterapia, nomeadamente aumento da incidência de neoplasias secundárias e problemas faciais advindos de complicações após o tratamento, tais como assimetria facial e dermatite periocular (Mehta *et al.* 2012).

A termoablação consiste na aplicação de uma fonte de calor diretamente no tumor, por exemplo, sob a forma de radiação de infravermelhos. Esta radiação causa hipertermia das células tumorais e leva a morte celular por apoptose (Mehta *et al.* 2012). São atingidas temperaturas entre os 45 e 60°C, que não provocam a coagulação do sangue nos vasos da retina. Esta técnica é utilizada sobretudo para retinoblastomas de pequenas dimensões (Chintagumpala *et al.* 2007).

A quimioterapia, no tratamento do retinoblastoma, é utilizada com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor, de modo a poder aplicar outras terapias mais localizadas, tais como a termoablação ou a crioablação, de modo a erradicar totalmente a doença (Shahsavari *et al.* 2009; Shields *et al.* 2010). Esta abordagem é aconselhável para casos de retinoblastomas intraoculares de grandes dimensões ou em casos de doença unilateral com tumores pequenos, mas nos quais as terapias mais localizadas não surtiram efeito. Os principais fármacos quimioterapêuticos direcionados para o tratamento de retinoblastoma são a carboplatina, o etoposídeo e a vincristina, sendo que em alguns casos tem sido usada conjuntamente a ciclosporina, de modo a evitar a resistência aos citostáticos, cujos regimes-padrão consistem em 6 ciclos de doses *standard* dos agentes quimioterapêuticos referidos anteriormente, representados na figura 5 (Mehta *et al.* 2012). Num estudo com 78 doentes, o regime padrão resultou na completa resposta do tumor em 72% dos doentes que

foram tratados apenas com quimioterapia. Nesse estudo, foi também observado uma elevada taxa de resposta de 84% em tumores da mácula (Ray *et al.* 2012). Os efeitos secundários são os esperados, tais como infecções bacterianas, sendo que há um elevado risco do desenvolvimento de novos tumores noutros órgãos, principalmente com o uso do etoposídeo.



**Figura 5 – Estrutura química dos fármacos quimioterapêuticos mais utilizados no tratamento de retinoblastoma.** (a) vincristina (Noble *et al.* 2009); (b) etoposídeo (Merresse *et al.* 1999); (c) carboplatina (Henderson *et al.* 2011) (d) ciclosporina (Berg, *Biochemistry*, 5<sup>th</sup> edition, 2002).

Devido aos efeitos tóxicos referidos anteriormente, nos últimos anos têm-se desenvolvido agentes quimioterapêuticos com vista ao tratamento do retinoblastoma, tais como o topotecano, um inibidor da DNA topoisomerase-1, e o 2-deoxi-D-glicose (2-DG), um inibidor glicolítico. Para além disso, tem-se investigado novas vias de administração para estes fármacos, tais como administração intra-vítrea ou intra-arterial na artéria oftálmica (Shahsavari *et al.* 2009; Shields *et al.* 2010).

Tal como o nome indica, a quimioablação é uma abordagem terapêutica que combina a termoablação com a quimioterapia e é utilizada em casos de tumores de grandes

dimensões ou em tumores que já se tenham disseminado até áreas subretiniais. As duas técnicas são utilizadas com algumas horas de intervalo a separá-las, podendo atingir taxas de controlo tumoral de 89%. Os efeitos adversos que são devidos à quimioteroterapia são principalmente atrofia focal da íris, descolamento da retina e edema da córnea. Esta terapêutica é vantajosa principalmente para casos de tumores de pequenas dimensões adjacentes à fóvea e ao nervo ótico (Chintagumpala *et al.* 2007). Um exemplo da eficácia desta terapêutica foi um estudo onde 394 tumores foram completamente controlados após o tratamento com termoquimioterapia (Ray *et al.* 2012).

A crioblação tem como objetivo a destruição do endotélio vascular que suporta o tumor, devido a um rápido arrefecimento do mesmo. Desta forma, permite um elevado influxo de agentes quimioterapêuticos na cavidade vítrea (Mehta *et al.* 2012). Pode ser utilizada para combater tumores periféricos ou pequenos tumores recorrentes do tratamento com outras abordagens. Esta terapia pode provocar efeitos secundários indesejáveis, tais como edema da conjuntiva e descolamento da retina (Chintagumpala *et al.* 2007). Este método consiste em técnicas de congelamento/descongelamento triplas que são realizadas em uma ou duas sessões (Ray *et al.* 2012).

Apesar da eficácia demonstrada pelos tratamentos anteriores, os seus efeitos adversos continuam a ser um fator preponderante, nomeadamente para os pais das crianças afetadas com retinoblastoma, devido ao elevado risco de perda de visão ou do próprio olho, bem como a possibilidade do desenvolvimento de tumores secundários devido aos efeitos mutagénicos provocados principalmente pela quimioterapia e telerradioterapia. Devido aos problemas causados pelo carácter mutagénico da radio e da quimioterapia, tem-se investigado qual o potencial terapêutico da terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) no tratamento do retinoblastoma. Esta via de investigação tem por

base o facto de a PDT não apresentar efeitos mutagénicos, o que no tratamento do retinoblastoma se revela uma vantagem muito importante.

## **2 – Terapia Fotodinâmica**

### **2.1 Perspetiva histórica**

A luz tem sido usada como agente terapêutico desde a antiguidade, nomeadamente com a sua aplicação por parte dos Egípcios, Indianos, Chineses e Gregos no tratamento de psoríase e vitíligo (Pervaiz *et al.* 2006). Em 1903, foi atribuído o prémio Nobel ao investigador Finsen devido ao tratamento eficaz do *lupus vulgaris* usando luz, surgindo assim a fototerapia (Allison *et al.* 2010). Contudo, a primeira evidência experimental do processo de fotossensibilização remonta ao início do século XX, em 1900, quando Oscar Raab verificou que a combinação de acridina com luz era tóxica para as paramécias (Juzeniene *et al.* 2007). Esta descoberta foi feita por acaso, já que a acridina teria apenas como objetivo funcionar como sonda fluorescente, mas ao ser sujeita a uma fonte de luz provocou a morte dos protozoários. Raab e os seus professores descobriram então que a acridina tinha funcionado como agente fotossensibilizador, isto é, um composto que ao absorver luz dava início a uma reação fotoquímica ou fotofísica (Allison *et al.* 2010; Agostinis *et al.* 2011). Von Tappeiner e os seus colegas concluíram que esta fotossensibilização seria dinâmica e diferente da verificada em placas fotográficas com outros cromóforos. Foi então criado o termo reação fotodinâmica para este tipo de reações na presença de oxigénio molecular (O<sub>2</sub>). Von Tappeiner ao avaliar o potencial antitumoral da fotossensibilização verificou qual o efeito da exposição luminosa de um tumor na

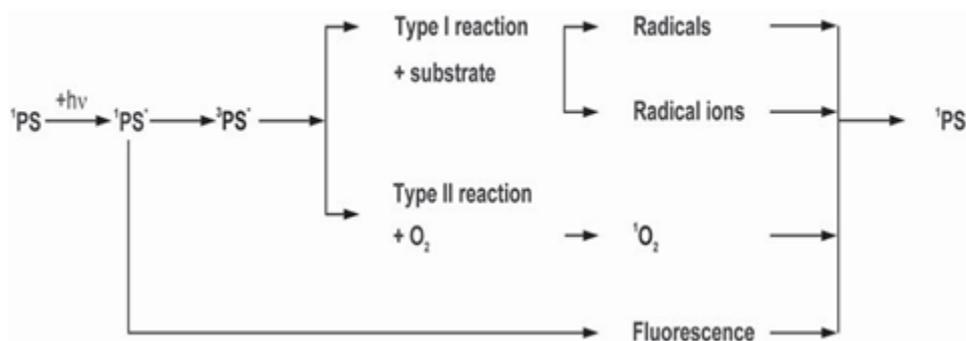
presença de eosina. Contudo, a abordagem mais atual denominada terapia fotodinâmica surgiu apenas décadas após as investigações levadas a cabo por Von Tappeiner, quando Lipson e os seus colegas, bem como a equipa de Schwartz, utilizaram uma mistura de porfirinas fluorescentes localizadas num tumor, mistura essa denominada por derivados de hematoporfirinas (HpD, do inglês *Hematoporphyrins Derivative*) (Pervaiz *et al.* 2006). Cada vez mais a terapia fotodinâmica se assume como uma maior área de investigação, sendo que atualmente existem cerca de 16000 artigos referenciados sobre terapia fotodinâmica na PubMed.

## **2.2 PDT: Princípios, fontes luminosas, fotossensibilizadores e citotoxicidade**

### *2.2.1 Princípios*

A PDT é uma terapêutica reconhecida, sendo usada no tratamento de vários tumores sólidos, bem como de outras lesões (Pervaiz *et al.* 2006). Esta terapia consiste na administração de um fotossensibilizador (FS), seguindo-se a aplicação de uma fonte luminosa sobre o tumor, sendo que a luz emitida terá de ter um comprimento de onda adequado tanto ao fotossensibilizador a usar como à profundidade a que se encontra o tumor a tratar. A ativação promovida pela luz irá levar à excitação da molécula do seu estado normal ( $^1\text{FS}$ ) para o estado de singleto excitado ( $^1\text{FS}^*$ ). Após esta ativação, pode haver um decaimento para o estado singleto normal, com formação de fluorescência, mas sem haver efeito fotodinâmico. Para que este efeito aconteça é necessária uma conversão de spin para o estado tripleto excitado ( $^3\text{FS}^*$ ) (Triesscheijn *et al.* 2006). A interação desta molécula no estado tripleto com outras moléculas pode dar origem a dois tipos de reação foto-oxidativa, representadas na figura 6. A reação do tipo I pode envolver tanto a

transferência de elétrons ou de prótons  $H^+$ , produzindo radicais tanto do fotossensibilizador como do substrato. Estes intermediários, ao reagir com o oxigênio molecular podem formar peróxidos, iões superóxido e radicais hidroxilo, desencadeando a ativação da cadeia de radicais livres. Por outro lado, quando ocorre uma reação do tipo II, esta é mediada pelo processo de transferência de energia para o oxigênio no estado singleto e pelo retorno do FS para o seu estado basal.



**Figura 6 – Princípio da terapia fotodinâmica.** Após ativação pela luz, o fotossensibilizador atinge o seu estado tripleto excitado, podendo seguir dois tipos de reação: reação tipo I, onde se verifica a formação de radicais; reação do tipo II que leva à formação de oxigênio singleto, sendo a espécie citotóxica mais importante na PDT (Retirado de Triesscheijn *et al.* 2006).

Vários autores têm postulado que alguns FS têm tendência a acumular-se preferencialmente nas células tumorais, uma vez que as células tumorais apresentam características específicas que as diferenciam das células normais (Juzeniene *et al.* 2007). Por exemplo, as células tumorais apresentam um pH mais baixo que os tecidos normais, devido às elevadas concentrações de lactato resultantes de maior atividade glicolítica que, por sua vez, irá promover a maior acumulação de fármacos que possam protonar na presença de pH mais ácido (Gerweck *et al.* 1996). Por outro lado, existem macrófagos

nos tecidos tumorais que podem fagocitar agregados do fármaco ou mesmo lipoproteínas ligadas a fármacos (Korbelik *et al.* 1991). Na superfície das células tumorais existe mesmo maior expressão de recetores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), o que está correlacionado com o facto de FS mais lipofílicos poderem associar-se a estas lipoproteínas (Juzeniene *et al.* 2007). De facto, existem várias propriedades características dos tecidos tumorais que podem levar à maior internalização do FS que, conjuntamente com a iluminação local do tumor pela fonte luminosa, torna a PDT uma terapia altamente seletiva e capaz de reduzir significativamente os riscos de dano das células normais existentes noutras abordagens terapêuticas, tais como na radio e na quimioterapia (Juzeniene *et al.* 2007).

### 2.2.2 Fontes luminosas

Para que a PDT seja eficaz, é necessário o uso de uma fonte luminosa adequada. A eficácia da terapia vai depender da maior ou menor correspondência entre o espectro de emissão da fonte luminosa com o espectro de absorção do FS (Juzeniene *et al.* 2007). Para além disso, a maior ou menor penetração no tecido de determinada fonte luminosa também é muito importante, sendo que uma luz com um comprimento de onda correspondente à zona do vermelho ou infravermelho é mais penetrante. Para valores de comprimento de onda entre os 600nm e os 1200nm encontra-se a denominada janela ótica do tecido (Agostinis *et al.* 2011). Contudo, nem todos os comprimentos de onda dentro desta janela ótica são capazes de desencadear um efeito fotodinâmico, pois é necessário transferir energia para que o oxigénio passe do estado normal para o estado singlete, o que só é possível com uso de fontes luminosas com um comprimento de onda até aos 850nm. Tendo em conta estes fatores é necessário também determinar o espectro de ação do FS, que

descreve a eficácia relativa para diferentes valores de comprimentos de onda (Juzeniene *et al.* 2007).

Atualmente, as fontes luminosas utilizadas na PDT pertencem a três grandes grupos: lâmpadas de largo espectro, díodos e lasers (Calzavar-Pinton *et al.* 2007), sendo que se deve ter sempre em conta a fluência total de luz a aplicar, que consiste na taxa de energia aplicada ao tecido biológico, a taxa de fluência (medida do número de partículas que intersejam uma unidade de área num determinado período de tempo – unidade  $J/m^2$ ), o tempo de exposição assim como o modo de entrega da fonte luminosa (Agostinis *et al.* 2011).

As lâmpadas de largo espectro no início da aplicação da PDT eram amplamente utilizadas devido ao seu baixo custo e fácil manuseamento mas, por outro lado, o seu acoplamento a fibras óticas para entrega de luz a órgãos internos sem diminuição de eficácia é difícil (Triesscheijn *et al.* 2006). Posteriormente foram-se desenvolvendo díodos, que resultaram em sistemas mais baratos, móveis, mas que apenas eram capazes de emitir a um só comprimento de onda, reduzindo significativamente a sua versatilidade (Triesscheijn *et al.* 2006). Os lasers vieram contribuir significativamente para uma melhoria das condições da PDT, visto que permitem uma seleção do exato comprimento de onda, bem como da aplicação precisa da luz. Podem ser utilizados dois tipos de lasers, os de onda contínua e os lasers de pulso (como o laser de vapor de ouro, GVL, do inglês *gold vapor laser*), sendo que a sua eficácia não difere significativamente (Lukšienė 2003). Como já foi referido anteriormente, a tecnologia de fibra ótica constitui um excelente auxílio na PDT, visto que permite alcançar regiões mais interiores do organismo, que só com a iluminação superficial não seria possível tratar com esta abordagem terapêutica.

### 2.2.3 Fotossensibilizadores

Atualmente existem vários FSs aprovados para uso clínico que estão descritos na Tabela 3. Um FS ideal deverá possuir determinadas características, tais como ser um composto quimicamente puro com acumulação preferencial no tumor, rápida remoção do organismo e um grande pico de absorção na região dos 600nm, aquela que é descrita como sendo a mais penetrante nos tecidos (Triesscheijn *et al.* 2006).

**Tabela 3 – Fotossensibilizadores aprovados para prática clínica** (Adaptado de Allison *et al.* 2010).

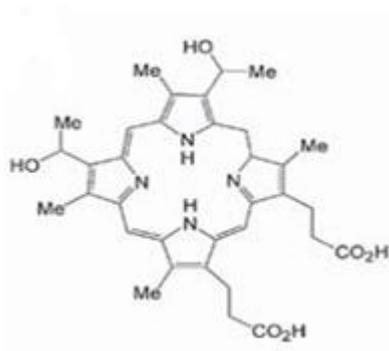
<b>Grupo Fotossensibilizador</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Nome químico</b>
<b>Porfirina</b>	Photofrin®	HpD
	Photogem®	HpD
	Levulan®	ALA
	Metvix®	M-ALA
	Hexvix®	H-ALA
	Visudine®	Verteporfina
<b>Texafirina</b>	Lu-tex; Antrin®	Lutexafirina
<b>Clorina</b>	Foscan®	Temoporfina
	LS11; Photolon®	Taloporfina
	Litx™; Apoptesin™	
	Laserphyrin Photochlor	HPPH
<b>Ftalocianinas</b>	Photosense®	Ftalocianina
	Pc4	Ftalocianina
<b>Padoporfina</b>	Tookad	Bacterioclorifla

Para além disso, não deverá apresentar toxicidade na ausência de fonte luminosa e deverá permitir a formação de oxigénio singlete, ou seja, a reação do tipo II, que é descrita como sendo a mais eficaz na destruição do tecido tumoral (Lukšienė 2003).

A hematoporfirina (Hp, do inglês *hematoporphyrin*) foi considerada um poderoso FS logo em 1912, por Meyer-Betz, sendo que na década de 50 foi provado que possuía características de acumulação preferencial em tecidos tumorais, por Figge e seus colaboradores. Por síntese química, a Hp daria origem a derivados (HpD do inglês *hematoporphyrin derivatives*), que apresentavam ainda melhores características antitumorais que a Hp. Os HpD consistiam numa mistura de porfirinas não puras (Triesscheijn *et al.* 2006).

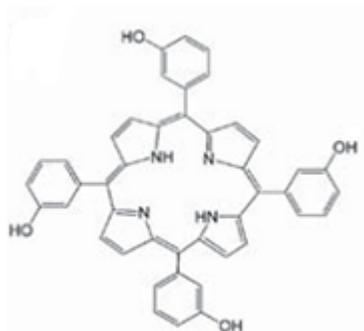
Posto isto, alguns HpD foram purificados através de métodos cromatográficos por Dougerty e seus colegas, dando origem ao Photofrin®, cuja estrutura química se encontra representada na figura 7, que é ainda hoje um dos FS mais utilizados na prática clínica (Juzeniene *et al.* 2007).

O Photofrin® apresenta vários picos de absorção sendo o pico de 630nm de intensidade reduzida. Contudo, fontes luminosas com este comprimento de onda são utilizadas devido ao seu poder penetrante, sendo necessárias elevadas fluências de luz para compensar a baixa intensidade do pico de absorção do Photofrin® para este comprimento de onda. Outra desvantagem deste fotossensibilizador é a fotossensibilidade que provoca ao doente durante períodos de tempo que podem variar de um a três meses (Triesscheijn *et al.* 2006).



**Figura 7 - Estrutura química do componente principal Photofrin®, o porfímero de sódio** (Retirado de Triesscheijn *et al.* 2006)

Outra família de FS utilizados atualmente é a família das clorinas, dos quais se destaca o meta-tetrahidroxifenilclorina (m-THPC, do inglês *meta-tetra hydroxyphenyl chlorine*), cuja estrutura química se encontra representada na figura 8. O m-THPC é um FS bastante potente, já que produz elevado número de moléculas de oxigénio singlete quando ativado por luz com o comprimento de onda de 652nm, para a qual apresenta um pico de absorção e se verifica uma maior penetração da luz comparativamente com os 630nm utilizados nos tratamentos referidos anteriormente. Devido a este facto as energias luminosas necessárias para a sua ativação são mais reduzidas do que as utilizadas para o Photofrin® e a iluminação terá de ser altamente precisa, para que a luz não atinja tecidos normais e de modo a que não haja ativação do m-THPC nestes tecidos. De salientar que os doentes referem alguma dor durante os tratamentos com este FS. Este FS é utilizado no tratamento paliativo de tumores da cabeça e pescoço, bem como no tratamento de tumores da cavidade oral, esófago, estômago, pâncreas e pulmão (Allison *et al.* 2010; Triesscheijn *et al.* 2006).



**Figura 8 - Estrutura química do meta-tetrahidroxidenil clorina.** Retirado de Triesscheijn *et al.* 2006.

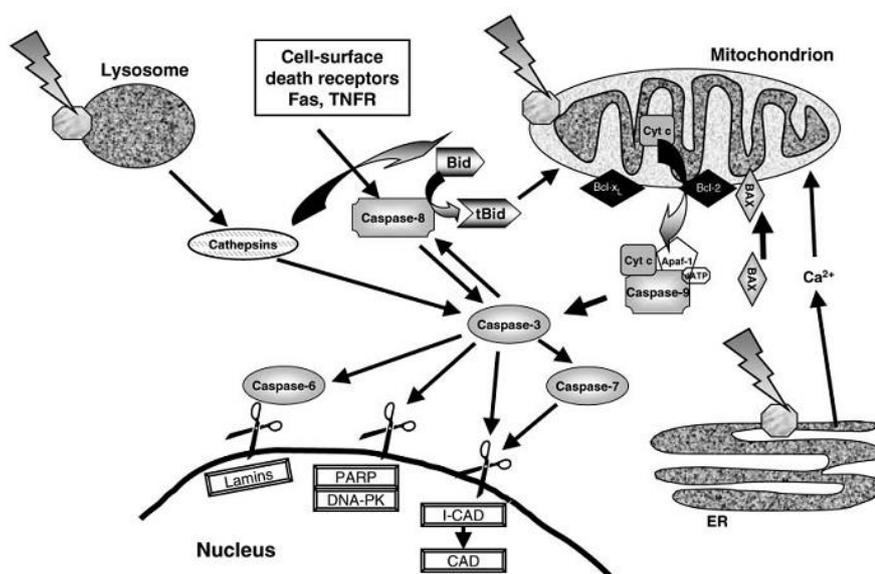
Um outro fotossensibilizador a destacar é a verteporfina, membro da família dos derivados de benzoporfirinas. Este composto atua principalmente por destruição dos vasos sanguíneos que envolvem o tumor. Este composto tem sido muito utilizado em oftalmologia, não no tratamento de retinoblastoma, mas no tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI), do astrocitoma oftalmológico, melanoma coróidal, sendo igualmente usado no tratamento de neoplasias cutâneas (Triesscheijn *et al.* 2006).

Para além dos referidos FS, existem muitos outros em desenvolvimento e em estudo, tais como a etiletiopurina de estanho (SnET2), o mono-L-aspartilclorina e6 (Npe6) e lutécio texafirina (Lutex). Todos estes FS apresentam picos de absorção com comprimentos de onda relativamente altos (660, 664, 690 e 732nm, respetivamente), o que provoca baixa fotossensibilidade da pele (Triesscheijn *et al.* 2006).

#### 2.2.4 Citotoxicidade

A meia-vida do oxigénio singleto é muito baixo, pelo que o seu efeito será sentido, principalmente, no local onde é produzido. Devido a este facto, os diferentes FS atuam

preferencialmente em locais distintos. Por exemplo, o Photofrin® atua nas membranas lipídicas, o Npe6 ao nível dos lisossomas (Agostinis *et al.* 2011), a verteporfina afeta as mitocôndrias (Belzacq *et al.* 2001) e o m-THPC o retículo endoplasmático (Marchal *et al.* 2007). Todos estes efeitos podem levar à morte celular, sendo que a PDT pode ativar as três principais vias de morte celular: apoptose, necrose, e autofagia. A apoptose, representada na figura 9, é a principal via de morte celular ativada por PDT (Agostinis *et al.* 2011).

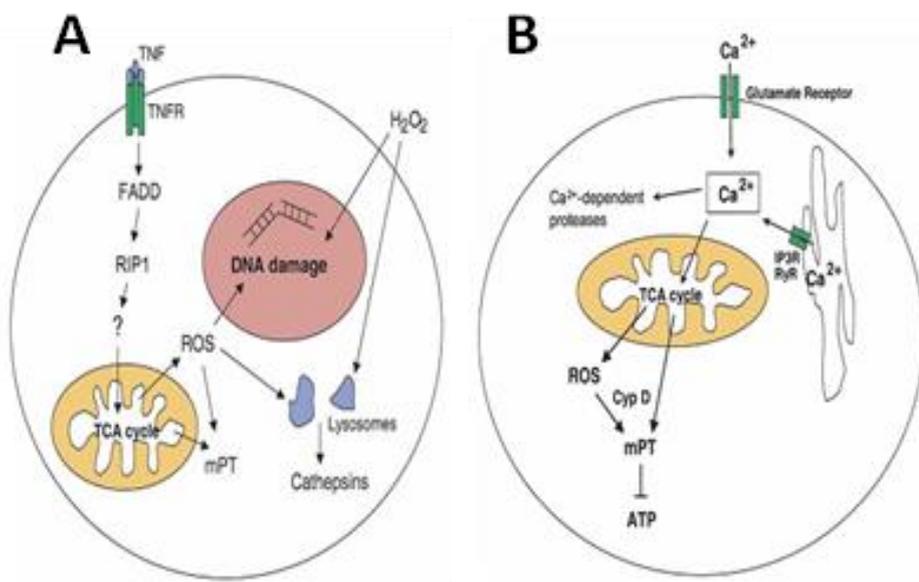


**Figura 9 – Representação esquemática dos diferentes mecanismos de apoptose induzida por PDT.** Os fotossensibilizadores utilizados em PDT podem afetar diferentes organelos intracelulares, nomeadamente a mitocôndria, lisossomas e retículo endoplasmático. Danos resultantes de PDT ao nível da mitocôndria levam à libertação de citocromo c, que irá por sua vez ativar a caspase-9 que, conseqüentemente irá levar à clivagem e ativação da caspase-3. A caspase-3 é um dos principais efetores da apoptose, já que promove a ativação de diferentes proteínas envolvidas em diferentes processos que culminam na morte celular por apoptose (Retirado de Oleinick *et al.* 2002).

Os mecanismos que levam à apoptose são já conhecidos. Existem diferentes FS que podem ativar o NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa beta*) e estimular a via de sinalização da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Para além disso, a apoptose é mais ativada pelos FS que têm influência na mitocôndria, já que este é um organelo que intervém na regulação deste processo de morte celular. A apoptose é despoletada aquando da ativação luminosa, visto que há uma inibição da produção de ATP (adenosina trifostato) pela ATP sintase, podendo ser também lesados os complexos I, III e IV da cadeia respiratória. Este processo leva a uma libertação de citocromo c por parte da mitocôndria. A libertação de citocromo c irá ativar a cascata de sinalização das caspases, levando a diversos processos de clivagem irreversível de proteínas com papéis importantes a nível estrutural, de sinalização intracelular e de transcrição de genes (Calzavara-Pinton *et al.* 2007).

No que diz respeito ao processo de morte celular por necrose podem estar envolvidos certos processos como a ativação da proteína RIP1 (do inglês, *receptor interacting protein 1*), excessiva produção de espécies reativas de oxigénio, dano de lisossomas e excesso de cálcio intracelular, como se descreve na figura 10. A resposta imunitária pode provocar a libertação de citoquinas pró-inflamatórias, como é o caso do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*). O TNF pode levar à ativação de uma via de transdução de sinais que provoque aumento da produção de ROS ao nível mitocondrial, provocando dano no DNA ou permeabilização das membranas lisossomais. Estes fatores, combinados com o aumento de peróxido de hidrogénio libertado por macrófagos pode provocar a morte celular por necrose. Por outro lado, o FS pode provocar dano no retículo endoplasmático, o reservatório intracelular de cálcio, provocando um pico intracelular deste. Este excesso de cálcio pode levar à ativação de proteases dependentes de cálcio, à estimulação da atividade do ciclo de Krebs e a produção de ROS ao nível da mitocôndria, podendo provocar a perda do potencial de membrana mitocondrial interna levando à perda da produção de ATP e

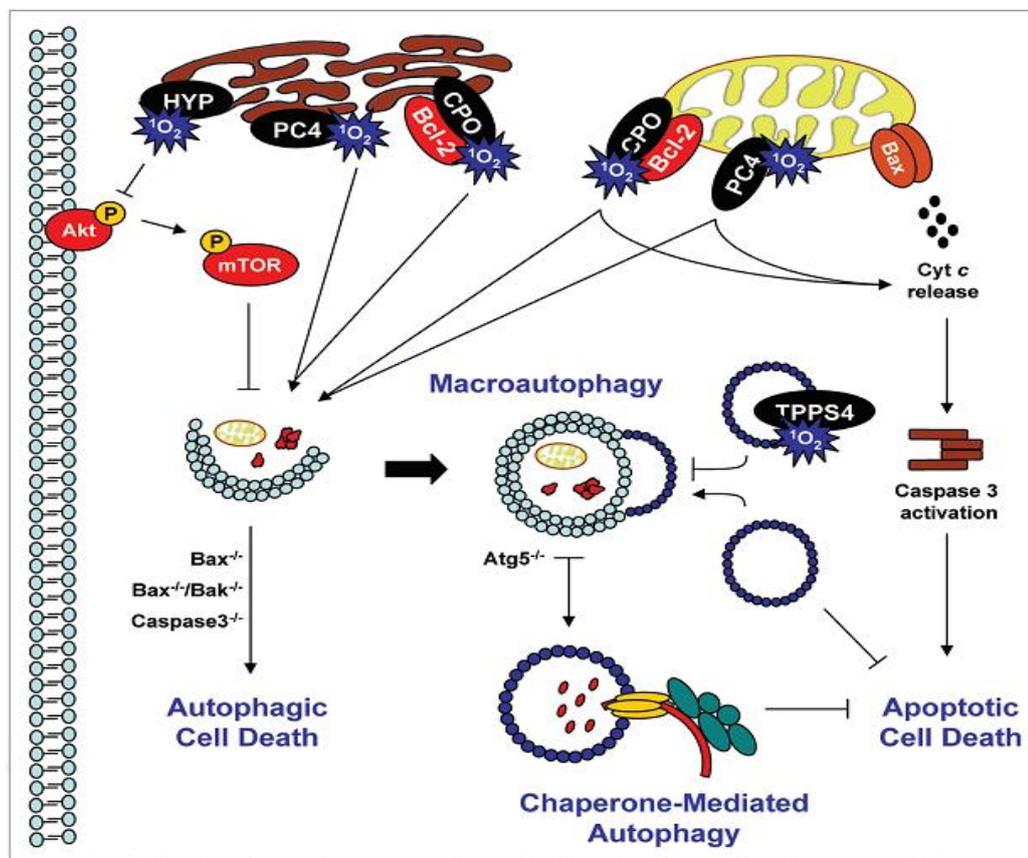
consequente morte celular por necrose, processo esse representado esquematicamente na figura 10 B (Agostinis *et al.* 2011; Zong *et al.* 2006).



**Figura 10 - Necrose induzida por resposta imunitária (A) e necrose mediada por um processo dependente do cálcio intracelular (B).** Em A, a resposta imunitária induzida pelo TNF leva ao aumento da produção de ROS, podendo levar a danos no DNA, nas membranas lisossomais e consequente morte celular por necrose. Já em B, um grande aumento dos níveis intracelulares de cálcio pode provocar um aumento de ROS, causando perda do potencial de membrana mitocondrial e, por consequência, à inibição da produção de ATP, promovendo deste modo morte celular por necrose (adaptado de Zong *et al.* 2006).

A autofagia (ou macroautofagia) é uma via lisossomal para degradação ou reciclagem de proteínas ou organelos intracelulares, que pode ser ativada por vários sinais de stresse, incluindo stresse oxidativo, podendo ter um papel citoprotetor ou pró-morte celular após quimioterapia. Contudo, existem estudos que referem a autofagia como um mecanismo que garante a viabilidade celular após PDT, como representado na figura 11. Este facto pode

ser contrariado pelo uso de FS que afetem a via lisossomal, levando a que as células sigam para o processo apoptótico (Agostinis *et al.* 2011).

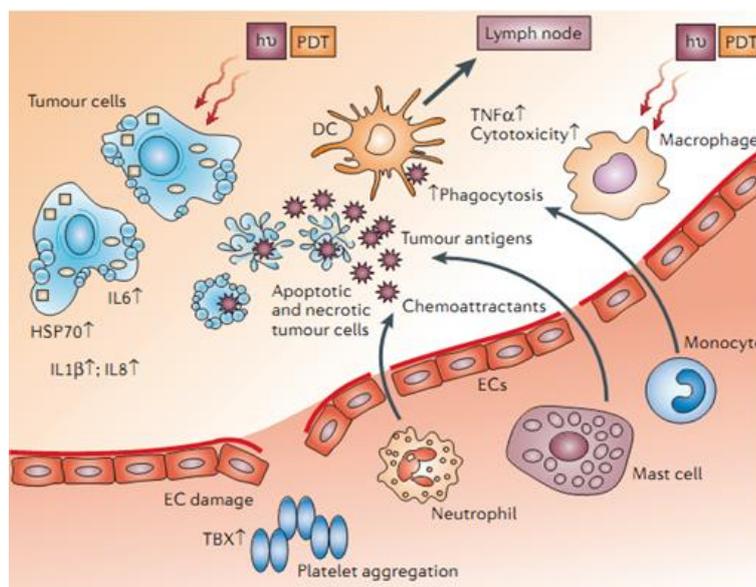


**Figura 11 – Autofagia induzida por PDT.** A ação do oxigênio singlete produzido pela PDT ao nível do retículo endoplasmático ou na via lisossomal pode levar à inibição da via apoptótica, levando a morte celular autofágica (retirado de Dewaele *et al.* 2010).

Para além da morte celular propriamente dita, no que diz respeito à terapia antitumoral, a PDT desempenha um outro papel muito importante, o efeito antivascular. O primeiro estudo para comprovar este efeito foi realizado na década de 60, por Star e seus colaboradores, em que verificou o efeito de PDT usando HpD nos vasos sanguíneos que rodeavam o tumor implantado num modelo animal (ratinhos), tendo observado

vasoconstrição seguida de estagnação do fluxo sanguíneo, hemorragias e formação de agregados de plaquetas em vasos de grandes dimensões (Agostinis *et al.* 2011).

A PDT pode ainda alterar a reação imunológica, tendo sido demonstrado que pode diminuir o grau de severidade dos sintomas de doenças imunológicas induzidas experimentalmente. Verificou-se que o uso dos FS ALA, verteporfina e HpD sensibilizam seletivamente os monócitos (CD14+), as células dendríticas (CD83+) e as células de Langerhans. Para além disso, podem também ativar linfócitos que possuam o recetor da interleucina-2 (IL-2). Noutros estudos, verificou-se que o tratamento de tumores em murganhos com PDT levava a uma sobre-regulação dos níveis de interleucina-6 (IL-6) e uma diminuição dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) da interleucina-10 (IL-10), havendo um grande aumento dos níveis desta interleucina na pele, o que permite explicar a



**Figura 12 – Consequências do processo de inflamação induzido por PDT.** O tratamento com PDT induz aumento das interleucinas 6, 1β e 8, bem como morte celular por apoptose e necrose. Estes eventos levam ao recrutamento de células e moléculas do sistema imunitário com aumento da fagocitose e consequente aumento da citotoxicidade induzida pela PDT (retirado de Castano *et al.* 2006).

fotossensibilidade característica dos tratamentos com PDT. Estes resultados demonstram que a IL-6 pode ter um papel determinante na modulação de resposta imunitária antitumoral e no efeito inflamatório local produzido por PDT, processo representado esquematicamente na figura 12.

Por outro lado, esta terapia revela-se menos eficaz no tratamento de tumores em ratinhos com imunodeficiência combinada severa (SCID, do inglês *severe combined immunodeficient*) do que em ratinhos com o seu sistema imunológico intacto, o que revela o papel fundamental da resposta imunitária antitumoral produzido pela PDT para um tratamento mais eficaz (Calzavara-Pinton *et al.* 2007).

### **3 – Terapia fotodinâmica e tratamento de retinoblastoma**

Como foi referido anteriormente, a PDT revelou desde a sua descoberta um potencial enorme para a terapia antitumoral, aplicada a várias neoplasias. O tratamento de retinoblastoma recorrendo à PDT foi alvo de estudo nas últimas três décadas. Estes estudos foram iniciados visto a PDT não apresentar efeitos mutagénicos, o que no caso particular do retinoblastoma poderia levar ao aparecimento de neoplasias secundárias, como acontece com a radio e quimioterapia.

Estudos *in vitro* foram realizados ao longo dos anos de modo a avaliar a eficácia de diferentes FS na morte de culturas celulares de retinoblastoma. O FS conhecido há mais tempo, a Hp, foi a primeira molécula fotossensibilizadora a ser estudada e que se revelou eficaz em induzir morte celular nas diferentes linhas celulares quando ativada por luz branca (Sery *et al.* 1979). Neste estudo, verificou-se que a morte celular era mais acentuada quando os períodos de exposição à luz eram mais prolongados (Sery *et al.*

1979). Por outro lado, outros investigadores determinaram o efeito de Photofrin II<sup>®</sup> (resultante da purificação de HpD) na morte de culturas celulares de retinoblastoma. Os resultados destes estudos revelaram que baixas concentrações deste FS e altas doses de energia luminosa provocavam morte celular de forma dependente da concentração de FS no meio, enquanto a dose de energia luminosa não provocava diferenças significativas (Jens Winther, 1989). Este sucesso da PDT no tratamento de retinoblastoma realçou a importância das hematoporfirinas neste processo, nomeadamente da PpIX (do inglês *protoporphyrin IX*), como foi comprovado num estudo realizado por Ruiz-Galindo e seus colaboradores. Estes investigadores verificaram um aumento da expressão de protoporfirinogénio oxidase (PPOX), uroporfirinogénio sintase (UROS) e ácido aminolevulínico sintase (ALAS), enzimas envolvidas na síntese do grupo heme da PpIX, após administração de ALA (Ruiz-Galindo *et al.* 2007).

A verteporfina (derivado de benzoporfirinas) também foi avaliada como FS para tratamento de retinoblastoma com PDT, tendo-se revelado igualmente eficaz na indução de morte celular em cinco linhas celulares distintas de retinoblastoma, de entre as quais uma resistente ao etoposídeo. Foi também verificado que eram necessárias concentrações reduzidas deste FS para provocar a morte celular (na ordem do nanomolar), sendo que o aumento de concentração diminuía a quantidade de energia luminosa necessária para haver morte das células e que esta acontecia de forma dependente da concentração de verteporfina administrada (Stephan *et al.* 2008; Jin C. *et al.* 1999).

Contudo, a investigação dos efeitos da PDT no tratamento do retinoblastoma não se ficou apenas pelos estudos *in vitro*, tendo sido efetuados diversas investigações envolvendo modelos animais. Nestes estudos *in vivo* foram também avaliados diferentes FS e o modo como afetavam o crescimento e o microambiente tumoral. A maioria dos estudos foi realizada verificando a eficácia de FS da família das porfirinas, destacando-se a Photofrin

II® e a dihematoporfirina. No caso deste último, verificou-se uma remissão total em cerca de 15 a 25% dos tumores intraoculares induzidos no modelo animal havendo, contudo, reações adversas tais como hemorragias intraoculares (Winther 1987). No que diz respeito à Photofrin II®, verificou-se que quando ativada por uma fonte luminosa de comprimento de onda correspondente à região do vermelho (~620 – 740nm) era capaz de induzir morte celular em tumores intraoculares induzidos em ratinhos, de forma dependente da concentração deste FS e da quantidade de energia luminosa administrada. Esta terapia afetava também os vasos sanguíneos envolventes e os tecidos normais, o que provocava efeitos adversos tais como danos na conjuntiva e na córnea, sendo um fator limitante deste tratamento. Estudando a cinética do processo de morte dos tumores verificou-se que o mecanismo induzido pela PDT seria bifásico, havendo inicialmente um processo de morte direta das células tumorais, seguido por uma destruição secundária de tecido, devido ao dano causado nos vasos sanguíneos envolventes (Winther *et al.* 1987; Winther *et al.* 1988; Winther *et al.* 1989; Winther 1990). A verteporfina e o m-THPC também foram estudados em ensaios envolvendo modelos de xenotransplantes derivados de três linhas celulares distintas. Verificou-se uma elevada eficácia nos três modelos usando m-THPC ativado por laser, sendo que a verteporfina foi eficaz num dos modelos, também quando ativada por laser (Aerts *et al.* 2010).

A investigação nesta área foi sendo desenvolvida até à realização de ensaios clínicos. Ohnishi e seus colaboradores realizaram um estudo envolvendo o tratamento de retinoblastoma em cinco crianças, utilizando HpD e iluminação com um laser de argon. Neste ensaio clínico observou-se a destruição dos tecidos tumorais, bem como angioneecrose, pensando-se que este tratamento seria suficiente para tratar tumores de pequenas dimensões. Por outro lado, para tratar tumores de maiores dimensões seria necessário a combinação entre PDT e radioterapia (Ohnishi Y. *et al.* 1986).

O efeito da presença de oxigénio na eficácia da PDT, especialmente o efeito antivascular e a resposta imunitária desencadeada, também foram investigados por diversas equipas. A importância da presença de oxigénio no efeito fotodinâmico foi demonstrada através da acumulação intracelular de peróxido lipídico, um produto resultante da oxidação de lípidos provocada por stresse oxidativo, em linhas celulares de retinoblastoma, após PDT usando HpD, em condições aeróbias e anaeróbias. Neste estudo verificou-se que em condições anaeróbias a PDT se revelava ineficaz em induzir morte celular (Ohnishi *et al.* 1990).

Na PDT, a vascularização do tumor é um dos seus alvos preferenciais, sendo até fulcral para a destruição do tumor em condições *in vivo*. Este facto foi comprovado por estudos em que foi avaliado o efeito de PDT usando Photofrin® na perfusão sanguínea intraocular, usando o método de captação de cloreto de rubídio-86 ( $^{86}\text{RbCl}$ ). Através deste método, verificou-se uma diminuição da captação de  $^{86}\text{RbCl}$  após a aplicação de PDT, demonstrando que a vascularização dos olhos com tumores foi prejudicada devido à ação do FS com posterior irradiação (Horsman *et al.* 1989). Para além disso, um outro estudo realizado por White e seus colegas, comprovou que a PDT era ineficaz no tratamento de um modelo animal de retinoblastoma pouco vascularizado, demonstrando uma vez mais o papel fundamental do dano induzido nos vasos sanguíneos que envolvem o retinoblastoma para uma PDT bem-sucedida (White *et al.* 1988).

Como já foi referido, a PDT pode induzir uma resposta imunitária antitumoral. Este facto foi também estudado no retinoblastoma. Um grupo de investigadores verificou a ativação de macrófagos com capacidade antitumoral para células de retinoblastoma revestidas por imunoglobulinas G (IgG). Foram utilizadas duas fontes de irradiação, uma fonte de luz branca e outra na região do vermelho, sendo que a luz branca se revelou mais eficaz na ativação dos macrófagos, demonstrando o papel de imunopotenciação promovido

pela HpD, que pode ser determinante para a destruição de retinoblastoma (Yamamoto *et al.* 1992; Yamamoto *et al.* 1994).

Outro desafio nesta área de investigação é a indução de uma maior absorção dos FS pelas células tumorais. Este facto pode ser conseguido através da adição de diferentes grupos funcionais, ou mesmo proteínas, à molécula FS de modo a permitir maior absorção por parte do tumor. Por exemplo, um estudo realizado por Schmidt-Erfurth e colaboradores permitiu concluir que a conjugação do FS clorina e6 (Ce6) com LDL potenciava a absorção do FS nas celulares tumorais, segundo um mecanismo de absorção mediado por recetores, demonstrado pela saturação dos recetores, bem como pela inibição competitiva destes (Schmidt-Erfurth *et al.* 1997). Outros investigadores verificaram igualmente que a conjugação entre um açúcar (manose e galactose) e porfirinas, ligadas por dietilenoglicol (TPP(p-Deg-O- $\alpha$ -GalOH)<sub>3</sub> e TPP(p-Deg-O- $\alpha$ -ManOH)<sub>3</sub>) exibiam maior atividade fotoquímica, sendo um processo igualmente mediado por uma interação entre o açúcar e recetores celulares (Laville *et al.* 2006).

Outro estudo muito interessante avaliou a relevância de bicamadas planares para a modelação de interações entre porfirinas glicodendrímicas e células de retinoblastoma. Neste estudo, os investigadores utilizaram um sistema de bicamada com concavalina A como modelo de membranas de retinoblastoma e estudaram a interação da porfirina com a linha celular Y79 e a adesão de lipossomas incorporando porfirina com células imobilizadas num sensor adequado. Os autores do estudo verificaram que os lipossomas incorporando porfirina eram mais fototóxicos do que a porfirina ou os lipossomas nas suas formas livres. Para além disso, eles observaram uma forte tendência destas porfirinas glicodendrímicas para formarem agregados em solução ou para interagirem com proteínas sanguíneas. Desta forma, era difícil avaliar a real contribuição do reconhecimento molecular, pelo que eles imobilizaram as células num sistema QCM-D,

sendo que as células se encontravam totalmente sem soro bovino fetal antes da injeção das porfirinas. Com esta experiência, os autores demonstraram que as porfirinas manosiladas interagem especificamente com os recetores de manose suportados pelas células Y79 (Makky *et al.* 2012). Gary-Bobo e seus colaboradores realizaram um estudo onde avaliaram o efeito de nanopartículas de sílica mesoporosas multifuncionalizadas (MSN) combinadas com três diferentes abordagens: terapia fotodinâmica de excitação de um fóton (OPE-PDT, do inglês *one photon excitation photodynamic therapy*), entrega mediada por camptotecina e direcionamento usando manose ou galactose nas células da linha celular de retinoblastoma Y79. Os autores desenharam igualmente uma MSN encapsulando um FS especificamente para terapia fotodinâmica de excitação de dois fótons (TPE-PDT, do inglês *two photon excitation photodynamic therapy*) e funcionalizada com manose à sua superfície. Os investigadores observaram elevada morte celular com a TPE-PDT com a MSN funcionalizada com manose, mesmo usando um curto período de irradiação (três *scans* de 1,25 segundos cada) a baixa fluência ( $10,6\text{J cm}^{-2}$ ). Por outro lado, com os estudos de OPE-PDT combinada com a entrega mediada por camptotecina, eles descobriram um efeito sinérgico destas abordagens de modo a induzir morte celular (Gary-Bobo *et al.* 2012).

#### **4 – Características Estruturais dos fotossensibilizadores**

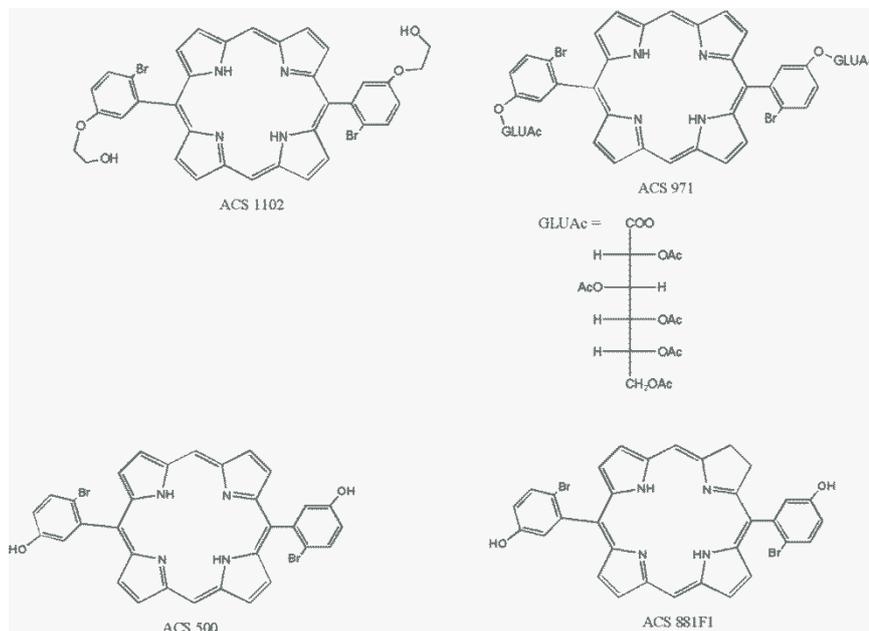
Nesta dissertação, foram utilizados quatro fotossensibilizadores com características estruturais distintas: 5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina (doravante ACS 500), meso bis 5,15-[(2-bromo-5-(2-hidroxietiloxi)fenil)] porfirina (ACS 1102) e meso bis 5-15-[(2-bromo-5-pentaacetilgliconilcarboniloxi)fenil] porfirina (ACS 971).

As porfirinas são compostos tetrapirrólicos, sendo os maiores constituintes da hemoglobina e da mioglobina. Estes compostos possuem macrociclos heterocíclicos altamente conjugados, podendo também possuir um átomo metálico central. As porfirinas constituem assim um sistema composto por 22 elétrons  $\pi$ , dando origem a uma absorção num comprimento de onda elevado, tendo deste modo despertado o interesse da comunidade científica para o seu potencial como agentes fotossensibilizadores a utilizar em Medicina (O'Connor *et al.* 2009). Vários estudos têm também sido realizados ao longo das décadas no sentido de desenvolver novos compostos porfirínicos com um maior rendimento na produção de oxigénio singlete, sendo que a adição de grupos halogenados tem sido vista como muito promissora (Azenha *et al.* 2002). Assim sendo, neste trabalho pretendeu-se avaliar o potencial citotóxico de três compostos porfirínicos halogenados com bromo, os compostos 5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina (ACS 500), meso bis 5,15-[(2-bromo-5-(2-hidroxi-etiloxi)fenil] porfirina (ACS 1102) e meso bis 5-15-[(2-bromo-5-pentaacetilgliconilcarboniloxi)fenil] porfirina (ACS 971). O ACS 971, para além da halogenação, possui igualmente uma glicosilação (Gluc-OAC). Este composto foi alvo de estudo nesta dissertação, visto que vários estudos têm demonstrado que as glicosilações são importantes no reconhecimento celular, sendo que derivados de porfirinas acopladas a sacarídeos têm demonstrado uma afinidade de ligação às células de linhas tumorais humanas muito superior às porfirinas por si só, concluindo-se portanto que a adição de grupos glicosilados potencia a captação pelas células tumorais (Vedachalam *et al.* 2011).

Uma outra família de fotossensibilizadores bastante promissora é a família das clorinas, que possuem uma estrutura química bastante semelhante à das porfirinas, com a diferença de o seu anel porfirínicos não ser totalmente insaturado (Banfi *et al.* 2004). Assim sendo, neste trabalho avaliou-se igualmente o potencial citotóxico do composto

5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)clorina (ACS 881F1), a clorina correspondente à porfirina ACS 500.

A figura 13 apresenta a estrutura química dos quatro fotossensibilizadores a serem estudados nesta dissertação.



**Figura 13 – Representação da estrutura química dos fotossensibilizadores ACS 1102, ACS 971, ACS 500 e ACS 881F1.**

## **II – Objetivos**



A terapia fotodinâmica desde cedo demonstrou ser uma alternativa terapêutica antitumoral. Contudo, o seu papel no tratamento de retinoblastoma não está esclarecido, sendo objetivo principal deste trabalho avaliar o seu efeito neste tipo de cancro. Assim, pretende-se avaliar e comparar o efeito citotóxico de quatro fotossensibilizadores: 5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina (ACS500), 5,15-bis(2-bromo-3-hidroxifenil)clorina (ACS881F1), meso bis 5,15-[(2-bromo-5-(2-hidroxietiloxi)fenil)] porfirina (ACS1102) e meso bis 5-15-[(2-bromo-5-pentaacetilgliconilcarboniloxi)fenil] porfirina (ACS971). Constitui ainda um segundo objetivo deste trabalho, avaliar os efeitos celulares da terapia fotodinâmica baseada nestes compostos em termos de viabilidade celular e vias de morte, danos no DNA, stresse oxidativo e defesas antioxidantes.



### **III – Materiais e Métodos**



Ao longo das últimas décadas, a terapia fotodinâmica foi estudada como uma alternativa às terapias antitumorais clássicas, devido à sua seletividade e aos seus efeitos secundários muito agressivos para os doentes oncológicos. Desta forma, desde a descoberta de moléculas como a hematoporfirina e do seu potencial para aplicação em terapia fotodinâmica que se desenvolveram novas moléculas fotossensibilizadoras não só porfirinas, mas também de outras famílias, como as clorinas e as ftalocianinas, por exemplo.

No que diz respeito à classe das porfirinas, estas têm o potencial de ser melhoradas através da adição de grupos funcionais por síntese química. A conjugação com glicoconjugados ou com átomos do grupo dos halogéneos, tais como bromo e flúor são exemplos desta evolução.

Neste trabalho foi avaliado o potencial citotóxico de moléculas fotossensibilizadoras no que diz respeito ao tratamento do retinoblastoma, avaliando-se inicialmente o seu efeito ao nível da inibição da atividade metabólica. Posteriormente, após o tratamento fotodinâmico, caracterizou-se a ação intracelular, avaliando o tipo de morte celular induzida, o estado do ciclo celular, a indução de danos no DNA e a expressão da proteína pró-apoptótica p53. Foram igualmente avaliados os efeitos do tratamento fotodinâmico ao nível do stresse oxidativo e das defesas antioxidantes, através da determinação das espécies reativas de oxigénio intracelulares, da expressão do glutatião reduzido e da atividade da superóxido dismutase.

Para a realização destes estudos utilizaram-se culturas celulares de uma linha celular humana de retinoblastoma, designada Y79. Esta linha celular foi isolada em 1971 por T. W. Reid e seus colaboradores. A sua cultura foi iniciada através de um explante de um tumor primário obtido imediatamente após enucleação de um doente com histórico familiar de retinoblastoma (ATCC).

## 1 – Culturas celulares

### 1.1 – Propagação

A linha celular de retinoblastoma Y79 foi obtida na *American Type Culture Collection* (HTB-18, ATCC) e propagada em suspensão celular, respeitando as indicações do fornecedor. Assim sendo, a sua propagação foi realizada em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), suplementado com soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA), numa concentração final de 20%, 100 $\mu$ M de piruvato de sódio (Gibco, RU) e 1% de antibiótico (100U/mL de penicilina e 10 $\mu$ g/mL de estreptomicina; Gibco, RU), mantida em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C numa incubadora *Binder* (Binder, Alemanha).

Para os diferentes estudos a concentração das suspensões celulares foi ajustada com base na contagem celular obtida pelo método do azul de tripano. Para isto, uma alíquota de suspensão celular corada com azul de tripano foi colocada numa câmara de *neubauer*, e observada num microscópio ótico invertido (Nikon, Eclipse TS 100, Japão) com ampliação de 100 vezes, de modo a aferir qual o número de células.

### 1.2 – Revestimento de placas com poli-D-lisina

Neste trabalho pretendeu-se avaliar os diferentes efeitos induzidos pelos FS ao nível intracelular, ou seja, avaliar os efeitos induzidos pelas moléculas de FS que foram captadas pelas células e não as moléculas de FS que estariam presentes apenas no meio de cultura. Por este motivo, antes da realização do tratamento fotodinâmico é essencial a remoção e consequente troca do meio de cultura, de modo a remover todo o FS que não foi captado pelas células. Sendo que a linha Y79 se propaga em cultura em suspensão, a troca de meio

foi efetuada através de centrifugação, que é um processo moroso e especialmente difícil no caso dos estudos se realizarem em placas multipoço. Assim sendo, procedeu-se a um revestimento de cada poço das placas com poli-D-lisina (Sigma, EUA). Este revestimento permite a ancoragem das células, tornando-as aderentes. Esta metodologia foi apenas seguida após confirmação de que o revestimento com poli-D-lisina não alteraria significativamente o crescimento das células da linha celular em estudo, tendo sido utilizado para isso o ensaio do azul de tripano, como será descrito posteriormente.

Deste modo, para efetuar o revestimento das placas, preparou-se uma solução de poli-D-lisina (0,1 mg/mL). Colocaram-se 200µL desta solução em cada poço, deixando-se atuar durante 10 minutos. De seguida procedendo-se a uma lavagem com água ultra pura estéril, de forma a remover o excedente de poli-D-lisina. As placas eram sujeitas a radiação ultravioleta durante a noite, de modo a garantir a esterilidade das mesmas, sendo seladas e armazenadas a 4°C até à sua utilização.

### **1.3 – Avaliação da viabilidade celular em cultura aderente**

De modo a avaliar se as células da linha celular Y79 se mantinham viáveis e proliferativas quando sujeitas ao crescimento em cultura aderente, recorreu-se ao método de avaliação da viabilidade celular pelo azul de tripano. Para isso, preparam-se suspensões celulares com 450000 células, que foram colocadas em placas de 6 poços revestidas com poli-D-lisina e em placas de 6 poços não revestidas. Procedeu-se a contagens do número de células para cada uma das condições anteriores às 24h, 48h e 72h de modo a avaliar se existiriam diferenças significativas no crescimento das células nos dois tipos de crescimento considerados.

#### 1.4 – Tratamento fotodinâmico

O tratamento fotodinâmico consiste essencialmente na ativação dos FS por uma fonte luminosa de comprimento de onda adequado, como foi referido anteriormente.

No nosso trabalho, para a realização do tratamento fotodinâmico, foram preparadas suspensões celulares em placas de 24 poços preparadas com o revestimento com poli-D-lisina, tendo sido colocadas na incubadora durante 24h de modo a permitir a sua anco-ragem ao revestimento. Posteriormente procedeu-se à incubação com diferentes concentrações dos quatro FS referidos, tendo sido preparadas diferentes soluções com uma concentração que permitia a administração do mesmo volume de 5µL em todas as condições. Realizaram-se dois controlos, um com células não tratadas e outro em que se administraram 5µL do veículo de administração dos FS, neste caso uma mistura ternária de água, polietilenoglicol e etanol [H<sub>2</sub>O/PEG400/EtOH (50/30/20, v/v/v)]. A irradiação efetuou-se 24h após a incubação com os FS. Previamente à irradiação retirou-se o meio e efetuou-se uma lavagem com 200µL de tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*), colocando-se novamente meio fresco. A irradiação foi realizada recorrendo a uma fonte de luz fluorescente equipada com um filtro vermelho ( $\lambda_{\text{cut-off}} < 560\text{nm}$ ). A energia da luz foi medida com um radiómetro X97 da Gigahertz-Optic. A irradiação foi efetuada com um fluxo de 7,5mW/cm<sup>2</sup> até atingir um total de 10J.

## 2– Estudos de captação

De modo a realizar os estudos de captação, incubaram-se 450000 células com uma concentração de 5 $\mu$ M de cada um dos FS, em placas de 6 poços (Sarstedt, Alemanha), tendo-se avaliado a captação dos compostos 2h, 6h, 24h e 48h após a incubação, de modo a avaliar se a percentagem de captação seria dependente do tempo de incubação. Para isso, a cada tempo considerado, as células foram submetidas a uma centrifugação a 1300g, durante 5 minutos, de modo a remover o meio. Adicionou-se ao *pellet* resultante 2mL de metanol, de modo a garantir a completa degradação e ruptura das células, tendo-se deixado o metanol a atuar durante 5 minutos. Após este período, procedeu-se a nova centrifugação nas condições já referidas e guardou-se o sobrenadante, cuja intensidade de fluorescência foi determinada por espectroscopia de fluorescência recorrendo a um espectrómetro SPEX fluoromax (Horiba, Japão), utilizando comprimentos de onda adequados para cada um dos FS considerados. A concentração intracelular foi determinada após a obtenção de uma curva de calibração obtida a partir da intensidade de fluorescência de soluções de metanol com cada um dos fotossensibilizadores, seguindo a metodologia descrita por Marchal e colaboradores (Marchal *et al.* 2007).

## 3 – Avaliação da atividade metabólica

Existem diferentes métodos que permitem estudar os efeitos citotóxicos dos FS. Para isso, após a realização do tratamento fotodinâmico, utilizaram-se métodos de espectrofotometria, nomeadamente o ensaio de *alaraz blue*, o ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide) e o ensaio com sulforodamina B

(SRB), de modo a avaliar os efeitos na atividade metabólica e consequente efeito na proliferação celular.

### **3.1 - Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de *alamar blue***

O *alamar blue* (Sigma, EUA) é uma sonda de oxidação-redução utilizada para avaliar a proliferação celular. Isto deve-se ao facto das células metabolicamente ativas e proliferativas apresentarem um ambiente reduzido, enquanto a inibição do crescimento celular leva a um ambiente celular oxidado. Este método utiliza uma sonda que apresenta duas formas: uma forma não fluorescente e de cor azul que se encontra oxidada e que se torna rosa e fluorescente após redução. Deste modo, as células metabolicamente ativas levarão à redução da sonda, promovendo a mudança de cor de azul para rosa. Este ensaio tem como grande vantagem o facto de se poder utilizar tanto um espectrofotómetro como um fluorímetro para a avaliação do efeito citotóxico dos fármacos a testar na proliferação celular (Collins *et al.* 1997). Para a realização deste estudo, distribuem-se suspensões celulares com 450000 células/mL em meio de cultura numa placa de 24 poços revestida com poli-D-lisina, com um volume final de 500µL. O tratamento fotodinâmico foi realizado como referido anteriormente. A análise da proliferação foi feita 24h e 48h após irradiação. Para tal foram adicionados 50µL de *alamar blue*, de modo a este estar numa proporção de 1:10, deixando-se a incubar durante 24h. Os resultados são expressos segundo a percentagem de inibição da proliferação das células tratadas em relação às culturas controlo, normalizadas para 100%, utilizando a equação 1, após leitura num espectrofotómetro ELISA (Biotek<sup>®</sup> *Synergy HT*) (Longo-Sorbello *et al.* 2006; Laranjo 2010).

$$\% \text{ proliferação} = \frac{(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} A_{\lambda 1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda 1} A_{\lambda 2} \text{ (Células tratadas)}}{(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} A^{\circ} \lambda 1 - (\epsilon_{OX})_{\lambda 1} A^{\circ} \lambda 2 \text{ (Células controle)}} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

$\epsilon_{OX}$  = Coeficiente de extinção molar da forma oxidada do alamar blue (azul)

A = Absorvância dos poços tratados

$A^{\circ}$  = Absorvância dos poços controle

$\lambda 1 = 570\text{nm}$

$\lambda 2 = 600\text{nm}$

$(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} = 117,216$

$(\epsilon_{OX})_{\lambda 1} = 80,586$

Esta abordagem foi utilizada com o objetivo de construir as curvas de dose-resposta de cada um dos fotossensibilizadores e determinar a concentração dos FS que inibe a proliferação das culturas celulares em 50% (IC50). Para estabelecer estas curvas utilizaram-se como termo de comparação as culturas celulares controle, submetidas apenas ao veículo de administração dos FS referido anteriormente, às quais se atribuiu o valor de 100%. As curvas de dose resposta foram construídas recorrendo-se ao *software* Origin 8.0, que através do processamento dos resultados obtidos desenhou as curvas com o melhor ajuste aos resultados experimentais, fornecendo as respetivas equações. Deste modo foi possível calcular os valores de IC50 para os quatro FS considerados às 24h e 48h

### 3.2 - Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide)

O ensaio do MTT foi utilizado para avaliar o efeito dos FS na proliferação das células Y79. Este composto consiste num sal de tetrazólio solúvel em água, que é reduzido pelas células metabolicamente ativas com formação de um sal de cor violeta insolúvel em soluções aquosas, formando-se cristais de formazano, como se encontra representado na figura 14. Este processo de redução está associado à função de desidrogenases mitocondriais, contudo também pode ser devida à ação de moléculas como NADH e NADPH (equivalentes redutores). Após se proceder à solubilização dos cristais de formazano, através da adição de solventes orgânicos, pode-se quantificar por espectrofotometria a quantidade de cristais formados (Liu 1999; Abe *et al.* 2000; Langdon 2004; Buch *et al.* 2012).

Para a realização deste estudo, as células foram preparadas e tratadas com o tratamento fotodinâmico como descrito anteriormente. Os resultados estão expressos em percentagem de inibição da proliferação das células tratadas em relação às células controlo, normalizadas para 100%, utilizando a equação 2, sendo que se avaliou a proliferação celular 24h e 48h após a irradiação.

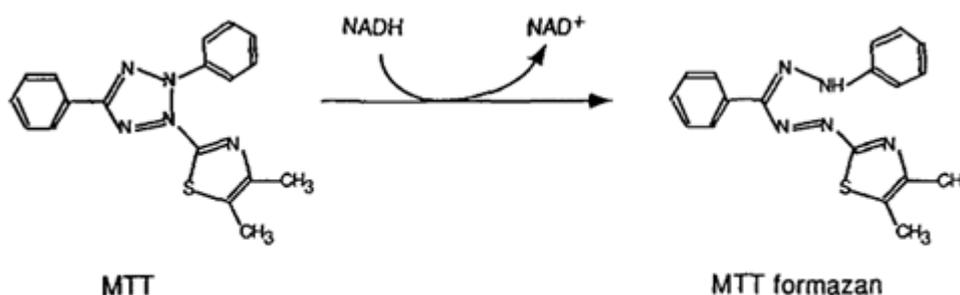


Figura 14 - Representação esquemática da reação da redução de MTT (Liu 1999).

Para avaliar a proliferação celular, descartou-se o meio de cultura e procedeu-se a uma lavagem com 500µL de PBS em cada poço. Adicionaram-se 150µL de uma solução de MTT (0,5mg/mL; Sigma, EUA) em PBS, pH 7,4 e procedeu-se a uma incubação no escuro, a 37°C, durante 4horas. Após a incubação, de forma a dissolver os cristais de formazano, adicionaram-se 150µL de uma solução 0,04M ácido clorídrico em isopropanol e agitaram-se as placas durante 30min. Após a solubilização dos cristais, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96poços (Sarstedt, Alemanha), medindo-se posteriormente a absorvância num espectrofotómetro, no comprimento de onda de 570nm e um comprimento de onda de referência de 620nm (Langdon 2004). Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da proliferação das culturas celulares após o tratamento fotodinâmico em relação às culturas celulares tratadas apenas com o solvente dos FS normalizadas a 100%, utilizando a equação 2.

$$\% \text{ proliferação} = \frac{(A_{570nm} - A_{620nm})(\text{Células controlo})}{(A_{570nm} - A_{620nm})(\text{Células tratadas})} \quad (\text{equação 2})$$

Esta abordagem foi utilizada com o objetivo de determinar a concentração dos FS que inibe a proliferação das culturas celulares em 50% (IC50). Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa Origin Pro 8.0.

### 3.3 - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de sulforodamina B (SRB)

O método de SRB utiliza uma sonda que se liga a aminoácidos das proteínas celulares, o que permite obter uma estimativa da massa total de proteína, que está relacionada com o

número de células. Comparado com outros ensaios que permitem avaliar a proliferação celular, o método da SRB apresenta várias vantagens, tais como maior sensibilidade, melhor linearidade e um menor custo.

Para a realização deste estudo, as células foram preparadas de igual modo como para os estudos de *alamar blue* e MTT. Procedeu-se à incubação com as concentrações de 25nM e de 50nM dos quatro FS, realizando-se dois controles, um com células não tratadas e outro com o veículo de administração dos FS. O tratamento fotodinâmico foi realizado como descrito anteriormente, e a análise da proliferação foi feita 24h após irradiação.

Aquando da análise da proliferação, descartou-se o meio de cultura e efetuou-se uma lavagem com PBS. Descartou-se de seguida o PBS e realizou-se nova lavagem com água ultrapura, que foi igualmente descartada, adicionando-se uma solução de 200µL de ácido acético 1% em metanol, de modo a fixar as células, deixando a atuar durante 30min. Posteriormente descartou-se a solução e adicionaram-se às células 200µL de sulforodamina B, que ficaram a incubar durante 4h ao abrigo da luz. Após este período de tempo, lavou-se a placa de modo a remover o excesso de SRB e após secagem da placa adicionaram-se 200µL de TRIS-NaOH. A leitura da absorvância foi feita com o comprimento de onda de 540nm, com um filtro de referência a 590nm, num espectrofotómetro ELISA (Biotek<sup>®</sup> Synergy HT, EUA). Os resultados são expressos segundo a percentagem de inibição da proliferação das células tratadas em relação às culturas controlo, normalizadas para 100% (Keepers *et al.* 1991; Longo-Sorbello *et al.* 2006; Papazisis *et al.* 1997).

## 4 – Avaliação da citotoxicidade celular

Neste trabalho, pretendeu-se determinar quais os mecanismos intracelulares pelos quais os FS inibem a proliferação celular. Para isso, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo para avaliar a viabilidade celular e quais as vias de morte que foram induzidas pelo tratamento fotodinâmico, através da dupla marcação com anexina V-FITC (AnV) e iodeto de propídeo (IP) assim como ver como é que estas alterações se repercutem ao nível do ciclo celular. Pretendeu-se igualmente avaliar a existência de danos no DNA, através do ensaio cometa e determinar a expressão da proteína pró-apoptótica p53, recorrendo à técnica de *western blot*.

### 4.1 – Avaliação da viabilidade celular.

A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo, utilizando a técnica de dupla marcação com Anexina V (AnV) acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo. A AnV é uma proteína anticoagulante que se liga com elevada afinidade a fosfolípidos aniónicos, tais como fosfatidilserina. Em células viáveis, não-apoptóticas, existe uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada lipídica, sendo que no folheto externo existe fosfatidilcolina e esfingomiéline, enquanto no folheto interno se encontra fosfatidilserina. Durante a apoptose, ocorre a translocação deste fosfolípido para o folheto externo, podendo ser identificado através da incubação das células com AnV-FITC. Esta translocação da fosfatidilserina deve-se ao facto de ser identificada por recetores específicos que sinalizam as células com resíduos externos deste fosfolípido para serem removidas do tecido. Este mecanismo ocorre enquanto ainda existe integridade da membrana celular, sendo um evento característico de apoptose inicial

(Koopman *et al.* 1994; van Heerde *et al.* 2000; Bedner *et al.* 1999). Por outro lado, o iodeto de propídeo é um corante com a capacidade de se intercalar no DNA celular. Contudo, este corante não consegue atravessar a bicamada lipídica, sendo apenas capaz de intercalar no DNA quando a integridade da membrana celular se encontra comprometida, o que se verifica quando as células se encontram em apoptose tardia ou necrose (Darzynkiewicz *et al.* 1992).

A aplicação deste método de dupla marcação AnV-FITC e iodeto de propídeo permite agrupar e classificar a população celular em quatro grupos distintos: grupo I, caracterizado por células viáveis; grupo II, onde se encontram células em apoptose inicial; grupo III, composto por células em apoptose tardia/necrose; e, por último, o grupo IV, que contabiliza as células em necrose. Desta forma, cada um destes grupos possui um perfil de marcação característico. Assim sendo, as células viáveis do grupo I apresentam-se negativas para ambas as marcações. As células do grupo II, encontrando-se em apoptose inicial e apresentam marcação positiva para AnV-FITC, mas negativa para a marcação com iodeto de propídeo. As células pertencentes ao grupo III estão em apoptose tardia/necrose e apresentam-se positivas para ambas as marcações. Por último, as células características do grupo IV apresentam marcação negativa para AnV-FITC e positiva para iodeto de propídeo, característica de células necróticas (Bedner *et al.* 1999).

Para se realizar esta técnica, utilizaram-se 3 milhões de células obtidas após centrifugação a 1300g, durante 5min de uma suspensão celular. O *pellet* obtido foi ressuspenso em PBS realizando-se nova centrifugação. O *pellet resultante* foi ressuspenso em 100µL de tampão de ligação e incubou-se as células com 1µL de AnV-FITC e 5µL de iodeto de propídeo (KIT Immunotech, Beckman Coulter, República Checa). Após a incubação realiza-se a análise no citómetro, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525nm para AnV-FITC e de 640nm para o iodeto de propídeo. Os resultados

desta técnica de dupla marcação são apresentados na forma de percentagem de células presentes em cada grupo.

## 4.2 - Avaliação do ciclo celular

O ciclo celular consiste na sequência de eventos pelos quais uma célula duplica o seu material genético e se divide em duas células-filhas idênticas entre si. Este ciclo divide-se em quatro fases principais: a fase S, na qual o material genético é replicado apenas uma vez e, posteriormente, na fase M (mitose), os cromossomas duplicados são distribuídos equitativamente pelas células-filhas. Entre estas duas fases, existem outras duas, denominadas G1 e G2 (*gap-1* e *gap-2*), sendo que a fase G1 precede a fase S e a fase G2 precede a mitose (Tessema *et al.* 2004). Assim sendo, recorreu-se à análise do ciclo celular por citometria de fluxo para verificar a existência de alterações induzidas após o tratamento fotodinâmico com os FS considerados neste trabalho. Para se realizar a análise do ciclo celular, centrifugou-se uma suspensão celular com aproximadamente três milhões de células a 1300g, durante 5 minutos, tendo-se descartado o sobrenadante. Ao *pellet*, adicionaram-se 200µL de etanol a 70% com o tubo em agitação num vórtex, tendo-se incubado durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após a incubação, adicionaram-se 2mL de PBS e procedeu-se a nova centrifugação a 1300g, durante 5min. De seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 250µL de iodeto de propídeo (PI/Solução de RNase), agitou-se suavemente e incubou-se durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. A deteção foi efetuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 488nm.

### 4.3 – Avaliação de danos no DNA pelo ensaio cometa

A avaliação de danos ao nível do DNA de uma célula eucariótica individual assume cada vez mais um papel fundamental no que diz respeito à avaliação dos efeitos de compostos tóxicos, de novos fármacos, de genotoxicidade, entre outros fatores. O ensaio cometa, ou electroforese em gel de células individualizadas (SCGE, do inglês *Single Cell Gell Electrophoresis*) é um método versátil, sensível, simples e económico que permite avaliar dano no DNA (e reparação) em células individualizadas. Este ensaio permite detetar quebras tanto em cadeias duplas como em cadeias simples, detetar locaisapurínicos e apirimidínicos, *cross-links* no DNA, danos nas bases ou pares de bases e núcleos apoptóticos nas células (Nandhakumar *et al.* 2011). Este método combina a eletroforese em gel de DNA com microscopia de fluorescência de forma a visualizar a migração das cadeias de DNA de células individuais incorporadas em agarose. Deste modo, se o DNA carregado negativamente possuir quebras, as *supercoils* de DNA são relaxadas e as extremidades quebradas podem migrar em direção ao ânodo durante a eletroforese. Caso o DNA não possua danos, a ausência de extremidades livres e o elevado tamanho dos fragmentos evitam a migração. A quantificação da quantidade relativa de DNA que migra constitui um método simples de quantificar o número de quebras no DNA de uma única célula (Olive *et al.* 2006). A terminologia de “ensaio cometa” foi introduzida na década de 90, após uma modificação do método original, desenvolvido por Ostling e Johanson, devido ao aspeto que o DNA danificado apresentava. Assim sendo, a cabeça do cometa continha o DNA de elevado peso molecular e a cauda do cometa continha as extremidades dos fragmentos que tinham migrado. Estes “cometas” podiam ser medidos em tempo real, a partir de imagens digitalizadas e usando *software* adequado. O momento da cauda (medida da quantidade de DNA e a sua distribuição na cauda), bem como o comprimento

da cauda e a percentagem de DNA nela contido, são características comumente utilizadas para a quantificação do dano no DNA (Olive *et al.* 2006).

Recorreu-se a este método de modo a avaliar a existência de danos no DNA induzidos pelos FS e a possível existência de diferenças nos danos causados pelos diferentes FS, bem como as diferenças entre as concentrações consideradas. Foram igualmente preparados controlos em simultâneo com todos os ensaios.

Antes de sujeitar as células ao ensaio cometa, as culturas celulares foram incubadas com as concentrações de 25nM e 50nM de cada fotossensibilizador e irradiadas, com um fluxo de 7,5mW/cm<sup>2</sup> até atingir 10J, 24h após a incubação com os FS. Os ensaios cometa foram efetuados 24h após a irradiação.

Inicialmente foram revestidas lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha) com uma camada de agarose utilizando uma solução de 1,5% de *Normal Melting Point Agarose* (NMPA; Sigma, EUA). As suspensões celulares foram centrifugadas a 1300g, durante 5min, e foram posteriormente diluídas de modo a obter suspensões celulares com cerca de 50000 células. Preparou-se agarose que constituiria a camada superior nas lâminas, a *low melting point agarose* (LMPA; Sigma, EUA) a 1%. Esta agarose, como o nome indica, possui um ponto de fusão mais baixo, sendo adicionada às células a uma temperatura de 37°C, temperatura de cultura da linha celular. Prepararam-se microtubos *eppendorf*® com solução de LMPA 1% e suspensão celular, numa proporção de 1:1, homogeneizou-se cuidadosamente e colocou-se sobre as lâminas revestidas com NMPA, tendo-se deixado a solidificar a segunda camada de agarose a 4°C, durante 30 minutos. Após a solidificação, colocaram-se as lâminas em solução de lise (25mM de NaCl [Sigma, EUA], 100 mM de EDTA [Sigma, EUA], 10mM de Tris [Sigma, EUA], 1% de Triton X-100 [Merck, Alemanha], 10% de DMSO [Sigma, EUA]) durante a noite, a 4°C, para promover a formação de poros e posterior destruição da membrana citoplasmática. Posteriormente, as

lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese (300mM de NaOH e 1mM de EDTA), durante uma hora, de modo que as células adquirissem características alcalinas, tendo este tampão  $\text{pH} > 13$ . A eletroforese foi realizada com tensão de 25mV e corrente de 1000 mA durante 15 minutos, a 4°C, numa tina de eletroforese horizontal (BioRAD, EUA). As lâminas foram depois submetidas à solução de neutralização (Tris a 0,4M), tendo-se realizado três lavagens com este tampão, durante 5 minutos. As lâminas foram guardadas e, antes da sua observação, foram coradas com brometo de etídeo 1x (Diluição 1:10 a partir de solução de 20µg/mL BioRAD), durante 20 minutos.

As observações foram realizadas num microscópio Motic AE31 equipado com sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II com lâmpada de halogéneo de mercúrio de 100 watts. Para a observação da fluorescência emitida pelo brometo de etídeo utilizou-se filtro de excitação  $540 \pm 25\text{nm}$ , *beam splitter* de 565nm e filtro de emissão de  $605 \pm 55\text{nm}$ . As imagens foram adquiridas em câmara Moticam 5000 Cooled acoplada a computador dedicado com o *software* Motic Images Advanced 3.2. foram adquiridas imagens de forma a se obterem cerca de 100 exemplares de cometas de cada condição de tratamento. Em todas as imagens adquiridas, os cometas obtidos foram analisados utilizando o *software Comet score<sup>TM</sup>*, de modo a calcular os parâmetros do comprimento de cauda, percentagem de DNA na cauda e o momento de cauda. Este parâmetro é expresso como o produto do comprimento de cauda pela percentagem de DNA na cauda (Zhang *et al.* 2013).

#### 4.4 – Avaliação da expressão da proteína p53

A proteína p53 é uma proteína supressora tumoral codificada pelo gene TP53. Esta proteína é responsável pela estabilidade genética, desempenhando diferentes papéis na

paragem do ciclo celular, apoptose, senescência e diferenciação. Mutações que provoquem inativação desta proteína são ubíquas e podem ser detetadas tanto em cancros familiares como esporádicos (Inoue *et al.* 2012). De modo a verificar se o tratamento fotodinâmico induzia alterações dos níveis de expressão da p53 recorreu-se à técnica de *western blot* (WB). Esta técnica é um método utilizado em biologia molecular, bioquímica ou imunogenética, para detetar proteínas de uma determinada amostra de um tecido homogeneizado ou extrato celular. Neste método, recorre-se a um gel de eletroforese para separar proteínas desnaturadas através das diferenças de peso molecular. As proteínas são posteriormente transferidas para uma membrana, sendo as mais comuns as de nitrocelulose ou as de difluoreto de polivinilideno (PVDF), sendo depois detetadas através do uso de anticorpos específicos contra a proteína alvo de estudo (anticorpo primário). Após a marcação da proteína em estudo com o anticorpo primário, a sua identificação é conseguida com recurso a um anticorpo secundário, que ligue especificamente ao anticorpo primário. O anticorpo secundário pode ser marcado e visualizado através de um filme. Este filme pode ser armazenado e ser visualizado a qualquer momento para quantificação dos níveis proteicos (Yang *et al.* 2009). O WB oferece as seguintes vantagens: as membranas adsorventes são flexíveis e de fácil manuseamento; as proteínas imobilizadas na membrana encontram-se acessíveis para diferentes ligandos; utiliza pequenas quantidades de reagentes de transferência; é possível obter várias réplicas de um gel; podem armazenar-se os padrões da eletrotransferência durante muito tempo; a proteína transferida pode ser usada para várias análises sucessivas (Kurien *et al.* 2006).

Inicialmente prepararam-se suspensões celulares com aproximadamente 6 milhões de células, tendo-se efetuado uma centrifugação a 1300g, durante 5 minutos. De seguida, procedeu-se a uma lavagem com PBS e realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições referidas anteriormente. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 200µL

de tampão RIPA (tampão de radioimunoprecipitação) suplementado com *Complete Mini* (cOmplete, Mini, Roche, Canadá) e DTT. O conteúdo foi transferido para um microtubo *ependorf*®, procedendo-se a agitação no vórtex. As amostras foram sujeitas a sonicação, com uma amplitude de 15 em três ciclos de 15 segundos cada. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 14000g, durante 10 minutos, a uma temperatura de 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram transferidos para novos microtubos e posteriormente armazenados a -80°C.

Para a quantificação de proteína das amostras utilizou-se o método de BCA (*BCA<sup>TM</sup> protein assay kit* [Pierce, EUA]), de acordo com o protocolo definido pelo fornecedor. Antes da aplicação das amostras na eletroforese, estas foram descongeladas e homogeneizadas por vórtex e desnaturadas a 95°C, num banho seco, durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante (250mM de Tris a pH 7,4, 30% de glicerol, 10% de SDS, 10mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,05% de azul de bromofenol

Para realizar a eletroforese, polimerizaram-se géis de acrilamida a 10%, que foram posteriormente colocados no sistema com o tampão de eletroforese [(25mM de Tris-HCl, 192mM de glicina, 0,1% (v/v) de SDS (Bio-Rad, EUA)], tendo sido aplicadas as amostras e o correspondente padrão de pesos moleculares (Precision Plus Standards, Dual Color, Bio-Rad, EUA). A eletroforese foi realizada durante 30 minutos inicialmente com uma diferença de potencial de 80V e posteriormente com 150V, sendo que no fim da corrida os géis foram colocados em contato com membranas de PVDF (Milipore®, EUA) ativadas com metanol. De seguida, procedeu-se à eletrotransferência com um potencial de 100V, em tampão com 100mM de CAPS, pH 11 (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*) (Sigma, EUA). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas com solução de TBST-BSA a 4% (*Tris-Buffered Saline Tween-20*), à temperatura ambiente. Após uma hora, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário da p53, durante a noite,

com agitação constante e a 4°C. Após esta incubação, realizaram-se lavagens com TBS-T a 1%, tendo-se incubado posteriormente com o anticorpo secundário adequado, durante uma hora, com agitação constante e à temperatura ambiente, período após o qual se repetem as lavagens com TBS-T a 1%. As membranas foram, depois, incubadas com substrato enzimático (*ECF Western Blotting*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

Após esta análise as membranas foram incubadas com o anticorpo contra a actina, utilizada como controlo da quantidade de proteína, efetuando o mesmo procedimento descrito.

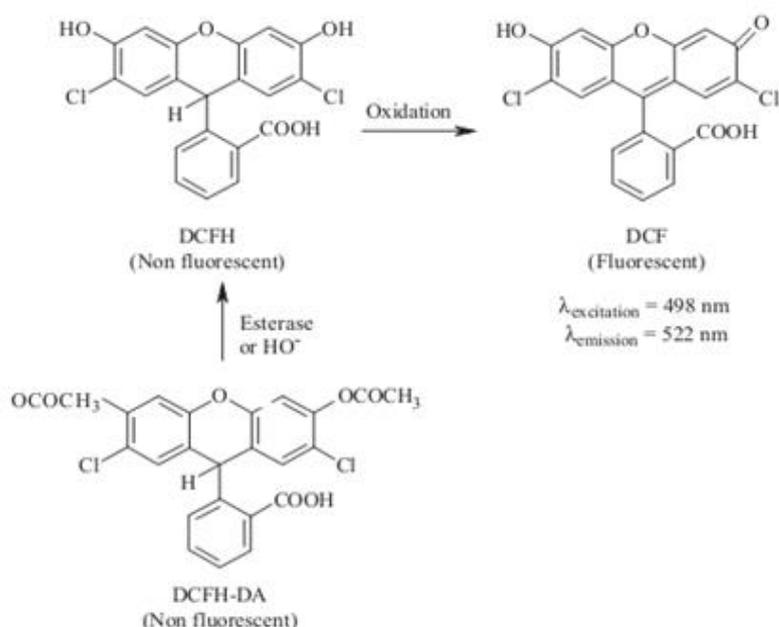
## **5 – Avaliação do stresse oxidativo e das defesas antioxidantes**

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar qual o efeito dos FS e consequente tratamento fotodinâmico no stresse oxidativo. Para isso, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo para a avaliar a produção intracelular de peróxidos, através da marcação com a sonda DFCH<sub>2</sub>-DA (*2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*) e a produção intracelular do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), através da marcação com a sonda DHE (*dihydroethidium*). De modo a avaliar alterações ao nível do potencial de membrana mitocondrial recorreu-se à marcação com a sonda *5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide* (JC-1) De modo a avaliar as defesas antioxidantes, recorreu-se à citometria de fluxo para avaliar a expressão do glutatião reduzido (GSH) utilizando a marcação com o alaranjado de mercúrio e determinou-se a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), utilizando um *kit* específico.

## 5.1 – Avaliação da produção intracelular de peróxidos

A produção intracelular de peróxidos após o tratamento fotodinâmico foi determinada por citometria de fluxo, através da quantificação da oxidação intracelular da sonda 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH<sub>2</sub>-DA, Sigma, EUA). Esta é uma sonda não-fluorescente lipossolúvel que atravessa a membrana celular devido à presença dos grupos acetatos. Estes, no interior da célula, são removidos por esterases, levando à acumulação de DCFH<sub>2</sub> no citosol. Esta molécula é oxidada por peróxidos intracelulares, levando à formação de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) que é altamente fluorescente. Esta reação está descrita na figura 15. Esta sonda emite fluorescência de cor verde com o comprimento de onda de 530nm, quando excitada com um comprimento de onda de 488nm, sendo a intensidade de fluorescência proporcional à concentração intracelular de peróxidos, dos quais se destaca a importância do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Carter *et al.* 1994; O'Malley *et al.* 2004; Brömme *et al.* 2008).

Para esta avaliação, centrifugou-se uma suspensão celular com cerca de 3 milhões de células com 1300g, durante 5min. Ressuspendeu-se o *pellet* em PBS e realizou-se a incubação com DCFH<sub>2</sub>-DA numa concentração de 5µM, dissolvida em dimetilformamida a 1mM, durante 45 minutos, na ausência de luz e a uma temperatura de 37°C (Molecular Probes®, Invitrogen™, país). De seguida, centrifugou-se a suspensão celular a 1300g, durante 5min e ressuspendeu-se o *pellet* em 400µL de solução tampão PBS. A deteção por citometria de fluxo foi realizada usando um comprimento de excitação de 504nm e de emissão de 529nm. Os resultados são apresentados como média das intensidades de fluorescência.



**Figura 15 - Representação esquemática da reação de DCFH a DCF, que permite a detecção de peróxidos intracelulares.** A sonda DCFH<sub>2</sub>-DA é transformada em DCFH por ação de esterases intracelulares. Este intermediário, por oxidação induzida pelos peróxidos, forma DCF (Retirado de Gomes *et al.* 2005).

## 5.2 – Avaliação da produção intracelular do radical superóxido

Recorrendo à técnica de citometria de fluxo, pôde-se avaliar a produção intracelular do radical superóxido, utilizando à sonda dihidroetídeo (DHE, Sigma, EUA). Esta sonda é capaz de atravessar facilmente a bicamada lipídica da membrana celular, sendo que é oxidada pelo radical superóxido a etídeo. Este é um composto que se intercala no DNA e que emite fluorescência de cor vermelha. Esta reação é específica para o radical superóxido, visto que para a oxidação induzida por peróxido de hidrogénio e ácido hipocloroso é mínima (Zhao *et al.* 2003; Tarpey *et al.* 2004; Brandes *et al.* 2005).

Para realizar este procedimento, centrifugou-se uma suspensão celular com cerca de 3 milhões de células a 1300g, durante 5min e ressuspendeu-se o *pellet* em tampão PBS. De seguida, procedeu-se à incubação da suspensão celular com DHE dissolvido em DMSO, numa concentração final de 5 $\mu$ M (Dernbach *et al.* 2004; Laranjo 2010), durante 15 minutos a 37°C, na ausência de luz. Após a incubação, procedeu-se a nova centrifugação, com posterior ressuspensão em 400 $\mu$ L de tampão PBS. A deteção foi efetuada com um comprimento de onda de excitação de 620nm.

### 5.3 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A passagem de eletrões na cadeia respiratória mitocondrial durante a fosforilação oxidativa liberta energia que é armazenada na forma de gradiente protónico. Para além disso, é gerado também um gradiente eletroquímico, denominado por potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Em células viáveis,  $\Delta\Psi_m$  assume valores entre 180-200mV (Bedner *et al.* 1999).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pode ser um método de avaliar morte celular, visto que o decréscimo nos valores de  $\Delta\Psi_m$  é um dos eventos iniciais da apoptose. Estudos indicam que interações entre membros da família de proteínas Bcl-2/Bax que se localizam na membrana mitocondrial e a formação de homo ou heterodímeros parecem desempenhar um papel importante no controlo de  $\Delta\Psi_m$  (Bedner *et al.* 1999).

A sonda 5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) é uma sonda fluorescente capaz de medir especificamente alterações no  $\Delta\Psi_m$  (Bortner *et al.* 1999). O JC-1 é um catião lipofílico com a capacidade de formar agregados

(A) ou monómeros (M), dependendo do estado do potencial de membrana mitocondrial (polarizado *versus* despolarizado). As duas formas de JC-1 emitem fluorescência a comprimentos de onda diferentes. Nas células viáveis, o elevado  $\Delta\Psi_m$  permite a formação de agregados de JC-1, que são detetáveis através de emissão de fluorescência ao comprimento de onda de 585nm (fluorescência vermelha). Quando há diminuição do potencial de membrana mitocondrial, ou despolarização da célula, JC-1 é extrusado da mitocôndria na forma de monómeros, o que pode ser identificado por emissão de fluorescência a um comprimento de onda de 525nm (fluorescência verde). Deste modo, a razão entre a fluorescência emitida pelo JC-1 na forma de monómeros e a fluorescência emitida na forma de agregados (M/A), determinada por citometria de fluxo, é indicativo de uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (Bortner et al. 1999; Salvioli et al. 1997; Bedner et al. 1999; Wagner et al. 2003).

Para a realização deste procedimento, centrifugou-se uma suspensão celular com cerca de 3 milhões de células a 1300g, durante 5 minutos, ressuspendendo-se o *pellet* em tampão PBS. De seguida, as células foram incubadas com 1  $\mu$ L de JC-1 a partir de uma solução com concentração de 5mg/mL, (Molecular Probes®, Invitrogen™) ao abrigo da luz, a uma temperatura de 37°C, durante 15 minutos (Laranjo 2010). A deteção foi efetuada utilizando a um comprimento de onda de excitação de 490nm (Wagner *et al.* 2003). Os resultados obtidos devem ser apresentados como a média de intensidade de fluorescência (MIF), tanto para a forma de monómeros, bem como para a forma de agregados, calculando-se posteriormente a razão M/A.

#### 5.4 – Avaliação da expressão do glutatião reduzido

O glutatião reduzido (GSH) é um nucleófilo forte e confere proteção às células contra danos advindos de radicais livres, oxidantes e eletrófilos. A modulação das concentrações de GSH pode influenciar a sensibilidade das células à radioterapia, bem como o efeito citotóxico de diferentes agentes quimioterapêuticos (Rice *et al.* 1986). Em 1975, foi desenvolvido um método rápido e simples para marcação de GSH, de modo a evitar o recurso a métodos de citometria de fluxo que envolvessem a utilização de luz ultravioleta (UV). Este novo método baseia-se no uso de um composto denominado alaranjado de mercúrio. Este composto liga-se aos grupos sulfidril das proteínas, sendo que a sua cinética de ligação ao GSH é superior à da sua ligação aos grupos sulfidril referidos anteriormente (O'Connor *et al.* 1988). Assim sendo, para a deteção de GSH, centrifugou-se uma suspensão celular com aproximadamente 3 milhões de células a 1300g, durante 5min, tendo-se ressuspensão o *pellet* em 1ml de tampão PBS. De seguida, adicionou-se alaranjado de mercúrio (Sigma, EUA) a uma concentração de 40 $\mu$ M, incubando-se a 37°C, na ausência de luz, durante 15min. Após a marcação, as células foram novamente centrifugadas a 1300g, durante 5min e ressuspendeu-se o *pellet* em 400 $\mu$ L de PBS. A deteção foi efetuada com o comprimento de onda de excitação de 620nm.

#### 5.5 – Determinação da atividade da superóxido dismutase

Como foi referido anteriormente, a terapia fotodinâmica pode levar a morte celular por induzir elevados níveis de espécies reativas de oxigénio, sendo que esse aumento pode ser devido por atividade alterada das enzimas responsáveis pela diminuição das ROS quando estas atingem níveis tóxicos para as células. No que diz respeito à enzima superóxido

dismutase (SOD), esta converte o radical superóxido em oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio. Existem três tipos de SOD, que se encontram altamente compartmentalizadas: a SOD contendo manganésio no seu centro ativo que se localiza na mitocôndria; a SOD contendo cobre e zinco no local ativo que se encontra no citoplasma e no núcleo e, por último, existe igualmente SOD extracelular (Weydert *et al.* 2010).

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a atividade da SOD, de modo a verificar se as alterações ao nível da produção intracelular do radical superóxido se deviam a uma atividade alterada desta enzima. Existe diversos métodos para a determinação da atividade da SOD, tanto diretos como indiretos. Neste trabalho, para a determinação da atividade da superóxido dismutase utilizou-se um *kit* que consistiu na utilização de uma sonda altamente solúvel em água, a WTS-1 (*2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt*). A taxa de redução com oxigénio molecular está linearmente relacionada com a atividade da xantina oxidase e é inibida pela SOD. Este método permite determinar a atividade da SOD através de um método colorimétrico, analisando-se a absorvância com o comprimento de onda de 440nm, que é proporcional à quantidade de radical superóxido (SOD determination Kit, Fluka Analytical®, Suíça).

## 6. Análise estatística

O tratamento estatístico foi efetuado recorrendo ao *software* IBM SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) Statistics versão 20. Na análise descritiva dos resultados quantitativos obtidos foi realizada com recurso a medidas de tendência central (média), de

localização (mediana) e de dispersão (desvio-padrão e amplitude inter-quartil), de acordo com a distribuição estatística dos valores observados.

Na análise estatística inferencial, a normalidade das distribuição dos valores foi avaliada com recurso aos testes de Shapiro-Wilk (quando  $n < 30$ ) e de Kolmogor-Smirnov (em caso contrário). Na comparação das condições experimentais com o controlo no que diz respeito à análise dos resultados relativos ao conteúdo proteico, stresse oxidativo, defesas antioxidantes, potencial de membrana mitocondrial e expressão da proteína p53, foi utilizado o teste t de Student para uma média, obtendo-se a comparação de cada condição com o valor dos controlos, aos quais as medições foram normalizadas. Foi utilizada a correção de Bonferroni nas comparações realizadas.

Na avaliação da viabilidade celular, alterações do ciclo celular e danos no DNA as diferentes condições foram comparadas utilizando o teste ANOVA (Analysis of Variance) de um fator no caso de existir normalidade da distribuição subjacente e homogeneidade de variâncias, avaliada pelo teste de Levene, ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis no caso contrário. As comparações múltiplas foram realizadas com correção de Bonferroni.

No que diz respeito à avaliação da viabilidade celular pelo método de azul de tripano e na avaliação da captação celular, as comparações entre as duas condições avaliadas foram realizadas utilizando o teste paramétrico t de Student para amostras independentes ou o teste não paramétrico correspondente de Mann-Whitney, dependendo da normalidade da distribuição subjacente.

Na análise de proliferação celular segundo o método de MTT e *alamar blue*, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo sigmoidal de dose – resposta utilizando o *software* OriginLab v. 8.0:

$$Proliferação (\%) = \frac{100}{1 + 10^{p \cdot (\log x_0 - x)}}$$

onde  $x_0$  corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50% (IC<sub>50</sub>). A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas para o mesmo tempo de incubação foi realizada segundo o teste ANOVA de um fator, com comparações múltiplas de acordo com a correção de Bonferroni. A comparação entre os dois tempos de incubação estudados para cada linha celular foi realizada com recurso ao teste t de Student para amostras independentes.



## **IV – Resultados<sup>1</sup>**

---

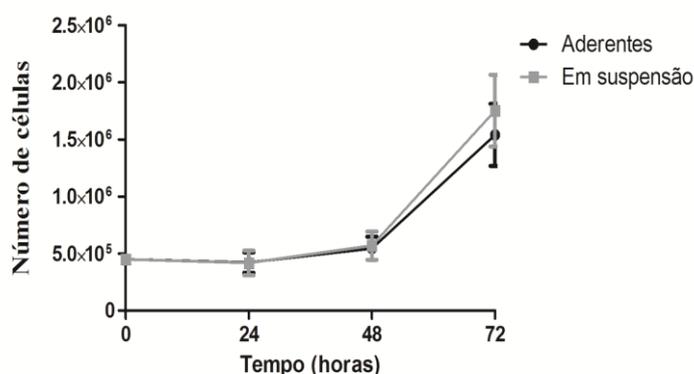
<sup>1</sup> Os resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos em co-autoria com a Mestre Mafalda Laranjo.



Os métodos descritos no capítulo anterior foram utilizados com o intuito de avaliar o potencial de quatro compostos fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica no retinoblastoma, com o objetivo de avaliar os seus efeitos citotóxicos, bem como avaliar os seus efeitos ao nível da produção de espécies reativas de oxigénio.

## 1 – Determinação da viabilidade celular pelo método de azul de tripano

De modo a ser possível realizar o tratamento fotodinâmico na linha Y79 foi induzido o crescimento das células da linha Y79 em cultura aderente, através da utilização de revestimento das placas multipoço com poli-D-lisina. De modo a validar este processo comparam-se culturas celulares mantidas em suspensão com culturas nas quais a adesão foi induzida pelo revestimento com poli-D-lisina, em termos de viabilidade e crescimento celular. Assim, na figura 16 encontram-se representadas as curvas de crescimento obtidas pelo método de exclusão do azul de tripano para as culturas celulares aderentes e em suspensão.

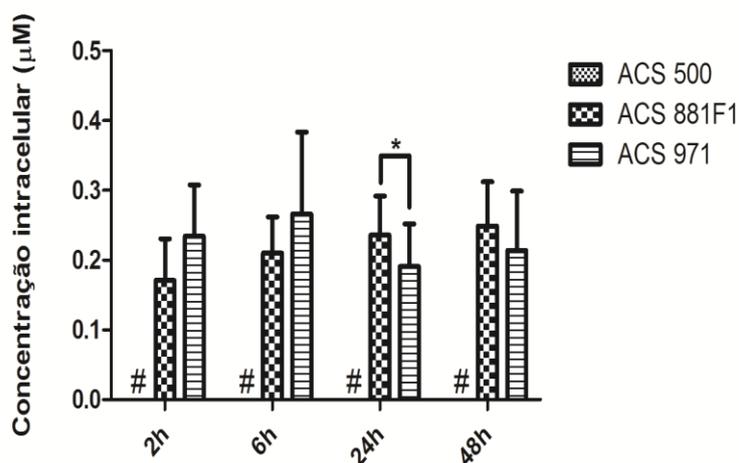


**Figura 16 – Comparação do crescimento da linha celular Y79 em cultura aderente e cultura em suspensão.** Avaliação do número de células pelo método de exclusão do azul de tripano. Os resultados representados correspondem à média e ao desvio padrão de n=8.

Comprovou-se que não existem diferenças significativas na curva de crescimento da linha celular humana de retinoblastoma Y79 quando cultivadas em cultura aderente ou em suspensão ao longo do período de tempo considerado.

## 2 – Estudos de captação

O gráfico da figura 17 apresenta os resultados referentes à captação celular dos três fotossensibilizadores, ACS500, ACS 881F1 e ACS971 pela linha celular Y79. Em relação ao FS ACS500, a sua captação deverá ser inferior ao limite de detecção do fluorímetro utilizado neste estudo, que corresponde a cerca de  $0,07\mu\text{M}$ , resultado assinalado por # no gráfico da figura 17.



**Figura 17 – Captação celular dos fotossensibilizadores nas células Y79.** Os resultados encontram-se expressos como a média e o desvio padrão de  $n \geq 5$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo encontram-se assinaladas com \*, tendo-se considerado um nível de significância de 0,05. O símbolo # indica captação não detetável, verificado com o ACS 500.

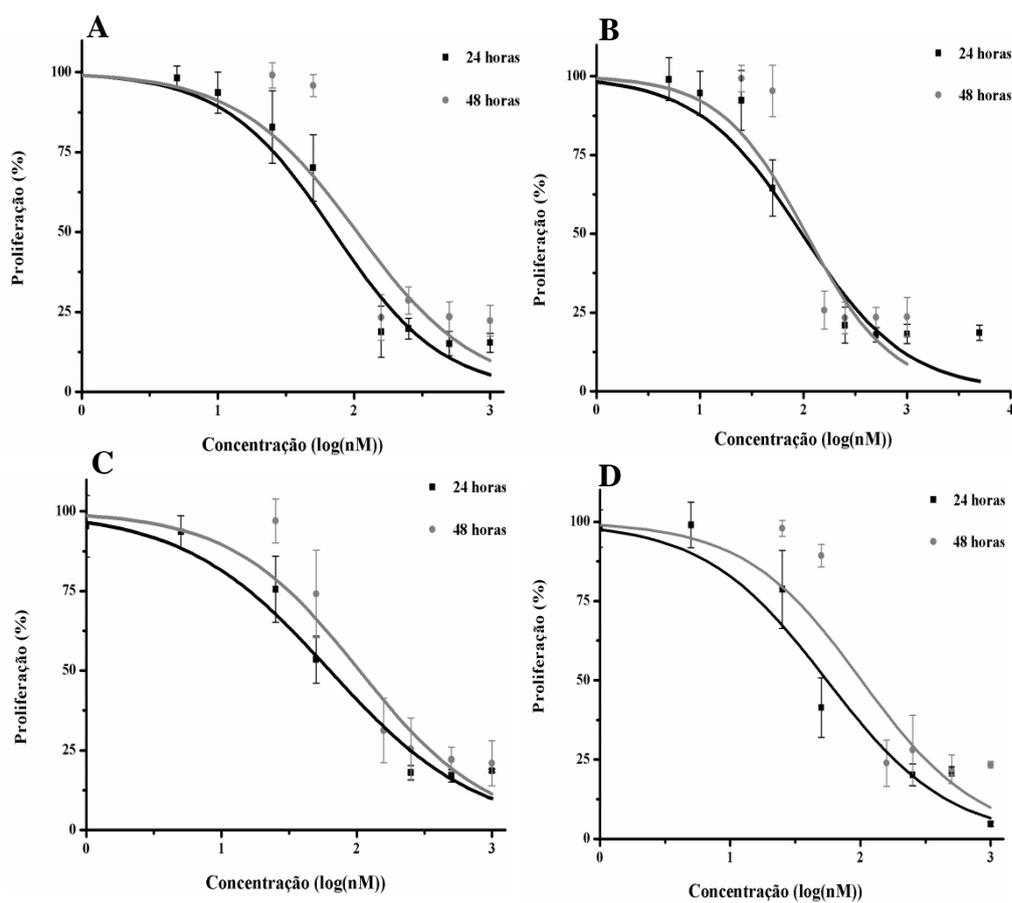
As células da linha Y79 apresentaram uma concentração intracelular do FS ACS 881F1 de  $0,17\pm 0,06\mu\text{M}$  duas horas após incubação,  $0,20\pm 0,05\mu\text{M}$  após 6h,  $0,24\pm 0,06\mu\text{M}$  24h após a incubação e  $0,25\pm 0,06\mu\text{M}$  48h após a incubação, não se verificando alterações significativas ao longo do tempo ( $p>0,05$ ), existindo, contudo, uma tendência para o seu aumento. No que diz respeito à captação do FS ACS 971, a concentração celular determinada após 2h de incubação foi de  $0,23\pm 0,07\mu\text{M}$ ,  $0,27\pm 0,10\mu\text{M}$  após 6h de incubação,  $0,19\pm 0,06\mu\text{M}$  após 24h de incubação e  $0,21\pm 0,08\mu\text{M}$  após 48h de incubação, não existindo diferenças significativas entre as concentrações intracelulares determinadas nos diferentes tempos considerados ( $p>0,05$ ). No que diz respeito às concentrações intracelulares observadas com os dois FS, verificamos que a captação do FS ACS881F1 é significativamente superior à captação do FC ACS971 24h após o início da incubação com os FS ( $p=0,030$ ).

### **3 – Estudos de citotoxicidade**

De modo a avaliar o efeito do tratamento fotodinâmico com base nos FS escolhidos nas culturas celulares de retinoblastoma realizaram-se ensaios de citotoxicidade. Assim, realizou-se o ensaio de *alamar blue* e o ensaio de MTT, que avaliam a viabilidade de forma indireta através de reações metabólicas e, posteriormente, avaliou-se a viabilidade celular recorrendo ao ensaio de sulforrodamina B (SRB), que avalia a biomassa proteica.

### 3.1 - Ensaio de *alamar blue*

Como referido anteriormente, recorreu-se ao ensaio de *alamar blue* para avaliar os efeitos dos FS estudados na citotoxicidade. Na figura 18 encontram-se representadas as curvas de dose resposta ao tratamento fotodinâmico com os quatro FS considerados neste trabalho, ACS 500 (figura 18A), ACS 881F1 (figura 18B), ACS 971 (figura 18C) e ACS 1102 (figura 18).



**Figura 18 – Curvas de dose resposta das células de retinoblastoma Y79 ao tratamento fotodinâmico.** Os resultados foram obtidos pelo ensaio *alamar blue* após 24h e 48h do tratamento fotodinâmico com (A) ACS 500, (B) ACS 881F1, (C) ACS 971 e (D) ACS 1102. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média e ao desvio padrão de  $n \geq 5$  para cada ponto experimental.

Através da análise destas curvas verificou-se que a resposta após o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores é dependente da concentração à qual as células foram submetidas e do tempo de incubação. Na **Tabela 4** encontram-se sistematizados os valores de IC50 dos diferentes compostos para as 24h e as 48h. Podemos verificar que, para o composto ACS 500, às 24h se obteve um valor de IC50 de 70,8nM, enquanto para o ACS 881F1 se obteve o valor de 96,64nM. No que diz respeito aos FS ACS 971 e ACS 1102, os valores de IC50 determinados pelo ensaio de *alamar blue* foram de 63,30nM e de 55,22nM, respetivamente. Após 48h, verifica-se uma tendência para o aumento nos valores de IC50 para os quatro FS considerados, nomeadamente, 105,05nM, 105,95nM, 104,89nM e 101,84nM para os compostos ACS 500, ACS 881F1, ACS 971 e ACS 1102, respetivamente. No entanto, não existem diferenças significativas entre os dois tempos considerados para nenhum dos FS estudados ( $p>0,05$ ).

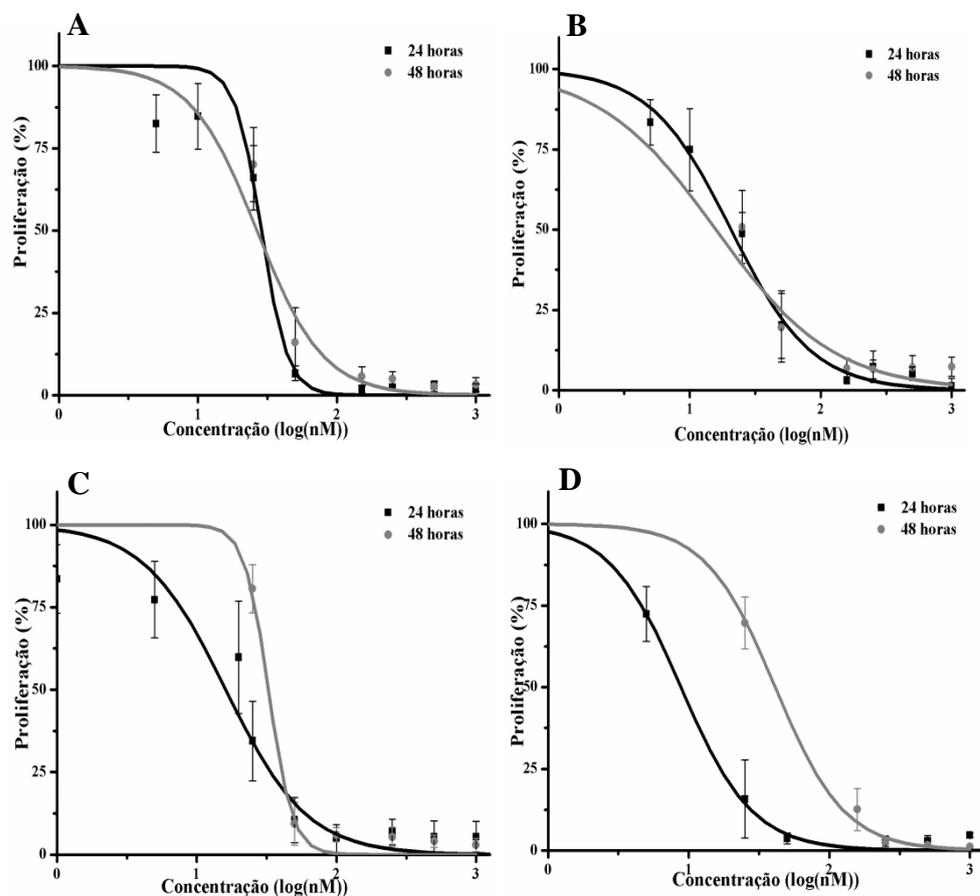
**Tabela 4 – Valores de IC50, determinado pelo ensaio de *alamar blue*, dos FS ACS500, ACS 881F1, ACS 971 e ACS 1102 na linha de retinoblastoma humano Y79 após 24h e 48h do tratamento fotodinâmico.** Os resultados do IC50 e respetivo intervalo de confiança a 95% estão expressos em nM. Para o cálculo do IC50 foram utilizados  $n \geq 5$ . O  $r^2$  das curvas de dose-resposta ajustadas aos pontos experimentais com assíntotas fixas em 0 e 100, a partir das quais se calcularam os IC50 é igual ou superior a 0,90 para as 24horas e igual ou superior a 80 para as 48horas.

	ACS 500	ACS 881F1	ACS 971	ACS 1102
<b>24h</b>	70,8nM [41,35; 121,25]	96,64nM [46,34; 201,53]	63,30nM [34,37; 116,59]	55,22nM [32,23; 94,598]
<b>48h</b>	105,05nM [40,79; 270,52]	105,95nM [45,68; 245,79]	104,89nM [57,70; 190,68]	101,84nM [43,59; 237,97]

Na comparação entre os quatro FS também não foi possível observar diferenças significativas entre a resposta induzida pelo tratamento fotodinâmico ( $p>0,05$ ).

### 3.2 - Ensaio de MTT

Na figura 19, encontram-se representadas as curvas de dose resposta com o tratamento fotodinâmico, para os compostos ACS 500 (figura 19A), ACS 881F1 (figura 19B), ACS 971 (figura 19C) e ACS 1102 (figura 19D), determinadas com o ensaio de MTT. Confirmou-se que a resposta ao tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados é dependente da concentração de FS à qual as células são submetidas, bem como dependente do tempo de incubação. Na **Tabela 5** encontram-se esquematizados os valores de IC50 dos diferentes FS para os tempos considerados.



**Figura 19 – Curvas de dose resposta das células de retinoblastoma Y79 ao tratamento fotodinâmico obtidas com o ensaio de MTT.** Curvas de dose resposta ao tratamento fotodinâmico após 24 e 48h com (A) ACS 500, (B) ACS 881F1, (C) ACS 971 e (D) ACS 1102. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média e ao desvio padrão de  $n \geq 5$  para cada ponto experimental.

Podemos verificar que, para o composto ACS 500, às 24h se obteve um valor de IC50 de 28,67nM, enquanto para o ACS 881F1 se obteve o valor de 20,65nM. No que diz respeito aos FS ACS 971 e ACS 1102, os valores de IC50 determinados pelo ensaio de *alamar blue* foram de 16,13nM e de 8,80nM, respectivamente. Já 48h após o tratamento, valores de IC50 determinados foram de 26,6nM, 15,84nM, 32,60nM e 41,25nM para os compostos ACS 500, ACS 881F1, ACS 971 e ACS 1102, respectivamente. Verificou-se que existem diferenças significativas entre a resposta ao tratamento fotodinâmico após 24h e após 48h no tratamento com os FS ACS 971 ( $p=0,020$ ) e ACS 1102 ( $p<0,001$ ), sendo que para os restantes compostos não se observaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ).

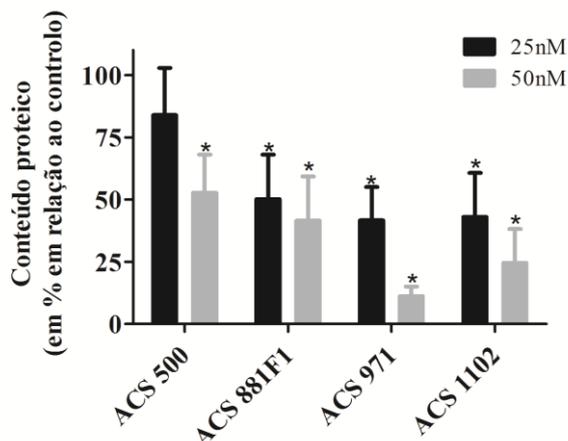
**Tabela 5 – Valores de IC50, determinado pelo ensaio de MTT, dos FS ACS500, ACS 881F1, ACS 971 e ACS 1102 na linha de retinoblastoma humano Y79 após 24h e 48h do tratamento fotodinâmico.** Os resultados do IC50 e respetivo intervalo de confiança a 95% estão expressos em nM. Para o cálculo do IC50 foram utilizados  $n \geq 5$ . O  $r^2$  das curvas de dose-resposta ajustadas aos pontos experimentais com assíptotas fixas em 0 e 100, a partir das quais se calcularam os IC50 é igual ou superior a 0,90. O símbolo \* indica diferenças significativas nos valores de IC50 entre 24h e 48h para cada fotossensibilizador. O símbolo # indica diferenças significativas entre os valores de IC50 dos fotossensibilizadores para o mesmo tempo de incubação considerado.

	ACS 500	ACS 881F1	ACS 971	ACS 1102
<b>24h</b>	28,67nM [23,04; 35,68] #	20,65nM [14,81; 28,79]	16,13nM [9,19; 28,31] *	8,80nM [4,88; 15,88] * #
<b>48h</b>	26,6nM [15,23; 46,46]	15,84nM [6,17; 40,67]	32,60nM [24,60; 43,20] *	41,25nM [29,79; 57,12] *

Comparando FS verificou-se que existem diferenças significativas na resposta ao tratamento fotodinâmico com os fotossensibilizadores ACS 500 e ACS 1102 às 24h após irradiação ( $p=0,010$ ).

### 3.3 - Ensaio de sulforrodamina B

Para a realização do estudo de viabilidade, tendo em conta o conteúdo proteico, recorreu-se ao ensaio de sulforrodamina B. Os resultados encontram-se apresentados na figura 20.



**Figura 20 – Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de sulforrodamina B 24 horas após o tratamento fotodinâmico com os FS ACS 500, ACS 881F1, ACS 971 e ACS 1102, nas concentrações de 25nM e de 50nM.** Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação às culturas controlo, que foram ajustadas a 100%, expressando a média e desvio padrão de  $n \geq 6$ . As diferenças significativas em relação ao controlo encontram-se assinaladas com \*, tendo-se considerado um nível de significância de 0,05.

Através da análise do gráfico da figura 20, podemos verificar que existe um decréscimo significativo no conteúdo proteico após o tratamento fotodinâmico com 50nM de ACS 500 ( $p=0,001$ ), 25nM e 50nM do FS ACS 881F1 ( $p=0,001$  e  $p=0,004$  respetivamente), 25nM e 50nM de ACS 971 ( $p<0,001$ ). Verificou-se igualmente um decréscimo significativo quando as células foram sujeitas a tratamento com 25nM do FS ACS 1102 ( $p=0,001$ ) e com 50nM do mesmo FS ( $p<0,001$ ), comparativamente às culturas celulares controlo não tratadas. Assim, verificou-se que de um modo geral o tratamento

fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores induz diminuição da biomassa celular e, portanto, abaixamento da viabilidade.

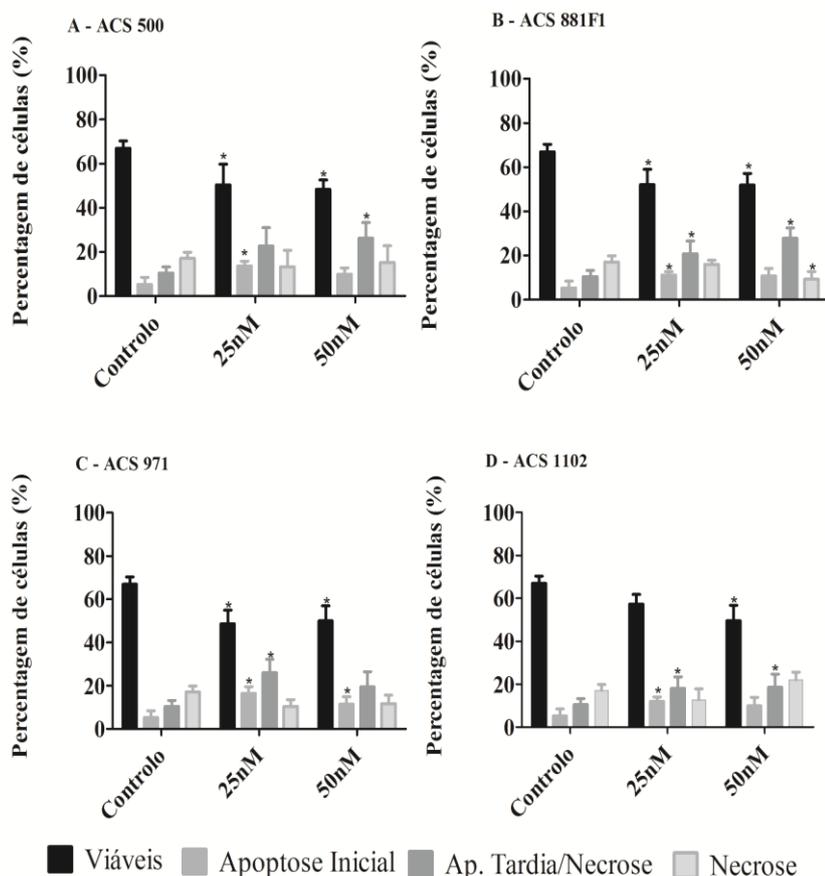
#### **4 - Avaliação dos efeitos celulares**

Após verificar que o tratamento fotodinâmico influencia a viabilidade celular, pretendeu-se avaliar as vias de morte celulares envolvidas assim como os efeitos no ciclo celular, no DNA e na expressão da proteína p53.

##### **4.1 – Vias de morte celular**

A avaliação da viabilidade e das vias de morte celular permitiu obter os resultados apresentados na figura 21.

Podemos observar um decréscimo significativo do número de células viáveis após o tratamento fotodinâmico com 25nM e com 50nM do FS ACS 500 ( $p=0,006$  e  $p=0,001$ , respetivamente), com 25nM e 50nM do composto ACS 881F1 ( $p=0,003$  e  $p=0,023$ ), com 25nM e 50nM de ACS 971 ( $p=0,001$  e  $p=0,005$ ) e após o tratamento com 50nM do FS ACS 1102, não se verificando diferenças significativas com o tratamento com 25nM deste composto ( $p=0,624$ ), comparativamente às culturas celulares controlo. No que diz respeito à população de células em apoptose inicial, verificou-se um aumento significativo desta após o tratamento fotodinâmico com 25nM do FS ACS 500 ( $p=0,001$ ), 25nM de ACS 881F1 ( $p=0,006$ ), 25nM e 50nM do composto ACS 971 ( $p<0,001$  e  $p=0,032$ , respetivamente) e com 25nM de ACS 1102 ( $p=0,006$ ), comparativamente ao controlo.



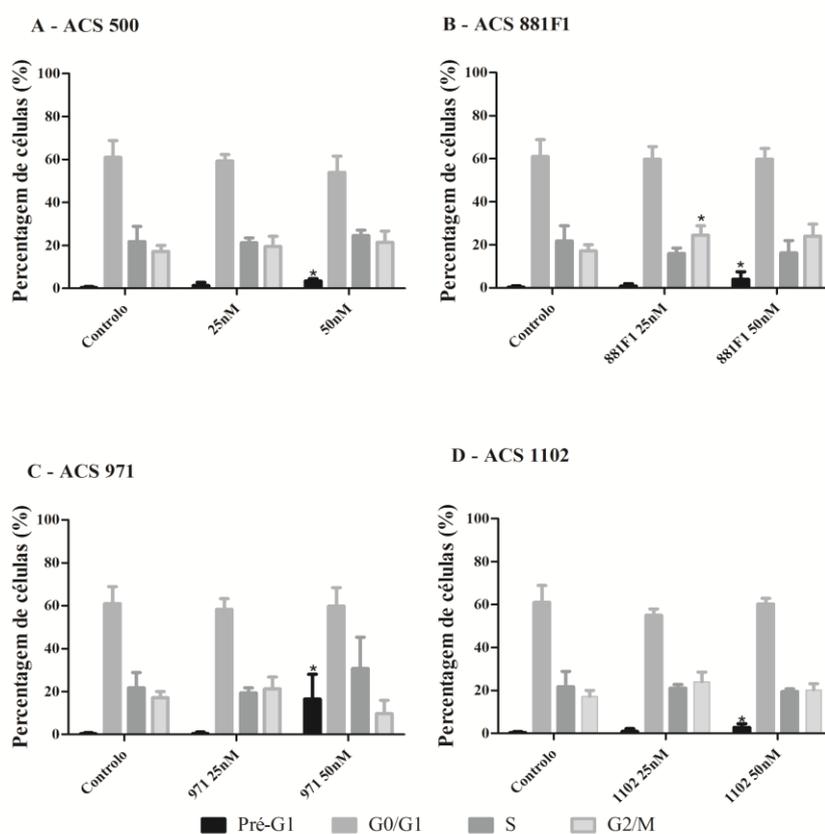
**Figura 21 – Viabilidade e vias de morte celular.** Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo através da dupla marcação com AnV/IP 24h horas após o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores: (A) ACS 500; (B) ACS 881F1; (C) ACS 971 e (D) ACS 1102. Os resultados encontram-se expressos como a percentagem de células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e necrose. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo encontram-se assinaladas com \*, tendo-se considerado um nível de significância de 0,05. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão de  $n \geq 6$ .

Foi ainda possível observar um aumento significativo do número de células em apoptose tardia/necrose após o tratamento fotodinâmico com 50nM do FS ACS 500 ( $p=0,001$ ), 25nM e 50nM de ACS 881F1 ( $p=0,005$  e  $p<0,001$ , respetivamente), com 25nM do FS ACS 971 ( $p<0,001$ ) e com 25nM e 50nM do composto ACS 1102 ( $p=0,042$  e  $p=0,039$ ), comparativamente às culturas celulares controlo. No que diz respeito à população de células em necrose, esta apenas sofreu um aumento significativo após o

tratamento com 50nM do fotossensibilizador ACS 881F1 ( $p=0,027$ ), comparativamente ao controlo. Assim, verificou-se que após o tratamento fotodinâmico com os FS nas concentrações estudadas a principal via de morte celular ativada é a apoptose.

## 4.2 – Avaliação do ciclo celular

Neste trabalho, procedeu-se à avaliação do ciclo celular e na figura 22, encontram-se representados os resultados, expressos como a percentagem de células existentes em cada uma das fases dos ciclos celular G0/G1, S e G2/M.



**Figura 22 – Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, com recurso à marcação com iodeto de propídeo.** Os resultados estão representados como a percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular: (A) ACS 500; (B) ACS 881F1; (C) ACS971; (D) ACS1102. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo encontram-se assinaladas com \*, tendo-se considerado um nível de significância de 0,05. Os resultados expressão a média e o desvio padrão  $n \geq 6$ .

Verificou-se o aparecimento de um pico significativo correspondente a fase pré-G1 após o tratamento fotodinâmico com a concentração de 50nM dos fotossensibilizadores ACS 500 ( $p=0,040$ ), ACS 881F1 ( $p=0,024$ ), ACS 971 ( $p=0,004$ ) e ACS 1102 ( $p=0,048$ ). Observou-se também que o tratamento fotodinâmico com todos os FS não induziu diferenças significativas no número de células presentes na fase G0/G1 ou na fase S do ciclo celular, comparativamente às culturas celulares controle não tratadas ( $p>0,05$ ). No que diz respeito ao número de células na fase G2/M, apenas se verificou um aumento significativo após o tratamento fotodinâmico com 25nM do fotossensibilizador ACS 881F1 ( $p=0,032$ ), comparativamente ao controle, sendo que os restantes tratamentos não induziram qualquer alteração significativa ( $p>0,05$ ).

#### **4.3 – Avaliação de danos no DNA pelo ensaio cometa**

De modo a avaliar os efeitos do tratamento fotodinâmico ao nível de danos no DNA, recorreu-se ao ensaio cometa, tendo-se analisado os parâmetros tamanho de cauda, percentagem de DNA na cauda e momento de cauda. Os resultados obtidos permitiram verificar que a população de células sujeitas ao tratamento fotodinâmico apresentam uma distribuição fora da normalidade destes parâmetros, existindo um grande número de células que não sofreram danos no DNA. A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos relativos ao tamanho da cauda, percentagem de DNA na cauda e momento de cauda após o tratamento fotodinâmico, estando representados os valores das medianas e das amplitudes interquartis para cada parâmetro de cada condição.

**Tabela 6 – Valores de mediana e amplitude interquartil (AIQ) dos parâmetros tamanho da cauda, percentagem de DNA na cauda e momento de cauda após tratamento fotodinâmico.**

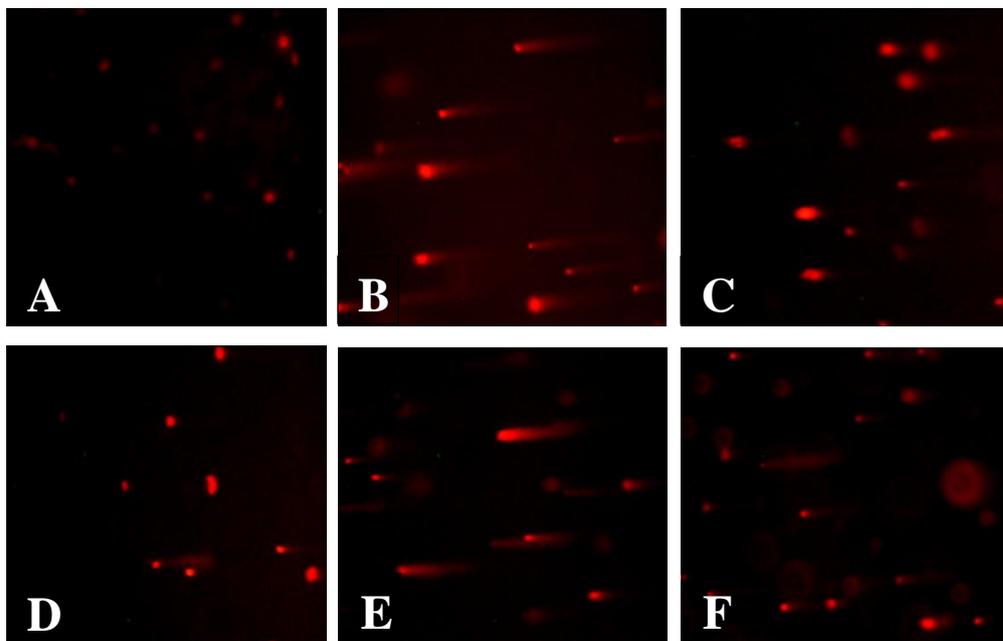
	Tamanho da cauda		Percentagem de DNA na cauda		Momento de Cauda	
	Mediana	AIQ	Mediana	AIQ	Mediana	AIQ
<b>Controlo</b>	2	7	2,444	6,525	0,026	0,455
<b>ACS500</b>	3	7	1,998	7,771	0,014	0,4375
<b>ACS881F1</b>	4	5	3,312	10,543	0,022	0,422
<b>ACS971</b>	6	23	8,727	16,466	0,377	3,926
<b>ACS1102</b>	7	20,5	7,673	15,968	0,492	3,3835

No que diz respeito ao tamanho da cauda, não se observaram diferenças significativas após o tratamento com 50nM do FS ACS 500 e com 50nM do FS ACS 881F1 ( $p>0,05$ ), comparativamente ao controlo de células não tratadas. Por outro lado, foi possível verificar diferenças significativas no tamanho de cauda após o tratamento com 50nM de ACS 971 ( $p<0,001$ ) e 50nM do FS ACS 1102 ( $p<0,001$ ).

Quanto ao parâmetro de percentagem de DNA presente na cauda, não se observaram diferenças significativas após o tratamento com 50nM do FS ACS 500 e com 50nM do FS 881F1 ( $p>0,05$ ), comparativamente ao controlo de células não tratadas. Por outro lado, foi possível verificar diferenças significativas no tamanho de cauda após o tratamento com 50nM de ACS 971 e 50nM de ACS 1102 ( $p<0,001$ ).

Por último, foi também avaliado o momento de cauda, não se observaram diferenças significativas após o tratamento com 50nM do FS ACS 500 e com 50nM do FS ACS881F1 ( $p>0,05$ ), comparativamente ao controlo de células não. Por outro lado, foi possível verificar diferenças significativas no tamanho de cauda após o tratamento com 50nM de ACS 971 e 50nM de ACS ( $p<0,001$ ).

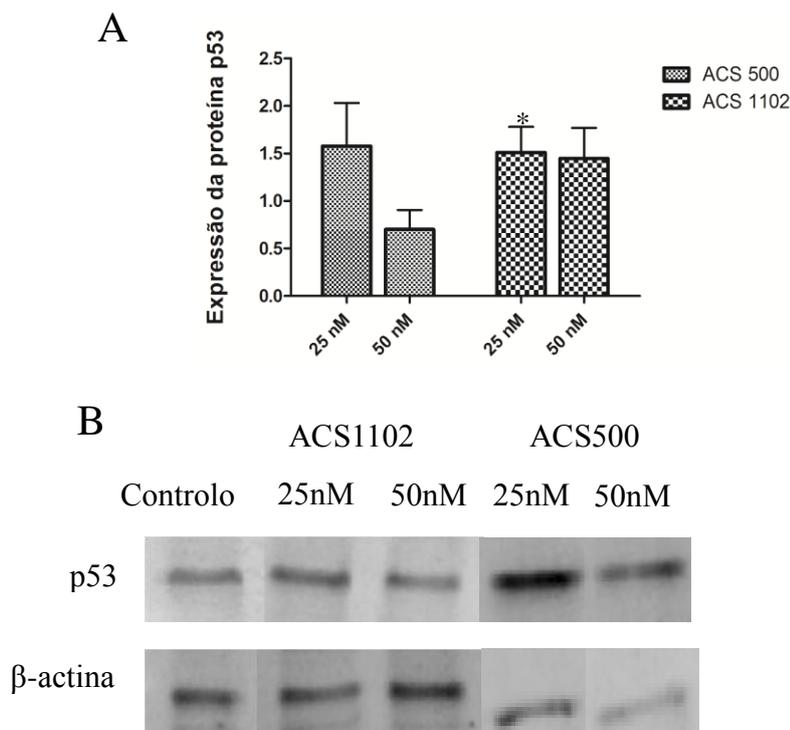
A figura 23 apresenta imagens ilustrativas dos ensaios cometas obtidos com o tratamento fotodinâmico.



**Figura 23 – Avaliação de danos no DNA pelo ensaio cometa.** A figura apresenta imagens ilustrativas dos cometas obtidos no (A) controlo de células não tratadas, (B) controlo positivo com peróxido de hidrogénio, (C) 50nM do FS ACS 500, (D) 50nM do FS ACS 881F1, (E) 50nM do FS ACS971 e (F) 50nM do FS ACS1102, obtidas com ampliação 100X.

#### 4.4 – Expressão da proteína p53

Neste trabalho foi avaliada a expressão da proteína p53 após o tratamento fotodinâmico com os FS ACS 500 e ACS 1102. Os resultados obtidos por *western blot* estão representados na figura 24.



**Figura 24 – Avaliação da expressão da proteína p53 por *western blot*.** (A) o gráfico representa a expressão da proteína p53 sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de p53 e a intensidade de fluorescência da actina, normalizada em relação ao controlo (razão de intensidade do controlo igual a 1), apresentando a média e desvio padrão de  $n \geq 4$ . (B) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína p53 e da actina para cada uma das condições experimentais.

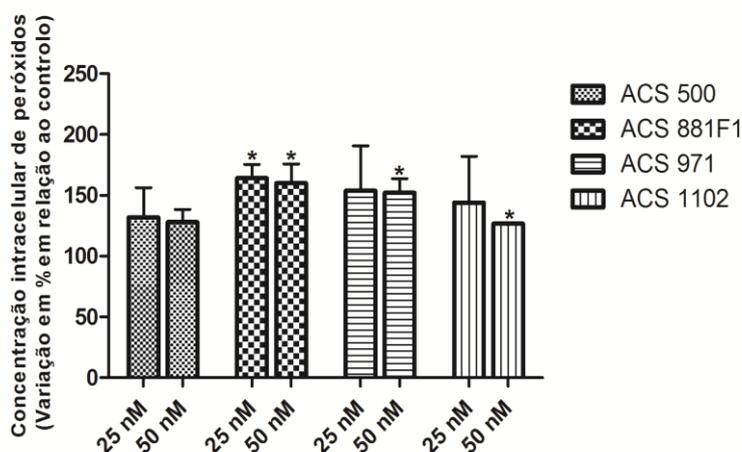
Através da análise do gráfico da figura 24 (A), podemos observar um aumento da expressão da proteína p53 após o tratamento fotodinâmico com o FS ACS 1102, com a concentração de 25nM ( $p=0,022$ ), comparativamente ao controlo. Para as restantes condições, não se verificaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ), existindo, contudo, uma tendência para o seu aumento com exceção do tratamento com 50nM de ACS 500, comparativamente ao controlo. Na figura 23 B, encontra-se representado um *imunoblot* ilustrativo da expressão de p53 e de actina, para cada uma das condições.

## 5 - Stresse oxidativo e defesas antioxidantes

Neste trabalho foram avaliados os efeitos do tratamento fotodinâmico ao nível do stresse oxidativo e das defesas antioxidantes. Para a avaliação dos efeitos no stresse oxidativo avaliou-se a produção intracelular de peróxidos e do radical superóxido por citometria de fluxo. No que diz respeito aos efeitos nas defesas antioxidantes, avaliou-se a expressão do glutatião reduzido por citometria de fluxo e a expressão da enzima superóxido dismutase.

### 5.1 - Produção intracelular de peróxidos

Neste trabalho avaliaram-se os níveis intracelulares de peróxidos, recorrendo à sonda DCFH<sub>2</sub>-DA. Os resultados apresentados no gráfico da figura 25 referem-se às MIF dos tratamentos fotodinâmicos com os diferentes fotossensibilizadores, normalizados em relação ao controlo, considerado como 100%.

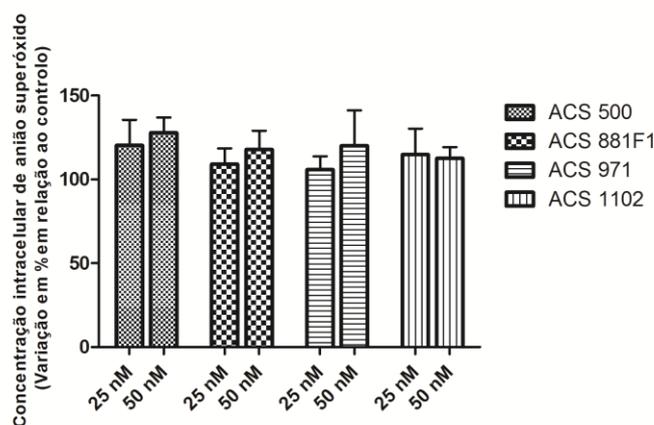


**Figura 25 – Avaliação dos níveis intracelulares de peróxidos por citometria de fluxo, através da marcação com a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA.** Os resultados são expressos como % em relação ao controlo. Os resultados apresentam a média e desvio padrão de  $n \geq 4$ . As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo encontram-se assinaladas com \*, tendo-se considerado um nível de significância de 0,05.

Através da análise do gráfico anterior, podemos verificar um aumento significativo dos níveis intracelulares de peróxidos após o tratamento fotodinâmico com 25nM e com 50nM do FS ACS 881F1 ( $p=0,002$  e  $p=0,040$ , respetivamente) e com 50nM dos FS ACS 971 ( $p=0,016$ ) e ACS 1102 ( $p<0,001$ ), comparativamente às culturas celulares controlo não tratadas. De referir que os restantes tratamentos fotodinâmicos estudados não induziram qualquer tipo de alteração significativa ( $p>0,05$ ) comparativamente ao controlo.

## 5.2 - Avaliação da produção intracelular do radical superóxido

De modo a avaliar a produção intracelular do anião superóxido, utilizou-se a marcação por citometria de fluxo com a sonda DHE.

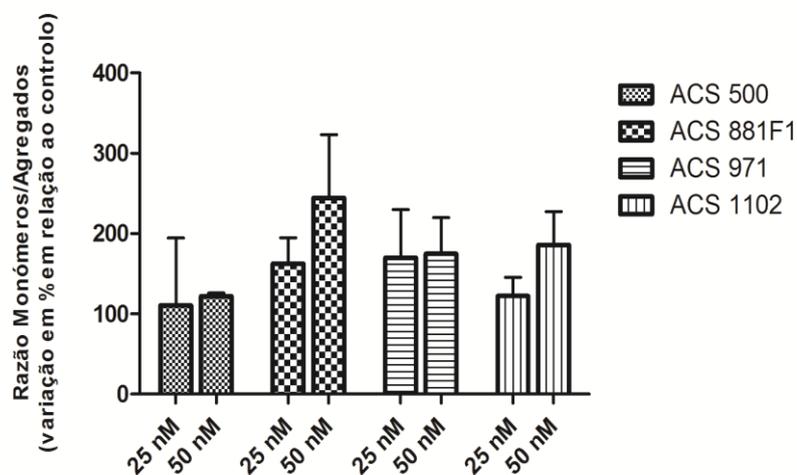


**Figura 26 – Avaliação dos níveis intracelulares de anião superóxido por citometria de fluxo, através da marcação com a sonda DHE** Os resultados são expressos como % em relação ao controlo. Os resultados apresentam a média e desvio padrão de  $n \geq 4$ .

Através da análise do gráfico da figura 26, podemos observar que o tratamento fotodinâmico com os diferentes fotossensibilizadores não induz alterações significativas nos níveis intracelulares de anião superóxido comparativamente ao controlo, com nenhuma das duas concentrações testadas ( $p>0,05$ ).

### 5.3 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Os resultados preliminares do efeito do tratamento fotodinâmico com os quatro FS estudados encontram-se apresentados na figura 27.



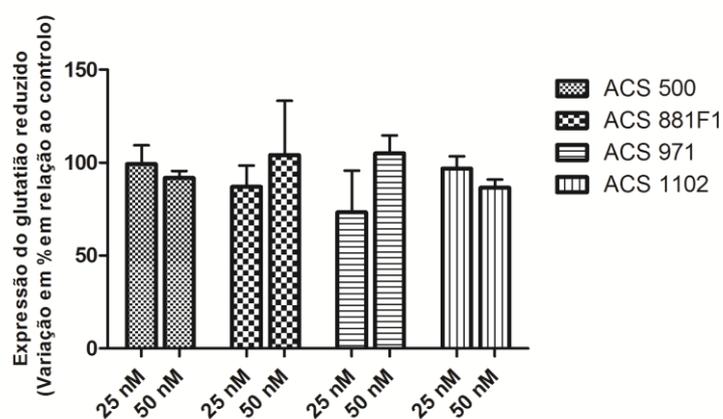
**Figura 27 – Análise do potencial de membrana mitocondrial.** Os resultados são expressos como % em relação ao controlo. Os resultados apresentam a média e desvio padrão de  $n\geq 4$ .

Pôde-se verificar que o tratamento fotodinâmico com as duas concentrações dos quatro fotossensibilizadores estudados não apresentou alterações significativas na razão monómeros/agregados, comparativamente ao controlo ( $p>0,05$ ). Deste modo, verificou-se que não existiam alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial.

Contudo, estes resultados indicam uma tendência para o aumento da razão M/A, indiciando uma tendência para a disrupção do potencial de membrana mitocondrial após o tratamento fotodinâmico com os FS estudados.

#### 5.4 – Avaliação da expressão do glutatião reduzido

Os resultados relativos à determinação da expressão do glutatião reduzido (GSH) encontram-se apresentados na figura 28.

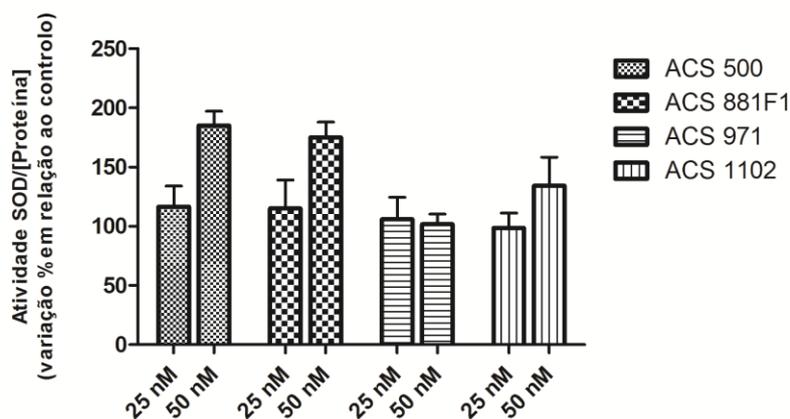


**Figura 28 – Avaliação da expressão do glutatião reduzido, através da técnica de citometria de fluxo, com recurso à marcação com alaranjado de mercúrio.** Os resultados encontram-se expressos como a % em relação ao controlo. Os resultados apresentam a média e desvio padrão de  $n \geq 4$ .

Podemos observar que o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados não induz diferenças significativas na expressão do glutatião reduzido, comparativamente às culturas celulares não tratadas ( $p > 0,05$ ).

### 5.5 – Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Neste trabalho foi avaliada a atividade da enzima SOD após o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados. Na figura 29 encontra-se representado o gráfico relativo aos resultados da atividade da SOD por concentração de proteína após o tratamento fotodinâmico, 24 horas após a irradiação.



**Figura 29 – Atividade da superóxido dismutase após o tratamento fotodinâmico.** Os resultados encontram-se expressos como a razão entre a atividade da SOD de cada condição e a atividade da SOD nas culturas controle. Os resultados apresentam a média e desvio padrão de  $n \geq 4$ .

Através da análise do gráfico, podemos observar que existe um aumento significativo da atividade da SOD para o tratamento fotodinâmico com 50nM dos fotossensibilizadores ACS 500 ( $p=0,007$ ) e ACS 881F1 ( $p=0,010$ ). Para as restantes condições estudadas as alterações observadas não demonstraram ser significativas ( $p>0,05$ ).

## **V – Discussão**



Como foi referido anteriormente, o tratamento do retinoblastoma com as terapias convencionais de radio e quimioterapia, pode levar a problemas anos mais tarde após o tratamento. Um exemplo dessas complicações é o aparecimento de neoplasias secundárias, como é o caso de osteossarcoma, que podem surgir devido ao caráter mutagénico das terapias convencionais. Assim, como a terapia fotodinâmica não apresenta essa característica mutagénica, assume-se como uma importante alternativa terapêutica para este tumor.

De modo a ser possível realizar o tratamento fotodinâmico nas células da linha de retinoblastoma humano Y79 promoveu-se a sua adesão a placas multipoço revestidas com poli-D-lisina. Verificou-se que o revestimento não alterava significativamente o perfil de proliferação das células, pelo que foi possível seguir com este procedimento de modo a realizar os estudos. Esta abordagem para promover a adesão das células Y79 foi já realizada anteriormente, num estudo que pretendia avaliar a libertação de melatonina e a produção dos precursores do 5-hidroxitriptofano e da serotonina após a indução de diferenciação por incubação com butirato de sódio (Deng *et al.* 1991).

A eficácia da terapia fotodinâmica depende, de forma fundamental, da captação celular dos fotossensibilizadores, retenção e a sua acumulação no tecido tumoral. Assim sendo, foi analisada a captação celular dos compostos ACS500, ACS971 e ACS881F1 através de métodos fluorimétricos. Analisando os resultados apresentados nos gráficos da figura 16, observou-se uma tendência para o aumento da captação ao longo do tempo. Observaram-se apenas diferenças significativas entre os FS ACS 881F1 e o ACS 971 apenas às 24h após incubação. Não têm sido documentadas diferenças significativas entre a captação celular de porfirinas e das suas clorinas correspondentes (Banfi *et al.* 2006). Nesta dissertação foi possível observar resultados idênticos, visto que as células da linha Y79 apresentavam uma baixa captação da clorina ACS 881F1. No caso da incubação com

a porfirina ACS 500, foi impossível determinar a sua captação intracelular, visto esta ser inferior ao limite de deteção do fluorímetro utilizado (cerca de  $0,07\mu\text{M}$ ), contudo, a captação destes dois compostos encontrar-se-ão na mesma ordem de grandeza. Devido à presença de uma glicosilação na sua estrutura, seria de esperar que o FS ACS 971 exibisse uma maior captação, visto que a glicoconjugação seja considerada por vários autores como uma abordagem efetiva para aumentar a solubilidade aquosa através da alteração da anfifilicidade dos macrociclos (Ballut *et al.* 2012). Essa baixa captação poderá estar relacionada com o facto de a linha celular de retinoblastoma Y79 utilizada neste trabalho não expressar todos os tipos de transportadores de glicose, expressando apenas os tipos 1 e 4 (GLUT1 e GLUT4, respetivamente) (Tsukamoto *et al.* 1997).

Nesta dissertação, de modo a avaliar o efeito do tratamento fotodinâmico dos diferentes FS recorreu-se aos ensaios de MTT e *alamar blue*, que avaliam a atividade metabólica das células. Ambos os ensaios apresentam algumas limitações, visto que não é possível distinguir entre diminuição da atividade metabólica ou proliferativa das células ou uma redução do número de células das condições ou aumento do número de células na população controlo. Contudo, apesar destas limitações, estes dois ensaios são extremamente úteis na determinação dos valores de IC50 que permitem o avançar para estudos de citotoxicidade.

Recorreu-se aos ensaios de MTT e de *alamar blue* devido à sua capacidade de avaliar o ambiente de oxidação e redução do meio intracelular e, assim, avaliar os efeitos antiproliferativos dos FS estudados nesta dissertação (Freshney, 2005). Analisando a proliferação celular, tanto pelo ensaio de MTT como pelo ensaio de *alamar blue*, verificou-se que a mistura ternária usada como solvente dos quatro FS considerados não influencia a proliferação celular. Este facto é verificado tendo em conta que não se observaram diferenças na proliferação entre as culturas celulares às quais se administraram

o solvente e as culturas celulares controlo que não foram submetidas a qualquer tratamento. Utilizando os dois métodos referidos anteriormente, foi possível construir as curvas de dose resposta. Em ambos os métodos verificou-se que a fototoxicidade aumenta com o aumento da concentração de incubação para todos os fotossensibilizadores.

No que diz respeito aos ensaios com MTT, para as 24h, determinaram-se valores de IC50 que foram de 28,67nM para o composto ACS 500, 20,65nM para o ACS 881F1, 16,13nM para o composto ACS 971 e 8,80nM para o ACS 1102. Na análise dos resultados para as 48h observou-se um aumento dos valores de IC50 para os compostos ACS 500, ACS 971 e ACS 1102, de 26,6nM, 32,60nM e 41,25nM, respetivamente. Já para o composto ACS 881F1 verificou-se um decréscimo do valor de IC50 que se determinou como sendo de 15,84nM. O aumento dos valores de IC50 com o tempo de incubação pode indicar que o tratamento com estes três fotossensibilizadores não induz alterações irreversíveis nas células, indicando capacidade de recuperação após os danos causados pelo tratamento inicial.

No que diz respeito aos ensaios com *alamar blue*, registaram-se valores de IC50, para as 24h, de 70,8nM para o FS ACS 500, 96,64nM para o ACS 881F1, 60,30nM para o composto ACS 971 e 55,22nM para o ACS 1102. No que concerne aos resultados obtidos para as 48h, observou-se um aumento dos valores de IC50 para os quatro compostos estudados, tendo-se registado as concentrações de 105,05nM para o ACS 500, 105,95nM para o ACS 881F1, 104,89nM para o composto ACS 971 e, por último, 101,84nM para o ACS 1102. Tal como referido anteriormente, este aumento dos valores de IC50 pode indicar uma capacidade de recuperação por parte das células após o tratamento fotodinâmico. Por este facto, foram também realizados outros ensaios de modo a avaliar a viabilidade celular. Os resultados obtidos com estes ensaios podem ser complementados com o ensaio da SRB, que avalia a proliferação celular através do conteúdo proteico. De

acrescentar ainda que existem diferenças entre os valores de IC50 determinados pelos métodos do *alamar blue* e do MTT. Estas diferenças podem ser explicadas devido às próprias características dos métodos, sendo que ambos os métodos mostram a mesma tendência de resultados, apresentando valores de IC50 dentro da mesma ordem de grandeza. Para além disso, existem estudos onde a utilização de métodos distintos para a avaliação da proliferação celular também levam a algumas diferenças nos resultados obtidos com os diferentes métodos. Compagnin e seus colaboradores utilizaram o método de azul de tripano e o ensaio de MTS (modificação do ensaio MTT) de modo a verificar os efeitos antiproliferativos de terapia fotodinâmica com Photofrin® e da terapia combinada entre PDT e cisplatina no tratamento de cancro do esófago. Nesse estudo, verificaram que os resultados de ambos os ensaios diferiam, visto que o azul de tripano permite distinguir células vivas de células mortas, enquanto o ensaio de MTS avalia a atividade de desidrogenases, sendo que observaram a mesma tendência de resultados para os dois métodos (Compagnin *et al.* 2009).

Hirohara *et al.* desenvolveram um estudo em que estudaram a citotoxicidade de porfirinas e correspondentes clorinas contendo S-glicosídeos fundidas com pirrolidina em que utilizaram valores de fluência semelhantes ao utilizado neste trabalho, tendo determinado valores de IC50 próximos dos determinados no âmbito desta dissertação. Para além disso verificaram igualmente uma maior eficácia no tratamento fotodinâmico com clorinas, o que não se verificou nos tratamentos com ACS 500 e ACS 881F1, já que estes FS revelaram uma eficácia no tratamento fotodinâmico muito semelhante, tal como determinado por Banfi *et al.*. Este grupo de investigadores estudou as diferenças de 5,10,15,20-tetraaril e 5,15-diarilporfirinas e as suas clorinas correspondentes, tendo verificado que a citotoxicidade após o tratamento fotodinâmico induzia efeitos semelhantes entre porfirinas e clorinas. Estes investigadores chegaram à conclusão de que a

conformação da molécula fotossensibilizadora não seria afetada apenas pela adição de dois átomos de hidrogénio de modo a que o anel do FS não fosse totalmente insaturado, pelo que as diferenças ao nível da citotoxicidade entre porfirinas e clorinas não poderia ser apenas explicadas pela diferença estrutural (Banfi *et al.* 2006). Nesse mesmo estudo, verificaram que a adição de grupos glicosilados acetilados diminuía a eficácia do tratamento fotodinâmico, contudo, com o FS ACS 971 estudado nesta dissertação essa diminuição não se verifica, quando comparado com a porfirina não glicosilada (Hirohara *et al.* 2009). Estas diferenças de resultados podem ser explicadas pelo facto de as propriedades químicas e fotofísicas dos diferentes compostos não serem suficientes para explicar o seu efeito citotóxico, estando envolvidos processos biológicos na indução da fotocitotoxicidade, tais como o tipo celular (Hirohara *et al.* 2009). Um outro grupo de investigadores realizou um estudo em que avaliou a eficácia de porfirinas glicoconjugadas ligadas por dietilenoglicol em que os valores de IC50 também se correlacionavam com os determinados com os quatro fotossensibilizadores estudados nesta dissertação (Laville *et al.* 2006). De realçar os resultados obtidos com o composto ACS 971, que possui um grupo glicoconjugado na sua estrutura química. Neste artigo, observou-se que das 16 porfirinas com diferentes glicoconjugados estudados, os que apresentavam maior *uptake* apresentavam igualmente maior citotoxicidade, o que não foi possível determinar com todos os quatro FS estudados nesta dissertação. Contudo, os autores do artigo referido verificaram que o glicoconjugado apresentava maior *uptake* do que o FS correspondente contendo apenas o *linker*, o que não foi possível determinar com os fotossensibilizadores ACS 971 e ACS 1102 (Laville *et al.* 2006).

Laville *et al.* reportaram que os mesmos fotossensibilizadores nas linhas HT29 (linha celular humana de adenocarcinoma do cólon) e B16 (linha celular murina de melanoma) demonstravam serem muito menos eficazes do que na linha humana de retinoblastoma,

tendo estabelecido a hipótese de que a própria linha Y79 pudesse exibir uma sensibilidade intrínseca ao tratamento fotodinâmico (Laville *et al.* 2006). No que diz respeito ao composto ACS 500, este foi estudado na linha celular humana de adenocarcinoma colorretal WiDr, tendo apresentado valores de IC50 entre os 140nM e os 180nM (Laranjo *et al.* 2013), corroborando a hipótese citada anteriormente.

Após se terem estabelecido as curvas de dose-resposta correspondentes a cada um dos FS, com recurso aos ensaios de MTT e *alamar blue*, foi possível determinar os valores de IC50 correspondentes, referidos anteriormente. Estes valores de IC50 permitiram determinar a gama de concentrações a que os FS têm efeito ao nível da proliferação celular. Deste modo, decidiu-se prosseguir com o estudo dos efeitos celulares após o tratamento fotodinâmico com os quatro FS, utilizando para isso apenas as concentrações de 25nM e 50nM.

No ensaio de SRB avaliou-se o conteúdo proteico das células sujeitas ao tratamento fotodinâmico com os diferentes FS estudados, comparativamente às células controlo e, conseqüentemente, a proliferação celular. Observou-se que o tratamento fotodinâmico após administração de 25nM do FS ACS 500 não induzia diferenças significativas no conteúdo proteico em relação às culturas controlo. Por outro lado, verificou-se que o tratamento fotodinâmico com os restantes FS e com as duas concentrações consideradas induziam diferenças significativas relativamente às células controlo, verificando-se uma diminuição do conteúdo proteico após o tratamento fotodinâmico. Verificou-se igualmente que não existem diferenças significativas entre os tratamentos com os diferentes fotossensibilizadores e com as duas concentrações utilizadas. O uso deste método para avaliar o conteúdo proteico de células de retinoblastoma não está descrito na literatura, contudo, este método já foi utilizado em estudos relacionados com terapia fotodinâmica. Haywood-Small e seus colaboradores recorreram ao ensaio de SRB de modo a determinar

valores de IC50, IC75 e IC90 do fotossensibilizador ftalocianina na linha humana de carcinoma cervical SiHa (Haywood-Small *et al.* 2006), verificando que a terapia fotodinâmica influenciava o conteúdo proteico da linha celular. No método de SRB, o corante liga-se aos aminoácidos básicos das proteínas celulares constituindo uma medida indireta da massa total de proteína que, portanto, está relacionada com o número de células.

Os ensaios de MTT, do *alamar blue* e da SRB podem indicar alguma informação acerca da capacidade proliferativa das células e do seu conteúdo proteico após o tratamento fotodinâmico, contudo não fornecem informações sobre os mecanismos intracelulares que levam à citotoxicidade revelada pelo tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados nesta dissertação. Não existem publicações que se refiram a estes mecanismos intracelulares no que diz respeito ao tratamento fotodinâmico em linhas celulares de retinoblastoma. Deste modo, recorreu-se a diferentes métodos para avaliar esses mesmos processos após o tratamento fotodinâmico com os FS considerados neste trabalho, nomeadamente as vias de morte ativadas após a PDT recorrendo à técnica de citometria de fluxo, através da dupla marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo, a produção intracelular de ROS, pela marcação com as sondas DCFH<sub>2</sub>-DA e DHE, o potencial de membrana mitocondrial usando a sonda JC-1, alterações no ciclo celular recorrendo a iodeto de propídeo e alterações das defesas antioxidantes usando o alaranjado de mercúrio de modo a avaliar os níveis de GSH.

Durante a apoptose, ocorre a translocação do fosfolípido fosfatidilserina para o folheto externo da membrana celular, podendo ser identificado através da incubação das células com AnV-FITC (Koopman *et al.* 1994; van Heerde *et al.* 2000; Bedner *et al.* 1999). Por outro lado, o iodeto de propídeo é um corante com a capacidade de se intercalar no DNA celular. Contudo, este corante não consegue atravessar a bicamada lipídica, sendo apenas

capaz de se intercalar no DNA quando a integridade da membrana celular se encontra comprometida, o que se verifica quando as células se encontram em apoptose tardia ou necrose (Darzynkiewicz *et al.* 1992). Para o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores, verificou-se uma diminuição do número de células viáveis na maioria dos tratamentos fotodinâmicos, correspondente a um aumento do número de células apoptóticas. Observou-se que não existiam alterações significativas no que diz respeito à morte celular por necrose, comparativamente às culturas celulares controle, com exceção do tratamento com 50nM do FS ACS 881F1. Foi também possível observar um aumento do número de células em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose nas restantes condições experimentais. Sasnauskiene e seus colaboradores estudaram os efeitos da PDT utilizando a clorina mTHPC como fotossensibilizador na linha humana de carcinoma de células escamosas A-431. Neste estudo verificou-se que o tratamento fotodinâmico nesta linha celular levava a apoptose com baixas concentrações do FS, contudo, para maiores concentrações observava-se tanto apoptose como autofagia (Sasnauskiene *et al.* 2009). O m-THPC foi também estudado em linhas de adenocarcinoma do cólon tendo, com baixas fluências, desencadeando morte celular por apoptose. Neste estudo verificou-se que o aumento da fluência provocava morte celular por necrose (Marchal *et al.* 2003). Esta mesma tendência verificou-se com o FS fotocianina numa linha celular humana de carcinoma hepatocelular (Shao *et al.* 2012). Zhao *et al.* verificaram que a PDT com Photophrin<sup>®</sup> e baixas fluências provocava morte celular por apoptose na linha celular humana de adenocarcinoma do pulmão ASTC-a-1, num processo dependente da atividade mitocondrial (Zhao *et al.* 2011). Um estudo realizado por Haywood-Small e seus colaboradores mostrou que a PDT recorrendo a elevadas concentrações do fotossensibilizador ftalocianina induziam morte celular por necrose em células de carcinoma cervical. Segundo esta evidência, os autores colocaram a hipótese de que este

tipo de morte celular poderia prevenir o desenvolvimento de resistência ao tratamento fotodinâmico devido ao seu caráter rápido e agressivo (Haywood-Small *et al.* 2006). A morte celular por apoptose através da via intrínseca, na dependente da mitocôndria foi identificada também após tratamento fotodinâmico com *pheophorbide A*, um FS do tipo clorínico (Anh *et al.* 2013). Banfi e colaboradores realizaram um estudo onde avaliaram a citotoxicidade de diferentes fotossensibilizadores, tanto porfirínicos como clorínicos. Para além dos seus efeitos na proliferação celular, verificaram também que a principal via de morte ativada era a apoptose (Banfi *et al.* 2004). Verificando-se esta tendência de alteração da via de morte celular ativada dependendo da concentração de FS e da fluência utilizada, pode-se propor a realização de novos estudos utilizando concentrações de FS ou fluências superiores, de modo a verificar se existem alterações na tendência de morte celular por apoptose determinada nesta dissertação. Esta morte celular, maioritariamente por apoptose, confere uma vantagem sobre a morte celular por necrose, uma vez que os fármacos tipicamente indutores de necrose exibem elevada toxicidade (Haywood-Small *et al.* 2006).

Existem dois pontos de controlo principais no ciclo celular: ponto de controlo entre a fase G1 e a fase S e o ponto de controlo entre a fase G2 e a mitose (fase M) (Shao *et al.* 2012). Diferentes estudos já demonstraram que as ROS estão envolvidas na transição da G0/G1 para S e da transição G2/M. Este envolvimento pode-se dever à existência de motivos sensíveis ao estado de oxidação-redução (redox) de várias proteínas reguladoras do ciclo celular, como por exemplo resíduos de cisteína na caspase-3 (cys-285) ou cofatores metálicos de cinases ou fosfatases. A presença destes motivos indica que variações no estado redox celular podem influenciar a regulação da normal progressão do ciclo celular de G0/G1 para S, para G2 e conseqüentemente para a mitose (Shao *et al.* 2012). Nas células tumorais, sabe-se que o ciclo celular é regulado de forma aberrante, sendo constantemente ativado pela indução de reguladores positivos, sendo estes muitas vezes

codificados por proto-oncogenes, ou pela inativação dos reguladores negativos, que são normalmente codificados por genes supressores tumorais (Tessema *et al.* 2004). Por este facto, foi estudado qual o efeito do tratamento fotodinâmico com os FS considerados no ciclo celular. Foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, com a marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo. Este método baseia-se na marcação do DNA com o iodeto de propídeo, sendo que a fluorescência detetada será proporcional ao conteúdo de DNA. Esta análise do conteúdo em DNA permite a distinção de quatro fases do ciclo celular: fase G1, fase S, onde ocorre síntese de DNA (logo apresentará maior conteúdo de DNA), fase G2 e mitose, que são impossíveis de distinguir entre si, visto que apresentam o mesmo conteúdo de DNA. Os resultados obtidos demonstraram um aumento da percentagem de células na fase pré-G1 e na fase G2/M, após o tratamento fotodinâmico, comparativamente ao controlo. Vários estudos demonstraram que o tratamento fotodinâmico em células tumorais pode levar a alterações ao nível do ciclo celular. Piette *et al.* demonstraram que o uso de fotossensibilizadores que se ligavam à membrana celular levava a uma paragem no ciclo celular na fase G2/M (Piette *et al.* 2003). Por outro lado, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados por Sasnauskiene e seus colaboradores, ao determinarem uma paragem do ciclo celular na fase G2/M após tratamento fotodinâmico com m-THPC e cloreto de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenilfenazinium (Safranina) (Sasnauskiene *et al.* 2009). Esta paragem do ciclo na fase G2/M foi também observada num estudo que combinava a quimioterapia convencional com cisplatina e o tratamento fotodinâmico com Photofrin II<sup>®</sup> (Compagnin *et al.* 2010). Haywood-Small *et al.* verificaram um aumento da população das células de carcinoma cervical na fase G0/G1 após PDT com uma ftalocianina (Haywood-Small *et al.* 2006). Um outro grupo de investigadores verificou um aumento da população celular na fase G2/M e uma diminuição da população em fase S após o tratamento fotodinâmico com um FS do

tipo ftalocianina. Este aumento do número de células na fase G2/M está de acordo com uma inibição da mitose celular e consequente inibição da proliferação celular (Shao *et al.* 2012).

Neste trabalho, foi possível observar um aumento significativo da expressão da proteína p53 após o tratamento com 25nM do FS 1102, comparativamente ao controlo. Para os restantes tratamentos verificou-se uma tendência para o aumento da mesma, com exceção do tratamento com 50nM de ACS 500. Esta tendência indica que o tratamento fotodinâmico com os diferentes FS poderá levar ao aumento de expressão de p53, sendo que esta proteína está relacionada com a morte celular por apoptose, corroborando os resultados obtidos por citometria de fluxo. De facto, o aumento da expressão de p53 após tratamento fotodinâmico encontra-se documentado. Tong e seus colaboradores verificaram um aumento dos níveis de expressão da p53 após o tratamento fotodinâmico com Photofrin®, na linha celular de fibroblastos GM38A, de modo a comparar estes resultados com uma linha celular imortalizada de Síndrome de Li-Fraumeni expressando uma forma mutada de p53 (Tong *et al.* 2000). Um outro estudo verificou igualmente que o tratamento fotodinâmico com protoporfirina IX levava também à indução da ativação da p53 na linha celular de adenocarcinoma do cólon HCT116 (Zawacka-Pankau *et al.* 2006). Existem, contudo, outros métodos que podem ser utilizados para comprovar a ativação da morte celular por apoptose, como é o caso da determinação da expressão de proteínas tais como a caspase-3, a BAX e a BCL<sub>2</sub>, pela determinação dos níveis de citocromo c no citosol ou determinação de alterações morfológicas características de apoptose (Compagnin *et al.* 2010; Marchal *et al.* 2004; Shao *et al.* 2012), pelo que no futuro se poderá avaliar se existirão alterações destes fatores com o tratamento fotodinâmico com os FS estudados neste trabalho.

Nesta dissertação, verificou-se que o tratamento fotodinâmico com os diferentes fotossensibilizadores não induziam danos significativos no DNA das células da linha Y79, sendo que os danos observados eram de baixo grau e que a maioria da população celular não sofria qualquer tipo de dano. Resultados semelhantes foram descritos quando se estudou o tratamento fotodinâmico com mTHPC numa linha celular de carcinoma nasofaríngeo. Neste estudo não foram descritas diferenças significativas no que diz respeito ao momento de cauda, parâmetro usado como índice de dano de DNA, visto que o comprimento de cauda se relaciona com a percentagem de DNA na cauda (Yow *et al.* 2000). Contudo, existem igualmente vários relatos de que a terapia fotodinâmica com diferentes fotossensibilizadores possa induzir danos no DNA. Woods e seus colaboradores verificaram que o uso de PDT com Photofrin® como FS induzia um aumento da percentagem de DNA presente na cauda dos cometas numa linha celular de queratinócitos, sendo o dano induzido dependente tanto da concentração de fotossensibilizador como da fluência da irradiação à qual as células foram sujeitas (Woods *et al.* 2004). Uma outra equipa de investigadores estudou o efeito de PDT utilizando meso-tetrasulfonatofenilporfirinas e o correspondente complexo metálico (átomo de magnésio como ião metálico) no DNA de células HeLA. Os autores verificaram que estes compostos porfirínicos induziam um aumento dos locais apurínicos dependente da concentração de FS e da fluência à qual as células eram sujeitas (Binder *et al.* 2010). Um resultado bastante interessante foi obtido por Rousset e seus colaboradores. Nesse trabalho, os autores investigaram os danos no DNA induzidos por PDT com mTHPC, avaliando os danos após diferentes tempo de incubação. Verificaram que existia um aumento significativo do momento de cauda após o tratamento fotodinâmico. Contudo, verificaram que esse dano era reparado até 100%, 24h após o tratamento. Essa evidência poderá explicar os resultados obtidos nesta dissertação, indicando que o facto de existir um número reduzido

de células exibindo danos no DNA se possa dever a um mecanismo de reparação das células que se mantiveram viáveis mesmo após sofrerem danos no DNA (Rousset *et al.* 2009).

As ROS são muito importantes no que diz respeito aos efeitos induzidos após o tratamento fotodinâmico. Desse modo, foi avaliada a produção intracelular de peróxidos e do radical superóxido, por citometria de fluxo, recorrendo às sondas DCFH<sub>2</sub>-DA e DHE, respetivamente. Considerando os níveis de peróxidos intracelulares, observou-se um aumento significativo para o tratamento fotodinâmico com 25nM e com 50nM do FS ACS 881F1 e com 50nM dos FS ACS 971 e ACS 1102. No que diz respeito à produção do radical superóxido, verificou-se uma tendência para o aumento da sua concentração intracelular após o tratamento fotodinâmico com os quatro FS. O facto de o tratamento fotodinâmico não induzir grandes diferenças na produção destas espécies reativas de oxigénio pode ser explicado pela ação de espécies mais lesivas, tais como o oxigénio singleto, descrito como a principal ROS produzida pela reação fotodinâmica (Sharman *et al.* 1999; Lukšienė 2003). Tem sido descrito na literatura que o tratamento fotodinâmico induzirá um aumento da concentração de peróxidos intracelulares. Wawrzynska *et al.* verificaram este aumento após o tratamento fotodinâmico com a clorina e6 em células de músculo liso vascular humano, de modo a verificar qual a eficácia deste tratamento na isquemia cardíaca causada por aterosclerose, numa abordagem diferente do que o tratamento de tumores (Wawrzynska *et al.* 2010). Já Wu e Xing verificaram que o tratamento fotodinâmico usando Photofrin® como FS na linha celular ASTC-a-1 provocava o aumento da concentração de peróxidos intracelulares, tendo determinado também que esta ROS seria originada na mitocôndria (Wu *et al.* 2012). Um outro trabalho desenvolvido por Ali-Seyed e seus colaboradores com um FS derivado da clorina e6 (Photolon<sup>TM</sup>) verificaram um aumento da concentração de peróxidos intracelulares após

PDT ao longo do tempo até aos 60min após o tratamento, sendo que a partir daí se verificou um decréscimo até às 3h (Ali-Seyed *et al.* 2011). Este decréscimo pode indicar que as ROS têm um tempo de vida limitado e que se dissipam ao longo do tempo. Este facto, e tendo em conta que nesta dissertação as ROS foram analisadas 24h após o tratamento fotodinâmico, pode explicar o aumento pouco significativo das ROS. Um outro estudo, já citado anteriormente e utilizando também Photofrin® no tratamento fotodinâmico na linha ASTC-a-1, verificou-se igualmente aumento da concentração intracelular de peróxidos dependente da atividade mitocondrial. Neste estudo verificaram que a morte celular desencadeada pela PDT era proporcional à concentração de ROS e não à concentração de FS utilizada. Desde modo, os autores deste estudo hipotetizaram que as ROS produzidas pela reação fotodinâmica seriam apenas parte do processo desencadeado pela terapia e que as ROS geradas pelas células constituem um importante fator que contribui para a fototoxicidade da PDT. Verificaram também que a fração de ROS endógenas era dissipada com o aumento da concentração do FS (Zhao *et al.* 2011).

A diminuição do potencial de membrana mitocondrial resulta da *swelling* mitocondrial e da rutura da sua membrana externa, contribuindo assim para a libertação de citocromo c da membrana mitocondrial interna, um dos eventos principais da apoptose (Ali-Seyed *et al.* 2011). Os resultados preliminares do tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados nesta dissertação evidenciaram uma tendência para o aumento da razão monómeros/agregados, correspondente a uma disrupção do potencial de membrana mitocondrial. Marchal *et al.* verificaram que PDT utilizando mTHPC na linha celular de adenocarcinoma do colon HT29 provocava a disrupção do potencial de membrana mitocondrial (Marchal *et al.* 2004). Um outro estudo revelou que o tratamento fotodinâmico usando fotocianina na linha HepG2 provocava um decréscimo da razão M/A, sinónimo de despolarização da membrana mitocondrial. O potencial de membrana

mitocondrial é um indicador da atividade da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, da atividade mitocondrial, sendo que a sua disrupção é um dos eventos de apoptose (Shao *et al.* 2012). De referir ainda que se pode monitorizar o potencial de membrana mitocondrial usando a sonda rodamina 123 sendo que, com este método, a intensidade de fluorescência da sonda é proporcional ao potencial da membrana mitocondrial. Um estudo realizado por Wu e Xing determinou que havia diminuição daquele potencial após PDT com Photofrin®, sendo que a diminuição do potencial de membrana mitocondrial era proporcional ao aumento de espécies reativas de oxigénio (Wu *et al.* 2012).

O glutatião reduzido (GSH) apresenta-se como uma defesa primária contra o stresse oxidativo, uma vez que é capaz de eliminar radicais livres ou de reduzir peróxidos (Chiou *et al.* 2010). Os resultados relativos à expressão de GSH permitiram verificar que não existiam diferenças significativas após o tratamento fotodinâmico, observando-se contudo uma tendência para um ligeiro aumento. Estes resultados indicam que as células sujeitas ao tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados nesta dissertação não foram capazes de ativar a defesa antioxidante contra os peróxidos gerados após a PDT. Esta incapacidade de defesa pode ser explicada pela rápida depleção das reservas mitocondriais de GSH após a PDT. As mitocôndrias apresentam baixos níveis de GSH que têm de ser regenerados a partir das reservas presentes no citosol. Chiou e seus colaboradores verificaram que a PDT com verteporfina causava a depleção dos níveis mitocondriais de GSH nas células da linha celular HepG2 em apenas 10 minutos, sendo esta defesa antioxidante insuficiente devido a esta rápida depleção (Chiou *et al.* 2010).

A atividade de SOD é um indicador direto de stresse oxidativo, comportando-se como a defesa primária contra radicais livres e o dano induzido por estes (Choromauska *et al.* 2012). Neste trabalho, verificámos que o tratamento fotodinâmico com os quatro

fotosensibilizadores não induzia diferenças significativas na expressão de SOD, evidenciando, contudo, uma tendência para o seu aumento. Esta tendência para o aumento da expressão de SOD poderá explicar os resultados obtidos no que diz respeito à concentração intracelular do radical superóxido, cujos resultados não apresentaram diferenças significativas. A ausência de diferenças nesse parâmetro pode então ser explicada pelo papel de defesa antioxidante desempenhado pela SOD. De facto, esse papel protetor foi verificado num estudo em que se avaliou a eficácia da PDT com Photofrin® na linha de adenocarcinoma do colon C-26. Nesse estudo, os autores verificaram um aumento da expressão de SOD após a PDT. Para além disso, ao realizarem uma pré-incubação das células com um composto que mimitava a ação da SOD verificaram que o tratamento fotodinâmico após essa pré-incubação era muito menos eficaz, realçando o papel de defesa antioxidante desempenhado pela SOD (Golab *et al.* 2003).

Nesta dissertação, foi possível verificar que os FS estudados levam a diminuição da proliferação celular em concentrações da ordem do nanomolar. Para além disso, o tratamento fotodinâmico leva a morte celular por apoptose, o que confere uma vantagem terapêutica relativamente à morte celular por necrose, que apresenta uma natureza mais tóxica. Estes resultados apresentam-se como promissores no que diz respeito ao recurso da terapia fotodinâmica como alternativa no tratamento fotodinâmico, sendo fundamental a realização de estudos *in vivo* em modelos hétero e ortotópicos.

## **VI – Conclusões**



A realização desta dissertação, que teve como principal objetivo avaliar a aplicabilidade dos quatro fotossensibilizadores estudados em terapia fotodinâmica para o para o retinoblastoma permitiu tirar diversas conclusões.

Os estudos de captação demonstraram que os compostos ACS 881F1 e ACS 971 são captados pelas células da linha de retinoblastoma humano Y79, acumulando-se numa concentração intracelular na ordem dos nanomolar, não havendo diferenças significativas entre os FS.

Os ensaios de MTT e de *alamar blue* permitiram comprovar que os quatro fotossensibilizadores estudados possuem efeitos anti proliferativos. Os valores da concentração de IC50 entre os diferentes compostos encontram-se na ordem dos nanomolar, comprovando-se assim os efeitos anti proliferativos dos quatro FS estudados, mesmo a baixas concentrações.

Recorrendo ao ensaio de SRB, pode-se concluir que o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores estudados provoca uma diminuição do conteúdo proteico, sendo possível desta forma comprovar que os FS estudados induzem diminuição da viabilidade corroborando os ensaios de MTT e *alamar blue*.

A PDT com os quatro fotossensibilizadores produz efeitos na viabilidade celular das culturas celulares de Y79, não havendo diferenças significativas entre o efeito dos diferentes fotossensibilizadores.

A principal via de morte após o tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores é a apoptose.

O tratamento fotodinâmico com os quatro fotossensibilizadores induz paragem do ciclo celular na fase G2/M e induz o aparecimento de um pico em pré-G1, associado à morte celular por apoptose.

Recorrendo ao ensaio cometa, foi possível verificar que o tratamento fotodinâmico com os diferentes fotossensibilizadores não induz danos significativos no DNA, verificando-se alterações nos parâmetros tamanho de cauda, percentagem de DNA na cauda e momento de cauda num número pouco representativo da população celular, comprovando assim que a PDT poderá ser uma abordagem terapêutica interessante para o tratamento de retinoblastoma.

O tratamento fotodinâmico com os FS ACS 500 e ACS 1102 provocaram um aumento da expressão da proteína p53, envolvida no processo de apoptose, corroborando assim que a morte celular se deverá maioritariamente por apoptose.

Os resultados preliminares relativos à avaliação do potencial de membrana mitocondrial indicam que a mitocôndria seja o alvo intracelular do tratamento fotodinâmico com os fotossensibilizadores estudados.

Os resultados relativos à produção de ROS indicam que os níveis intracelulares de peróxidos aumentam após o tratamento fotodinâmico com os diferentes fotossensibilizadores, indicando que possam estar envolvidos no processo fotooxidativo e que possa ser uma ROS determinante na indução de danos mitocondriais que precipitem o processo de morte celular por apoptose. No que diz respeito ao anião superóxido, não se verificaram diferenças significativas, existindo contudo uma tendência para o seu aumento.

Não foi possível identificar diferenças significativas na expressão da enzima superóxido dismutase e do glutatião reduzido, elementos envolvidos na defesa antioxidante, pelo que as células de retinoblastoma Y70 não têm capacidade de defesa contra as ROS induzidas pelo tratamento fotodinâmico.

Este estudo permitiu comprovar que os quatro fotossensibilizadores estudados têm efeito fotodinâmico *in vitro* na linha celular Y79, induzindo preferencialmente morte celular por apoptose, mesmo recorrendo a baixas concentrações de fotossensibilizadores. Pode-se

concluir que o tratamento fotodinâmico pode ser uma importante alternativa terapêutica para o tratamento de retinoblastoma, sendo de absoluto interesse o início de estudos *in vivo*.



## **Bibliografia**



- Abe, K., Matsuki, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience research* 38: 325-329.
- Aerts, I., Leuraud, P., Blais, J., Pouliquen, A., Maillard, P., Houdayer, C., Couturier, J., Sastre-Garau, X., Grierson, D., Doz, F., Poupon, F. (2010). *In vivo* efficacy of photodynamic therapy in three xenograft models. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 7: 275-283.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K., Foster, T., Girotti, A., Gollnick, S., Hahn, S., Hamblin, M., Juzeniene, A., Kessel, D., Korblick, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer journal for clinicians* 61: 250-281.
- Ahn, M., Yoon, H-E., Kwon, S-M., Lee, J., Min, S-K., Kim, Y-C., Ahn, S-G., Yoon, J-H. (2013). Synthesized pheophorbide a-mediated photodynamic therapy induced apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 42: 17-25.
- Ali-Seyed, M., Bhuvanewari, R., Soo, K., Olivo, M. (2011). Photolon<sup>TM</sup>-photosensitization induces apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes. *International Journal of oncology* 39: 821-831.
- Allison, R., Sibata, C. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 7 (2): 61-7.
- Azenha, E., Serra, A., Pineiro, M., Pereira, M., Melo, J., Arnaut, L., Formosinho, S., Rocha Gonsalves, A. (2002). Heavy-atom effects on metalloporphyrins and polyhalogenated porphyrins. *Chemical Physics* 280: 177-190.

- Ballut, S., Naud-Martin, D., Loock, B., Maillard, P. (2010). A strategy for the targeting of photosensitizers. Synthesis, characterization, and photobiological property of porphyrins bearing glycodendrimeric moieties. *The Journal of Organic Chemistry* 76: 2010-2028.
- Balmer, A., Zografos, L., Munier, F. (2006). Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 25: 5341-5349.
- Banfi, S., Caruso, E., Caprioli, S., Mazzagatti, L., Canti, G., Ravizza, R., Gariboldi, M., Monti, E. (2004). Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorganic and medicinal chemistry* 12: 4853-4860.
- Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M., Darzynkiewicz, Z. (1999). Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35 (3): 181-95.
- Belzacq, A., Jacotot, E., Vieira, H., Mistro, D., Granville, D., Xie, Z., Reed, J., Kroemer, G., Brenner, C. (2001). Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin: identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. *Cancer Research* 61: 1260-1264.
- Berg, Jeremy M. *Biochemistry*, 5<sup>a</sup> ed., Nova Iorque, W H Freeman; 2002.
- Binder, S., Kolarova, H., Tomankova, K., Bajgar, R., Daskova, A., Mosinger, J. (2011). Phototoxic effects of TPPS<sub>4</sub> and MgTPPS<sub>4</sub> on DNA fragmentation of HeLa cells. *Toxicology in Vitro* 25: 1169-1172.
- Bortner, C., Cidlowski, J. (1999). Caspase independent/dependent regulation of K<sup>+</sup>, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 274 (31): 21953-21962.
- Brandes, R., Janiszewski, M. (2005). Direct detection of reactive oxygen species *ex vivo*. *Kidney international* 67 (5): 1662-4.

- Brömme, H., Zühlke, L., Silber, R., Simm, A. (2008). DCFH<sub>2</sub> interactions with hydroxyl radicals and other oxidants--influence of organic solvents. *Experimental gerontology* 43 (7): 638-644.
- Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sanger, M., Schmidberger, H., Langguth, P. (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT assay – a comparative study. *Radiation oncology* 7:1-7.
- Calzavara-Pinton, P., Venturini, M., Sala, R. (2007). Photodynamic therapy: update. Part 1: Photochemistry and photobiology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 21 (3): 293-302.
- Carter, W., Paul, J. (1994). Intracellular hydrogen peroxide detection in endothelial cells and superoxide anion. *Journal of Leukocyte Biology* 55: 253-258.
- Castano, A. P., Mroz, P., Hamblin, M. R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature reviews. Cancer* 6: 535-45.
- Chintagumpala, M., Chevez-Barrios, P., Paysse, E., Plon, S., Hurwitz, R. (2007). Retinoblastoma: review of current management. *The oncologist* 12 (10): 1237-1246.
- Chiou, J-F., Wang, Y-H., Jou, M-J., Liu, T-Z., S, C-T. (2010). Verteporfin-photoinduced apoptosis in HepG2 cells mediated by reactive oxygen species intermediates. *Free Radical Research* 44 (2): 155-170.
- Choromanska, A., Saczko, J., Kulbacka, J., Skolucka, N., Majkowski, M. (2012). The potential of photodynamic therapy in the treatment of malignant melanoma – an *in vitro* study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 21 (2): 179-186.
- Collins, L., Franzblau. (1997). Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41 (5): 1004-1009.

- Compagnin, C., Mognato, M., Celotti, L., Canti, G., Palumbo, G., Reddi, E. (2010). Cell proliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin in combination with photodynamic therapy. *Cell proliferation* 43: 262-274.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Bino, G., Gorczyca, W. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13 (8): 795-808.
- Deng, M., Lopez, G-C., Lynch, H., Wurtman, R. (1991). Melatonin and its precursors in Y79 human retinoblastoma cells: effect of sodium butyrate. *Brain Research* 561 (2): 274-278.
- Deng, M., Lopez, G-C., Lynch, H., Wurtman, R. (1991). Melatonin and its precursors in Y79 human retinoblastoma cells: effect sodium butyrate. *Brain Research* 561 (2): 274-278.
- Dernbach, E., Urbich, C., Brandes, R., Hofmann, W., Zeiher, A., Dimmeler, S. (2004). Antioxidante stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 104 (12): 3591-3597.
- Dewaele, M., Maes, H., Agostinis, P. (2010). ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy* 6 (7): 838-854.
- DiCiommo, D., Gallie, B., Bremner, R., (2000). Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Seminars in cancer biology* 10 (4): 255-269.
- Dimaras, H., Kimani, K., Dimba, E., Gronsdahl, P., White, A., Chan, H., Gallie, B. (2012). Retinoblastoma. *Lancet* 379: 1436-1446.
- Freshney, R. (2005). Cytotoxicity. In: *Culture of animal cells: A manual of basic techniques*. 5th ed. USA: Jonh Wiley and Sons Inc.. pp. 359-373.

- Gary-Bobo, M., Mir, Y., Rouxel, C., Brevet, D., Hocine, O., Maynadier, M., Gallud, A., Silva, A., Mongin, O., Blanchard-Desce, M., Richeter, S., Loock, B., Maillard, P., Morère, A., Garcia, M., Raehm, L., Durand, J-O. (2012) Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the *in vitro* treatment of retinoblastoma: drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 432: 99-104.
- Gerweck, L. E., Seetharaman, K. (1996). Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Research* 56: 1194–1198.
- Golab, J., Nowis, D., Skrzycki, M., Czczot, H., Baranczyk-Kuzman, A., Wilczynski, G., Makowski, M., Mroz, P., Kozar, K., Kaminski, R., Jalili, A., Kopec, M., Grzela, T., Jakobisiak, M. (2003). Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (1): 407-414.
- Gombos, D., Chevez-Barrios, P. (2007). Current treatment and management of retinoblastoma. *Pediatric Oncology* 9: 453-458.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods* 65 (2-3): 45-80.
- Haywood-Small, S., Vernon, D., Griffiths, J., Schofield, J., Brown, S. (2006). Phtalocianine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339: 569-576.

- Henderson, P., Li, T., He, M., Zhang, H., Malfati, M., Gandara, D., Grimminger, P., Danenberg, K., Beckett, L., White, R., Turteltaub, K., Pan, X. (2011). A microdosing approach for characterizing formation and repair of carboplatin-DNA monoadducts and chemoresistance. *International journal of cancer* 129 (6): 1425-34.
- Hirohara, S., Obata, M., Alitomo, H., Sharyo, K., Ando, T., Tano, S., Tanihara, M. (2009). Synthesis and photocytotoxicity of S-glycosylated 5,10,15,20-tetrakis(tetrafluorophenyl)porphyrin metal complexes as efficient  $^1\text{O}_2$ -generating glycoconjugates. *Bioconjugate Chemistry* 20: 944-952.
- Horsman, M., Whinther, J. (1989). Vascular effects of photodynamic therapy in an intraocular retinoblastoma-like tumour. *Acta oncologica* 28 (5): 693-697.
- Houston, S., Murray, T., Wolfe, S., Fernandes, C. (2012). Current update on Retinoblastoma. *International Ophthalmology* 51(1): 77-91.
- Inoue, K., Kurabayashi, A., Shuin, T., Ohtsuki, Y., Furihata, M. (2012). Overexpression of p53 protein in human tumors. *Medical molecular morphology* 45: 115-123.
- Jin, C., Wu, Z., Li, Y., Li, Y., Chen, H., North, J. (1999). The killing effect of photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative in retinoblastoma cell line in vitro. *Yan Ke Xue Bao* 15 (1):1-6.
- Juzeniene, A., Peng, Q., Moan, J., 2007. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical and photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 6 (12): 1234-45.
- Kaufman, L. M., Mafee, M. F., Song, C. D. (1998). Retinoblastoma and simulating lesions. Role of CT, MR imaging and use of Gd-DTPA contrast enhancement. *Radiologic Clinics of North America* 36: 1101-17.

- Keepers, Y., Pizao, P., Peters, G., Ark-Otte, J., Winograd, B., Pinedo, H. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer* 27 (7): 897-900.
- Khetan, V., Gupta, A., Gopal, L. (2011). Retinoblastoma: Recent trends, a mini review based on published literature. *Oman Journal of Ophthalmology* 4(3): 108.
- Kiss, S., Leiderman, Y., Mukai, S. (2008). Diagnosis, classification and treatment of retinoblastoma. *International Ophthalmology Clinics* 48 (2): 135-147.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis. *Journal of West China University of Medical Sciences* 32 (4): 602-604.
- Korbelik, M., Kros, G., Olive, P. L., Chaplin, D. J. (1991). Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages, *Br.J.Cancer*, 1991, 64, 508–512.
- Kurien, B., Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods* 38: 283-293.
- Langdon, Simon P. *Cancer Cell Culture: Methods and protocols*, New Jersey, Humana Press; 2004.
- Laranjo, M. (2010). Ação intracelular da terapia fotodinâmica. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Laranjo, M., Serra, A., Abrantes, M., Piñero, M., Gonçalves, A., Casalta-Lopes, J., Carvalho, L., Sarmiento-Ribeiro, A., Rocha-Gonsalves, A., Botelho, F. (2012). 2-Bromo-5-hydrophenylporphyrins for photodynamic therapy: photosensitization efficiency, subcellular localization and *in vivo* studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 10 (1): 51-61.

- Laville, I., Pigaglio, S., Blais, J-C., François, D., Loock, B., Maillard, P., Grierson, D., Blais, J. (2006). Photodynamic efficacy of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 49: 2558-2567.
- Liu, Y. (1999). Understanding the biological activity of amyloid proteins *in vitro*: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. *Programme of neuro-psychopharmacology and biological psychiatry* 23: 377-396.
- Longo-Sorbello, S., Saydam, G., Banerjee, D., Bertino, J.,. (2006). Cytotoxicity and cell growth assays. In: *Cell Biology*. 3rd ed. USA: Elsevier Inc.. pp. 315-324.
- Lukšienė, Ž. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina* 39 (12): 1137-1150.
- Mahajan, A., Crum, A., Jonhson, M., Materin, M. (2011). Ocular neoplastic disease. *Seminars in ultrasound, computed Tomography and magnetic resonance* 32 (1): 28-37.
- Makky, A., Daghdjina, K., Michel, J-P., Maillard, P., Rosilio, V. (2012) Assessment of the relevance of supported planar bilayers for modeling specific interactions between glycodendrimeric porphyrins and retinoblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818: 2831-2838.
- Marchal, S., Bezdetnaya, L., Guillemin, F. (2004). Modality of cell death induced by Foscan®-based photodynamic therapy in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Biochemistry* 69 (1): 45-49.
- Marchal, S., François, A., Dumas, D., Guillemin, F., Bezdetnaya, L. (2007). Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *British Journal of Cancer* 96: 944-95.

- Mehta, M., Sethi, S., Pushker, N., Kashyap, S., Sen, S., Bajaj, M. S., Ghose, S. (2012). Retinoblastoma. *Singapore Medical Journal* 53 (2): 128-136.
- Meresse, P., Bertounesque, E., Imbert, T., Monneret, C. (1999). Synthetic approaches to condensed aromatic analogues from etoposide. Synthesis of A-ring pyridazine picroetoposide. *Tetrahedron* 55: 12805-12818.
- Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugan, M., Rao, K., Cahnd, P., Bhat, B. (2011). Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (comet assay). *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapy* 2 (2): 107-111.
- Noble, C., Guo, Z., Hayes, M., Marks, J., Park, J., Benz, C., Kirpotin, D., Drummond, D. (2009). Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 64 (4): 741-51.
- O'Malley, Y., Reszka, K., Britigan, B. (2004). Direct oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by pyocyanin and other redox-active compounds independent of reactive oxygen species production. *Free radical biology & medicine* 36 (1): 90-100.
- O'Connor, A., Gallagher, W., Byrne, A. (2009). Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* 85: 1053-1074.
- Ohnishi, Y., Murakami, M., Wakeyama, H. (1990). Effects of hematoporphyrin derivative and light on Y79 retinoblastoma cells in vitro. *Investigative ophthalmology and visual science* 31 (5): 792-797.
- Ohnishi, Y., Tamana Y., Minei M. (1986) Photoradiation therapy using radiation argon laser and a hematoporphyrin derivative for retinoblastoma – a preliminary report. *Japanese Journal of Ophtalmology* 30 (4): 409-419.

- Oleinick, N., Morris, R., Belichenko, I. (2001). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 1-21.
- Olive, P., Banáth, J. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1 (1): 23-29.
- Papazidis, K., Geromichalos, G., Dimitriadis, K., Kortsaris, A. (1997). Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods* 208: 151-158.
- Pervaiz, S., Olivo, M. (2006). Frontiers in research review: Cutting-Edge molecular approaches to therapeutics. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 551-556.
- Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J-Y., Habraken, Y., Agostinis, P. (2003). Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochemical Pharmacology* 66: 1651-1659.
- Ray, A., Gombos, D. (2012). Retinoblastoma: An overview. *Indian Journal of Pediatrics* 79 (7): 916-921.
- Rice, G., Bump, E., Shrieve, D., Lee, W., Kovacs, M. (1986). Quantitative analysis of cellular glutathione by flow cytometry utilizing monochlorobimane: some applications to radiation and drug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Cancer research* 46: 6105-6110.
- Rousset, N., Kerninon, E., Eléouet, S., Néel, T., Auget, J-L., Vonarx, V., Carré, J., Lajat, Y., Patrice, T. (200). Use of alkaline Comet assay to assess DNA repair after m-THPC-PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 56: 118-131.

- Ruiz-Galindo, E., Arenas-Huertero, F., Ramón-Gallegos, E. (2007). Expression of genes involved in heme biosynthesis in the human retinoblastoma cell lines WERI-Rb-1 and Y79: implications for photodynamic therapy. *Journal of experimental & clinical cancer research* 26 (2):195-200.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., Cossarizza, A. (1997). JC-1, but not DiOC<sub>6</sub>(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess  $\Delta\Psi$  changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters* 411 (1): 77-82.
- Sasnaukiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V., Kirveliene, V. (2009). Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis* 14: 276-286.
- Schmidt-Erfurth, U., Diddens, H., Birngruber, R., Hasan, T. (1997). Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. *British Journal of Cancer* 75 (1): 54-61
- Sery, T. (1979). Photodynamic killing of retinoblastoma cells with hematoporphyrin and light. *Cancer Research* 39: 96-100.
- Shahsavari, M., Mashayekhi, A. (2009). Pharmacotherapy for Retinoblastoma. *Journal of Ophthalmic Visual Research* 4 (3): 169-173.
- Shao, J., Xue, J., Dai, Y., Liu, H., Chen, N., Jia, L., Huang, J. (2012). Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phtalocyanine photosensitizer Photocyanine: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest. *European Journal of Cancer* 48: 2086-2096.
- Sharman, W., Allen, C., van Lier, J. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* 4 (11): 507-517.

- Shields, C., Shields, J. (2004). Diagnosis and management of retinoblastoma. *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center* 11(5): 317-27.
- Shields, C., Shields, J. (2010). Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma: the beginning of a long journey. *Clinical and experimental ophthalmology* 38 (6): 638-43.
- Stephan, H., Boeloeni, R., Eggert, A., Bornfeld, N., Schueler, A. (2008). Photodynamic therapy in retinoblastoma: effects of verteporfin on retinoblastoma cell lines. *Investigative ophthalmology and visual science* 49 (7): 3158-63.
- Tarpey, M., Wink, D., Grisham, M. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 286 (3): 431-44.
- Tessema, M., Lehmann, U., Kreipe, H. (2004). Cell cycle and no end. *Virchows archive* 444 (4): 313-323.
- Tong, Z., Singh, G., Rainbow, A. (2000). The role of p53 tumor suppressor in the response of human cells to Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 71 (2): 201-210.
- Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J., Stewart, F. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *The oncologist* 11 (9): 1034-44.
- Tsukamoto, H., Mishima, H., Hirata, K., Sato, E., Kurokawa, T, Ishibashi, S. (1997). Differences in expression of glucose transporter protein isoforms in human retinoblastoma cell lines. *Japanese Journal of Ophtalmology* 41 (4): 226-230.
- van Heerde, W., Robert-Offerman, S., Dumont, E., Hofstra, L., Doevandans, P., Smits, J., Daemen, M., Reutelingspinger, C. (2000). Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovascular research* 45 (3): 549-559.

- Vedachalam, S., Choi, B-H., Pasunooti, K., Ching, K., Lee, K., Yoon, H., Liu, X-W. (2011). Glycosylated porphyrin derivatives and their photodynamic activity in cancer cells. *Medicinal chemistry communications* 2: 371-377.
- Wagner, O., Lifshitz, J., Janmey, P., Linden, M., McIntosh, T., Letierrier, J. (2003). Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23 (27): 9046-9058.
- Warwrzynska, M., Kalas, W., Bialy, D., Ziolo, E., Arkowski, J., Mazurek, W., Strzadala, L. (2010). *In vitro* photodynamic therapy with chlorin e6 leads to apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* 58: 67-75.
- Weydert, C., Cullen, J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols* 5 (1): 51-66.
- Whinther, J., Overgaard, J. (1987) Porphyrin photodynamic therapy in an experimental retinoblastoma model. *Ophthalmic Paediatrics Genetics* 8 (1): 49-52.
- Whinther, J., Overgaard, J. (1987). Experimental studies of photodynamic therapy in a retinoblastoma-like tumour. *Acta Ophthalmologica Supplements* 182: 140-143.
- Whinther, J., Overgaard, J. (1989). Photodynamic therapy of experimental intraocular retinoblastoma - dose-response relationship to light energy and photofrin II. *Acta Ophthalmologica* 67 (1): 44-50.
- Whinther, J., Overgaard, J. (1989). Photodynamic therapy of experimental intraocular retinoblastoma- dose-response relationship to light energy and photofrin II. *Acta Ophthalmologica* 67 (1): 44-50.

- White, L., Gomer, C., Doiron, D., Szirth, B. (1988). Ineffective photodynamic therapy (PDT) in xenograft model poorly vascularized. *British Journal of Cancer* 57: 455-458.
- Winther, J. (1987). Porphyrin photodynamic therapy in an experimental retinoblastoma model. *Ophthalmic Paediatrics and Genetics* 8 (1): 49-52.
- Winther, J. (1990). The effect of photodynamic therapy on a retinoblastoma-like tumour. An experimental *in vitro* and *in vivo* study on the potential use of photodynamic therapy in the treatment of retinoblastoma. *Acta Ophthalmologica Supplements* 197: 1-37.
- Woods, J., Traynor, N., Brancaleon, L., Moseley, H. (2004). The effect of Photofrin on DNA strands breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study. *Photochemistry and Photobiology* 79 (1): 105-113.
- Wu, S., Xing, D. (2012). Mechanism of mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis under Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Journal of X-ray Science and Technology* 20:363-372.
- Yamamoto N., Hooper, J., Yamamoto N., Yamamoto S. (1992). Tumoricidal capacities of macrophages photodynamically activated with hematoporphyrin derivative. *Photochemistry and Photobiology* 56 (2): 245-250.
- Yamamoto N., Sery, T., Hooper, J., Willett, N., Lindsay, D. (1994). Effectiveness of photofrin II in activation of macrophages and *in vitro* killing of retinoblastomacells. *Photochemistry and Photobiology* 60 (2): 160-164.
- Yang, Y., Ma, H. (2009). Western blotting and ELISA techniques. *Resercher* 1 (2): 67-86.

- Yow, C., Mak, N., Szeto, S., Chen, J., Lee, Y., Cheung, N., Huang, D., Leung, A. (2000). Photocytotoxic and DNA damaging effect of Temoporfin (mTHPC) and merocyanine 540 (MC540) on nasopharyngeal carcinoma cell. *Toxicology Letters* 115: 53-61.
- Zawacka-Pankau, J., Issaeva, N., Hossain, S., Pramanik, A., Selivanova, G., Podhajska, A. (2007). Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein *in vitro* and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2466-2472.
- Zhang, T., Tan, Y., Zhai, R., Liu, Z. (2013). DNA damage induced by oridonin involves cell cycle arrest at G2/M phase in human MCF-7 cells. *Wspolczesna Onkologia* 17 (1): 38-44.
- Zhao, H., Xing, D., Chen, Q. (2011). New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy. *European Journal of Cancer* 47: 2750-2761.
- Zong, W., Thompson, C. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes and Development* 20: 1-15.

