

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece 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 on 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 acknowledgement.



*“Supports, honors, and recognizes brothers and sisters of children diagnosed with cancer so they may face the future with strength, courage, and hope.”*

American Cancer Society



# **Agradecimientos**



Apesar desta dissertação ser um trabalho maioritariamente individual não seria possível sem a contribuição de algumas pessoas. Desta forma, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

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 Margarida Abrantes, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora desta dissertação, pela excelência na orientação, pela sua total disponibilidade, pelo exemplo de dedicação, de trabalho e de alegria que sempre demonstrou, dia após dia. Um agradecimento enorme pela partilha de conhecimento e por todo o tempo dedicado a este trabalho. Acima de tudo, um agradecimento pelo voto de confiança e autonomia depositado em mim.

À Mestre Salomé Pires, pela amizade, pela disponibilidade constante e empenho sempre demonstrados, pela ajuda incansável mesmo quando isso implicou um acréscimo de trabalho, pela paciência e pelo seu incentivo.

À Doutora Mafalda Laranjo, pelo exemplo de pessoa dedicada, trabalhadora, profissional e por se mostrar sempre disponível para ajudar.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves nomeadamente no auxílio prestado aos estudos de citometria de fluxo e pela partilha de conhecimento na interpretação dos resultados, e à Mestre Raquel Alves, um agradecimento por toda a ajuda e apoio durante este trabalho e pela simpatia demonstrada.

Ao Doutor Paulo Matafome pelo enorme auxílio prestado durante o *aortic ring assay*, pela partilha de conhecimento na interpretação dos resultados obtidos e pelo esclarecimento de todas as dúvidas que foram surgindo.

Aos Doutores Ana Brito e Fernando Mendes e ao Mestre João Casalta, 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 D.<sup>a</sup> Cláudia Caridade, pela imensa simpatia todos os dias.

Ao Mestre Ricardo Teixo, que por mais que diga será sempre insuficiente para mostrar o quão grata estou por toda a ajuda. O meu agradecimento especial, a ti, pela paciência, partilha de experiências, distribuição de trabalho, por todos os bons ensinamentos e pela boa disposição mais do que constante. Não poderia deixar de agradecer, pela ajuda enorme no trabalho científico, empenho demonstrado na análise dos resultados obtidos e todas as críticas construtivas que contribuíram para que eu me superasse a cada dia.

Aos melhores colegas de laboratório que se poderia pedir, pela intensa partilha de boas histórias, risos dos mais sinceros, e sobretudo, pela disponibilidade sem medida. À Beatriz, à Inês, ao Gonçalo, ao Nuno, ao Rafael, ao Pedro, ao André e ao Tiago, por terem feito valer a pena todos os minutos passados na vossa companhia.

À Direção do Núcleo de Estudantes do Departamento de Física 2015/2016, pelo desafio constante que me proporcionaram, por me deixarem tentar e criar de novo, por terem dito “tu consegues, acreditamos em ti” vezes sem conta, pelo embarque na loucura que não poderia ter corrido de maneira melhor e, acima de tudo, porque crescemos em conjunto, superámo-nos e mostramos que com bom trabalho o idealizável é possível.

À Estudantina Feminina de Coimbra, por todos os ensinamentos cheios de alma, porque somos milhões e milhões na terra inteira e por ser a melhor e mais bonita loucura que cometi.

À Yulia Martynova, por mostrar que a distância não separa nada nem ninguém. O meu agradecimento deste lado do mundo pelo apoio, por querer saber sempre mais e pelo carinho constante.



Aos melhores padrinhos que Coimbra me poderia ter oferecido, Fátima Machado, Nuno Santos, Gonçalo Chaves e Lea Velez. Por me mostrarem que Coimbra é a cidade dos amores e que de todas as lições não poderei esquecer que estes são “os nossos verdes anos”, pela ajuda infundável em todas as minhas dúvidas, por crescerem comigo, pelo apoio quando necessário e pelas poucas, mas enormes, palavras quando as lágrimas eram imensas.

À Mónica, Catarina, Vanessa e Telma, pela partilha de sabedoria e pelas palavras certas quando não sabia mais o que dizer nem escrever. Por me permitirem pensar sobre questões que pensei nunca terem resposta, por me fazerem olhar para o mundo de forma atenta, por me mostrarem que ao partilhar uma casa se constrói amizade a sério e, claro, por me deixarem acabar com a vossa paciência sempre que era e não era possível. No fundo, pelas gargalhadas sem fim e brincadeiras sem idade.

Aos meus primos, miúdos e graúdos, por estarem sempre lá para mim e pelo simples sorriso que torna sempre tudo perfeito e igual. Aos meus tios, por olharem por mim.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos que são mais do que irmãos e que nunca se esquecem de te apoiar, por mais diferente que seja o nosso fuso-horário. Jéssica, Diana, Cristiana, Ana, Sónia, André, Diogo, Márcia e André Rocha, o maior agradecimento pela amizade sem medida e sem quantificação temporal, pela partilha de bons momentos, por tornarmos a distância insignificante, pelas mensagens fora de horas que tanto sabem bem, pelos sorrisos cheios de amor, pelos abraços cheios de força, pelas parvoíces que nos fazem viajar pelo tempo e pela admiração que tanto me faz sonhar e acreditar que vou sempre conseguir mais.

Aos amigos da faculdade, esses que dizem ser para sempre. Ao Ashley, João Gouveia, Tó João, Catarina Sá, Sara Anjo, Diana Lourenço, Catarina Oliveira, Nuno Pinheiro, Pedro Oliveira, Pedro Rocha, Bruno Cerqueira, Iolanda Rodrigues, Sami Silva e Mariana Cortesão pelas demonstrações de carinho mais que gigantes quando os pais não podem estar por perto, pela partilha diária de tudo, pela criação de momentos para a vida, pela paciência que é sempre precisa, pelo bom humor que sempre nos rodeou, pela ajuda constante em tudo o que precisei, pelos momentos de sensatez e pelos momentos cheios de juízo e os outros sem juízo nenhum. Pela felicidade compartilhada que nunca teve princípio nem fim e porque sonhamos em ficar.

À Joana Costa, por ser igual a mim. Por olharmos o mundo da mesma forma, pela partilha desmedida de aventuras, pelas chamadas que não têm limite de minutos, pela troca de olhares que dizem tudo e mais alguma coisa, pelo conforto de uma mensagem e pela confiança que já está num patamar superior. Por termos vivido Coimbra com a mesma intensidade, pela amizade que nunca acaba, pela paciência que nunca se esgota e pela companhia que nunca vai embora. Por me mostrar o real significado de que a amizade não é uma só coisa boa, mas milhões de pequenos pormenores.

Ao Joel, por ser, sem dúvida, o melhor namorado do mundo. Por me permitir questionar aquilo que sou ou não capaz, por me conseguir pôr a testar quais os meus limites, pelo apoio nas minhas decisões e pelo pequeno grande orgulho demonstrado. Por consentir todas as brincadeiras e parvoíces que acabam com toda a paciência, pelas conversas fora de horas, pelos sorrisos a todas as horas, pelos infinitos abraços que me fazem querer sempre mais, por me manter sempre por perto, por nunca se cansar de me ouvir, mesmo quando as histórias já não fazem sentido e por ter a paciência que o amor exige. Sobretudo, por falar quando as palavras são necessárias e por partilhar o silêncio quando elas não são mais precisas. Por tudo isto e muito mais, pelo para sempre que será o tempo que nós quisermos.

Por último, mas sem dúvida o maior agradecimento que poderia fazer, aos meus pais. Estes ensinaram-me que só com amor se pode mudar o mundo e, sem eles, não teria quaisquer possibilidades de provar isso. Por serem enormes e nunca desistirem de mim, pela confiança depositada a 100%, pelo orgulho demonstrado em cada abraço e pela força. Pela alegria de cada retorno a casa e por me fazerem querer ser como eles, um dia. Por serem os verdadeiros super-heróis da vida real e, claro está, não poderia deixar de agradecer ao meu irmão que, apesar de ainda ser uma criança, me ensinou que tudo é sempre possível, que afinal as brigas são saudáveis e que tanto me consegue apoiar sem se aperceber.

# Índice



<b>Resumo</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Lista de fórmulas, abreviaturas e símbolos</b> .....	11
<b>I. Introdução</b> .....	19
1. RETINOBLASTOMA .....	21
1.1. Conceito básico .....	21
1.2. Sinais e sintomas do Retinoblastoma .....	24
1.3. Classificação do Retinoblastoma .....	25
1.4. Diagnóstico do Tumor da retina .....	27
1.5. Abordagens terapêuticas.....	28
2. TERAPIA FOTODINÂMICA.....	31
2.1. Princípios .....	31
2.2. Fotossensibilizadores .....	34
2.3. Fontes luminosas.....	36
2.4. PDT e angiogénese.....	37
2.5. PDT e tratamento do retinoblastoma .....	38
2.6. Perspetivas futuras .....	39
3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAS DO FOTOSSENSIBILIZADOR.....	40
4. OXIGENOTERAPIA.....	40
4.1. Hipoxia .....	41
4.2. Princípios da oxigenoterapia .....	42
4.3. Modos de aplicação .....	44
4.4. Efeitos adversos, indicações e contraindicações.....	45
<b>II. Objetivos</b> .....	49
<b>III. Materias e Métodos</b> .....	51
1. CULTURAS CELULARES.....	53
1.1. Propagação .....	53
2. TRATAMENTO FOTODINÂMICO.....	53

3.	TRATAMENTO HIPERBÁRICO.....	54
4.	COMBINAÇÃO DE TERAPIAS.....	54
5.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA.....	55
5.1.	Avaliação da proliferação celular pelo ensaio <i>alamar blue</i> .....	55
5.2.	Avaliação da proliferação celular pelo ensaio SRB.....	56
6.	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR.....	57
6.1.	Avaliação da viabilidade celular e tipos de morte celular.....	58
7.	AVALIAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO E DA ANGIOGÉNESE.....	60
7.1.	<i>Aortic ring assay</i> .....	60
8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>63</b>
1.	Avaliação da combinação da terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador ACS881F1 com a oxigenoterapia.....	65
1.1.	Avaliação da citotoxicidade celular.....	65
1.1.1.	Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio <i>alamar blue</i> .....	65
1.1.2.	Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio SRB.....	71
2.	Avaliação da combinação da terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador Photofrin® com a oxigenoterapia.....	74
2.1.	Avaliação da citotoxicidade celular.....	74
2.1.1.	Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio <i>alamar blue</i> .....	74
2.1.2.	Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio SRB.....	75
3.	Avaliação dos efeitos celulares.....	76
3.1.	Vias de morte celular.....	76
4.	Avaliação da vascularização e da angiogénese.....	77
4.1.	<i>Aortic ring assay</i> .....	78
<b>V.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>83</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>95</b>
<b>VII.</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>99</b>

# Resumo





O retinoblastoma é o tumor intraocular maligno mais comum nas crianças e apresenta uma incidência de 1 em cada 15 000 a 20 000 nascimentos. A terapia fotodinâmica (PDT) é um tratamento promissor no que diz respeito ao retinoblastoma e apresenta-se como uma abordagem terapêutica emergente no tratamento de outras neoplasias malignas, podendo induzir morte celular através de um mecanismo que envolve o stresse oxidativo, depois da ativação luminosa das moléculas fotossensibilizadoras. A oxigenoterapia (OT) é o método através do qual ocorre fornecimento de oxigénio, em maiores concentrações do que à pressão atmosférica normal, de forma a tratar ou a melhorar algumas condições patológicas. Esta terapia aumenta o teor de oxigénio no sangue e nos tecidos, o que reduz a inflamação e melhora as medidas de stresse oxidativo.

A presente dissertação permitiu avaliar a eficácia da combinação da ação fotodinâmica do fotossensibilizador ACS881F1 com a oxigenoterapia no retinoblastoma humano, *in vitro*. Verificou-se que, tanto para o ensaio do *alamar blue* como para o ensaio do SRB, o aumento do tempo de exposição à oxigenoterapia e o aumento da pressão parcial de oxigénio na terapia combinada apresentou uma tendência para a indução de melhores resultados, comparativamente à terapia fotodinâmica aplicada de forma isolada. Hipotetizou-se, também, a realização destes dois ensaios em células previamente submetidas a um ambiente hipóxico durante 2h, período após o qual imediatamente se realizaram os tratamentos com PDT e com OT+PDT (oxigenoterapia antes da terapia fotodinâmica), com 2 bar de pressão. De uma forma geral, foi observado que a associação da terapia fotodinâmica com o tratamento hiperbárico induziu um decréscimo da atividade metabólica e do conteúdo proteico, nas células de uma linha celular de retinoblastoma humano, compatível com a diminuição da viabilidade celular. A morte celular ocorreu preferencialmente por apoptose para a oxigenoterapia aplicada de forma isolada, a 2 bar de pressão (OT 2bar), e para a combinação da terapia fotodinâmica antes da oxigenoterapia a 1 bar de pressão (PDT+OT 1bar). Relativamente à avaliação da vascularização e da angiogénese pelo *aortic ring assay* verificou-se que, em todas as metodologias, a PDT aplicada de forma isolada apresentou melhores resultados do que a combinação OT60+PDT (oxigenoterapia a 2 bar, durante 60 min, antes da terapia fotodinâmica) e, por sua vez, a combinação referida foi preferível em relação à oxigenoterapia a 2 bar de pressão aplicada de forma isolada, durante 60 min (OT60 2bar).

A elevada citotoxicidade induzida pela PDT utilizando o fotossensibilizador ACS881F1 levou a que a utilização da oxigenoterapia em simultâneo com a PDT seja pouco representativa. Assim, por forma a realizar uma prova de conceito em relação ao potencial terapêutico da combinação da

terapia fotodinâmica e oxigenoterapia, recorreu-se ao fotossensibilizador Photofrin<sup>®</sup>, sendo que a combinação testada OT60 a 2 bar+PDT (oxigenoterapia a 2 bar durante 60 min antes da terapia fotodinâmica) foi a que apresentou melhores resultados.

Este trabalho pretende revelar, assim, o potencial do tratamento fotodinâmico em combinação com a oxigenoterapia aplicado ao retinoblastoma.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; oxigenoterapia; retinoblastoma; apoptose; *aortic ring assay*.

# **Abstract**



Retinoblastoma (RB) is the most common intraocular malignancy tumor in children with an incidence of 1 in 15000-20000 births. Photodynamic therapy (PDT) is an increasingly promising treatment for retinoblastoma and other cancers.

PDT can induce cell death by increasing oxidative stress, through light activation of non-toxic photosensitizer (PS) molecules. Oxygen therapy (OT) consists in oxygen delivery to a patient, at greater pressures comparing with atmospheric pressure. OT increases oxygen concentration in blood and tissues, and reduce inflammation and increase oxidative stress.

This scientific work allowed to evaluate the efficacy of the combination of photodynamic action ACS881F1 photosensitizer with oxygen therapy in human retinoblastoma, in vitro. It was found that for both assays, alamar blue and SRB, an increased exposure time to oxygen therapy and an increased pressure in combination therapy showed a tendency to induce better results compared with photodynamic therapy alone. Besides these experiments, was also hypothesized the performance of these two tests on cells previously subjected to a hypoxic environment for 2 h, immediately following by PDT and oxygen therapy before photodynamic therapy, 2 bar of pressure (OT + PDT 2bar). In general, it was observed that the photodynamic and 100% oxygen treatment induces a decrease in metabolic activity and protein content in retinoblastoma cell line, consequently a decrease of cell viability. Cell death occurs preferentially by apoptosis for oxygen therapy, 2 bar of pressure (OT 2bar) and oxygen 100% therapy after photodynamic therapy, 1 bar of pressure (PDT + OT 1bar).

The evaluation of vascularization and angiogenesis by aortic ring assay showed that, in all methodologies, PDT applied alone showed better outcomes than the combination oxygen therapy at 2 bar before photodynamic therapy (OT 60 + PDT) and this combination was better in relation to oxygen therapy applied alone, 2 bar of pressure (OT60 2bar).

The high cytotoxicity induced by PDT using ACS881F1 as photosensitizer showed that the addition of oxygen therapy was not representative. Therefore, it was used the photosensitizer Photofrin® showing the combination oxygen therapy before photodynamic therapy, 2 bar of pressure (PDT+OT60 2bar) the best outcomes. Therefore, is possible to conclude that this work presents great potential in photodynamic treatment combined with oxygen therapy of retinoblastoma.

Key-words: photodynamic therapy; oxygen therapy; retinoblastoma; apoptosis; aortic ring assay.



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





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

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

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – Singleto de oxigénio

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

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

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

ACS500 - 5,15-bis (2-bromo-3-hidroxifenil) porfirina

ACS88F1 - 5,15-bis (2-bromo-3-hidroxifenil) clorina

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AnV – Anexina V

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato, do inglês *adenosine triphosphate*

bFGF – do inglês *basic fibroblast growth factor*

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CT – Tomografia computadorizada, do inglês *computed tomography*

EBR – Feixe de radiação externa, do inglês *external beam radiation*

EUA – Estados Unidos da América

FBS – Soro bovino fetal, do inglês *Fetal Bovine Serum*

FITC - Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína, do inglês *fluorescein isothiocyanate*

FS – Fotossensibilizador

ICRB - Classificação Internacional do retinoblastoma intraocular, do inglês *International Classification of Retinoblastoma*

IP – Iodeto de propídeo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio

H<sub>2</sub>O – Molécula de água

HpD - derivados de hematoporfirina, do inglês *hematoporphyrin derivates*

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

LDL – Lipoproteína de baixa densidade, do inglês *low density lipoprotein*

LEDs - do inglês *Light-emitting diodes*

MIF – Média de intensidade de fluorescência

MRI – Imagem em ressonância magnética, do inglês *magnetic resonance imaging*

m-THPC - meta-tetrahidroxifenilclorina, do inglês *meta-tetra hydroxyphenyl chlorine*

PDT – Terapia fotodinâmica, do inglês *photodynamic therapy*

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sup>2•-</sup> - Ânion superóxido

OH• - Radical hidroxilo

OT – Oxigenoterapia, do inglês *oxygen therapy*

RB - Retinoblastoma

*RB1* – Gene retinoblastoma 1

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SRB - sulforodamina B

THPTS - tetrahidroporfirina-tetratosilato, do inglês *tetrahy-droporphyrin-tetratosylat*

UHMS - *Undersea and Hyperbaric Medical Society*

US – Ultrassonografia

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endotelial growth factor*

$\Delta\Psi_m$  – Potencial da membrana mitocondrial

# **Índice de quadros e figuras**



## Índice de quadros

<b>Quadro 1</b> - Variação geográfica da idade ao diagnóstico, mortalidade e primeiro sinal de apresentação. Retirada de Dimaras et al., 2012. ....	22
<b>Quadro 2</b> – Sistema Internacional de Classificação do Retinoblastoma (ICRB).....	26
<b>Quadro 3</b> – Fotossensibilizadores clinicamente aplicados. Retirado de Agostinis, et. al, 2011. ....	35
<b>Quadro 4</b> - Padrões de marcação com AnV/IP. ....	59

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Representação da estrutura interna do olho. Retirado de American Cancer Society, 2015. ....	22
<b>Figura 2</b> - Fotografia de um olho com uma lesão característica de leucocoria devido a retinoblastoma. Retirado de Teixo, 2013.....	24
<b>Figura 3</b> - Fotografia dos olhos de uma criança com estrabismo e leucocoria bilateral devido a retinoblastoma. Retirado de Teixo, 2013.....	25
<b>Figura 4</b> - Princípios da Terapia Fotodinâmica (PDT). O fotossensibilizador (PS) é administrado e depois de um período de distribuição, acumula-se seletivamente no tumor. A irradiação ativa o PS e a presença de oxigénio molecular desencadeia uma reação fotodinâmica que culmina com a produção do oxigénio singlete. Retirado de Agostinis et. al, 2011. ....	33
<b>Figura 5</b> - Reações do tipo I e do tipo II da terapia fotodinâmica (PDT). Retirado de Dolmans et al., 2003.....	34
<b>Figura 6</b> – Representação da estrutura química dos fotossensibilizadores ACS 500 e ACS 881F1. Retirado Teixo, 2013.....	40
<b>Figura 7</b> - Estrutura química do alamar blue. Retirado de Mikus & Steverding, 2000.....	55
<b>Figura 8</b> - Esquema representativo da realização do ensaio metabólico alamar blue. Retirado de Mikus & Steverding, 2000.....	56
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática da perda de integridade da membrana plasmática durante a apoptose. Retirado de (Engeland et al., 1998). ....	59
<b>Figura 10</b> - Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio alamar blue das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias. Os resultados foram	

realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com as concentrações de 5 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigênio puro (OT) foi realizada durante 30 min a 1 bar, antes (OT30+PDT) ou após (PDT+OT30) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo. .... 66

**Figura 11** – Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio alamar blue das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias. Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com as concentrações de 5 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigênio puro (OT) foi realizada durante 60 min a 1 bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo. .... 68

**Figura 12** – Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio alamar blue das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias. Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com a concentração de 100 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigênio puro (OT) foi realizada durante 60 min a 2 bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 6 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo. .... 69

**Figura 13** - Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de alamar blue com o FS ACS881F1, nas concentrações 50 nM, 100 nM e 500 nM. Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo a terapia com oxigênio puro (OT) foi realizada durante 60 min a 2 bar antes (OT60+PDT) da PDT. As terapias foram sujeitas a hipoxia 2h antes da PDT (Hip-PDT) e da terapia combinada (Hip-OT60+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo. .... 70

**Figura 14** - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio SRB das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias. Os resultados foram realizados 24h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com as concentrações de 50 nM, 100 nM e 500 nM de ACS881F1, enquanto a com oxigênio puro (OT) realizada durante 60 min a 1bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 6 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo. .... 71

**Figura 15** - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio SRB das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias. Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com a concentração de 100 nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) realizada durante 60 min a 2 bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 5 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.. .... 72

**Figura 16** - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB com o FS ACS881F1, nas concentrações 50 nM, 100 nM e 500 nM. Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo a oxigenoterapia (OT) realizada durante 60 min a 2bar antes (OT60+PDT) da PDT. As terapias foram sujeitas a um tratamento de hipoxia durante 2h antes da PDT (Hip-PDT) e da terapia combinada (Hip-OT60+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo. .... 73

**Figura 17** - Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de alamar blue com o Photofrin®, nas concentrações 50 nM, 100 nM e 500 nM. Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico realizado de forma isolada a após a oxigenoterapia (OT) (durante 60min a 2bar - OT60min+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de pelo menos 8 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.. .... 74

**Figura 18** - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB com o Photofrin®, nas concentrações 50 nM, 100 nM e 500 nM. Os resultados foram realizados 24 h após a realização

das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico realizado de forma isolada a após a oxigenoterapia (OT) (durante 60min a 2bar - OT60min+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de pelo menos 5 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo. .... 75

**Figura 19** - Viabilidade e tipo de morte celular das células de retinoblastoma humano Y79-GFP-Luc após a realização das terapias. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo pela dupla marcação com anexina-V/iodeto de propídeo, 24h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigénio puro (OT) foi realizada durante 60min, a 1 bar e a 2bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT) do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes... 76

**Figura 20** – Avaliação do sprout das células da aorta recolhida de ratos. Os resultados foram obtidos por aortic ring assay, 24h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100 nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) foi realizada durante 60 min a 2bar, antes do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de 11 experiências independentes... 78

**Figura 21** – Avaliação da densidade das células da aorta recolhida de ratos. Os resultados foram obtidos por aortic ring assay, 24 h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100 nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) foi realizada durante 60min a 2bar, antes do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de 16 experiências independentes. .... 79

**Figura 22** – Avaliação da confluência das células da aorta recolhida de ratos. Os resultados foram obtidos por aortic ring assay, 24h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100 nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) foi realizada durante 60 min a 2 bar, antes do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de 11 experiências independentes. .... 80



# **I. Introdução**



## 1. RETINOBLASTOMA

### 1.1. Conceito básico

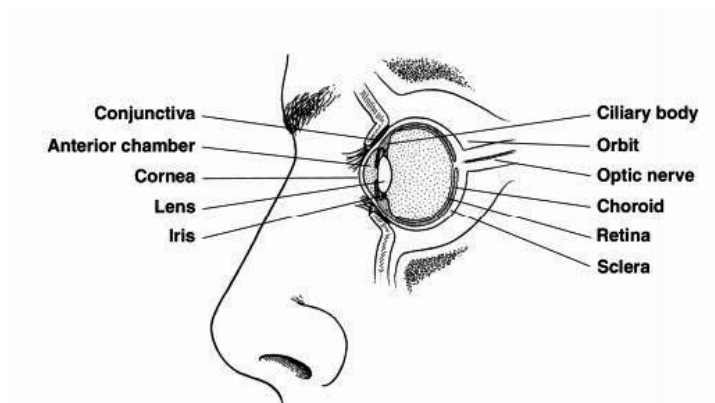
O cancro tem origem num processo complexo, composto por várias fases (Knudson, 1971). Ashley (Ashley, 1969) verificou que as neoplasias malignas constituem um processo que ocorre em duas etapas, fisiologicamente diferentes, como sugerido pelo processo de formação tumoral, e o número de mutações envolvidas em cada etapa varia com o tipo de neoplasia. No caso do retinoblastoma, vários estudos mostram que este é causado por dois eventos mutacionais, isto é, uma mutação nas células germinativas seguida de uma mutação nas células somáticas, tal como postulado por Knudson na denominada “*Two hit hypothesis*” (Knudson, 1971).

As neoplasias malignas podem ser então definidas como uma doença genética que requer alterações em genes supressores tumorais e em proto-oncogenes, que podem ocorrer devido a fatores intrínsecos ou a agentes exógenos iniciando-se com a proliferação descontrolada das células (Giordano & Lee, 2006).

O retinoblastoma (RB) é o tumor intraocular maligno mais comum nas crianças e apresenta uma incidência de 1 em cada 15000 a 20000 nascimentos. Este tumor, na ausência de tratamento, é sempre fatal, devido à progressão da doença por extensão intracraniana e doença sistémica, verificando-se uma esperança de vida de 2 anos na ausência de tratamento. Não existe diferença significativa na incidência entre raças, localizações geográficas ou o grau de desenvolvimento industrial (Wang, et al., 2015).

De forma a melhor compreender a evolução do retinoblastoma, é importante conhecer a constituição e a funcionalidade do olho humano (Figura 1). A cavidade principal do globo ocular é preenchido por um material denominado de humor vítreo. A face anterior do globo ocular possui lentes transparentes chamada de córnea e cristalino. A íris (parte colorida do olho que atua como um obturador de câmara) permite a entrada de luz no globo ocular de modo a impressionar a retina, camada interna de células localizada na parte posterior do olho. É constituída por células nervosas especializadas que são sensíveis à luz. Estas células sensíveis à luz encontram-se ligadas ao cérebro, através do nervo ótico, que se prolonga para fora da face posterior do globo ocular. O padrão de luz (imagem) que atinge a retina é enviado através do nervo ótico para uma área do cérebro denominada de córtex visual, permitindo-nos a visão (American Cancer Society, 2015).

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?



**Figura 1-** Representação da estrutura interna do olho. Retirado de American Cancer Society, 2015.

O processo de carcinogénese do retinoblastoma inicia-se pela mutação do gene *RB1* (retinoblastoma 1), que foi o primeiro gene supressor de tumores a ser descrito (Dimaras, et al., 2012). Nas populações onde a taxa de natalidade é maior verifica-se maior número de casos da doença. Cerca de 40-70% das crianças com retinoblastoma na Ásia e na África morrem, em comparação com 3-5% na Europa, Canadá e EUA, tal como descrito no Quadro 1 (Dimaras, et al., 2012).

**Quadro 1** - Variação geográfica da idade ao diagnóstico, mortalidade e primeiro sinal de apresentação. Retirada de Dimaras *et al.*, 2012.

	Mean age at diagnosis (months)		Mortality (%)	Cases with different first presenting signs (%)				
	Unilateral	Bilateral		Leucocoria	Proptosis	Swelling	Strabismus	Hypopyon
<b>Europe</b>								
All countries <sup>7</sup>	..	..	5-11%	..	..	..	..	..
<b>Asia</b>								
Malaysia <sup>8</sup>	..	..	..	..	22%	..	..	..
Taiwan <sup>9</sup>	27	16	36%	78%	17%	..	13%	..
<b>África</b>								
Mali <sup>10</sup>	..	..	..	..	55%	..	..	..
Nigeria <sup>11</sup>	31	15	..	62%	85%	30%	..	46%
Eastern Africa <sup>12</sup>	36	24	..	56%	30%	28%	11%	..
Kenya <sup>13</sup>	36	25	73%	..	..	..	..	..
<b>North America</b>								
Mexico <sup>14</sup>	31	20	11%	..	..	..	..	..
USA <sup>15</sup>	25	13	..	56%	..	<1%	24%	..
Canada	27*	15†	1%‡	~80%‡	0%‡	..	..	..
<b>Central America</b>								
Honduras <sup>16</sup>	..	..	35-73%	54-83%	..	..	..	..
<b>South America</b>								
Brazil <sup>17</sup>	..	..	5-22%	79%	..	10%	11%	..

O retinoblastoma pode ser classificado de acordo com dois critérios: ou unilateral ou bilateral, e hereditário (familiar) ou não hereditário (esporádico) (Dimaras, et al., 2012).

Alfred Knudson nos seus estudos tentou compreender a evolução desta neoplasia tendo por base o facto, há muito conhecido, de crianças unilateralmente afetadas pelo retinoblastoma serem diagnosticadas numa idade mais tardia do que as crianças afetadas bilateralmente. A partir desta observação formulou a hipótese “*Two hits*”, na qual os dois eventos distintos de mutação estão na base do desenvolvimento do retinoblastoma. A descoberta do gene *RB1* localizado no braço longo, região 1, banda 4 do cromossoma 13 (13q14) na década de 1980, confirma que o *RB1* foi o primeiro gene supressor tumoral a ser identificado (Dimaras, et al., 2012).

A perda da função de *RB1* inicia o retinoma e causa instabilidade genómica, mas é insuficiente para causar retinoblastoma. Por sua vez, a instabilidade genómica conduz a mudanças noutros genes. O evento que desencadeia a proliferação maligna, depois da mutação no gene *RB1* é, até à data, desconhecido (Dimaras, et al., 2012). Apesar disso, Comings assumiu que o gene que levava ao aparecimento de retinoblastoma poderia ser específico da retina (Comings, 1973). A perda de *RB1*, em muitas outras neoplasias em humanos, pode contribuir para a sua progressão do cancro, muito provavelmente, pela perda do controlo do ciclo celular e da estabilidade genómica (Dimaras, et al., 2012; American Cancer Society, 2015; Comings, 1973).

Em ambos os tipos de retinoblastoma hereditário e não hereditário, as mutações nos dois alelos do gene supressor tumoral referido iniciam o crescimento do tumor. No retinoblastoma hereditário, a primeira mutação no *RB1* (M1) é constitucional, predispondo as crianças ao tumor da retina. Mutações somáticas (M2) numa ou mais células da retina favorecem o crescimento tumoral (Dimaras, et al., 2012).

Todo o retinoblastoma bilateral é considerado hereditário mas apenas uma pequena proporção da doença unilateral pode ser transmitida às gerações futuras. Cerca de 1% das crianças que são portadoras da mutação (que pode ou não ter sido herdada) não desenvolvem tumor da retina (portadores não afetados), embora os seus descendentes que carreguem a mutação tenham 50 % de risco de desenvolver a doença (Dimaras, et al., 2012).

A perda da 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 ao retinoblastoma esporádico. O retinoblastoma esporádico é, frequentemente, encontrado numa idade mais avançada do que o

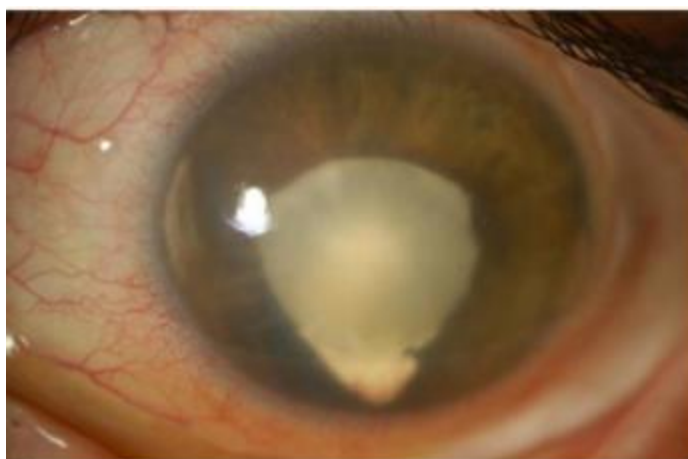
## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

retinoblastoma hereditário. Não existem causas relacionadas com o estilo de vida ou ambientais conhecidas para o retinoblastoma (Teixo, 2013; American Cancer Society, 2015).

### **1.2. Sinais e sintomas do Retinoblastoma**

Como o retinoblastoma ocorre normalmente em crianças muito pequenas, os seus portadores não têm a capacidade de descrever os seus sintomas. Por este motivo, a identificação de um problema na retina surge apenas com o aparecimento de sinais como a leucocória ou o estrabismo, identificados pelos pais ou pelo médico assistente. A leucocória, como se pode ver no exemplo da Figura 2, é caracterizada pelo aparecimento de um tumor de coloração branca, o qual produz um reflexo da luz na pupila, sendo geralmente o sinal mais precoce de retinoblastoma (Teixo, 2013; American Cancer Society, 2015).



**Figura 2** - Fotografia de um olho com uma lesão característica de leucocória devido a retinoblastoma. Retirado de Teixo, 2013.

A leucocória é mais fácil de reconhecer em ambientes que possuam pouca luz, pelo que a identificação deste sinal é complicada. Com base num estudo realizado no Reino Unido, mostrou-se que 1 em cada 4 crianças podem ter de aguardar mais de 4 meses até ser identificada a necessidade de supervisão por um oftalmologista, o que pode reduzir as suas hipóteses de sobrevivência (Dimaras et al. 2012). Outro sinal deste tipo de tumor está relacionado com o desalinhamento dos olhos, condição denominada de estrabismo. O estrabismo tem imensas causas possíveis. A maioria das vezes é causado por uma fraqueza dos músculos que controlam os movimentos oculares, mas também pode ser causado por retinoblastoma, como se pode ver no exemplo da Figura 3. Outros sinais tais como a heterocromia, o hifema, o glaucoma, a inflamação

e a celulite orbitária, podem estar presentes, mas são menos comuns como sintomas de retinoblastoma (Teixo, 2013).



**Figura 3** - Fotografia dos olhos de uma criança com estrabismo e leucocória bilateral devido a retinoblastoma. Retirado de Teixo, 2013.

O retinoblastoma exibe três modelos de crescimento característicos: o endofítico, o exofítico e o difuso (este de mais difícil diagnóstico, sendo análogo a uma inflamação ou hemorragia). No modelo endofítico o crescimento é intravítreo, no modelo exofítico o crescimento é sub-retiniano com invasão da coroideia, enquanto no modelo difuso o crescimento é análogo a uma inflamação ou hemorragia sendo esta forma de difícil diagnóstico. A forma mais usual de invasão celular verificada no retinoblastoma é para a retina, com atingimento do nervo ótico. De seguida, ocorre invasão tumoral das meninges, com disseminação, através do líquido cefalo-raquídeo, a todo o Sistema Nervoso Central. Pode ainda existir extensão tumoral a regiões extraoculares, o que pode conduzir à sua disseminação linfática e, conseqüentemente, ao aparecimento de metástases na órbita à distância, reduzindo ainda mais as hipóteses de sobrevivência (Mahajan et al. 2011; Teixo, 2013).

### **1.3. Classificação do Retinoblastoma**

A classificação da extensão do tumor, quando da apresentação inicial, é fundamental para a avaliação do prognóstico, a previsão de resultados, o tratamento e, mais importante, para a melhoria do tratamento, através de estudos clínicos rigorosos (Dimaras, et al. 2012).

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?

Na década de 60, foi criado um sistema de classificação do retinoblastoma, por Reese e Ellsworth (Classificação Reese-Ellsworth, 1963), baseado no estadió do tumor intraocular e na previsão de preservação do globo ocular, após tratamento com radioterapia externa (EBR, do inglês *external beam radiation*). Nesta classificação, os olhos afetados com retinoblastoma são classificados de acordo com a localização e o tamanho do tumor, sendo agrupados em cinco grupos (de I a 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 (Kiss, Leiderman, & Mukai, 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 conservadores. A classificação internacional do retinoblastoma (ICRB, do inglês *international classification of retinoblastoma*), baseia-se na previsão de resultados de olhos tratados com quimioterapia e tratamento focal com laser, tendo sido aceite na reunião da Sociedade Internacional de Genética de Doenças dos Olhos e Retinoblastoma, em 2003 (Dimaras, et al. 2012; Teixo, 2013).

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

Grupo	Subgrupo	Característica geral	Características específicas
A	A	Tumor pequeno	Retinoblastoma com menos de 3mm
A	A	Tumor maior	Retinoblastoma com mais de 3mm
A	A	Mácula	Retinoblastoma localizado na mácula
B	B	Justapapilar Fluído subretinal	Retinoblastoma localizado na justapapilar
C	C1	Metástases focais (próxima do tumor)	Metástases subretinais
C	C2		Metástases vítreas
C	C3		Metástases vítreas
D	D1	Metástases difusas (afastadas do tumor)	Metástases subretinais
D	D2		Metástases vítreas
D	D3		Metástases subretinais e vítreas
E	E	Retinoblastoma extenso	Aspecto opaco devido a hemorragias na câmara anterior, vítreo ou espaço subretinano. Invasão do nervo óptico pós-laminar, coróide, esclera, órbita e câmara anterior.



Este sistema de classificação, sistematizado no Quadro 2, baseia-se sobretudo na disseminação do tumor para o humor vítreo e para o espaço subretiniano, tendo também em consideração a dimensão do tumor e a sua localização (Kiss, Leiderman, & Mukai, 2008; Teixo, 2013).

### 1.4. Diagnóstico do Tumor da retina

A idade de diagnóstico do retinoblastoma é o resultado de ambas as bases moleculares. O efeito mortal do atraso no diagnóstico é óbvio na Ásia e na África, onde a proptose (protusão do olho devida à propagação do tumor na órbita) parece ser a apresentação mais comum (Dimaras, et al. 2012). Nestas regiões, fatores socio-económicos e o pobre reconhecimento da gravidade da doença, impede o acesso aos cuidados e ao tratamento. Infelizmente, um elevado número de casos e sistemas de cuidados de saúde sobrecarregados significam que as crianças sofrem, quando uma deteção precoce e um tratamento cirúrgico simples poderiam ter eliminado a doença (Dimaras, et al. 2012).

Para um diagnóstico adequado, os médicos podem recorrer a vários métodos, tais como o exame ocular, estudos de imagem e pesquisa de metástases. (Mehta, et al. 2012; Teixo, 2013).

De forma a minimizar o desenvolvimento de neoplasias secundárias, as crianças com retinoblastoma são aconselhadas a evitar tratamento desnecessário com radiações, pois as crianças submetidas a radioterapia podem enfrentar anormalidades no crescimento e maturação de seu esqueleto craniofacial ou, ainda, neoplasias malignas secundárias (Graaf, et al., 2012).

Assim, opta-se preferencialmente pela utilização de imagem para diagnóstico, sem recorrer a radiações ionizantes. A ecografia (US) e a ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*) devem ser usadas em vez de tomografia computadorizada (CT, do inglês *computed tomography*). A dose de radiação deve ser otimizada, medida com precisão e claramente registada para facilitar o seguimento dos doentes. A dose administrada deve preservar o equilíbrio entre os riscos e os benefícios, tanto no diagnóstico como no tratamento (Graaf, et al., 2012).

O diagnóstico de retinoblastoma por ecografia (e complementado por ressonância magnética, se necessário) é essencial para o tratamento e na exclusão de metástases. Exames imagiológicos são realizados para a confirmação da presença de retinoblastoma e para descobrir o quão possa ele se pode ter disseminado, ou seja, para o estadiamento da doença (Teixo, 2013).

A ecografia é um método barato, facilmente disponível e não-invasivo que utiliza as ondas sonoras para criar imagens de tecidos. Com esta técnica, podemos observar o retinoblastoma

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

como uma massa intraocular mais ecogénica que o vítreo, com calcificações que são áreas mais hiperrefletivas características. A monitorização da dimensão do tumor, durante a quimiorredução, pode ser realizada com recurso a este tipo de método de imagem, pois é muito sensível no diagnóstico de calcificações porém, pouco sensível na identificação de disseminação extra-ocular (Teixo, 2013; American Cancer Society, 2015). Recorrendo à CT, pode-se identificar uma massa intraocular com uma densidade mais elevada do que a do corpo vítreo e verificar se apresenta calcificações, melhor evidenciadas após a administração de um agente de contraste iodado. A presença destas calcificações é característica de retinoblastoma. A ecografia é considerada o melhor método para o diagnóstico de retinoblastoma, uma vez que pode ser aplicado sem anestesia geral, e não está associado a uma exposição a radiação externa (Teixo, 2013). A MRI requer muito mais do que a realização de um exame de rotina da órbita. A MRI de elevado contraste e resolução, especialmente quando associada à injeção de gadolínio e a supressão do tecido adiposo, deve ser usada sempre que possível para responder às questões clínicas importantes, como é o caso da avaliação da massa intraocular e para determinar a extensão extra-ocular da doença. Esta técnica provou ser mais sensível para a avaliação da infiltração do nervo ótico, da extensão extra-ocular da extensão intracraniana. É uma técnica bastante frequente, porque fornece imagens muito detalhadas do olho e estruturas adjacentes, sem o uso de radiação ionizante, uma vez que usa ondas rádio. Um importante fator que influencia o sucesso da MRI no diagnóstico deste tumor é o uso de *hardware* apropriado e de sequências de pulsos otimizados com resolução espacial adequada para MRI ocular (Graaf, et al., 2012); (American Cancer Society, 2015).

### **1.5. Abordagens terapêuticas**

Nos últimos anos surgiram novas opções terapêuticas para o retinoblastoma surgiram nos últimos anos, cada uma delas apresentando riscos, benefícios e limitações particulares a serem consideradas (Kronbauer et al., 2000). A enucleação do olho afetado, que consiste na remoção do globo ocular, tem sido o método de escolha para os casos unilaterais devido à ausência de efeitos colaterais durante o tratamento e a longo prazo. Quando há comprometimento bilateral, mas restrito ao globo ocular, ou unilateral com invasão do nervo ótico, sugere-se a associação de radioterapia e de quimioterapia no intuito de preservar o olho com possibilidade de visão. O olho removido é substituído por um implante orbitário de silicone, de plástico ou de hidroxiapatite,

pela técnica mioconjuntival, em que o cirurgião coloca o implante na órbita posterior e anexa os músculos retos ao fórnix da conjuntiva, o que resulta no movimento normal do implante (Dimaras et al. 2012; Teixo, 2013; American Cancer Society, 2015). O grande efeito colateral desta abordagem, como é óbvio, é a perda de visão do olho operado. Para além disso, a remoção do olho pode afetar o futuro crescimento ósseo e de outros tecidos circundantes (Dimaras et al. 2012; Teixo, 2013; American Cancer Society, 2015). A fotocoagulação e a crioterapia podem ser utilizadas em tumores pequenos e circunscritos e sem invasão vítrea (Kronbauer et. al, 2000; Mehta et al. 2012). Para além destas, abordagens tais como a telerradioterapia, a braquiterapia, a termo-ablação e a quimioterapioterapia podem ser comumente utilizadas no tratamento deste tipo de tumor.

A telerradioterapia ou a irradiação externa é uma abordagem bastante eficaz no tratamento do retinoblastoma, e foi o primeiro tratamento conservador usado nesta patologia. Este tipo de tratamento foca os feixes de radiação ionizante provenientes de uma fonte externa, sendo a radiação administrada cinco dias por semana, durante as semanas necessárias para perfazer a dose estipulada. Alguns dos efeitos adversos não têm um grau de gravidade muito elevado como, por exemplo, as queimaduras cutâneas nas áreas da pele que receberam radiação. Mais importante, porém, é a possibilidade de lesar os tecidos saudáveis adjacentes. Estes danos conduzem, eventualmente, a cataratas, problemas na retina e no nervo ótico, acompanhados de redução da visão. Para além disto, pode levar ao crescimento ósseo lento e de outros tecidos que se encontrem junto da região ocular irradiada (American Cancer Society, 2015; Teixo, 2013).

A braquiterapia, consiste na colocação de implantes radioativos 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 de tempo que pode ir de dois a quatro dias. No entanto, não é aconselhado em casos de tumores de grandes dimensões ou em tumores que atinjam a mácula (Teixo, 2013). Para além disso, os efeitos colaterais deste tratamento revelam ser menos comuns do que os que surgem com a telerradioterapia, destacando-se as lesões causadas na retina e no nervo ótico, podendo afetar a visão apenas alguns meses depois (American Cancer Society, 2015). Esta terapêutica permite delimitar a extensão da radiação à órbita e à área periorbitária, prevenindo problemas associados à telerradioterapia, nomeadamente o aumento da incidência de neoplasias secundárias e problemas faciais advindos de complicações após o tratamento, tais como a assimetria facial e a

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

dermatite peri-ocular. Esta terapia não tem sido associada ao aparecimento de neoplasias secundárias (Mehta et al. 2012; Teixo, 2013).

A termo-ablação 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. São atingidas temperaturas menos elevadas que no caso da fotocoagulação, poupando os vasos sanguíneos da retina. Esta técnica é utilizada sobretudo para retinoblastomas de pequenas dimensões (Mehta et al. 2012; American Cancer Society, 2015).

A quimioterapia baseia-se no uso de fármacos anti-tumorais no tratamento do retinoblastoma, sendo o objetivo primordial a redução do tamanho do tumor, para que posteriormente, sejam aplicadas outras terapias mais localizadas, tais como a fotocoagulação a laser ou a crio-ablação, de modo a erradicar totalmente a doença (American Cancer Society, 2015). Esta abordagem é aconselhável para casos de retinoblastomas intra-oculares 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. Os regimes-padrão consistem em 6 ciclos de doses de concentrações *standard* dos agentes quimioterapêuticos referidos (Mehta et al. 2012). Os efeitos secundários são os comumente observados por quimioterapia sistémica, tais como infeções bacterianas, sendo ainda elevado o risco do desenvolvimento de novos tumores noutros órgãos, principalmente com o uso do etoposídeo (Teixo, 2013). Devido aos efeitos secundários referidos, a quimioterapia tem-se tornado uma parte integral da gestão atual do retinoblastoma. No entanto, os tratamentos da mesma resultam em complicações notáveis, incluindo neoplasias secundárias, como, por exemplo, a leucemia mielóide aguda (Wang et al., 2015). Portanto, existe uma necessidade urgente de identificar novas estratégias terapêuticas para melhorar o resultado clínico de doentes com retinoblastoma (Wang et al., 2015).

Tal como o nome indica, a quimiotermodoterapia é uma abordagem terapêutica que combina a termo-ablação com a quimioterapia, e é utilizada em casos de tumores de grandes dimensões ou em tumores que já se tenham disseminado até áreas sub-retinanas. As duas técnicas são utilizadas sequencialmente, com algumas horas de intervalo, podendo atingir taxas de controlo tumoral de

89%. Os efeitos adversos que são devidos à quimioterapioterapia são, principalmente, a atrofia focal da íris, o descolamento da retina e a edema da córnea. Esta modalidade é vantajosa principalmente para casos de tumores de pequenas dimensões adjacentes à fóvea e ao nervo ótico (Teixo, 2013).

A crioblação tem como objetivo a destruição do endotélio vascular que suporta o tumor, devido a um rápido arrefecimento, permitindo, desta forma, permite um elevado influxo de agentes quimioterapêuticos na cavidade vítrea (Mehta et al. 2012). Consiste numa sonda metálica que é arrefecida a temperaturas muito baixas, matando as células tumorais. Pode ser utilizada para tratar tumores periféricos ou pequenos tumores recorrentes, após tratamento com outras abordagens (American Cancer Society, 2015). Apesar da eficácia demonstrada pelos tratamentos anteriores, os seus efeitos adversos são 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 pela telerradioterapia. Devido aos problemas causados pelo carácter mutagénico da radioterapia 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 (American Cancer Society, 2015; Teixo, 2013).

## 2.TERAPIA FOTODINÂMICA

### 2.1. Princípios

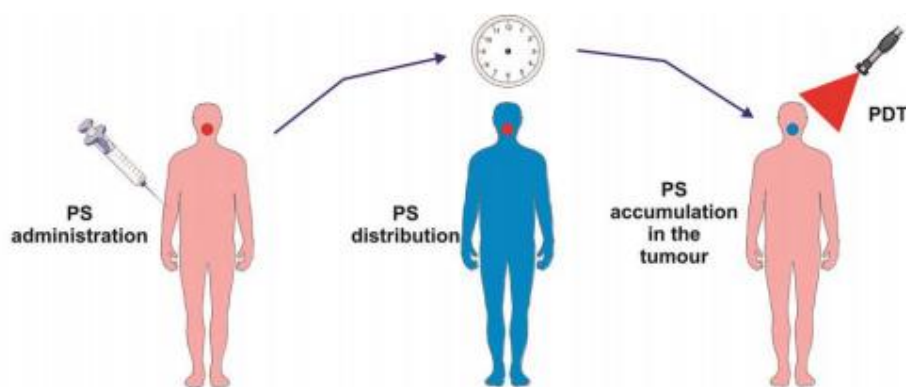
A terapia fotodinâmica consiste num tratamento promissor no que diz respeito ao retinoblastoma e outras neoplasias malignas, e tem tido um desenvolvimento rápido, sendo o centro de atenções em várias áreas médicas (Agostinis, et al., 2011).

A PDT é um processo que se realiza em duas fases, tal como descrito na Figura 4. Numa primeira etapa ocorre a administração de um fotossensibilizador, molécula inativa quando é administrada. Posteriormente, o local onde o tumor se encontra é irradiado com uma fonte luminosa, tendo esta um comprimento de onda apropriado, tanto para o fotossensibilizador como para a profundidade a que se localiza o tumor. A fonte luminosa pode ser enviada para praticamente qualquer órgão do organismo, por meio de dispositivos de fibra ótica flexível. A

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

fonte luminosa adequada vai promover a ativação fotoquímica do fotossensibilizador com produção oxigénio singleto e outras espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês *reactive oxygen species*), altamente citotóxicos, o que pode ter como consequência a morte celular. A seletividade desta técnica deve-se à capacidade de desenvolver fotossensibilizadores capazes de serem captados preferencialmente por lesões neoplásticas, e à entrega precisa da luz nos locais a tratar (Agostinis, et al., 2011). Como as células tumorais apresentam um conjunto de características que as diferenciam das células normais, dá-se uma acumulação preferencial do fotossensibilizador nas regiões tumorais. Sabe-se que as células tumorais apresentam maior atividade glicolítica o que resulta em elevadas concentrações de lactato. Assim, estas células têm um pH mais reduzido comparando com os tecidos normais o que, por sua vez, irá promover uma maior acumulação de fármacos que possam protonar na presença de pH mais ácido. De uma forma geral, a seletividade é tanto maior quanto o grau de hidrofobicidade do fotossensibilizador ou por conferirem propriedades anfifílicas à sua molécula. Na superfície das células tumorais existe maior expressão de recetores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), o que está correlacionado com o facto de fotossensibilizadores mais lipofílicos poderem associar-se a estas lipoproteínas. Sabe-se que as células tumorais têm um vasto conjunto de propriedades particulares que podem conduzir a uma maior acumulação do fotossensibilizador que, a par da iluminação local do tumor pela fonte de luz, torna a PDT uma terapia com elevada seletividade e capacidade de diminuir o aparecimento de neoplasias secundárias, tão características de outras abordagens terapêuticas (Jori, 1996; Teixo, 2013). Paradoxalmente, a natureza altamente localizada da PDT é igualmente uma limitação, porque o tratamento é ineficaz contra lesões metastáticas, que são a causa mais frequente de morte em doentes com cancro. Pesquisas recentes têm-se focado na otimização das condições ótimas da PDT, de modo a que possam induzir imunidade sistémica, de forma a ultrapassar esta limitação no futuro. A terapia fotodinâmica pode ser aplicada tanto antes como depois dos tratamentos mais convencionais, tais como a quimioterapia, a radioterapia, ou a cirurgia, sem comprometer estas modalidades terapêuticas. Nem a radiorresistência nem a quimiorresistência afetam a sensibilidade à PDT (Agostinis, et al., 2011).



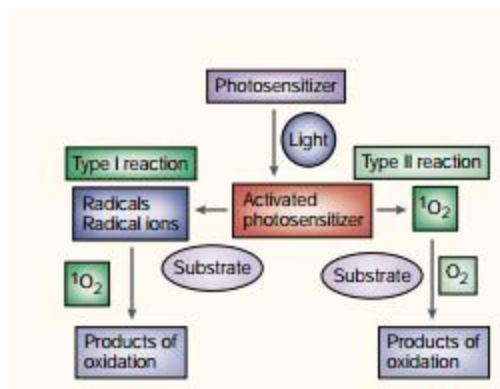
**Figura 4** - Princípios da Terapia Fotodinâmica (PDT). O fotossensibilizador (PS) é administrado e depois de um período de distribuição, acumula-se seletivamente no tumor. A irradiação ativa o PS e a presença de oxigênio molecular desencadeia uma reação fotodinâmica que culmina com a produção de oxigênio singlete. Retirado de Agostinis *et al.*, 2011.

Comparativamente a terapias mais convencionais, a PDT tem muitas vantagens, incluindo o ser pouco invasiva, ter toxicidade sistêmica baixa, ter seletividade para tecidos tumorais e sem efeitos negativos nos tecidos normais circundantes, razão custo/eficácia e rapidez no tratamento de doentes (Jeon, 2012). Os únicos efeitos adversos da PDT referem-se a dor, durante alguns protocolos de tratamento e fotossensibilidade cutânea persistente, que tem sido objeto de evasão por parte dos agentes mais recentes (Agostinis, *et al.*, 2011).

A ativação promovida pela luz irá levar à excitação da molécula do seu estado normal ( $^1FS$ ) para o estado de singlete excitado ( $^1FS^*$ ). Após esta ativação, pode existir um decaimento para o estado singlete normal, com emissão de fluorescência, mas sem ocorrer efeito fotodinâmico. Para que este efeito aconteça, é necessária uma conversão de spin para o estado tripleto excitado ( $^3FS^*$ ). Existem, assim, dois tipos de mecanismos, o do tipo I e o do tipo II, nos quais o fotossensibilizador no estado tripleto consegue reagir com biomoléculas. No mecanismo do tipo I, transferências de elétrons ou de prótons diretamente a partir do fotossensibilizador produzem iões, ou um eletrão, ou um próton, que é removido de substratos moleculares, formando radicais livres. Os radicais livres conseguem reagir rapidamente com o oxigênio molecular e, como resultado, há produção de ROS com a formação de peróxidos, de iões superóxido e de radicais hidroxilo, desencadeando a ativação da cadeia de radicais livres. Por sua vez, no mecanismo do tipo II, um estado eletronicamente excitado e altamente reativo do oxigênio, sendo designado por oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). A principal via de destruição das células deve-se a reações do tipo II, reações essas mediadas pelo processo de transferência de energia para o oxigênio e pelo retorno do fotossensibilizador para o seu estado fundamental. Com a

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?

ação de ambos os mecanismos, as lesões são criadas pela concentração existente de espécies reativas de oxigénio, tal como descrito na Figura 5 (Gursoy et al., 2012; Teixo, 2013).



**Figura 5** – Reações do tipo I e do tipo II da terapia fotodinâmica (PDT). Retirado de Dolmans *et al.*, 2003.

### 2.2. Fotossensibilizadores

Para o sucesso pretendido da PDT contra o cancro é essencial a seleção de um fotossensibilizador adequado. O fotossensibilizador ideal não deve ser tóxico na ausência de ativação luminosa, deve possuir absorção elevada no comprimento de onda da luz usado, deve ser preferencialmente captado pelas células tumorais, com posterior eliminação rápida pelo organismo, de forma a evitar fotossensibilidade prolongada (Gursoy et al., 2012)

A maioria dos fotossensibilizadores utilizados pela PDT nos tumores são baseados numa estrutura tetrapirrólica, idêntica à protoporfirina contida na hemoglobina. Um agente fotossensibilizador ideal deve ser um composto puro único que permita a análise de controlo de qualidade com baixos custos de produção e boa estabilidade em armazenamento. Deverá possuir elevada absorção da luz, com comprimentos de onda entre os 600 e os 800 nm, porque a absorção de fótons com comprimentos de onda muito superiores a 800 nm não providencia energia suficiente para excitar o oxigénio para o seu estado de singleto e formar ROS. A penetração da luz nos tecidos aumenta com o comprimento de onda, pelo que agentes com absorvância na zona do vermelho escuro, oferecem melhorias no controlo tumoral (Agostinis, et al., 2011; RR & CH, 2010).

Os fotossensibilizadores podem ser administrados por via intravenosa, ingeridos oralmente, ou aplicados topicamente dependendo do tipo de agente (Gursoy et al., 2012). Nos tecidos normais não deverá existir toxicidade no escuro e a eliminação do fotossensibilizador deve ser relativamente rápida, para minimizar os efeitos secundários fototóxicos. Estudos recentes sugerem que, por vezes, a resposta do tumor pode ser melhor quando a luz é entregue num



intervalo de tempo mais curto, quando o fotossensibilizador está ainda presente nos vasos sanguíneos. Nesta situação, produzem-se lesões nesses mesmos vasos. Embora o intervalo entre a administração do fotossensibilizador e a irradiação seja normalmente longa, permitindo que o fotossensibilizador tenha tempo suficiente para depurar dos tecidos normais, o recurso a tempos mais curtos pode ser igualmente vantajoso. Estudos realizados recentemente sugerem que a resposta inflamatória e a morte de células por necrose, após a irradiação, são importantes como função imuno-estimulante da PDT, ao passo que outros estudos sugerem que o fotossensibilizador conduz a uma morte celular predominantemente por apoptose e menor inflamação. Recentemente, alguns estudos revelaram que mecanismos de morte celular por apoptose induzidos por PDT são altamente imunogênicos e capazes de conduzir a imunidade anti-tumoral (Agostinis, et al., 2011). O primeiro fotossensibilizador, clinicamente usado na terapia anti-cancerígena, consistiu numa mistura solúvel em água de porfirinas não puras chamada de derivados de hematoporfirina (HpD, do inglês *hematoporphyrin derivates*). Mais tarde, estes derivados foram purificados, dando origem ao Photofrin®. Este fotossensibilizador ainda é bastante utilizado, mas apresenta baixa intensidade no pico de absorção de 630 nm e longa duração da fotossensibilidade para o doente (Agostinis, et al., 2011). Ao longo das últimas décadas, a comunidade científica realizou um esforço no sentido de desenvolver novos compostos que têm sido sugeridos como potencialmente úteis no tratamento de tumores com PDT. O Quadro 3 sumariza os fotossensibilizadores mais promissores que têm vindo a ser utilizados neste tipo de terapia.

**Quadro 3** – Fotossensibilizadores clinicamente aplicados. Retirado de Agostinis, *et. al*, 2011.

PHOTOSENSITIZER	STRUCTURE	WAVELENGTH, nm	APPROVED	TRIALS	CANCER TYPES
Porfimer sodium (Photofrin) (HPD)	Porphyrin	630	Worldwide		Lung, esophagus, bile duct, bladder, brain, ovarian
ALA	Porphyrin precursor	635	Worldwide		Skin, bladder, brain, esophagus
ALA esters	Porphyrin precursor	635	Europe		Skin, bladder
Temoporfin (Foscan) (mTHPC)	Chlorine	652	Europe	United States	Head and neck, lung, brain, skin, bile duct
Verteporfin	Chlorine	690	Worldwide (AMD)	United Kingdom	Ophthalmic, pancreatic, skin
HPPH	Chlorin	665		United States	Head and neck, esophagus, lung
SnEt2 (Purlytin)	Chlorin	660		United States	Skin, breast
Talaporfin (LS11, MACE, NPe6)	Chlorin	660		United States	Liver, colon, brain
Ce6-PVP (Fotolon), Ce6 derivatives (Radachlorin, Photodithazine)	Chlorin	660		Belarus, Russia	Nasopharyngeal, sarcoma, brain
Silicon phthalocyanine (Pc4)	Phthalocyanine	675		United States	Cutaneous T-cell lymphoma
Padoporfin (TOOKAD)	Bacteriochlorin	762		United States	Prostate
Motexafin lutetium (Lutex)	Texaphyrin	732		United States	Breast

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

Outra família de fotossensibilizadores utilizados atualmente é a família das clorinas, dos quais se destaca o meta-tetrahidroxifenilclorina (m-THPC, do inglês meta-tetra hydroxyphenyl chlorine). O m-THPC é um fotossensibilizador bastante potente, já que produz elevado número de moléculas de oxigênio singleto quando ativado por luz com o comprimento de onda de 652 nm, para o qual apresenta um pico de absorção e se verifica uma maior penetração da luz comparativamente com os 630 nm 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 não haja ativação do m-THPC nestes tecidos. De salientar que os doentes referem alguma dor durante os tratamentos com este FS. O m-THPC é utilizado no tratamento paliativo de tumores da cabeça e pescoço, bem como no tratamento de tumores da cavidade oral, do esófago, do estômago, do pâncreas e do pulmão (Teixo, 2013; Dougherty et al., 1998).

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, no tratamento da degenerescência macular da idade (DMI), do astrocitoma ocular, no melanoma uveal, sendo igualmente usado no tratamento de neoplasias cutâneas (Teixo, 2013).

Para além dos referidos fotossensibilizadores, existem muitos outros em desenvolvimento e em estudo, tais como a etiletiopurina de estanho (SnET2), o mono-L-aspartilclorina e6 (Npe6) e o lutécio texafirina (Lutex). Todos estes fotossensibilizadores apresentam picos de absorção para comprimentos de onda relativamente altos (660 nm, 664 nm, 690 nm e 732 nm, respetivamente), o que provoca baixa fotossensibilidade da pele (Agostinis, et al., 2011).

### **2.3. Fontes luminosas**

A luz para ativar o fotossensibilizador é um dos três componentes da terapia fotodinâmica (Jeon, 2012). A luz azul penetra de forma menos eficiente através do tecido, enquanto as radiações da zona do vermelho (visível) e infravermelho penetram mais profundamente. A região de comprimentos de onda entre os 600 e os 1200 nm é, muitas vezes, chamada de janela ótica dos tecidos. No entanto, um comprimento de onda com valores próximos dos 800 nm é suficiente para gerar  $^1\text{O}_2$ , porque os comprimentos de onda superiores têm energia suficiente para iniciar uma reação fotodinâmica. A escolha da fonte de luz deve ter em conta a absorção do

fotossensibilizador (excitação de fluorescência e espectros de ação), a doença (localização, tamanho das lesões, acessibilidade e características do tecido e o custo. A eficácia clínica da PDT depende da dose total de luz, o tempo de exposição à luz e modo de entrega de luz (Jeon, 2012).

Investigações recentes abordam fontes de luz, como lasers e fontes de luz incandescentes, para a utilização em terapia fotodinâmica (Agostinis, et al., 2011). Ambos os tipos têm sido usados para PDT e mostram eficácia semelhante. Ao contrário dos lasers de grandes dimensões, os lasers de diodo são pequenos e de baixo custo, de instalação simples, com dosimetria automática e calibração característica e uma vida operacional mais longa (Agostinis, et al., 2011). Estes últimos lasers já estão a ser direcionados especificamente para a PDT, pois o facto de terem elevada potência e propriedades monocromáticas, constituem uma vantagem para esta terapia (Agostinis, et al., 2011; Jeon, 2012). Fala-se ainda de LEDs (do inglês *Light-emitting diodes*), que são fontes de luz alternativas com larguras de banda espectrais estreitas e taxas de fluência elevadas (Agostinis, et al., 2011). A escolha das combinações ideais de fotossensibilizador, fontes de luz e parâmetros de tratamento é crucial no sucesso da terapia fotodinâmica (Agostinis, et al., 2011).

### 2.4. PDT e angiogénese

A angiogénese, definida como o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes, é um processo altamente complexo que envolve vários tipos de células e várias vias de sinalização. O processo referido envolve a estimulação das células endoteliais por vários fatores pró-angiogénicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*) (Aplin et al., 2008; Baker et al., 2012; Masson et al., 2002; Kurohane et al., 2001). Estudos clínicos recentes têm demonstrado que inibindo a angiogénese depois da quimioterapia e da radioterapia, pode ser uma abordagem para o tratamento de neoplasias (Bhuvaneswari et al., 2009).

A PDT pode provocar lesões a nível dos vasos sanguíneos tumorais, impedindo a chegada de nutrientes, o que constitui um importante mecanismo de destruição de neoplasias (Wang et al. 2012). As lesões na vascularização devidas à PDT podem envolver processos de vasoconstrição, de aumento da permeabilidade vascular, de formação de trombos e de paragem do fluxo sanguíneo (Wang et al. 2012).

Embora as respostas terapêuticas sejam encorajadoras, as recorrências têm-se verificado quando a PDT aplicada de forma isolada o que, conseqüentemente, provoca a angiogénese

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

tumoral. A distribuição de luz não homogênea, a dosagem incompleta do fotossensibilizador, o tipo de tecido e a dinâmica do tumor são alguns dos fatores que impõem restrições sobre a eficácia da terapia fotodinâmica. Além disso, como a PDT induz o stresse oxidativo pode causar um abaixamento da pressão parcial de oxigênio, condição que pode induzir a expressão de fatores de crescimento angiogênicos e de citocinas como uma resposta adaptativa (Bhuvaneswari et al., 2009).

A hipóxia tumoral é uma preocupação terapêutica, uma vez que reduz a eficácia da radioterapia, da quimioterapia e da PDT, conduzindo assim à angiogênese e ao aparecimento de metástases tumorais. Inúmeros estudos têm documentado o uso de agentes anti-angiogênicos, juntamente com tratamentos convencionais, para melhorar a resposta anti-tumoral (Bhuvaneswari et al., 2009). De um modo semelhante, combinando inibidores da angiogênese com a PDT, em estudos pré-clínicos, demonstrou-se claramente um aumento terapêutico e a eficácia (Bhuvaneswari et al., 2009). Por conseguinte, a fim de obter uma resposta completa e eficaz do tumor, usando a terapia de combinação e de segmentação de diferentes vias moleculares, sem aumentar a toxicidade, pode ser uma estratégia terapêutica alternativa (Bhuvaneswari et al., 2009).

### **2.5. PDT e tratamento do retinoblastoma**

As células tumorais podem desenvolver um mecanismo de resistência que reduzem a eficiência do tratamento, deixando o organismo vulnerável a recaídas. O aparecimento de resistência é pouco provável em caso de terapia fotodinâmica, uma vez que os fotossensibilizadores não são citotóxicos e induzem stresse oxidativo nas células tumorais através de ROS. A ativação do sistema imunitário combinada com a baixa resistência, fazem da PDT uma abordagem terapêutica anti-tumoral muito interessante (Walther *et al.*, 2014).

No entanto, muitas limitações técnicas estão ligadas aos fotossensibilizadores clinicamente aprovados, o que limita o seu uso para algumas aplicações, principalmente em dermatologia, em urologia e em gastroenterologia (Walther *et al.*, 2014).

Em oftalmologia, a aplicação clínica da PDT é para a neovascularização associada à degenerescência macular da idade. No entanto, o desenvolvimento real de uma nova geração de fotossensibilizadores deve definitivamente levar à avaliação pré-clínica da PDT como uma opção terapêutica para o tratamento de retinoblastoma. O seu uso no tratamento do retinoblastoma

pode consistir numa alternativa terapêutica promissora, não só nos países ocidentais no caso de formas tumorais resistentes, mas também em países menos avançados, devido à logística reduzida e aos custos associados a este tipo de tratamento (Walther *et al.*, 2014).

Num estudo realizado em que a molécula tetrahidroporfirina-tetratosilato (THPTS, do inglês *tetrahy-droporphyrin-tetratosylat*), usada como fotossensibilizador e que é ativada pela luz no comprimento de onda correspondente ao infravermelho, verificou-se que esta é rapidamente captada pelas células tumorais. Este composto é carregado positivamente e, portanto, pode ter como alvo o compartimento mitocondrial, levando a danos oxidativos mais rápidos (Walther *et al.*, 2014).

### 2.6. Perspetivas futuras

A PDT representa uma modalidade alternativa para o tratamento de neoplasias malignas humanas. Grande parte do trabalho clínico verificado até agora envolveu o tratamento de doentes com doença recorrente que não tinham respondido à terapia convencional.

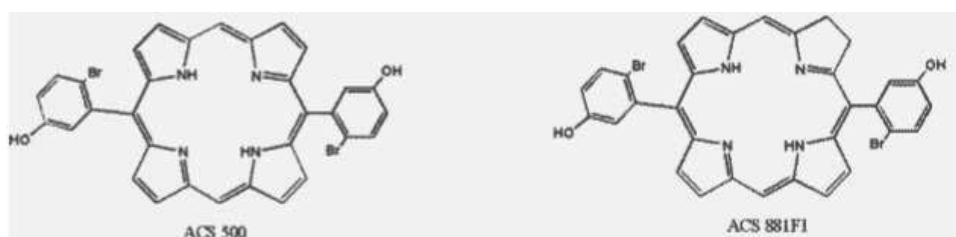
A investigação nesta área continua ativa e destina-se à definição dos locais mais apropriados para o uso da técnica. Algumas utilizações possíveis incluem a combinação de terapia fotodinâmica com a cirurgia, ou a quimioterapia, na redução dos tumores. O trabalho de laboratório, consistindo na procura da melhor compreensão dos mecanismos de citotoxicidade também continua, bem como investigações sobre alternativas com fotossensibilizadores para a melhoria da localização do tumor, menor fotossensibilidade cutânea, e picos de absorção em comprimentos de onda de luz que penetram mais profundamente dos que atualmente em uso. As tentativas de medição de oxigénio molecular permitirão o desenvolvimento de melhor dosimetria, a fim de correlacionar a resposta com níveis de tecidos reais do agente fotossensibilizador nos tecidos (Pass, 2012).

Finalmente, formas alternativas de entrega de luz, incluindo quimioluminescência, poderão ser capazes de entregar luz de alta intensidade localmente e de dispensar o uso de lasers. No entanto, o que esta técnica mais precisa para ser aceite como uma modalidade de tratamento do cancro, é a conclusão bem suportada por ensaios realizados que abordem a eficácia do tratamento (Pass, 2012).

Estudos pré-clínicos de novas técnicas devem continuar a definir e a expandir os limites desta abordagem experimental (Pass, 2012).

### **3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO FOTOSSENSIBILIZADOR**

Ao longo do estudo realizado para esta dissertação, foi utilizado o fotossensibilizador 5,15-bis (2-bromo-5-hidroxifenil) clorina (ACS 881F1), uma clorina derivada da porfirina 5,15-bis (2-bromo-5-hidroxifenil) porfirina (ACS500) (Serra et al., 2010).



**Figura 6** – Representação da estrutura química dos fotossensibilizadores ACS 500 e ACS 881F1. Retirado de Teixeira, 2013.

Este fotossensibilizador, bastante promissor, pertence à família das clorinas, que possuem uma estrutura química bastante semelhante à das porfirinas, com a diferença de o seu anel porfirínico não ser totalmente insaturado (Teixeira, 2013).

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 despertaram o interesse de toda a comunidade científica para o seu potencial como fotossensibilizador a utilizar em Medicina, devido a ter uma absorção num comprimento de onda elevado. 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 (Agostinis, et al., 2011; RR & CH, 2010; Teixeira, 2013).

Neste trabalho avaliou-se a potencialidade, a nível da citotoxicidade, do fotossensibilizador ACS88F1 na terapia fotodinâmica combinada com a terapia hiperbárica em células de uma linha celular de retinoblastoma humano.

### **4.OXIGENOTERAPIA**

Ao longo dos últimos 40 anos, a oxigenoterapia foi recomendada e utilizada numa ampla variedade de condições médicas, muitas vezes sem validação científica adequada de eficácia ou da segurança (Leach, Rees, & Wilmschurst, 1998; Callioglu et. al, 2015)

Um dos grandes avanços na pesquisa sobre o cancro, ao longo das últimas décadas, tem sido o reconhecimento crescente, contudo não universal, da adaptação da célula cancerígena ao seu microambiente, levando à doença invasiva e metastática. Em particular, as células tumorais são frequentemente confrontadas com uma redução significativa da disponibilidade de oxigênio (hipoxia intratumoral), que é um dos principais obstáculos à sobrevivência celular (Semenza, 2007). Desta forma, a oxigenoterapia poderá apresentar-se como uma nova abordagem terapêutica antitumoral, que possa ultrapassar esta limitação das terapias convencionais.

### 4.1. Hipóxia

O oxigênio é um componente essencial à vida. É um gás incolor e inodoro que constitui cerca de 21% da atmosfera, sendo essencial para a vida por ser um dos blocos básicos de construção do organismo. Todos os grandes componentes do organismo – água, proteínas, hidratos de carbono, lípidos – contêm oxigênio. Por outro lado, o oxigênio intervém na ocorrência de certas reações químicas que resultam na produção de energia. Esta energia é necessária para as mais variadas funções, tais como a circulação, a respiração e a digestão. Para além disso, é também importante para a manutenção da temperatura corporal.

Se o organismo é privado de oxigênio durante um longo período de tempo, as consequências podem ser graves, tais como a morte, após alguns minutos de privação. Uma oferta diminuída de oxigênio leva a múltiplos sintomas, onde se verifica uma redução, em todo o organismo, de determinadas funções importantes. Esta condição de reduzida pressão parcial de oxigênio é denominada de hipóxia (Neubauer & Walker, 1998).

A hipóxia é uma característica comum das células tumorais, sendo uma chave importante na progressão do tumor e na resistência à terapia anti-tumoral e uma característica do rápido crescimento tumoral e respetivas metástases. Os tecidos hipóxicos têm pressões parciais de  $O_2$  ( $pO_2$ ) mais baixas do que 2,5 mmHg. Como resultado de um desequilíbrio entre o fornecimento e o consumo de oxigênio, isto é, o rápido crescimento da massa tumoral leva ao aparecimento de regiões intratumorais pobremente vascularizadas, que se traduzem em áreas de hipóxia. Regiões com baixa oxigenação, comparativamente com os tecidos normais, têm sido encontradas em cancros da vulva, da próstata, do reto, do pâncreas, do pulmão, do cérebro, em sarcomas de tecidos moles, em melanomas malignos, em tumores metastáticos do fígado, em linfomas non-Hodgkin's e em neoplasias renais e mamárias. Regiões hipóxicas são também independentes das dimensões, do estadio, da histologia, do grau, da invasão ganglionar ou dos dados demográficos

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

do doente. A recorrência tumoral tem uma fração hipóxica maior do que os respectivos tumores primários. Assim, a resposta das células de tumor hipóxico é de extrema importância para a compreensão da progressão do tumor (Kunz & Ibrahim, 2003; Vaupel & Mayer, 2007; Castejón, 2015; Daruwalla & Christophi, 2006; Abrantes, 2013).

O crescimento dos tumores é limitado pela disponibilidade de oxigênio e de nutrientes e pela remoção de produtos residuais. À medida que um tumor cresce, as células sofrem privação de nutrientes e acidose, tornando-se hipóxicas, levando a que o seu microambiente se torne tóxico. As células tumorais podem adaptar-se ao microambiente isquêmico e pobre em nutrientes por três adaptações principais: o aumento do tecido de vascularização, a fuga à destruição apoptótica e o recorrerem à glicólise anaeróbia. Todos os três mecanismos são movidos pelo microambiente hipóxico adverso do tumor e permite a sobrevivência das células tumorais (Semenza, 2007; Daruwalla & Christophi, 2006).

As vias moleculares de sinalização que intervêm na angiogênese, a glicólise, a metastização, a morte celular e o pH, entre outros, são fatores regulados pelo estado de hipoxia (Semenza, 2007).

A hipóxia tem sido sugerida como um fator prognóstico adverso para o doente. Há uma resposta terapêutica desfavorável e uma pior sobrevida livre de doença pior para doentes com cancros associados a hipóxia ou a sarcomas de tecidos moles. Regiões de hipóxia tumoral estão associadas a células que proliferam lentamente. Essas células apresentam reduzida eficácia à quimioterapia, devido à rápida capacidade proliferativa, mas também foi demonstrado que diminui a eficácia de certos regimes de radioterapia, imunoterapia e terapia fotodinâmica. No caso da radioterapia, a resistência deve-se à reduzida produção de radicais livres pelos tecidos hipóxicos após a irradiação. Para além disso, as células tumorais destas regiões apresentam redução da radiosensibilidade (Semenza, 2007; Castejón, 2015).

O grau de inibição depende da gravidade e da duração da hipóxia (Vaupel e Mayer, 2007; Castejón, 2015).

### **4.2. Princípios da oxigenoterapia**

A oxigenoterapia (OT, do inglês *hyperbaric oxygen therapy*), é definida pela *Undersea and Hyperbaric Medical Society* (UHMS), como um tratamento em que o doente respira intermitentemente 100% de oxigênio, enquanto a câmara de tratamento é pressurizada com uma pressão superior à do nível do mar (1 atm). O aumento da pressão deve ser sistémico e pode ser



aplicado numa única pessoa ou em câmaras múltiplas (Leach, Rees, & Wilmshurst, 1998; Castejón, 2015; Gill & Bell, 2004).

A oxigenoterapia consiste no método de fornecimento de oxigénio a um doente, em concentrações superiores às da pressão atmosférica, de forma a corrigir ou a aumentar a pressão parcial de oxigénio no plasma e nos tecidos, que reduz a inflamação e que melhora o stresse oxidativo (Neubauer & Walker, 1998; Bent et al., 2012). Muito frequentemente, a OT é administrada como um tratamento de uma a duas horas, numa câmara selada especificamente criada para este procedimento.

De que forma a OT ajuda na rapidez do processo de tratamento? Sabe-se que o procedimento de tratamento não pode ocorrer sem níveis de oxigénio apropriados nos tecidos do organismo. Em muitos casos, tais como os que envolvem problemas circulatórios, não é possível alcançar a concentração de oxigénio adequada na região danificada e o processo natural do organismo se curar é impedido. Respirar oxigénio sob pressão pode, por vezes, superar essa situação (Neubauer & Walker, 1998).

Os efeitos da oxigenoterapia são baseados nas leis dos gases e efeitos fisiológicos e bioquímicos de hiperoxia e efeitos mecânicos da pressão (Kumar et al., 2015). Hiperóxia, como resultado da terapia mencionada, induz a formação de espécies reativas de oxigénio, que podem lesar as células tumorais pela indução do stresse oxidativo, mas desempenham um papel duplo no crescimento tumoral. Em células não-malignas, os níveis de ROS são relativamente baixos e regulados. Inicialmente, níveis baixos de ROS ajudam na progressão do tumor, através de lesões provocadas no ADN e proliferação descontrolada. Em excesso, porém, as ROS tornam-se tóxicas para as células tumorais induzindo a morte celular programada, denominada apoptose. As espécies reativas de oxigénio que potenciam os danos verificados são o anião superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o oxigénio singlete ( $^1O_2$ ) (Gill & Bell, 2004).

Muitos dos estudos experimentais e clínicos sugerem que a oxigenoterapia não tem efeito direto no crescimento dos tumores, e mostra ineficácia sem ser combinada com outras terapias. Porém, pode aumentar a eficácia de certas terapias que são limitadas devido ao microambiente do tumor hipóxico do tumor (Daruwalla & Christophi, 2006).

Desde que a OT ganhou visibilidade na área dos tratamentos anti-cancerígenos que tem vindo a ser utilizada como um tratamento adjuvante. Neoplasias avançadas da cabeça e do pescoço, e

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

alguns gliomas, têm um elevado número de células hipóxicas que tornam, por sua vez, a resposta à radioterapia insuficiente, pelo que têm sido alvo de tratamento com OT (Ogawa et al., 2013).

Para além de ser uma ótima escolha na combinação terapêutica, esta terapia remove o estímulo hipóxico e impulsiona a angiogénese, aumenta os níveis de ROS intratumorais sensibilizando, assim, as células para outras terapias (Daruwalla & Christophi, 2006; Ogawa et al., 2013; Castejón 2015).

De forma geral, neoplasias avançadas da cabeça e pescoço e do colo do útero têm um grande número de células em hipóxia que, por sua vez, exibem respostas pobres ao tratamento (Ogawa et al., 2013). Alguns tratamentos combinados com OT, para tratar tumores malignos, são a radioterapia, a quimioterapia e a terapia fotodinâmica (Daruwalla & Christophi, 2006).

A radioterapia combinada com OT tem sido usada clinicamente sob forma de duas aplicações: como agente terapêutico, para o tratamento de lesões causadas pela radiação e como radiosensibilizador, visando o aumento do efeito da radioterapia. Estudos realizados mostraram que a radioterapia imediatamente após OT constitui um aspeto positivo e seguro. Associadamente, a adição de OT pode proteger tecidos normais das lesões da irradiação (Ogawa et al., 2013; Moen & Stuhr, 2012).

A anatomia dos tecidos tumorais influencia o transporte de substâncias injetadas intravenosamente para as células cancerígenas, o que determina a eficácia dos agentes quimioterapêuticos. A oxigenoterapia pode ajudar a superar a resistência da quimioterapia em tumores hipóxicos, pelo aumento da perfusão do tumor e sensibilidade celular. Esta terapia combinada com a quimioterapia aumenta a absorção celular de certos fármacos anti-cancerígenos e a suscetibilidade das células a esses fármacos (Moen & Stuhr, 2012). Tal como descrito anteriormente, a resposta da PDT depende da oxigenação tumoral adequada, bem como da acumulação intratumoral do fotossensibilizador. Assim, a OT pode potenciar os efeitos da terapia fotodinâmica através do aumento da perfusão tumoral e do aumento da produção de ROS, especificamente da quantidade do oxigénio singleto (Castejón, 2015).

A OT está amplamente aceite como o único tratamento para a doença da descompressão (DCS) e para o embolismo gasoso arterial (Gill & Bell, 2004).

### **4.3. Modos de aplicação**

Quando a oxigenoterapia é aplicada como terapia adjuvante pode ser administrada tanto antes da irradiação, de forma a aumentar a pressão parcial de oxigénio nas células tumorais, como depois da irradiação, para reduzir os danos causados nos tecidos. Além disso, a administração realizada dentro de uma câmara de pressão enquanto os doentes são irradiados é difícil e caro. Um número limitado de unidades hiperbáricas está localizado na proximidade de departamentos de radioterapia (Daruwalla & Christophi, 2006; Castejón, 2015).

### **4.4. Efeitos adversos, indicações e contraindicações**

A OT é um tratamento relativamente seguro, mas apresenta alguns riscos, devido ao aumento da pressão e da hiperóxia (Gill & Bell, 2004). De acordo com os protocolos *standard*, se as pressões de oxigénio não excederem 3 atm, e se as sessões de tratamento forem limitadas a um máximo de 120 min, a terapia é considerada segura, apesar de que podem ocorrer alguns efeitos adversos (Castejón, 2015).

Algumas indicações para a OT aprovadas pela UHMS são a doença da descompressão e a embolia gasosa, o envenenamento por monóxido de carbono, a mionecrose, os abscessos intracranianos, as infeções de tecidos moles e os enxertos de pele. Por outro lado, a UHMS aprovou como contra-indicações à aplicação de OT o pneumotórax hipertensivo não tratado, a infeção no trato respiratório superior, a gravidez, a claustrofobia, história de cirurgia torácica ou cirurgia ao ouvido e lesões pulmonares assintomáticas. A única contraindicação absoluta é o pneumotórax hipertensivo não tratado, devendo ser excluído antes do tratamento. Existiram algumas preocupações de que a OT poderia estimular o crescimento maligno, aumentando a oxigenação do tumor. Esta indicação não foi confirmada (Feldmeier et. al, 2003) e concluiu-se que uma história relacionada com o crescimento maligno não deve ser uma contraindicação para a oxigenoterapia (Kumar et al., 2015; Gill & Bell, 2004).

Relativamente aos efeitos adversos, os mais conhecidos e observados são o barotrauma do ouvido médio, o barotrauma do ouvido interno, o “*sinus squeeze*” e a dor de dentes, que pode ocorrer durante a compactação ou descompactação, normalmente após o tratamento dentário que criou um espaço de ar sob uma obturação dentária. O barotrauma do ouvido médio é a complicação mais comum da oxigenoterapia, com uma incidência de cerca de 2% e o “*sinus squeeze*” a segunda complicação mais comum. Quando se verifica uma exposição prolongada a

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

este tratamento, ocorre toxicidade do oxigênio sendo o fôlego a complicação fatal mais comum de oxigenoterapia (Gill & Bell, 2004).

Até agora, evidências clínicas e experimentais do efeito da combinação de OT com outras terapias são limitadas. É importante não esquecer que, pela alteração dos níveis de oxigênio *in vivo*, esta terapia pode melhorar a radiosensibilidade dos tumores, reforçar a PDT ou o stresse oxidativo e a morte de células tumorais em quimioterapia (Daruwalla & Christophi, 2006).

A OT é uma terapia que tem custos elevados, não está universalmente disponível, e tem alguns riscos associados. A escassez de investigações nesta área torna difícil estabelecer a segurança e a eficácia no uso deste tratamento (Daruwalla & Christophi, 2006; Gill & Bell, 2004; Castejón, 2015).

## **II. Objetivos**



A terapia fotodinâmica apresenta-se como uma abordagem terapêutica emergente no tratamento de neoplasias, sendo vista como um tratamento ótimo no que diz respeito ao retinoblastoma. Por outro lado, a oxigenoterapia aumenta o teor de oxigênio no plasma e nos tecidos, e foi demonstrado que reduz a inflamação e melhora as medidas de stresse oxidativo. Assim sendo, o principal objetivo desta dissertação é avaliar a combinação da terapia fotodinâmica e da oxigenoterapia no retinoblastoma, como um tratamento promissor para este tipo de tumor.

Com base no descrito, pretende-se avaliar o efeito citotóxico de um fotossensibilizador: 5,15-bis (2-bromo-5-hidroxifenil) clorina (ACS 881F1) em células de uma linha celular de retinoblastoma humano.

A linha celular foi incubada com o fotossensibilizador referido para a realização da PDT. Para criar condições do aumento da pressão parcial de oxigênio foi usado a OT. Depois de submeter as células tumorais às terapias de combinação das terapias realizaram-se ensaios de viabilidade celular, ensaios metabólicos, avaliação do conteúdo proteico, stresse oxidativo e dos tipos de morte celular e os efeitos nos intervenientes da vascularização.





## **III. Materiais e Métodos**



## 1. CULTURAS CELULARES

### 1.1 Propagação

A linha celular de retinoblastoma Y79-GFP-Luc foi cedida ao Instituto de Biofísica e Biomatemática pelo Doutor Timothy W. Corson, investigador no Instituto *Eugene and Marilyn Glick Eye*, no Departamento de Oftalmologia da Universidade de Indiana. Esta linha celular foi descongelada e expandida em suspensão celular, tendo em conta as indicações cedidas (Corson et al., 2014). Desta forma, as células foram propagadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640, Sigma Aldrich®, EUA), suplementado com soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma Aldrich®, EUA), numa concentração final de 15%, 100µM de piruvato de sódio (Gibco, RU) e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina; Gibco, RU). A cultura celular foi mantida numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C numa incubadora Binder (Binder C-50, Alemanha).

Recorreu-se ao método do azul de tripano para ajustar as suspensões celulares nos diferentes estudos efetuados, tendo por base a contagem de células. Para isto, uma alíquota de suspensão celular corada com azul de tripano foi colocada numa câmara de *neubauer* e, posteriormente, observada num microscópio ótico invertido (Nikon, Eclipse TS 100, Japão) com ampliação de 100 vezes, de forma a conhecer qual o número de células.

## 2. TRATAMENTO FOTODINÂMICO

O tratamento fotodinâmico funciona por meio de uma reação fotoquímica, na qual há ativação do fotossensibilizador por uma fonte luminosa (Laranjo, 2010).

Nos estudos realizados com tratamento fotodinâmico, foram preparadas suspensões celulares em placas de 96 poços de fundo redondo, com uma concentração de 500 000 cél/mL perfazendo um volume de 150 µL por poço.

Posteriormente, procedeu-se à incubação com diferentes concentrações (5 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM) do fotossensibilizador 5,15-bis (2-bromo-3-hidroxifenil) clorina (ACS 881F1), tendo sido preparadas diferentes soluções com uma concentração que permitia a administração do mesmo volume de 1,5 µL (1%) em todas as condições. Realizaram-se dois controlos, um com células não tratadas e outro em que se administraram 1,5 µL do veículo de dissolução do fotossensibilizador, consistindo numa mistura ternária de água, de polietilenoglicol e de etanol [H<sub>2</sub>O/PEG400/EtOH (50/30/20, v/v/v)]. A irradiação efetuou-se 24 h após a incubação com o

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

fotossensibilizador. Previamente à irradiação centrifugaram-se as suspensões celulares com posterior remoção do meio, preservando o *pellet* e, de seguida, adicionou-se o mesmo volume de meio novo, sem FBS. A irradiação foi realizada recorrendo a uma fonte de luz equipada com um filtro vermelho ( $\lambda$  cut-off <560nm). A energia da luz foi medida com um radiómetro X97 da Gigahertz-Optic. A irradiação foi efetuada com um fluxo de 7,5 mW/cm<sup>2</sup> até atingir um total de 10 J.

### **3. TRATAMENTO HIPERBÁRICO**

A linha celular de retinoblastoma em estudo foi exposta a uma pressão de 1 bar e a uma pressão de 2 bar, numa câmara hiperbárica adaptada para o tratamento *in vitro* das células. A câmara em questão é capaz de manter a pressão num nível estável, e é possível ajustar a pressão (Silampos Lagos2 modificada) em dois aspetos: o tubo do reservatório de oxigénio foi diretamente equipado com a válvula de ajuste da panela de pressão e a outra válvula de segurança foi selada. A panela de pressão tem uma pressão máxima de segurança de 2,5 bar, o que nos permite realizar todos os estudos em condições de perfeita segurança. A tampa da panela de pressão tem um sistema que permite manter uma pressão constante e sem qualquer tipo de perdas. Uma válvula de descompressão foi adicionada ao sistema.

Foram estabelecidos dois períodos para a realização da terapia hiperbárica: 30 e 60 minutos. Durante o tratamento, a câmara foi colocada numa incubadora a 37 °C. Este protocolo foi melhorado com base na literatura (Castejón, 2015). A OT foi realizada 24 horas após a incubação com o fotossensibilizador, sendo realizada antes ou depois da irradiação. Desta forma, foram utilizados quatro esquemas de tratamentos diferentes: PDT+OT30min, PDT+OT60min, OT30min+PDT e OT60min+PDT.

### **4. COMBINAÇÃO DE TERAPIAS**

A combinação de terapias tem sido estudada de duas formas, alternando a aplicação da PDT em relação à OT. Assim, colocou-se a suspensão celular em placas de 96 poços de fundo redondo com 500 000 cél/mL. Todas as placas utilizadas têm dois grupos controlo, contendo células sem tratamento, e células incubadas com o solvente. Para além disso usaram-se diferentes concentrações de fotossensibilizador, de forma a observar os efeitos induzidos na atividade metabólica celular. O meio foi removido antes da irradiação.

## 5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA

Existem diferentes métodos que permitem estudar os efeitos citotóxicos do fotossensibilizador. Após a realização do tratamento fotodinâmico, utilizaram-se métodos de espectrofotometria, nomeadamente o ensaio de *alamar blue* e o ensaio com sulforodamina B (SRB), de modo a avaliar os efeitos na atividade metabólica e conseqüente efeito na proliferação celular.

### 5.1. Avaliação da proliferação celular pelo ensaio *alamar blue*

O *alamar blue* (Sigma, EUA) (**Figura 7**) é um ensaio colorimétrico quantitativo que utiliza uma sonda de oxidação-redução para avaliar a proliferação celular (Mikus & Steverding, 2000). A análise da proliferação e da citotoxicidade celulares é um passo vital na avaliação da viabilidade das células.

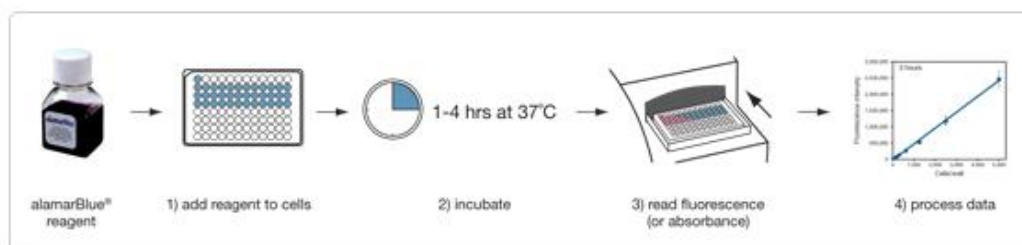


**Figura 7** - Estrutura química do *alamar blue*.  
Retirado de Mikus & Steverding, 2000.

Neste ensaio utiliza-se um indicador de viabilidade celular que fornece informação acerca da redução natural das células vivas, convertendo a resazurina numa molécula fluorescente. Isto é, a sonda usada 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. A quantidade de fluorescência produzida é proporcional ao número de células vivas. Este ensaio, quando comparado com outros existentes, tem como 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. Para além disso apresenta maior sensibilidade, é seguro e requer menos reagente e ainda apresenta como característica o facto de constituir um método rápido, simples e flexível (Antczak et al., 2007; O'Brien et. al, 2001).

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?

Na realização deste estudo distribuíram-se suspensões celulares com 500 000 células/mL em meio de cultura numa placa de 96 poços de fundo redondo, com um volume final de 150 µL. O tratamento fotodinâmico foi realizado *à priori*, com as condições descritas no ponto anterior e, para tal, procedeu-se à incubação com as concentrações de 5 nM, 50 nM, 100 nM e de 500 nM do fotossensibilizador ACS881F12. A análise da proliferação foi realizada 24h após irradiação. Assim, foram adicionados 7,5 µL de *alarmar blue* (5%), de modo a atingir a proporção de 1:20, e incubou-se durante 4h, a 37°C (Figura 7). 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 de ELISA (Biotek® Synergy HT) com os comprimentos de onda de 570nm e 620nm (Laranjo, 2010).



**Figura 8**– Esquema representativo da realização do ensaio metabólico *alarmar blue*. Retirado de Mikus & Steverding, 2000.

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

Onde  $\epsilon_{OX}$  corresponde ao coeficiente de extinção molar da forma oxidada do *alarmar blue*,  $A$  à absorvância dos poços tratados,  $A^{\circ}$  à absorvância dos poços controlo,  $\lambda 1$  corresponde a 570 nm,  $\lambda 2$  corresponde a 620 nm,  $(\epsilon_{OX})_{\lambda 2}$  corresponde a 117,216 e  $(\epsilon_{OX})_{\lambda 1}$  corresponde a 80,586.

### 5.2. Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio SRB

O método de SRB avalia a citotoxicidade e a proliferação celular, de forma indireta, utilizando uma sonda que se liga aos aminoácidos das proteínas celulares, o que permite obter uma estimativa da massa total de proteína (conteúdo proteico), a qual está relacionada com o número de células. Este método é baseado na capacidade da sulforodamina B se ligar electrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas, em células fixadas com TCA a 96% (Houghton et. al, 2007).

Devido às limitações que algumas técnicas apresentam, o ensaio SRB é uma técnica alternativa para avaliar a citotoxicidade. É um ensaio que apresenta elevada sensibilidade, é simples, fácil de reproduzir e oferece melhor linearidade (Houghton et. al, 2007).

Para a realização deste ensaio, as células foram preparadas nas mesmas condições em que foram preparadas para os estudos de *alamar blue*. Procedeu-se à incubação com as concentrações de 50 nM, 100 nM e de 500 nM do fotossensibilizador, realizando-se dois controlos, um com células não tratadas e outro com o veículo de administração do FS. O tratamento fotodinâmico foi realizado como descrito anteriormente, e a análise da proliferação foi feita 24 h após irradiação.

Aquando da análise da proliferação, foi necessário transferir as células das placas de 96 poços de fundo redondo para placas de fundo plano, por forma a aumentar a área de fixação das células. Para realizar a fixação, adicionaram-se 10% de TCA a 96%, durante 2 h (Skehan et al., 1990). Posteriormente descartou-se a solução e adicionaram-se às células 150 µL de sulforodamina B, incubando-se durante 1 h ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Após este período de tempo, lavou-se a placa de modo a remover o excesso de SRB e após secagem da placa adicionaram-se 200 µL de TRIS-NaOH (10 mM, pH de 10). A leitura da absorvância foi realizada com o comprimento de onda de 540 nm com um filtro de referência a 590 nm, num espectrofotómetro de ELISA (Biotek® Synergy HT, EUA). Os resultados foram expressos segundo a percentagem de inibição da proliferação das células tratadas em relação às culturas controlo, normalizadas para 100% (Nakamura et al. 2006).

## 6. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

Um equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular conduz à homeostase dos tecidos. Uma perturbação neste equilíbrio pode, por vezes, conduzir a alterações no funcionamento das células o que pode dar origem a diferentes condições patológicas nomeadamente o cancro. A respeito disto, muita atenção tem sido prestada ao processo de proliferação celular nos mecanismos associados à carcinogénese (Engeland et al., 1998).

Ao longo deste estudo laboratorial, pretendeu-se determinar quais os mecanismos intracelulares pelos quais os fotossensibilizadores impossibilitam a proliferação celular. Assim sendo, recorreu-se à citometria de fluxo, técnica importante que permite avaliar o fenótipo e variadas características das células. É baseada nas propriedades de dispersão da luz das células a serem analisadas e inclui emissão de fluorescência. As células podem ser marcadas com

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

anticorpos ligados a fluorocromos, coloridas com membrana fluorescente, citoplasmática ou corantes nucleares. Assim, devido à presença de recetores na membrana e de antigénios, do potencial da membrana, do pH, da atividade enzimática e do conteúdo proteico, a identificação dos diferentes tipos de células pode ser facilitada utilizando esta metodologia (Macey, 2007). Neste estudo foi avaliada a viabilidade celular e as vias de morte celulares induzidas pela combinação da PDT com a OT, através da dupla marcação com anexina V-FITC (AnV) e iodeto de propídeo (IP).

### **6.1. Avaliação da viabilidade celular e tipos de morte celular.**

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a viabilidade das células, usando a dupla marcação com Anexina V (AnV) acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e a iodeto de propídeo (IP).

A AnV tem um importante papel na inibição da coagulação sanguínea, sendo, portanto, uma proteína anticoagulante que se liga com elevada afinidade a fosfolípidos aniónicos, como por exemplo a fosfatidilserina. Em células 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 a fosfatidilserina (Koopman et al., 2016; Teixeira, 2013). Foi demonstrado, recentemente, que a perda da assimetria da membrana plasmática é um evento inicial da apoptose, resultando na translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo, que através da incubação das células com AnV-FITC pode ser identificada (Telford, Tamul, & Bradford, 2016).

Esta translocação verifica-se através da sua identificação por recetores específicos que sinalizam as células com resíduos externos deste fosfolípido para serem removidas do tecido (Telford et al., 2016).

Por outro lado, o iodeto de propídeo é um marcador fluorescente com a capacidade de intercalar no ADN celular. Contudo, a membrana celular é impermeável ao IP, sendo que este apenas intercala no ADN em células com a integridade da membrana celular comprometida, tal como acontece nas células em necrose ou em estados tardios de apoptose, permitindo assim a distinção entre células apoptóticas e necróticas (Crowley et al., 2016).

A utilização deste procedimento de dupla marcação permite assim agrupar e classificar a população celular em quatro grupos diferentes: o **grupo I**, caracterizado por células viáveis ou

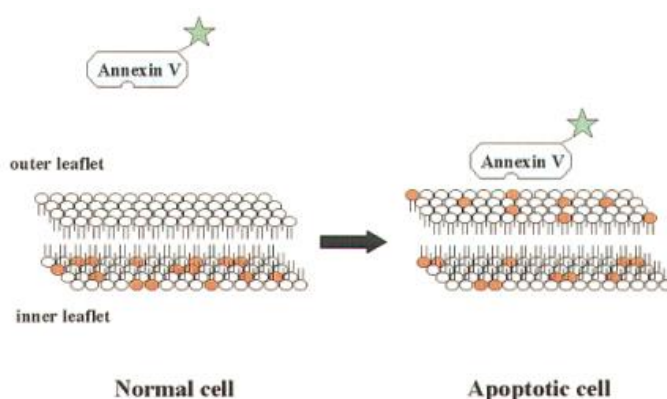


nenhuma morte celular mensurável; o **grupo II**, que se define como o grupo onde as células se encontram em apoptose inicial, onde a integridade da membrana se mantém intacta; o **grupo III**, constituído por células em apoptose tardia/necrose; e, por fim, o **grupo IV**, que contabiliza as células em necrose. Desta forma, cada um destes grupos possui um perfil de marcação característico de acordo com o apresentado no quadro 4 (Macey, 2007).

**Quadro 4** - Padrões de marcação com AnV/IP.

	<b>AnV-FITC</b>	<b>IP</b>
<b>Grupo I</b>	-	-
<b>Grupo II</b>	+	-
<b>Grupo III</b>	+	+
<b>Grupo IV</b>	-	+

Com base na exposição da fosfatidilserina é exposta durante a apoptose e sobre a capacidade da AnV se ligar com elevada afinidade à mesma, Koopman *et al.* (Koopman *et al.*, 2016) foram os primeiros a descrever um método que utiliza o hapteno aplicado extrinsecamente (isto é, com FITC ou a biotina) para detetar a apoptose. Como representado esquematicamente na Figura 8, a AnV marcada com hapteno liga-se na presença de  $Ca^{2+}$ , em concentrações da ordem do mM, a resíduos de fosfatidilserina que estão expostos no folheto exterior da membrana plasmática de células apoptóticas. A AnV não é capaz de se ligar a células viáveis, uma vez que, a molécula não é capaz de penetrar a bicamada fosfolipídica (Engeland *et al.*, 1998).



**Figura 9** – Representação da translocação dos resíduos de fosfatidilserina do folheto interno da membrana para o folheto externo. Retirado de (Engeland *et al.*, 1998).

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

Para se realizar esta técnica, utilizaram-se 2 milhões de células de uma suspensão celular, obtidas após centrifugação a 1300 xG, durante 5 min. O *pellet* obtido foi ressuspensão em PBS realizando-se nova centrifugação. O *pellet* resultante foi ressuspensão em 100 µL de tampão de ligação (1x) e incubaram-se as células com 2,5 µL de AnV-FITC e 1 µL de iodeto de propídeo (KIT Immunotech, Beckman Coulter, República Checa), durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação (1x) e, de seguida, realizou-se a análise no citómetro, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm para AnV-FITC e de 640 nm para o iodeto de propídeo. Os resultados desta técnica de dupla marcação são apresentados na forma de percentagem de células presentes em cada grupo.

## **7. AVALIAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO E DA ANGIOGÉNESE**

### **7.1. Aortic ring assay**

A angiogénese, como já foi abordado anteriormente, é necessária para o crescimento do tumor primário e para o aparecimento de metástases. É composta por diversas etapas distintas, incluindo a degradação da matriz extracelular, a migração celular, a proliferação e a reorganização estrutural. A sua inibição tem sido demonstrada em estudos pré-clínicos para supressão do crescimento tumoral (Go & Owen, 2003). Vários estudos *in vivo* e *in vitro* estão disponíveis para avaliar a angiogénese, com as respetivas vantagens e desvantagens. Por exemplo, ensaios *in vivo* simulam o processo natural, mas são muitas vezes complicados pelas respostas inflamatórias que podem interferir com a angiogénese. Nesta perspetiva, e com base em vários estudos já realizados, o *aortic ring assay* é o único que integra as vantagens de ambos os sistemas *in vivo* e *in vitro* (Go & Owen, 2003).

O *aortic ring assay* permite analisar a proliferação celular, a migração, a formação do tubo, a ramificação de microvasos, o recrutamento perivascular e a remodelação, sem a necessidade de dissociação celular. Desta forma, este ensaio proporciona uma avaliação mais completa dos processos angiogénicos em comparação com outros ensaios. De uma forma sucinta, este ensaio recapitula todos os passos necessários envolvidos na angiogénese (Baker *et al.*, 2012; Go & Owen, 2003; Masson *et al.*, 2002).

Nicosia e Ottinetti (Nicosia & Ottinetti, 1990) foram os primeiros a conceber o *aortic ring assay* em ratos (Baker *et al.*, 2012).

As vantagens referentes a esta técnica são vastas, tais como, por exemplo, o facto de fisiologicamente ser mais relevante do que outros métodos *in vitro*, não apresenta custos muito elevados e é uma técnica simples (Baker *et al.*, 2012).

Algumas das limitações do *aortic ring assay* estão associados à falta de envolvimento dos tecidos não aórticos, a falta de fluxo sanguíneo e a regressão dos vasos ao longo do tempo, dando uma janela limitada para análise (Baker *et al.*, 2012).

Uma das grandes vantagens desta técnica é a fácil adaptação a diferentes aplicações, como testar os efeitos de fatores de crescimento e de fármacos de moléculas pequenas, manipulação genética e combinações (Baker *et al.*, 2012).

O *aortic ring assay* envolveu três etapas: a preparação da aorta, a colocação da agarose em poços de cultura e a cultura dos anéis aórticos. Os poços de cultura em agarose servem de moldes para a matriz de colagénio ou de fibrina (Go & Owen, 2003).

## 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados apresentados nesta dissertação foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® 22.0 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA).

Inicialmente, avaliou-se a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas, bem como da homogeneidade de variâncias, recorrendo aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente. No caso da existência de uma distribuição normal e de homogeneidade de variâncias foram utilizados testes paramétricos. Em caso contrário, recorreu-se a testes não paramétricos.

As comparações entre condições terapêuticas quando se verificava uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram realizadas segundo o teste ANOVA de um fator. Recorreu-se ao teste Kruskal-Wallis no caso contrário. Utilizou-se o teste de Games-Howell para comparações múltiplas em caso de variâncias não presumidas ou, em caso contrário, utilizou-se a correção de Bonferroni.

Foi considerada uma significância de 0,05 para todas as comparações realizadas.



## **IV. Resultados**



Com o objetivo de avaliar a combinação da terapia fotodinâmica e da terapia hiperbárica no tratamento do retinoblastoma, foram realizadas um conjunto de metodologias em que os resultados se encontram descritos neste capítulo. Assim foi avaliada a atividade metabólica e o conteúdo proteico, a vascularização e a viabilidade celular, através da citometria de fluxo. Todas as experiências realizadas foram desenvolvidas no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em colaboração com o Mestre Ricardo Teixo e a Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, e sob a supervisão da Professora Doutora Maria Filomena Botelho.

### **1. Avaliação da combinação da terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador ACS881F1 com a oxigenoterapia**

#### **1.1 Avaliação da citotoxicidade celular**

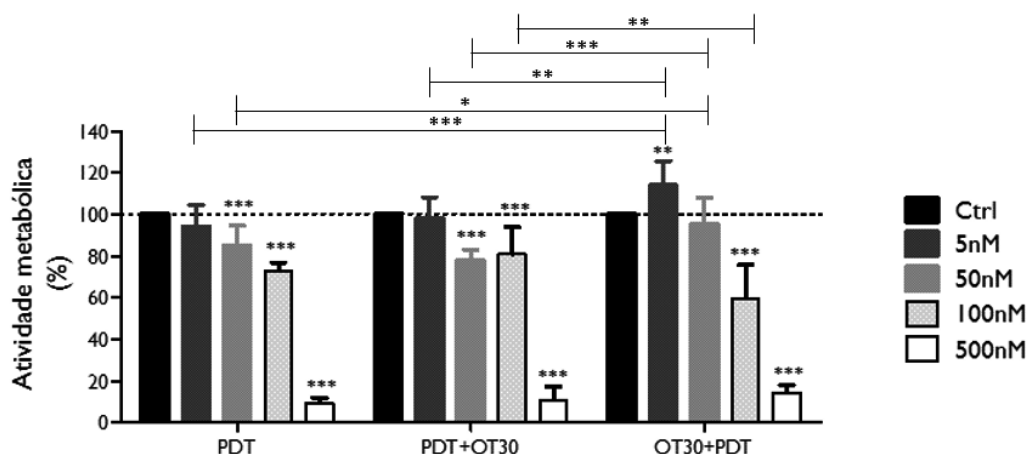
De modo a avaliar o efeito do tratamento fotodinâmico, utilizando o fotossensibilizador selecionado (ACS881F1), na linha celular de retinoblastoma humano, e o efeito da combinação com a oxigenoterapia, realizaram-se ensaios de citotoxicidade. Assim, realizou-se o ensaio de *alamar blue*, que avalia a viabilidade de forma indireta através de reações metabólicas e, posteriormente avaliada a viabilidade celular recorrendo ao ensaio de sulforrodamina B (SRB), o qual avalia o conteúdo proteico.

##### **1.1.1. Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio *alamar blue***

Como referido anteriormente, este ensaio permite analisar a proliferação e citotoxicidade celulares, sendo um passo essencial na apreciação da viabilidade celular.

O primeiro estudo consistiu, na avaliação da combinação das terapias, sujeitando as células ao tratamento fotodinâmico com o FS escolhido (ACS88F1) e exposição a 30 minutos de terapia com oxigénio puro à pressão de 1 bar, utilizando-se diferentes concentrações de FS (5 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM). Foram elaborados diferentes protocolos em que a OT durante 30 min foi aplicada antes e depois da PDT (OT30min+PDT; PDT+OT30min). Os resultados encontram-se descritos na Figura 10.

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?



**Figura 10 - Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio *alamar blue* das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias.** Os resultados foram realizados 24 h após as terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com as concentrações de 5 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigênio puro (OT) foi realizada durante 30 min a 1 bar, antes (OT30+PDT) ou após (PDT+OT30) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

De acordo com a Figura 10, a linha celular em estudo, sujeita a PDT de forma isolada, apresentou uma diminuição significativa da atividade metabólica em relação a controlo, com valores de  $85,12 \pm 9,42\%$  quando o tratamento foi realizado com a concentração de 50 nM ( $p < 0,001$ ), valores de  $72,90 \pm 3,85\%$  com a concentração de 100 nM ( $p < 0,001$ ) e valores de  $9,37 \pm 2,58\%$  com a concentração de 500 nM ( $p < 0,001$ ). Foi possível também verificar que existem diferenças significativas quando comparadas as várias concentrações de FS, sendo que quanto maior a concentração, maior a diminuição da atividade metabólica ( $p < 0,05$ ). Quanto às células sujeitas primeiro a PDT seguida de 30 min de terapia com oxigênio puro a 1 bar (PDT+OT30), verificou-se, de igual modo, uma diminuição significativa da atividade metabólica, comparativamente ao controlo, com valores de  $78,04 \pm 4,98\%$  com a concentração de FS de 50 nM ( $p < 0,001$ ), valores de  $80,75 \pm 12,98\%$  com a concentração de 100 nM ( $p < 0,001$ ) e valores de  $10,92 \pm 6,39\%$  com a concentração de 500 nM ( $p < 0,001$ ). Por último, quando as células foram primeiramente sujeitas a terapia com oxigênio puro a 1 bar durante 30 min seguida de PDT (OT30+PDT), verificou-se, novamente, uma diminuição significativa da atividade metabólica, comparativamente ao controlo, com valores de  $59,79 \pm 15,82\%$  com a concentração de FS de 100

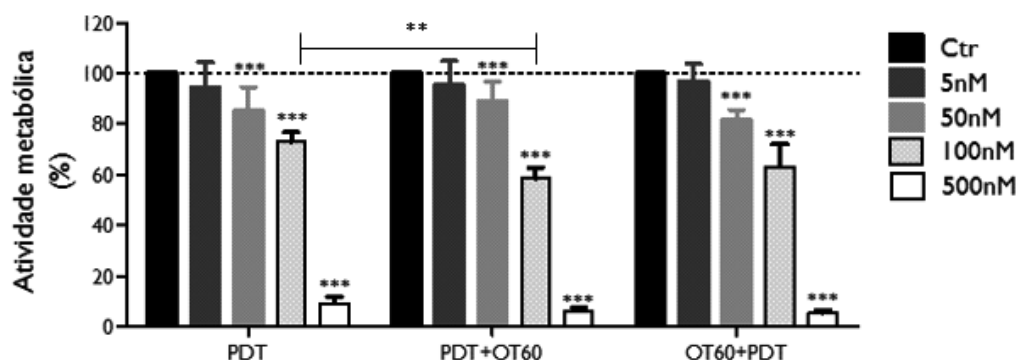


nM ( $p < 0,001$ ) e valores de  $14,36 \pm 3,72\%$  com a concentração de FS de 500 nM ( $p < 0,001$ ). Verificou-se ainda um aumento da atividade metabólica, comparativamente ao controlo, das células sujeitas a esta associação com a concentração de FS de 5 nM que atingiu os valores de  $113,88 \pm 11,83\%$  ( $p = 0,002$ ). Contudo, quando comparamos a proliferação celular com as duas modalidades de combinação, ou seja, antes e após a aplicação da terapia fotodinâmica (OT30+PDT e PDT+OT30, respetivamente), não existem diferenças com significado estatístico. Para além disso, foi possível verificar a existência de um incremento significativo da atividade metabólica comparando a PDT isolada com a terapia combinada OT30+PDT com as concentrações de ACS881F1 de 5 nM ( $113,88 \pm 11,83\%$ ;  $p < 0,001$ ) e de 50 nM ( $95,39 \pm 12,65\%$ ;  $p = 0,036$ ), comparativamente com as obtidas com as mesmas concentrações de PDT isolada (5 nM:  $94,38 \pm 9,93\%$  e 50 nM:  $85,12 \pm 9,42\%$ ). Seguindo a mesma linha de raciocínio, verificou-se também um aumento significativo da atividade metabólica na terapia combinada OT30+PDT com as mesmas concentrações de FS quando comparadas com a associação PDT+OT30 com valores de  $98,03 \pm 10,25\%$  ( $p = 0,004$ ) para a concentração de 5 nM e valores de  $78,04 \pm 4,98\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de 50 nM e um decréscimo significativo ( $p = 0,006$ ) da atividade metabólica apenas com a concentração de 100 nM cujos valores foram de  $59,792 \pm 15,82$  para a associação OT30+PDT e de valores  $80,75 \pm 12,98\%$  para a associação PDT+OT30.

Deste modo, e à luz dos resultados anteriormente obtidos, prosseguiu-se o estudo com a avaliação da combinação das terapias, sujeitando as células às mesmas condições de tratamento fotodinâmico com o mesmo FS, mas com uma exposição de 60 minutos à terapia com oxigénio puro a 1 bar de pressão. Tal como na avaliação anterior, foram realizados estudos com as duas associações (OT60min+PDT e PDT+OT60min), cujos resultados se encontram representados na Figura 11.

Mediante a análise do gráfico da Figura 11 é possível verificar que, a PDT aplicada de forma isolada, apresentou uma atividade metabólica significativamente inferior ao controlo, com valores de  $85,12 \pm 9,42\%$  para a concentração de 50 nM ( $p < 0,001$ ), valores de  $72,90 \pm 3,85\%$  para a concentração de 100 nM ( $p < 0,001$ ) e valores de  $9,37 \pm 2,58\%$  para a concentração de 500 nM ( $p < 0,001$ ). Foi também possível verificar que existem diferenças significativas quando comparadas a várias concentrações de FS, sendo que quanto maior a concentração, maior a diminuição da atividade metabólica ( $p > 0,05$ ). Uma vez mais é possível inferir que esta diminuição é significativamente dependente das concentrações de FS usadas.

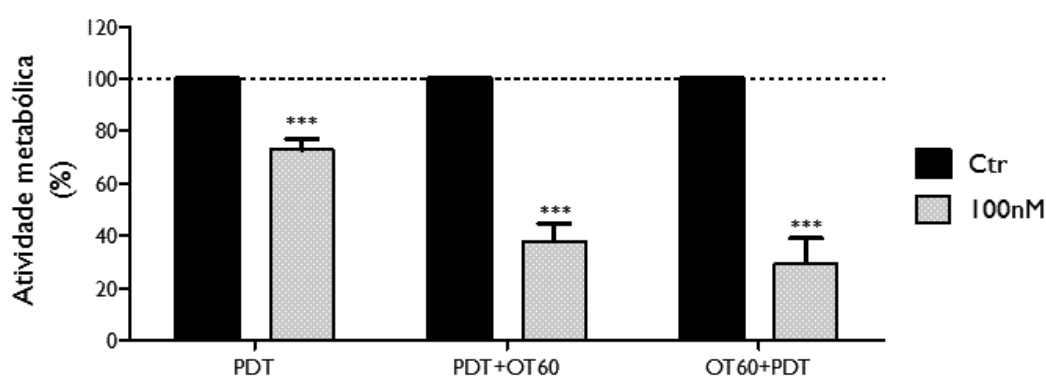
## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?



**Figura 11 – Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio *alamar blue* das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias.** Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com as concentrações de 5 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigênio puro (OT) foi realizada durante 60min a 1 bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controle, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes. Significância estatística: \* $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  em relação ao controle.

No que diz respeito às células sujeitas ao tratamento fotodinâmico seguido de 60 min de terapia com oxigênio puro a 1bar (PDT+OT60), verificou-se também uma diminuição significativa da atividade metabólica, comparativamente ao controle, valores de  $88,92\pm 8,04\%$  para a concentração de FS de 50 nM ( $p<0,001$ ), valores de  $58,48\pm 4,30\%$  para a concentração de FS de 100 nM ( $p<0,001$ ) e valores de  $6,37\pm 1,20\%$  para a concentração de FS de 500 nM ( $p<0,001$ ). Quanto à segunda modalidade de associação, ou seja, terapia com oxigênio puro durante 60 min a 1 bar seguida de PDT (OT60+PDT), verificou-se, novamente, uma diminuição significativa da atividade metabólica, comparativamente ao controle, com valores de  $81,56\pm 4,13\%$  para a concentração de FS de 50 nM ( $p<0,001$ ), valores de  $63,08\pm 8,88\%$  para a concentração de FS de 100 nM ( $p<0,001$ ) e valores de  $5,44\pm 1,18\%$  para a concentração de FS de 500 nM ( $p<0,001$ ). Além disso, para a concentração de FS de 100 nM a modalidade que apresentou a mais acentuada diminuição da atividade metabólica foi quando o tratamento fotodinâmico foi realizado previamente à OT com valores de  $72,90\pm 3,85\%$  para PDT aplicada de forma isolada comparativamente com  $58,48\pm 4,30\%$  para a associação PDT+OT60, diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,001$ ).

Seguidamente, foi investigado se o aumento da pressão a que as células estavam sujeitas poderia melhorar o resultado obtido nas combinações anteriores. Assim, aumentou-se a pressão até 2 bar e realizaram-se estudos apenas com 60 min de exposição a oxigénio puro, em combinação com PDT, depois (OT60min+PDT) e antes (PDT+OT60min), utilizando-se também apenas uma concentração de fotossensibilizador, a concentração de 100 nM. O ensaio de *alamar blue*, tal como nos estudos anteriores, foi realizado 24h após as células terem sido submetidas aos tratamentos. Os resultados encontram-se representados no gráfico da Figura 12.

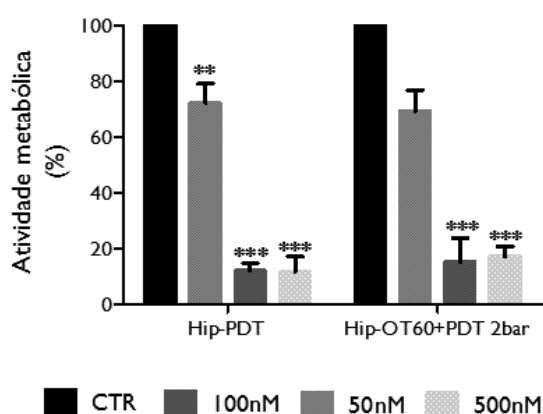


**Figura 12 – Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio *alamar blue* das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias.** Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com a concentração de 100 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigénio puro (OT) foi realizada durante 60 min a 2 bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 6 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

Com base nos resultados apresentados podemos dizer que houve uma tendência para que o aumento da pressão contribua para uma diminuição da sua atividade metabólica celular, uma vez que se verifica um decréscimo desta não só comparativamente à PDT isolada, mas também em comparação com os esquemas de combinação realizados à pressão de 1bar. De facto, os valores correspondentes à atividade metabólica foram de  $38,03 \pm 6,61\%$  para a combinação PDT+OT60 2 bar e de  $58,48 \pm 4,30\%$  para a combinação PDT+OT60 1bar enquanto na combinação OT60+PDT 2 bar os valores foram de  $29,48 \pm 9,57\%$  e na combinação OT60+PDT 1bar foram de  $63,08 \pm 8,88\%$ . Também se verificou que é perceptível uma diminuição significativa da atividade metabólica entre a combinação das terapias estudadas (PDT+OT60:  $38,03 \pm 6,61\%$ ,  $p < 0,001$ ; OT60+PDT:  $29,48 \pm 9,57\%$ ,  $p < 0,001$ ) e a PDT aplicada de forma isolada ( $72,90 \pm 3,85\%$ ).

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?

Em estudos posteriores, sujeitaram-se as células a uma condição de hipóxia (atmosfera com 2% de O<sub>2</sub>) durante 2 h seguido de OT60min+PDT a 2bar, com diferentes concentrações de fotossensibilizador, por forma a avaliar se um estado prévio de hipóxia poderia induzir uma maior eficácia da PDT com a combinação com a oxigenoterapia. Estes resultados encontram-se descritos no gráfico da Figura 13.



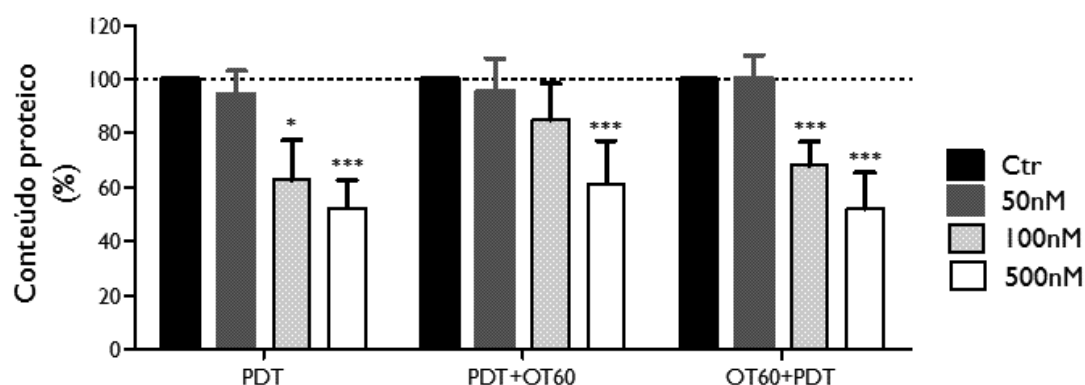
**Figura 13 - Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de *alamar blue* com o FS ACS881F1, nas concentrações 50nM, 100nM e 500nM.** Os resultados foram realizados 24h após a realização das terapias, sendo a terapia com oxigénio puro (OT) foi realizada durante 60 min a 2 bar antes (OT60+PDT) da PDT. As terapias foram sujeitas a hipoxia 2 h antes da PDT (Hip-PDT) e da terapia combinada (Hip-OT60+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de pelo menos de 4 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

As células da linha Y79-GFP-Luc, sujeitas a 2 h de hipóxia seguida de PDT (Hip-PDT), apresentam redução significativa da atividade metabólica em relação ao controlo com valores de  $72,19 \pm 12,45\%$  para a concentração de 50 nM ( $p = 0,006$ ), valores de  $12,15 \pm 2,69\%$  para a concentração de 100 nM ( $p < 0,001$ ) e valores de  $11,68 \pm 5,52\%$  para a concentração de 500 nM ( $p < 0,001$ ). No que diz respeito às células sujeitas à associação OT60min+PDT a 2bar, após hipóxia durante 2 h (Hip-OT60+PDT), verificou-se também uma diminuição significativa da atividade metabólica, comparativamente ao controlo, com valores de  $15,18 \pm 8,56\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de 100 nM e valores de  $17,20 \pm 3,70\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de 500 nM. Porém, mesmo após submeter as células a condições de hipóxia durante 2h, não se verificam diferenças significativas entre o tratamento apenas com PDT e a combinação com a terapia hiperbárica a 2bar de pressão (Hip-OT60+PDT 2bar).

### 1.1.2. Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio SRB

De forma a avaliar a citotoxicidade, tendo em conta a massa proteica total, recorreu-se ao ensaio de SRB.

Assim, no gráfico da Figura 14 encontram-se representados os estudos realizados para o tratamento fotodinâmico em que foi usado o fotossensibilizador ACS88F1 e para a combinação das terapias: PDT+OT60min e OT60min+PDT a 1bar, utilizando-se diferentes concentrações de fotossensibilizador.



**Figura 14 - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio SRB das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias.** Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com as concentrações de 50 nM, 100 nM e 500 nM de ACS88F1, enquanto a terapia com oxigénio puro (OT) realizada durante 60min a 1bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 6 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

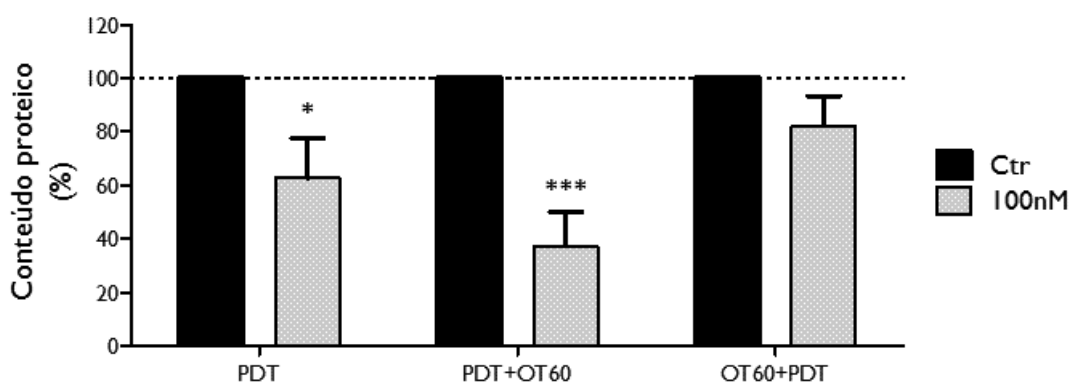
Semelhante ao constatado nos resultados anteriormente apresentados, as células sujeitas a PDT de forma isolada, apresentaram uma redução significativa do conteúdo proteico, com valores de  $62,77 \pm 14,72\%$  ( $p = 0,024$ ) para a concentração de 100 nM e valores de  $52,39 \pm 10,22\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de 500 nM, comparativamente ao controlo. Foi igualmente possível verificar que uma maior redução do conteúdo proteico, que foi significativamente superior quando o tratamento fotodinâmico foi realizado com 100 nM ( $p = 0,037$ ) e com 500 nM ( $p < 0,001$ ) comparativamente com a concentração de 50 nM. Referente às células sujeitas ao tratamento com a combinação PDT+OT60 a 1bar, verificou-se também uma diminuição significativa do conteúdo proteico, comparativamente ao controlo, com valores de  $61,39 \pm 15,85\%$  para a concentração de fotossensibilizador de 500 nM ( $p < 0,001$ ). Por último, nas células sujeitas à OT

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?

antes da PDT (OT60+PDT) a 1bar, verificou-se, novamente, uma diminuição significativa do conteúdo proteico, comparativamente ao controlo, com valores de  $68,01 \pm 8,96\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de FS de 100 nM e  $52,17 \pm 13,14\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de FS de 500 nM.

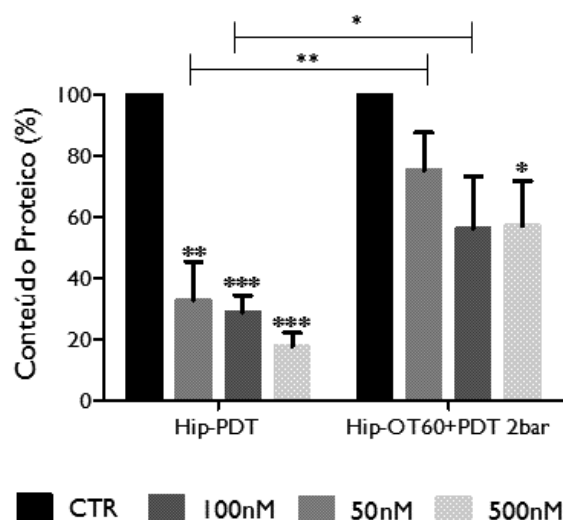
Paralelamente ao realizado no ensaio *alamar blue*, numa segunda abordagem, aumentou-se a pressão até 2bar, utilizando-se os mesmos protocolos de tratamento que nos estudos anteriores (OT60min antes e depois de PDT), estudando-se apenas uma concentração de FS igual a 100 nM. Os resultados encontram-se descritos na Figura 15.

Através da análise dos resultados, observou-se que as células de retinoblastoma humano Y79-GFP-lu, sujeitas apenas a PDT com a concentração de fotossensibilizador de 100 nM, apresentaram um conteúdo proteico de  $62,77 \pm 14,72\%$  que foi significativamente ( $p = 0,011$ ) inferior ao controlo. Quando o ensaio foi realizado com a combinação PDT+OT60 a 2bar, verificou-se também uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do conteúdo proteico, com valores de  $31,21 \pm 16,32\%$  para a concentração de fotossensibilizador de 100 nM. Para o tratamento de terapia combinada OT60+PDT a 2bar verificou-se que a diminuição do conteúdo proteico é significativamente ( $p = 0,050$ ) superior com valores de  $31,21 \pm 16,32\%$  comparativamente ao tratamento fotodinâmico isolado ( $62,77 \pm 14,72\%$ ).



**Figura 15 - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio SRB das células de retinoblastoma humano (Y79-GFP-Luc) após a realização das terapias.** Os resultados foram realizados 24h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico (PDT) realizado com a concentração de 100 nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) realizada durante 60min a 2bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT60) a PDT. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 5 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

Em estudos posteriores, sujeitaram-se as células a uma condição de hipóxia (atmosfera com 2% de O<sub>2</sub>) durante duas horas, seguido de OT60min+PDT a 2bar, com diferentes concentrações de ACS881F1, cujos resultados se encontram descritos no gráfico da Figura 16.



**Figura 16 - Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB com o FS ACS881F1, nas concentrações 50nM, 100nM e 500nM.** Os resultados foram realizados 24h após a realização das terapias, sendo a oxigenoterapia (OT) realizada durante 60min a 2bar antes (OT60+PDT) da PDT. As terapias foram sujeitas a um tratamento de hipoxia durante 2h antes da PDT (Hip-PDT) e da terapia combinada (Hip-OT60+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de  $n \geq 4$ . Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

Pela análise do gráfico acima representado, é possível apurar que nos casos em que as células foram sujeitas ao tratamento hipóxico seguido imediatamente de PDT (Hip-PDT), verifica-se uma diminuição significativa do conteúdo proteico, em comparação com o controlo, com valores de  $32,93 \pm 12,56\%$  ( $p = 0,002$ ) para a concentração de 50 nM, valores de  $29,08 \pm 5,33\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de 100n e valores de  $17,90 \pm 4,27\%$  ( $p < 0,001$ ) para a concentração de 500nM. No que diz respeito aos resultados obtidos na combinação das terapias (Hip-OT60+PDT 2bar), também se verificou uma diminuição significativa do conteúdo proteico em relação ao controlo, com valores de  $57,08 \pm 14,65\%$  ( $p = 0,022$ ) mas apenas quando concentração de fotossensibilizador foi igual a 500 nM, a maior concentração testada. Pudemos ainda verificar que, para a mesma condição de tratamento fotodinâmico, a PDT isolada promoveu uma maior diminuição do conteúdo proteico do que a combinação com a oxigenoterapia, durante 60min a 2bar, para as concentrações de 50 nM (Hip-PDT:  $32,93 \pm 12,56\%$  vs. Hip-OT60+PDT 2bar:  $75,33 \pm 12,07\%$ ,  $p = 0,008$ ) e de 500 nM (Hip-PDT:  $17,90 \pm 4,27\%$  vs. Hip-OT60+PDT 2bar:  $57,08 \pm 14,65\%$ ,  $p = 0,026$ ).

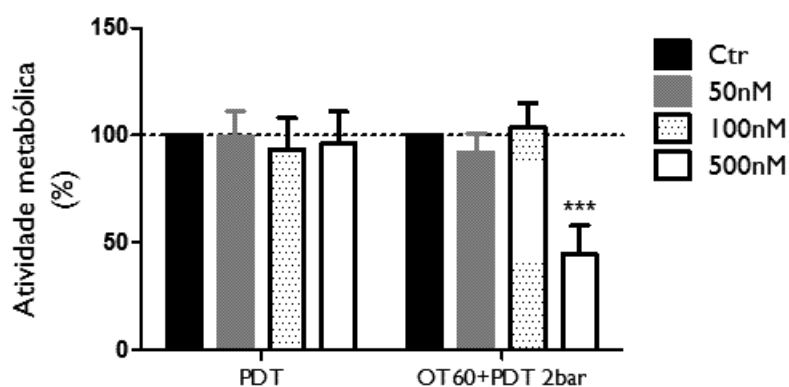
## 2. Avaliação da combinação da terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador Photofrin® com a oxigenoterapia

### 2.1. Avaliação da citotoxicidade celular

Realizaram-se ensaios de citotoxicidade de modo a avaliar o efeito do tratamento fotodinâmico, utilizando o fotossensibilizador Photofrin®, um dos aprovados para o uso clínico, na linha celular de retinoblastoma humano, e o efeito da combinação de terapias usando OT. Assim, realizou-se o ensaio de *alamar blue*, que avalia a viabilidade de forma indireta através de reações metabólicas e, posteriormente avaliou-se a viabilidade celular recorrendo ao ensaio de sulforrodamina B (SRB), o qual avalia o conteúdo proteico.

#### 2.1.1. Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio *alamar blue*

Recorreu-se apenas a OT60min+PDT a 2bar, com diferentes concentrações de Photofrin®, fotossensibilizador de referência e amplamente utilizado na prática clínica.



**Figura 17 - Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de *alamar blue* com o Photofrin®, nas concentrações 50 nM, 100 nM e 500 nM.** Os resultados foram realizados 24 h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico realizado de forma isolada a após a oxigenoterapia (OT) (durante 60min a 2bar - OT60min+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de pelo menos 8 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

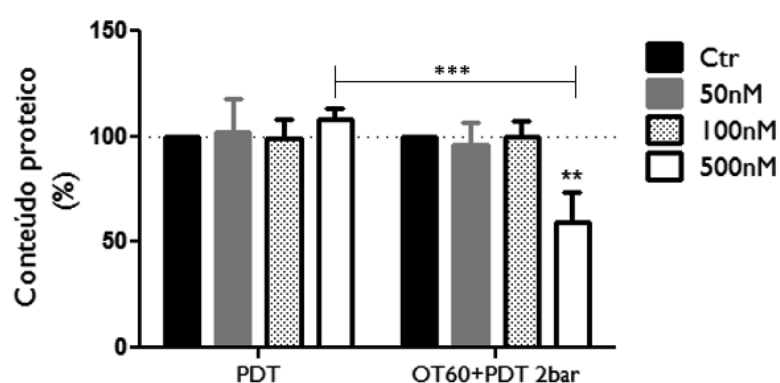
Verificou-se um decréscimo significativo da atividade metabólica após exposição ao Photofrin® combinado com a OT (OT60+PDT 2bar), comparativamente ao controlo, apenas com a



concentração mais elevada de 500nM, com valores de  $44,52 \pm 13,48\%$  ( $p < 0,001$ ) assim como em comparação com a PDT isolada com a mesma concentração de Photofrin®, condição que apresentou valores de  $96,03 \pm 14,87\%$  ( $p < 0,001$ ).

### 2.1.2. Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio SRB

Paralelamente ao realizado no ensaio de atividade metabólica, recorreu-se apenas a OT60min+PDT a 2bar, com diferentes concentrações de Photofrin®.



**Figura 18 - Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de SRB com o Photofrin®, nas concentrações 50 nM, 100 nM e 500 nM.** Os resultados foram realizados 24h após a realização das terapias, sendo o tratamento fotodinâmico realizado de forma isolada a após a oxigenoterapia (OT) (durante 60min a 2bar - OT60min+PDT). Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de proliferação em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e o desvio padrão de pelo menos 5 experiências independentes. Significância estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controlo.

Tendo em conta o gráfico da Figura 18, só foi possível verificar um decréscimo significativo do conteúdo proteico após exposição à PDT e à combinação das terapias (OT60+PDT 2bar), comparativamente ao controlo, com a concentração mais elevada de Photofrin®, ou seja, com 500nM, cujo valor foi de  $59,51 \pm 14,39\%$  ( $p = 0,001$ ). Além disso, verificou-se uma diminuição significativamente inferior do conteúdo proteico quando as células são sujeitas a OT60+PDT 2bar ( $59,51 \pm 14,39\%$ ,  $p < 0,001$ ) com uma concentração de FS igual a 500nM, em comparação com a PDT de forma isolada com a mesma concentração de FS ( $108,49 \pm 4,63\%$ ).

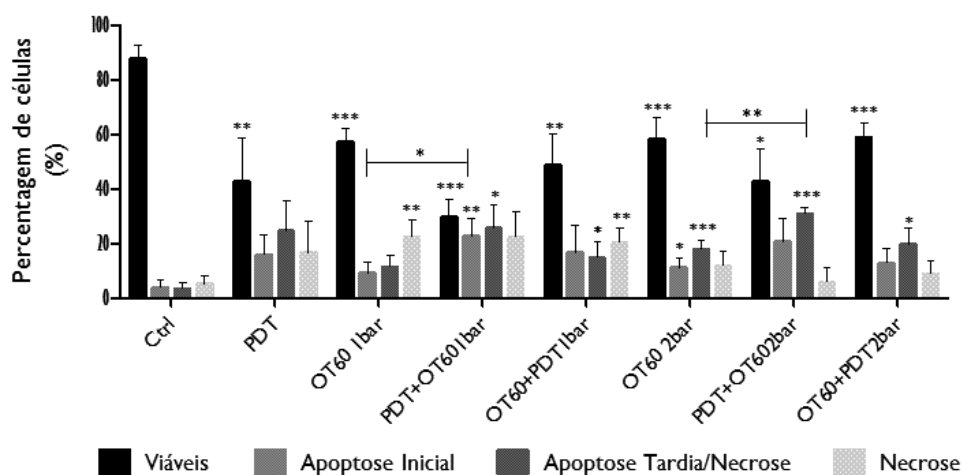
### 3. Avaliação dos efeitos celulares

Após verificar que o tratamento fotodinâmico e as respectivas combinações terapêuticas influenciam a viabilidade celular, pretendeu-se avaliar as vias de morte celulares envolvidas, por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação anexina V e iodeto de propídeo.

#### 3.1. Vias de morte celular

Os resultados obtidos no estudo de viabilidade e das vias de morte, para a linha celular de retinoblastoma humano Y79-GFP-Luc com o FS ACS881F1, encontram-se descritos na Figura 19.

Através da análise do gráfico da Figura 19, foi possível verificar um decréscimo significativo da percentagem de células viáveis após exposição às várias terapias e à combinação das mesmas, comparativamente ao controlo ( $87,57 \pm 4,79\%$ ). Para a PDT isolada os valores foram de  $42,67 \pm 15,92\%$  ( $p=0,007$ ), para o oxigénio puro à pressão de 1 bar durante 60 min (OT60 1bar) os valores foram de  $57,00 \pm 4,94\%$  ( $p<0,001$ ), para a combinação PDT+OT60 1bar os valores foram de  $29,83 \pm 6,46\%$  ( $p<0,001$ ), para a combinação OT60+PDT 1bar os valores foram de  $48,50 \pm 11,71\%$  ( $p=0,002$ ), para a oxigenoterapia durante 60 min à pressão de 2 bar (OT60 2bar) os valores foram de  $58,17 \pm 7,91\%$  ( $p<0,001$ ), para a combinação PDT+OT60 2bar os valores foram de  $42,50 \pm 11,96\%$  ( $p=0,022$ ) e para a combinação OT60+PDT 2bar os valores foram de  $58,83 \pm 5,31\%$  ( $p<0,001$ ).



**Figura 19 - Viabilidade e tipo de morte celular das células de retinoblastoma humano Y79-GFP-Luc após a realização das terapias.** Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo pela dupla marcação com anexina-V/iodeto de propídeo, 24h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100 nM de ACS881F1, enquanto a terapia com oxigénio puro (OT) foi realizada durante 60min, a 1 bar e a 2bar, antes (OT60+PDT) ou após (PDT+OT) do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de pelo menos 4 experiências independentes.

Verificou-se, também, que o tipo de morte celular preferencial é altamente dependente da terapia utilizada. Assim, em comparação com o controlo, verificou-se um aumento significativo da percentagem de células em apoptose inicial quando as células foram submetidas à combinação PDT+OT60 1bar ( $22,50 \pm 6,89\%$ ;  $p=0,008$ ) e à OT60 2bar ( $11,17 \pm 3,49\%$ ;  $p=0,033$ ), um aumento significativo das populações celulares em apoptose tardia/necrose após tratamento com a combinação PDT+OT60 1bar ( $25,50 \pm 8,98\%$ ;  $p=0,014$ ), com a combinação OT60+PDT 1bar ( $14,67 \pm 5,99\%$ ;  $p=0,043$ ), com OT60 2bar ( $18,83 \pm 3,06\%$ ;  $p<0,001$ ), com a combinação PDT+OT60 2bar ( $30,75 \pm 2,63\%$ ;  $p<0,001$ ) e com a combinação OT60+PDT 2bar ( $19,50 \pm 4,41\%$ ;  $p=0,011$ ). Para além disso, também se verificou um aumento significativo do número de células em necrose após tratamento com OT60 1bar ( $22,33 \pm 6,53\%$ ;  $p=0,008$ ) e com a combinação OT60+PDT 1bar ( $20,17 \pm 5,60\%$ ;  $p=0,006$ ). Por último, verificou-se que existe um aumento significativo no número de células em apoptose inicial quando a linha celular em estudo foi sujeita a à combinação PDT+OT60 1bar ( $25,50 \pm 8,98\%$ ;  $p=0,043$ ), em comparação com a condição OT60 1bar e um aumento significativo no número de células em apoptose tardia/necrose quando a linha celular em estudo foi submetida à terapia combinada PDT+OT60 2bar ( $30,75 \pm 2,63\%$ ;  $p=0,003$ ), em comparação com a condição OT60 2bar de forma isolada.

Contudo, e tal como observado nos ensaios de *alamar blue* e SRB, não se verificam alterações significativas no número de células viáveis entre PDT aplicada de forma isolada e as respetivas combinações com a terapia hiperbárica (PDT+OT e OT+PDT).

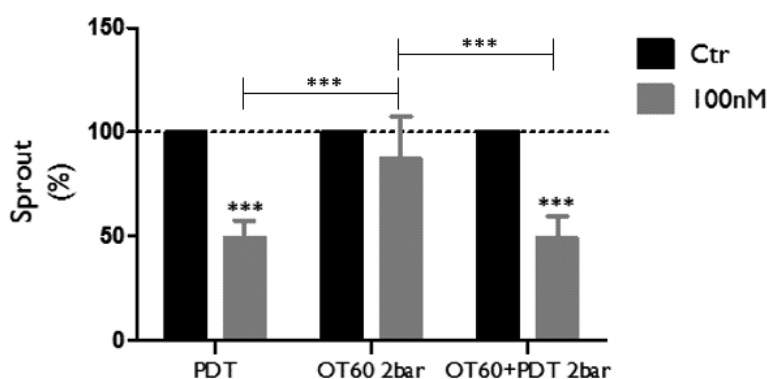
#### **4.Avaliação da vascularização e da angiogénese**

A vascularização e a angiogénese são processos essenciais na progressão tumoral, podendo constituir um alvo terapêutico em diversas abordagens, tais como a terapia fotodinâmica. Assim, avaliaram-se os efeitos da aplicação da PDT de forma isolada ou em combinação com a terapia hiperbárica no *sprout*, na densidade e na confluência das células de anéis de aorta recolhida de ratos.

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?

### 4.1. Aortic ring assay

Tal como referido anteriormente, recorreu-se ao *aortic ring assay* para avaliar os efeitos da PDT e da terapia combinada na vascularização e na angiogénese. Os resultados obtidos na avaliação dos efeitos das terapias estudadas no *sprout* celular das células de anéis de aorta de ratos encontram-se descritos na Figura 20.



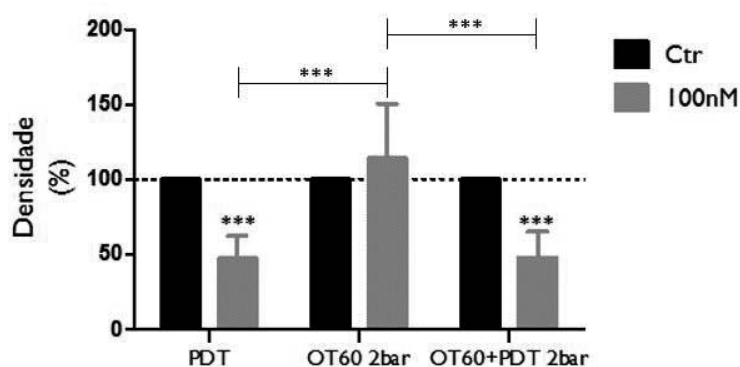
**Figura 20 – Avaliação do *sprout* das células da aorta recolhida de ratos.** Os resultados foram obtidos por *aortic ring assay*, 24 h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100 nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) foi realizada durante 60 min a 2 bar, antes do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de 11 experiências independentes.

Analisando o gráfico acima representado, foi possível verificar um decréscimo significativo do *sprout* (migração de estruturas organizadas e não de células individualizadas) após exposição à PDT aplicada de forma isolada, comparativamente ao controlo, com valores de 49,44±8,09% ( $p<0,001$ ) assim como uma diminuição significativa do *sprout* quando as células foram sujeitas à combinação OT60+PDT 2bar com valores de 49,15±10,45% ( $p<0,001$ ), comparativamente ao controlo. A PDT aplicada de forma isolada revelou um decréscimo do *sprout* mais acentuado do que a OT60 2bar isolada (PDT: 49,44±8,09%; OT60 2bar: 87,41%±20,10%;  $p<0,001$ ).

Por último, verificou-se que existiu um decréscimo do *sprout* quando as células foram sujeitas à combinação OT60+PDT 2bar, comparativamente à condição OT60 2bar (OT60+PDT 2bar: 49,15±10,45% vs. OT60 2bar: 87,41%±20,10%;  $p<0,001$ ).

O *aortic ring assay* permitiu ainda avaliar a densidade das células de aorta após serem submetidas aos tratamentos estudados, cujos resultados se encontram apresentados na Figura 21.

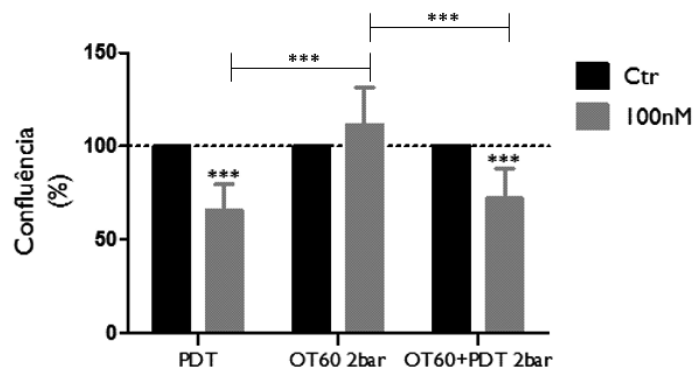
Pela análise do gráfico da Figura 21, abaixo representado, foi possível verificar um decréscimo significativo da densidade dos vasos sanguíneos após exposição à PDT, com valores de  $47,10 \pm 15,05\%$  ( $p < 0,001$ ), comparativamente com o controlo. Além disso, verificou-se uma diminuição significativa da densidade dos vasos sanguíneos quando as células foram sujeitas à combinação OT60+PDT 2bar com valores de  $47,77 \pm 17,36\%$  ( $p < 0,001$ ) em comparação com o controlo. A PDT aplicada de forma isolada revelou um decréscimo da densidade mais acentuado do que a OT60 2bar isolada (PDT:  $47,10 \pm 15,05\%$  vs. OT60 2bar:  $113,85 \pm 36,78\%$ ;  $p < 0,001$ ). Por último, verificou-se que o tratamento com a combinação OT60+PDT 2bar provocou um decréscimo superior na densidade dos vasos, comparativamente ao que ocorreu com a condição OT60 2bar (OT60+PDT 2bar:  $47,77 \pm 17,36\%$  vs. OT60 2bar:  $113,85 \pm 36,78\%$ ;  $p < 0,001$ ).



**Figura 21 - Avaliação da densidade das células da aorta recolhidas de ratos.** Os resultados foram obtidos por *aortic ring assay*, 24 h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) foi realizada durante 60min a 2bar, antes do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de 16 experiências independentes.

Por último, foi também avaliada a distância de confluência (distância de migração das células desde a aorta, contando até à zona mais exterior onde ainda se mantem a confluência, podendo também ser células isoladas) das células dos anéis de aorta, quando sujeitas às terapias estudadas nesta dissertação, cujos resultados se encontram representados na Figura 22.

## Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?



**Figura 22 - Avaliação da confluência das células da aorta recolhidas de ratos.** Os resultados foram obtidos por *aortic ring assay*, 24 h após a realização das terapias. O tratamento fotodinâmico (PDT) foi realizado com a concentração 100nM de ACS881F1, enquanto a oxigenoterapia (OT) foi realizada durante 60 min a 2 bar, antes do tratamento fotodinâmico. Os resultados encontram-se apresentados como a percentagem de células em relação ao controlo, que foi ajustado a 100%, expressando a média e desvio padrão de 11 experiências independentes.

Pela observação do gráfico da Figura 22, foi possível verificar, comparativamente com o controlo, um decréscimo significativo da distância de confluência após exposição à PDT isolada que apresentou valores de  $65,84 \pm 13,87\%$  ( $p < 0,001$ ) e após a exposição à combinação da terapia OT60+PDT 2bar que apresentou valores de  $72,36 \pm 15,69\%$  ( $p < 0,001$ ). A PDT aplicada de forma isolada revelou um decréscimo significativo ( $p < 0,001$ ) da distância de confluência mais acentuado do que a condição OT60 2bar isolada (PDT:  $65,84 \pm 13,87\%$  vs. OT60 2bar:  $113,85 \pm 36,78\%$ ). Foi ainda possível verificar que existiu um maior decréscimo na distância de confluência quando as células foram sujeitas à combinação OT60+PDT 2bar comparativamente à condição OT60 2bar (OT60+PDT 2bar:  $72,36 \pm 15,69\%$  vs. OT60 2bar:  $113,85 \pm 36,78\%$ ;  $p < 0,001$ ).

## **V. Discussão**





Sabe-se que o cancro, como patologia multifatorial, se inicia quando ocorre um crescimento celular descontrolado. Atualmente, sabe-se ainda que é uma doença com um grande impacto na população, surgindo um elevado número de casos, e sendo uma das principais causas de morte no mundo. Neste contexto, há um enorme número de estudos a decorrer na tentativa de encontrar novas abordagens terapêuticas.

A abordagem terapêutica ideal para doentes portadores de retinoblastoma ainda apresenta muitos desafios e enigmas. Com os grandes avanços que têm sido demonstrados a nível terapêutico, a sobrevivência destes doentes passou de 30%, em 1930 para 95% em 1990. Até há poucos anos, a enucleação e a radioterapia externa eram as modalidades de eleição no tratamento deste tipo de tumor (Antoneli et al., 2003).

Contudo, e tal como descrito anteriormente, as terapias convencionais, no tratamento do retinoblastoma, podem originar complicações anos mais tarde após o tratamento. O aparecimento de neoplasias secundárias é um exemplo desses problemas, como é o caso das neoplasias cutâneas e da bexiga neoplasias que podem surgir devido ao uso de terapias convencionais (Brown, Brown, & Walker, 2004). Assim, tem-se investigado qual o potencial terapêutico da terapia fotodinâmica, pois a sua gama das possíveis aplicações, isoladamente ou em combinação com outras abordagens terapêuticas aprovadas ou experimentais, não está definitivamente esgotada. A PDT não apresenta efeitos mutagénicos, o que é uma vantagem fulcral, e é ainda considerada uma estratégia anti-tumoral nova e promissora (Agostinis, et al., 2011; Brown, Brown, & Walker, 2004).

Por outro lado, a oxigenoterapia, tanto com pressão normal como em condição hiperbárica constitui uma abordagem terapêutica a que algumas patologias respondem favoravelmente. A OT revela melhorias nas medidas de stresse oxidativo e reduz a inflamação, logo apresenta vantagens para ser, também, uma terapia alternativa no tratamento do retinoblastoma. Um estudo de investigação já realizado demonstrou que a OT pode ser inibidora e mesmo induzir a redução do crescimento do tumor, como exemplo em casos de neoplasia da mama (Moen & Stuhr, 2012). Clinicamente, esta terapia foi investigada em combinação com a quimioterapia, a terapia fotodinâmica e a radioterapia (Daruwalla & Christophi, 2006). Assim, a combinação de PDT e OT pode constituir uma combinação terapêutica favorável para o tratamento do retinoblastoma.

A viabilidade celular pode ser monitorizada através de diversos métodos. Nesta dissertação, de modo a avaliar o efeito das terapias e a sua combinação, recorreu-se aos ensaios de *alamar blue* e de SRB, que avaliam respetivamente a atividade metabólica das células e o conteúdo proteico. O

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

primeiro ensaio é simples, no qual se verifica uma mudança de cor em resposta a uma redução química, em função da atividade metabólica e conseqüente crescimento celular (Antczak et al., 2007; O'Brien et. al, 2001; Gloeckner, Jonuleit, & Lemke, 2001). Por outro lado, o SRB é um ensaio usado para determinar a densidade celular, baseado na massa proteica total (Houghton et. al, 2007). Ambos os métodos referidos apresentam algumas limitações, pois não se consegue distinguir entre diminuição da atividade metabólica das células ou uma redução do seu número, e aumento do número de células na população controle. De forma a complementar os estudos realizados, recorreram-se a outros ensaios, nomeadamente, a citometria de fluxo pela dupla marcação AnV e IP, sendo este um método útil para o estudo da viabilidade celular e tipos de morte celular e o *aortic ring assay*, que permite avaliar a densidade dos vasos sanguíneos e a formação de novos vasos sanguíneos.

No ensaio de *alamar blue* avaliou-se a atividade metabólica das células sujeitas ao tratamento fotodinâmico, com base no fotossensibilizador ACS88F1 e à sua combinação com a oxigenoterapia, comparativamente às culturas em condição controle. Já no ensaio de SRB avaliou-se o conteúdo proteico das células sujeitas ao tratamento fotodinâmico com diferentes concentrações de fotossensibilizador e ao tratamento com oxigênio puro, comparativamente às células controle e, conseqüentemente, o tratamento realizado pela combinação de terapias.

As primeiras experiências realizadas com recurso ao ensaio do *alamar blue* permitiram avaliar inicialmente o efeito da terapia fotodinâmica, com diferentes concentrações de FS, e a exposição a oxigênio puro durante 30min (antes e depois da PDT), a 1bar de pressão. Observou-se que, quando as células foram sujeitas a PDT de forma isolada e sujeitas às duas combinações propostas (PDT+OT30 e OT30+PDT) ocorreu uma diminuição significativa da atividade metabólica para as concentrações de fotossensibilizador de 50 nM, 100 nM e 500 nM para a PDT e para a combinação PDT+HB030 e para a combinação OT30+PDT com as concentrações de 100 nM e de 500 nM. Após submeter as células da linha celular às referidas combinações terapêuticas não se observaram diferenças significativas entre o tratamento com PDT e a combinação com o oxigênio puro a 1bar de pressão, tanto antes como após a aplicação da terapia fotodinâmica. Para as concentrações de fotossensibilizador de 5 nM e de 50 nM, a PDT aplicada de forma isolada revelou inclusivamente melhores resultados do que a combinação PDT+OT30. Deste modo, de acordo com os resultados obtidos, progrediu-se no desempenho experimental submetendo a linha celular de retinoblastoma humano às mesmas condições de tratamento fotodinâmico, mas aumentando o tempo de

exposição ao oxigénio puro que passou para 60min, a 1bar de pressão. Sabe-se que o efeito do tratamento pode não ocorrer se não se verificarem níveis de oxigénio apropriados nos tecidos do organismo. Em muitos casos, não é possível alcançar a quantidade de oxigénio adequada na região lesada, pois o tempo de exposição pode não ter sido suficiente, o que se pode comprovar pela literatura já existente neste âmbito (Neubauer & Walker, 1998). Estudos *in vitro* confirmaram que há discrepâncias nas frações de crescimento entre células de diferentes linhas celulares de neoplasias após a exposição à hiperóxia. Neste contexto, estudos sobre o efeito da OT durante 30 min combinada com PDT em três diferentes linhas celulares de cancro colorrectal, concluíram que o tempo de 30 min à OT não aumentou a morte celular (Moen & Stuhr, 2012). Por esta razão procedeu-se ao aumento da exposição à terapia (60 min) com o objetivo de as células tumorais receberem a quantidade de oxigénio durante tempo suficiente para responderem de forma eficaz ao tratamento de PDT. Então, no que diz respeito à PDT de forma isolada e para as combinações PDT+OT60 e OT60+PDT, estas apresentaram uma diminuição significativa da atividade metabólica, comparativamente ao controlo, exceto para a concentração de FS de 5 nM. Assim, e tendo em conta que nos resultados de *alamar blue* a oxigenoterapia durante 60min apresentou uma tendência para resultados mais promissores comparativamente com a incubação durante 30 min, decidiu-se realizar o ensaio SRB apenas com o maior tempo de exposição. Logo, estudaram-se os efeitos da terapia fotodinâmica com oxigénio puro durante 60min antes (OT60+PDT) e depois da PDT (PDT+OT60), a 1bar de pressão, com diferentes concentrações de FS. Após a realização deste ensaio observou-se que a PDT aplicada de forma isolada e a combinação OT60+PDT induziram uma diminuição significativa do conteúdo proteico para as concentrações de FS de 100 nM e de 500 nM. Por outro lado, as células sujeitas à combinação PDT+OT60 apresentaram uma diminuição significativa do conteúdo proteico apenas para a concentração mais elevada de FS utilizada (500 nM), comparativamente ao controlo.

Tendo em conta que, mesmo nas condições descritas anteriormente, a combinação da oxigenoterapia com a PDT não acrescentou uma melhoria significativa ao resultado terapêutico, a nível da atividade metabólica e do conteúdo proteico, decidiu-se estudar o aumento de pressão (até 2bar) na oxigenoterapia na linha celular de retinoblastoma humano. Esta abordagem foi adotada, uma vez que regiões de hipóxia tumoral estão associadas a células que proliferam lentamente e essas células reduzem a eficácia do tratamento. Assim, ao aumentar a pressão parcial de oxigénio, como resultado da terapia mencionada, induz-se a formação de espécies reativas de oxigénio ou de radicais livres, que podem lesar as células tumorais pela indução de

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

stresse oxidativo (Gill & Bell, 2004; Daruwalla & Christophi, 2006). Com base na literatura, é possível verificar que este aumento melhora o fornecimento de oxigénio celular, aumentando o gradiente de difusão do tecido alveolar, levando a um aumento de O<sub>2</sub> nas áreas de hipóxia o que, por sua vez, altera as adaptações e melhora a resposta ao tratamento. Um estudo já realizado com a OT, em que se utilizou um aumento de pressão para 3 bar, mostrou que esse aumento de pressão poderia levar ao aumento da pressão parcial de oxigénio. Por outro lado, a UHMS (*Undersea and Hyperbaric Medical Society*) recomenda tratamentos com OT a 2-2,4 bar de pressão (Gill & Bell, 2004; Kumar et al., 2015). Os nossos estudos foram realizados apenas com 2 bar nas combinações OT60min+PDT e PDT+OT60min, utilizando-se uma concentração de FS de 100 nM. No que diz respeito aos ensaios de atividade metabólica, observou-se uma tendência para que o aumento da pressão a que as células estão sujeitas contribua para uma diminuição da sua atividade metabólica, uma vez que se verificou uma tendência para um decréscimo, não só comparativamente à PDT de forma isolada, mas também em comparação com os esquemas de combinação realizados à pressão de 1bar. O mesmo se verificou para o ensaio de SRB, em que os estudos foram realizados com as combinações OT60min+PDT e PDT+OT60min, utilizando-se apenas a concentração de 100 nM do fotossensibilizador ACS881F1. Observou-se uma diminuição mais acentuada do conteúdo proteico quando as células foram sujeitas à combinação das terapias, nomeadamente PDT+OT60, quando comparado com a PDT de forma isolada.

Na terapia fotodinâmica é pouco provável o desencadear de processos de resistência, uma vez que os fotossensibilizadores não são citotóxicos *per se* e só depois de ativação induzem stresse oxidativo nas células tumorais através de ROS, o que pode ter como consequência a morte celular (Agostinis, et al., 2011). Os radicais livres produzidos conseguem reagir rapidamente com o oxigénio molecular e, como resultado, há produção de ROS, com a formação de peróxidos, iões superóxido e radicais hidroxilo, desencadeando a ativação da cadeia de radicais livres (Gursoy et al., 2012; Teixo, 2013). Assim, e para além de todas as alterações envolvidas no efeito da PDT, sabe-se que a OT leva à hiperóxia o que, conseqüentemente, implica um aumento da quantidade de oxigénio na célula. Os radicais livres vão reagir com o oxigénio formando quantidades maiores de ROS provocando danos nas células tumorais, o que se traduz em melhores resultados ao tratamento. Tendo em conta este aspeto, optou-se apenas por realizar experiências com OT antes da PDT, sabendo que há diversos motivos para a utilização de OT como uma terapia combinada. Estudos recentes mostram que a radioterapia imediatamente após OT tem vantagens e é seguro.

Para além disso sabe-se que, a adição de OT pode proteger tecidos normais das lesões causadas pela irradiação (Ogawa et al., 2013; Moen & Stuhr, 2012). A OT tem o potencial para intercetar cada uma das adaptações sob condições hipóxicas (Daruwalla & Christophi, 2006). Os efeitos mais convincentes são observados quando a OT é usada numa configuração de adjuvante, mas esta é específica para o tipo e estadió do tumor (Daruwalla & Christophi, 2006).

Assim, e tendo em conta os resultados obtidos e, sabendo que as células estudadas foram cultivadas em condições de normóxia, onde não existe privação de oxigénio das culturas celulares, hipotetizou-se a realização dos ensaios de *alamar blue* e de SRB, em células previamente submetidas a um tratamento de hipóxia durante 2h, período após o qual se realizaram os estudos referentes ao tratamento com PDT isolada e com a combinação OT+PDT a 2 bar de pressão. Este tratamento de hipoxia durante 2h, teve como objetivo criar um ambiente celular com baixa pressão parcial de oxigénio, pois a ausência de diferenças significativas na PDT aplicada de forma isolada e nos esquemas de combinações testados poder-se-ia dever à existência de um ambiente de normóxia, onde os níveis de oxigénio presentes poderão ser suficientes para que o efeito fotodinâmico tenha o seu efeito máximo. Observou-se que as células sujeitas a 2h de hipóxia, e posteriormente tratadas com PDT, apresentaram uma redução significativa da atividade metabólica para qualquer concentração utilizada, em relação ao controlo. Por outro lado, nas células sujeitas ao tratamento de hipóxia durante 2h antes da combinação OT60+PDT verificou-se também uma diminuição significativa da atividade metabólica, para as concentrações de 100 nM e de 500 nM. Para o ensaio de SRB, a linha celular foi também sujeita a um tratamento de hipoxia durante 2h e realizaram-se estudos apenas com a combinação OT+PDT a 2bar de pressão. Nas células sujeitas ao tratamento de hipóxia durante 2h antes da combinação OT60+PDT, verificou-se também uma diminuição significativa do conteúdo proteico para a concentração de 500 nM. Em todos os estudos realizados com o tratamento hipóxico a PDT aplicada de forma isolada (Hip-PDT) revelou melhores resultados.

Os ensaios de *alamar blue* e de SRB podem indicar alguma informação acerca da capacidade proliferativa das células e do seu conteúdo proteico após o tratamento fotodinâmico e o tratamento de oxigénio puro, contudo não fornecem informações sobre os mecanismos intracelulares que levam à citotoxicidade revelada pelos tratamentos mencionados com o fotossensibilizador ACS881F1. Desta forma, existem diferentes métodos para avaliar esses mesmos processos após o tratamento fotodinâmico e as combinações terapêuticas consideradas com o FS considerado neste trabalho, nomeadamente as vias de morte celular. A técnica de

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

citometria de fluxo, através da dupla marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo, foi o método escolhido.

A perda da assimetria da membrana plasmática é um evento inicial da apoptose, resultando na translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo, que pode ser identificada através da incubação das células com AnV-FITC (Telford, Tamul, & Bradford, 2016). Por outro lado, o iodeto de propídeo é um marcador fluorescente com a capacidade de se intercalar o ADN celular. Contudo, a membrana celular é impermeável ao IP, sendo que este apenas intercala o ADN em células com a integridade da membrana celular comprometida, tal como acontece nas células em necrose ou em estados tardios da apoptose, permitindo assim a distinção entre células apoptóticas e necróticas (Crowley et al., 2016).

Após a exposição às diferentes terapias estudadas, verificou-se uma diminuição do número de células viáveis em todos os tratamentos realizados, comparativamente ao controlo. Foi também possível observar um aumento do número de células em apoptose inicial quando as células foram sujeitas a OT 2bar e a PDT+OT60 1bar e um aumento do número de células em apoptose tardia/necrose em todas as combinações realizadas, exceto para a PDT e para a condição OT60 1bar, quando aplicadas de forma isolada. Para além disso, também se verificou um aumento significativo do número de células em necrose após tratamento com a condição OT60 1bar e com a combinação OT60+PDT 1bar. No que diz respeito à apoptose inicial, observou-se que a combinação PDT+OT60 1bar apresentou um aumento significativo no número de células e apoptose, em comparação com a OT60 1bar, e o mesmo se verificou no número de células em apoptose tardia/necrose, mas com a pressão igual a 2bar.

A apoptose é um fenómeno de morte celular programada. É um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação da célula. Possui, assim, um papel bastante importante na preservação da homeostase do organismo e no controlo do tamanho do tecido (Anazetti, 2007).

O processo de necrose refere-se a um ganho de volume da célula, aumento de volumes dos organelos, rotura da membrana plasmática e, conseqüentemente, perda de conteúdo intracelular. As conseqüências da morte celular por apoptose e por necrose são bastante diferentes. Na apoptose estes produtos são isolados com segurança dentro dos macrófagos. No caso da necrose, a resposta inflamatória pode ser causada por componentes citosólicos. As evidências acumuladas

mostram que a morte celular por necrose pode ser, por vezes, controlada e programada quando uma célula é incapaz de morrer por apoptose (Castejón, 2015).

Os diferentes fotossensibilizadores atuam preferencialmente em locais distintos, uma vez que o tempo de semi-vida do oxigênio singleto é muito reduzido, pelo que o seu efeito será sentido, principalmente, no local onde é produzido. O Photofrin®, por exemplo, atua nas membranas lipídicas (Agostinis et al. 2011). O fotossensibilizador, a sua concentração, a potência e a energia total recebida da luz são particularidades do tratamento que influenciam o tipo predominante de morte celular (Laranjo, 2010; Teixeira, 2013). A terapia fotodinâmica pode ativar várias vias de morte celular como, por exemplo, a apoptose e a necrose, sendo a apoptose a principal via de morte celular ativada por esta terapia (Agostinis et al. 2011). Para além disso, a apoptose é principalmente ativada pelos FS que têm tropismo para a mitocôndria, pois este é o organelo celular que regula este tipo de morte celular. A ativação luminosa desencadeia a apoptose pela inibição da produção de ATP (adenosina trifosfato, do inglês *adenosine triphosphate*) através da ATP sintetase (Teixeira, 2013). De uma maneira geral, o tipo de morte é a necrose quando a intensidade do tratamento fotodinâmico é excessiva mas, no presente estudo, em alguns casos, o utilizaram-se baixas concentrações o que levou à morte, preferencialmente, por apoptose. Estudos realizados mostraram que, para além da diminuição da proliferação celular e do conteúdo proteico, observou-se que a via de morte celular predominante após PDT era a apoptose (Dougherty et al., 1998; Teixeira, 2013).

Para lidar com o microambiente hipóxico, as células tumorais aumentam a sua taxa metabólica, o que muitas vezes leva a possíveis lesões no ADN. Sob condições fisiológicas, quando as enzimas de reparação celular não podem corrigir o dano de ADN, a cascata apoptótica é ativada, o que resulta em morte celular. É de acrescentar que o stresse oxidativo desencadeia a apoptose. Quando se verifica uma regressão espontânea de tumores e quando os tumores que respondem a terapia citotóxica exibem um elevado grau de apoptose (Daruwalla & Christophi, 2006). Kumar e os seus co-autores defenderam que a exposição a OT durante 120min reforçava a apoptose em linhas celulares de fibroblastos. Para além disso, esta terapia reduzia a proliferação celular e promovia a morte celular (Kumar et al., 2015). Estudos *in vitro* em células tumorais da mama não mostraram apoptose depois da OT. Mais estudos foram realizados neste âmbito, e em células de osteossarcoma o tratamento com OT induziu a apoptose enquanto que, por outro lado, num estudo realizado em metástases do fígado se observou o aumento dos níveis de necrose ,

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

quando a OT é combinada com *SMA-pirarubicin (styrene maleic acid-pirarubicin)* (Moen & Stuhr, 2012).

Sabe-se que tanto a vascularização como a angiogénese são processos essenciais no crescimento tumoral, conduzindo a vários estudos com vista à sua definição como possíveis alvos terapêuticos em diversas terapias utilizadas. Assim, através do *aortic ring assay*, avaliou-se o *sprout*, a densidade e a confluência das células a partir da parede de anéis de aorta recolhida de ratos, quando estes são sujeitas à PDT aplicada de forma isolada e em combinação com a oxigenoterapia. No nosso estudo, avaliou-se a migração, a formação de novos tubos e a ramificação de microvasos. O *aortic ring assay* foi já utilizado para estudos de angiogénese em ratos (Baker, 2011) e em ratos diabéticos tratados com metformina (Sena et al., 2011), mas, até ao momento, não foi encontrada na literatura qualquer referência a estudos efetuados com a PDT e a OT, pelo que o nosso estudo se revela algo inovador. Assim, foi possível verificar um decréscimo significativo da distância de *sprout* após exposição à PDT isolada e à combinação OT60+PDT, comparativamente ao controlo. Verificou-se que existiu um decréscimo significativo na distância de *sprout* quando as células foram sujeitas à combinação OT60+PDT 2bar, comparativamente a OT60 a 2bar. Foi avaliada, também, a densidade dos novos vasos sanguíneos formados, sendo possível observar um decréscimo significativo da densidade dos vasos sanguíneos após exposição à PDT isolada e à combinação OT60+PDT a 2bar de pressão, comparativamente ao controlo. A par do que se observou anteriormente, a combinação OT60+PDT a 2 bar provocou um maior decréscimo do que a condição OT60 2 bar. Por último, foi também avaliada a distância de confluência das células que partem dos anéis da aorta. Observou-se um decréscimo significativo da distância de confluência após exposição à PDT isolada e após a exposição à combinação da terapia OT60+PDT 2bar, comparativamente ao controlo. Foi ainda possível verificar que as células sujeitas à combinação OT60+PDT 2bar apresentaram um decréscimo mais acentuado da distância referida, comparativamente à condição OT60 2bar.

Um dos objetivos deste estudo foi determinar o potencial do fotossensibilizador ACS881F1 numa abordagem terapêutica em combinação com a oxigenoterapia. Contudo, e de acordo com os resultados obtidos nesta dissertação, foi possível constatar que o tratamento fotodinâmico com este fotossensibilizador, por si só, apresenta uma elevada citotoxicidade. Devido a essa elevada citotoxicidade induzida pela PDT aplicada de forma isolada baseada na molécula ACS881F1, é possível concluir que a contribuição da adição da oxigenoterapia à PDT acaba por ser pouco



representativa. Assim, por forma a realizar uma prova de conceito em relação ao potencial terapêutico da combinação das terapias fotodinâmica e de oxigénio puro, recorreu-se ao fotossensibilizador Photofrin<sup>®</sup>, um dos fotossensibilizadores aprovados para utilização clínica. Devido às características fotofísicas apropriadas e à sua afinidade para as células tumorais, derivados da porfirina são frequentemente usados em PDT. O Photofrin<sup>®</sup> foi o primeiro fotossensibilizador a ser comercializado sendo, como já mencionado anteriormente, um fotossensibilizador de referência e amplamente utilizado na prática clínica (Dougherty, Cooper, & Mang, 1990; Hajri et al., 2002). A PDT com Photofrin<sup>®</sup> tem um importante papel no tratamento de diversos tumores, como por exemplo no cancro colorrectal (Hajri et al., 2002). Desta forma, e à semelhança de todos os resultados obtidos anteriormente, realizou-se o ensaio *alamar blue* por forma a avaliar as alterações na atividade metabólica quando as células de retinoblastoma humano Y79-GFP-Luc foram sujeitas aos tratamentos de PDT utilizando o fotossensibilizador Photofrin<sup>®</sup> e respetiva combinação com a oxigenoterapia. Assim, verificou-se um decréscimo significativo da atividade metabólica após exposição à PDT combinada com a OT (OT60+PDT 2bar), comparativamente ao controlo, apenas com a concentração de 500 nM. Observou-se ainda que, esta combinação terapêutica referida apresenta melhores efeitos nas células do que a PDT de forma isolada, uma vez que, o decréscimo da atividade metabólica foi superior para a combinação terapêutica. No caso do ensaio SRB, para a combinação OT+PDT a 2bar de pressão com o fotossensibilizador de referência Photofrin<sup>®</sup> foi possível observar um decréscimo significativo do conteúdo proteico após exposição à PDT e à combinação das terapias (OT60+PDT 2bar), comparativamente ao controlo, apenas com a concentração mais elevada (500 nM). Além disso, verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo proteico quando as células são sujeitas à combinação das terapias com uma concentração de Photofrin<sup>®</sup> igual a 500 nM, em comparação com a PDT de forma isolada com a mesma concentração de Photofrin<sup>®</sup>. Desta forma, foi possível verificar que a adição da oxigenoterapia à PDT baseada no Photofrin<sup>®</sup> pode ser benéfica e útil para a obtenção de um melhor resultado terapêutico em casos de fotossensibilizadores que, por si só, não consigam induzir citotoxicidade celular tão elevada como aquela que o fotossensibilizador ACS881F1 demonstrou ter.

Há mais de 25 anos que a PDT foi usada, pela primeira vez, em oncologia. Esta abordagem tem progredido lentamente e em algumas especialidades da medicina, por exemplo, na oncologia, na dermatologia e na oftalmologia, a PDT é amplamente usada. Porém, de uma forma geral em oncologia, as combinações de fotossensibilizadores existentes e de fontes de luz nas aplicações

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

em que têm sido usadas não demonstraram ter vantagens claras (Brown, Brown, & Walker, 2004). É então necessária uma ampla variedade de fotossensibilizadores e continuar a trilhar os novos caminhos de pesquisa.

Atualmente considera-se que a investigação ainda não conseguiu demonstrar que a oxigenoterapia tem um efeito inibidor de cancro ou que aumenta a probabilidade de reincidência. Alguns tipos de tumores, como por exemplo, os do colo do útero e da bexiga, parecem não responder à oxigenoterapia. Em estudos *in vitro* confirmou-se que existem discrepâncias em frações de crescimento entre linhas celulares de neoplasias de diferente natureza, após a exposição ao excesso de oxigénio em tecidos celulares, condição denominada por hiperóxia (Moen & Stuhr, 2012). A variabilidade de resultados observados em respostas à oxigenoterapia encontrada durante as últimas décadas, pode ser atribuída não só a diferenças nos tipos de neoplasia, mas também à grande variedade de protocolos de tratamento. Assim, diferenças na resposta ao oxigénio, entre os diferentes tipos de neoplasias, não devem conduzir a uma exclusão da OT como uma forma de tratamento ou como tratamento adjuvante para os diferentes tipos selecionados de neoplasia (Moen & Stuhr, 2012). Mais uma vez, são necessários mais estudos sobre OT e o seu efeito sobre certos tipos de cancro e estudos sobre os mecanismos subjacentes envolvidos.

No presente estudo, não foi possível averiguar qual a combinação que se revelou mais promissora para uma abordagem terapêutica viável pois, de entre todos os métodos utilizados não foi possível retirar uma conclusão coerente e observar qual a terapia isolada ou qual a combinação terapêutica apresentava melhores resultados. Para além disso, a morte celular preferencial foi dependente do tipo de combinação terapêutica. Quando as células foram sujeitas à combinação OT 2bar e à combinação PDT+OT 1bar o tipo de morte preferencial foi a apoptose inicial. Como a morte celular por apoptose é considerada uma morte mais limpa e é programada, confere uma vantagem terapêutica relativamente à morte celular por necrose e, assim, uma vantagem terapêutica na abordagem das terapias referidas.

Desta forma, e tendo em conta os resultados por nós obtidos, é possível hipotetizar que a oxigenoterapia conjugada com a terapia fotodinâmica possa constituir uma vantagem terapêutica no caso de uso de fotossensibilizadores cuja resposta não é totalmente eficaz e, assim, a oxigenoterapia poderá assumir-se como uma terapia adjuvante com interesse clínico. Contudo, é

fundamental a realização de mais estudos complementares, bem como de novas abordagens de combinações.

Consideramos que os estudos mais importantes a realizar no futuro serão estudos *in vitro* utilizando estruturas tridimensionais adequadas à cultura de células 3D e, para além disso, estudos *in vivo* realizados em modelos animais ortotópicos de retinoblastoma. Será possível avaliar a eficácia das terapias aplicadas, tanto com a modalidade isolada como com a combinação, no microambiente tumoral *in vivo*, onde existe a formação de regiões hipóxicas, nas quais a oxigenoterapia poderá constituir uma terapia adjuvante de grande relevo.



## **VI. Conclusões**



A realização desta dissertação, que teve como principal objetivo avaliar a combinação da terapia fotodinâmica com a oxigenoterapia no retinoblastoma como tratamento promissor para este tipo de tumor. Assim, foi avaliado o efeito citotóxico do fotossensibilizador 5,15-bis (2-bromo-3-hidroxifenil) clorina (ACS 881F1), bem como a sua combinação com a terapia com oxigênio puro, permitindo desta forma retirar diversas conclusões através dos vários ensaios realizados.

Diversos protocolos foram utilizados durante a execução deste projeto, por forma a melhorar o resultado terapêutico da combinação da PDT com a OT na linha celular Y79-GFP-Luc: PDT+OT 30min, PDT+OT 60min, OT 30min+PDT e OT 60min+PDT. Para além do tempo de exposição, a cada abordagem foram também associados diferentes valores de pressão, 1 e 2 bar.

Os ensaios de *alamar blue* e de SRB permitiram comprovar que o fotossensibilizador proposto possui efeitos anti proliferativos, mesmo utilizando baixas concentrações. Estes resultados foram também observados para a combinação da PDT com OT, após 30 min de exposição. Para além disso, conclui-se que o aumento do tempo de exposição à terapia hiperbárica e o aumento da pressão aplicada na abordagem combinada apresentou uma tendência para melhores resultados comparativamente à terapia fotodinâmica aplicada de forma isolada, corroborando a hipótese de que a combinação PDT+OT ou OT+PDT seria uma alternativa terapêutica mais favorável ao tratamento do retinoblastoma. Tendo em conta estes resultados, a linha celular de retinoblastoma humano Y79-GFP-Luc foi submetida a um ambiente hipóxico prévio durante 2h. De uma forma geral, foi observado que o tratamento fotodinâmico e de oxigênio puro induziu um decréscimo da atividade metabólica e do conteúdo proteico na linha celular de retinoblastoma, compatível com diminuição da viabilidade celular. Como já mencionado, o uso do fotossensibilizador ACS881F1 serviu para o estudo da citotoxicidade induzida pela PDT isolada, apresentando por si só elevada citotoxicidade com baixas concentrações, levando a que a combinação da oxigenoterapia com a PDT não mostrasse vantagens adicionais.

Os ensaios anteriores de *alamar blue* e SRB, permitiram dar informações relativas à atividade metabólica e ao conteúdo proteico, respetivamente. Todavia estes não informam sobre os processos intracelulares que levam à citotoxicidade induzida pelos tratamentos. Assim, recorreu-se à avaliação dos tipos de morte celular pela citometria de fluxo. A morte celular por apoptose foi a morte preferencial para a condição OT 2bar e para a combinação PDT+OT 1bar, mesmo recorrendo a baixas concentrações de fotossensibilizador. Neste caso, a oxigenoterapia aplicada

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

de forma isolada e a combinação revelaram resultados mais interessantes do que a PDT aplicada de forma isolada, comparativamente ao controlo.

O *aortic ring assay* permitiu avaliar a vascularização e a angiogénese, proporcionando uma avaliação mais completa dos processos angiogénicos em comparação com os outros ensaios. Assim, podemos inferir que a adição de OT à PDT não revelou melhorias no tratamento, pois a PDT aplicada de forma isolada apresentou um decréscimo mais acentuado da distância de *sprout*, da distância de confluência e da densidade dos vasos sanguíneos, permitindo concluir que a PDT baseada no fotossensibilizador ACS881F1 poderá ter os vasos sanguíneos com alvos terapêuticos.

Tendo em conta todos os resultados obtidos e de forma a responder ao objetivo do trabalho por nós proposto, recorreu-se, por último, ao fotossensibilizador de referência e já amplamente utilizado na prática clínica, o Photofrin®. Os resultados obtidos com o Photofrin® permitiram demonstrar que a combinação OT60+PDT 2bar é preferível à PDT aplicada de forma isolada. Estes resultados permitem igualmente concluir que a combinação de PDT com a OT pode ser uma abordagem bastante promissora no caso do uso de fotossensibilizadores menos eficazes.

A fim de aprofundar os conhecimentos acerca das condições de tratamento ideais a aplicar e quais os respetivos efeitos, outros ensaios podem ser realizados. Esses ensaios podem ser, por exemplo o MTT, que avalia a atividade mitocondrial e permite complementar os resultados da atividade metabólica. Por outro lado, podem ser realizados outros ensaios para avaliar a citotoxicidade da terapia e os mecanismos celulares despoletados pelas terapias estudadas, tais como: o ensaio cometa, por forma a avaliar possíveis danos no ADN; *western blot* para avaliar a expressão da proteína P53; e a citometria de fluxo, por forma a avaliar os níveis de stresse oxidativo e respetivas defesas antioxidantes. Para além disso, o desenvolvimento de modelos animais ortotópicos de retinoblastoma e consequentes estudos *in vivo* serão de extrema importância futura.

Em suma, o presente projeto destaca a terapia fotodinâmica e respetiva combinação com a oxigenoterapia como uma possível abordagem terapêutica promissora para o retinoblastoma, tendo por base as vantagens já mencionadas que esta combinação poderá implicar.



## **VII. Bibliografia**



- Abrantes, A. (2013). *Hipoxia Tumoral-Metabonómica e Imagem Estudo Experimental*. Universidade de Coimbra.
- Agostinis, P., Berg, K., Foster, T. H., Cengel, K. A., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., et al. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *American Cancer Society*, 61, 250-281.
- Al-Nasiry, S., Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22(5), 1304–1309.
- American Cancer Society, A. (2015). Retinoblastoma What is cancer ? Copyright American Cancet Society.
- Anazetti, M. C. (2007). Morte Celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular, 37–58.
- Antczak, C., Shum, D., Escobar, S., Bassit, B., Seshan, V. E., Wu, N., ... Djaballah, H. (2007). High-Troughput Identification of Inhibitors of Human Mitochondrial Peptide Deformylase. *J. Biomol. Screen*, 12(4), 521–535.
- Antoneli, C., Steinhorst, F., Ribeiro, K. de C., Erwenne, C. Ma., Arias, V., & Bianchi, A. (2003). Evolução do retinoblastoma, (2), 401–408.
- Aplin, a, Fogel, E., Zorzi, P., & Nicosia, R. (2008). Chapter 7 The Aortic Ring Model of Angiogenesis. *Methods in Enzymology*, 443(08), 119–136.
- Ashley, D. J. (1969). *Brit. J. Cancer* (23), 313.
- Baker, M., Robinson, S. D., Lechertier, T., Barber, P. R., Tavora, B., D'Amico, G., ... Hodivala-Dilke, K. (2012). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature Protocols*, 7(1), 89–104.
- Bent, S., Bertoglio, K., Ashwood, P., Nemeth, E., & Hendren, R. L. (2012). Brief Report: Hyperbaric Oxygen Therapy (OT) in Children with Autism Spectrum Disorder: A Clinical Trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 1127-1132.
- Bhuvaneswari, R., Gan, Y. Y., Soo, K. C., & Olivo, M. (2009). The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2275–2283.
- Brown, S. B., Brown, E. A., & Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment Photodynamic therapy.
- Callioglu, E. E., Tuzune, A., Demirci, S., Cengiz, C., & Caylan, R. (2015). Comparison of simultaneous systemic steroid and hyperbaric oxygen treatment versus only steroid in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(6), 9876-9882.

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

- Castejón, O. C. (2015). "Photodynamic Therapy improvement with hyperbaric oxygen therapy for human colon cancer treatment". Universidade de Coimbra.
- Comings, D. E. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3324–3328.
- Corson, T. W., Samuels, B. C., Wenzel, A. A., Geary, A. J., Riley, A. A., Mccarthy, B. P., ... Territo, P. R. (2014). Multimodality Imaging Methods for Assessing Retinoblastoma Orthotopic Xenograft Growth and Development, 9(6), 1–9.
- Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry, 647–652.
- Daruwalla, J., & Christophi, C. (2006). Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: A review. *World Journal of Surgery*, 30(12), 2112–2131.
- Dimaras, H., Kimani, K., Dimba, E. A., Gronsdahl, P., White, A., Chan, H. S., et al. (2012). Retinoblastoma. *The Lancet Oncology*, 379: 1436–1446.
- Dougherty, T. J., Cooper, M. T., & Mang, T. S. (1990). Cutaneous Phototoxic Occurrences in Patients Receiving Photofrin @, 488.
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbélik, M., ... Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889–905.
- Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 14 (1), 380-387.
- Engeland, V., V-, C. P. A., Schutte, B., Engeland, M. Van, Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., ... Reutelingsperger, C. P. M. (1998). affinity assay : a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine expo ... Annexin V-Affinity Assay : A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure, (July 2016).
- Feldmeier, J., Carl, U., Hartmann, K., & Sminia, P. (2003). Hyperbaric Oxygen: Does it promote growth or recurrence of malignancy? *UNDERSEA & HYPERBARIC MEDICAL*, 1-18.
- Gill, A., & Bell, C. (2004). Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 97(7), 385–395.
- Giordano, A., & Lee, W.-H. (2006). Preface. *Oncogene*, 25, 5189.
- Gloeckner, H., Jonuleit, T., & Lemke, H. D. (2001). Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue???. *Journal of Immunological Methods*, 252(1-2), 131–138.

- Go, R. S., & Owen, W. G. (2003). The rat aortic ring assay for in vitro study of angiogenesis. *Methods Mol.Med.*, 85, 59–64.
- Graaf, P. d., Göricke, S., Rodjan, F., Galluzzi, P., Maeder, P., Castelijns, J. A., et al. (2012). Guidelines for imaging retinoblastoma: imaging principles and MRI standardization. *Pediatric Radiology*, 2-14.
- Gursoy, H., Ozcakir-Tomruk, C., Tanalp, J., & Yılmaz, S. (2012). Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical Oral Investigations*, 17 (4), 1113-1125.
- Hajri, A., Wack, S., Meyer, C., Smith, M. K., Leberquier, C., Kedinger, M., & Aprahamian, M. (2002). In Vitro and In Vivo Efficacy of Photofrin and Pheophorbide a, a Bacteriochlorin, in Photodynamic Therapy of Colonic Cancer Cells, 75(2), 140–148.
- Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. J., & Lee, C. C. (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 42(4), 377–387.
- Jallali, N., Withey, S., & Butler, P. (2005). Hyperbaric oxygen as adjuvant therapy in the management of. *The American Journal of Surgery*, 189(4), 462-466.
- Jeon, K. W. (2012). *International Review of Cell and Molecular Biology*. USA: Elsevier.
- Jori, G. (1996). Tumour photosensitizers: Approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36(2), 87–93.
- Kiss, S., Leiderman, Y., & Mukai, S. (2008). Diagnosis, classification and treatment of retinoblastoma. *International Ophthalmology Clinics*, 48 (2). 135-147.
- Knudson, A. J. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4), 820–823.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C., Kuijten, G., Keehnen, R., Pals, S., & Oers, M. (2016). V Flow B, pp. 1415–1421.
- Kronbauer, F. L., Corrêa, Z. M., Marcon, Í. M., Tyllmann, C., & Tyllmann, C. (2000). O uso da quimioterapia no tratamento do retinoblastoma:Avaliação retrospectiva. *Arquivos Brasileiros de Oftamologia*, 63 (6), 481-486.
- Kumar, M. A., Radhika, B., Gollamudi, N., Reddy, S. P., & Yaga, U. S. (2015). Hyperbaric Oxygen Therapy—A Novel Treatment Modality in Oral Submucous Fibrosis: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Reserach*, 9(5), 2-5.
- Kurohane, K., Tominaga, A., Sato, K., North, J. R., Namba, Y., & Oku, N. (2001). Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. *Cancer Letters*, 167(1), 49–56.

## **Terapia Fotodinâmica combinada com oxigenoterapia: Uma abordagem no retinoblastoma?**

---

- Kunz, M., & Ibrahim, S. M. (2003). Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Molecular Cancer*, 2, 23.
- Laranjo, M. (2010). Ação intracelular da terapia fotodinâmica. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Leach, R. M., Rees, P. J., & Wilmshurst, P. (1998). Hyperbaric oxygen therapy. *ABC of Oxygen*, 317(7166), 1140–1143.
- Macey, M. G. (2007). *Flow Cytometry*. Totowa, New Jersey.
- Mahajan, A., Crum, A., Johnson, M., Materin, M. (2011). Ocular neoplastic disease. *Seminars in ultrasound, computed Tomography and magnetic resonance* 32 (1): 28-37.
- Masson, V., Devy, L., Grignet-Debrus, C., Bernt, S., Bajou, K., Blacher, S., ... Noël, A. (2002). Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biological Procedures Online*, 4(1), 24–31.
- Mehta, M., Sethi, S., Pushker, N., Kashyap, S., Sen, S., Bajaj, M. S., Ghose, S. (2012). Retinoblastoma. *Singapore Medical Journal* 53 (2): 128-136.
- Mikus, J., & Steverding, D. (2000). A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue?? *Parasitology International*, 48(3), 265–269.
- Moen, I., & Stuhr, L. E. (2012). Hyperbaric oxygen therapy and cancer—a review. *Targeted Oncology*, 7(4): 233–242.
- Nakamura, C. V., Santos, A. O., Vendrametto, M. C., Luize, P. S., Dias Filho, B. P., Cortez, D. a. G., & Ueda-Nakamura, T. (2006). Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), 61–66.
- Neubauer, R. A., & Walker, M. (1998). *Hyperbaric Oxygen Therapy*. USA: Library of Congress .
- Nicosia, R. F., & Ottinetti, A. (1990). Cultures of Rat Aorta : a Comparative Study of, (February), 119–128.
- Ogawa, K., Kohshi, K., Ishiuchi, S., Matsushita, M., Yoshimi, N., & Murayama, S. (2013). Old but new methods in radiation oncology: hyperbaric oxygen therapy. *International Journal of Clinical Oncology*, 18(3), 364-370.
- Pass, H. I. (2012). Photodynamic Therapy in Oncology: Mechanisms and Clinical Use. *Journal of the National Cancer Institut*, 85(6), 443-456.
- RR, A., & CH, S. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 61-75.

- Semenza, G. L. (2007). Hypoxia and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 85 (12), 223-224.
- Sena, C. M., Matafome, P., Louro, T., Nunes, E., Fernandes, R., & Seiça, R. M. (2011). Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats.
- Serra, A., Pineiro, M., Santos, C. I., Rocha, A., Abrantes, M., Laranjo, M., & Botelho, M. F. (2010). In Vitro Photodynamic Activity of 5, 15-bis (3-Hydroxyphenyl) porphyrin and Its Halogenated Derivatives Against Cancer Cells, (34), 206–212.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112.
- Teixo, R. J. (2013). *Terapia fotodinâmica: Uma abordagem no Retinoblastoma*. Universidade de Coimbra.
- Telford, W., Tamul, K., & Bradford, J. (2016). Measurement and Characterization of Apoptosis by Flow Cytometry, (July), 1–28.
- TIBBLES, P. M., & EDELSBERG, J. S. (1996). HYPERBARIC-OXYGEN THERAPY. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 1642-1648.
- Vaupel, P., & Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 225-239.
- Walther, J., Schastak, S., Dukic-Stefanovic, S., Wiedemann, P., Neuhaus, J., & Claudepierre, T. (2014). Efficient Photodynamic Therapy on Human Retinoblastoma Cell Lines. *PLOS One*, 9(1), 1-12.
- Wang, Y.-D., Su, Y.-J., Li, J.-Y., Yao, X.-C., & Liang, G.-J. (2015). Rapamycin, an mTOR inhibitor, induced apoptosis via independent mitochondrial and death receptor pathway in retinoblastoma Y79 cell. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(7), 10723–10730.