

Mecanismos celulares subjacentes à potencial ação fotodinâmica induzida por corantes cianínicos esquarílicos

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

João Rafael Rodrigues Siopa

Orientação: Professora Doutora Amélia Maria Lopes Dias da Silva
Professora Doutora Lucinda Vaz dos Reis



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vila Real, 2017

Mecanismos celulares subjacentes à potencial ação fotodinâmica induzida por corantes cianínicos esquarílicos

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

João Rafael Rodrigues Siopa

Orientação: Professora Doutora Amélia Maria Lopes Dias da Silva
Professora Doutora Lucinda Vaz dos Reis



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vila Real, 2017

Mecanismos celulares subjacentes à potencial ação fotodinâmica induzida por corantes cianínicos esquarílicos

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

João Rafael Rodrigues Siopa

Orientação: Professora Doutora Amélia Maria Lopes Dias da Silva
Professora Doutora Lucinda Vaz dos Reis

Composição do Júri:

Data: _____

Classificação: _____

Vila Real, 2017

Declaração

Eu, João Rafael Rodrigues Siopa, declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Vila Real, Abril de 2017

(João Rafael Rodrigues Siopa)

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para este percurso que foi o Mestrado em Bioquímica, e conseqüentemente, me ajudaram na execução desta dissertação.

Em primeiro lugar, gostaria de dirigir o meu sincero agradecimento à professora Amélia, não só pela orientação desta dissertação, mas também por toda a amizade, simpatia e partilha de conhecimentos, ao longo do último ano. À professora Lucinda pela co-orientação, amizade e disponibilidade para ajudar. Peço desculpa também por todas as dores de cabeça que lhes dei e agradeço por me terem aturado durante todo este tempo. Sem esta orientação, seria impossível a realização desta dissertação.

Ao professor Ramiro pela conceção dos LED's usados neste trabalho e à professora Guilhermina por me deixar usar alguns dos seus equipamentos, que tanto me ajudaram durante esta dissertação. Ao Tiago Martins e à Tânia Fernandes, pela amizade e por toda a ajuda e conselhos que me deram durante a realização desta dissertação.

Gostaria também de agradecer aos meus amigos Carlos, Marcelo, Tiago, Luís, Jorge, Rocha, Mónica e Sandra, por toda a ajuda, compreensão, gargalhadas, momentos de descontração e apoio. Sem vocês, nunca teria conseguido ultrapassar toda esta fase, desde a licenciatura até aqui. Estiveram sempre comigo e quero que saibam que estarei sempre com vocês. You are the best!

Agradeço também a toda a minha família, principalmente aos meus pais e ao meu irmão, por todo o apoio, psicológico e financeiro, por toda a amizade e compreensão que me disponibilizaram durante todo o meu percurso académico, especialmente na realização desta dissertação. Devo-vos tudo e a pessoa que sou é graças a vocês.

A todos, um enorme OBRIGADO!

Os resultados apresentados nesta dissertação de mestrado foram anteriormente apresentados/publicados nos seguintes eventos:

Comunicações orais e em painel:

[1] Siopa J., Reis L., Silva A.M. (2016). **Mecanismos fisiológicos desencadeados pela irradiação de células pré-expostas a um fotossensibilizador**, em Livro de Resumos de 10ª Edição Jornadas de Biologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 12 e 13 de Outubro, Vila Real Portugal. (Comunicação Oral)

[2] Siopa J., Martins T., Fernandes J.R., Reis L., Silva A.M. (2016). **Irradiação de células pré-expostas a corante escurilico aumenta o conteúdo em ROS e reduz a viabilidade celular**, em Livro de resumos de 9ª Edição das Jornadas de Bioquímica, 13 e 14 de Abril, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. (Comunicação em Pannel)

Resumo

A terapia fotodinâmica (PDT - do Inglês *Photodynamic Therapy*) é uma técnica terapêutica baseada numa reação fotoquímica que conjuga uma molécula fotossensibilizadora, oxigénio molecular e luz, sendo usada em tratamentos de várias doenças, não só como em alguns tipos de cancros, mas também de lesões não-malignas. Foi introduzida no século XX e, consiste na administração de um agente fotossensibilizador (FS) que, quando irradiado a comprimentos de onda e intensidades adequadas, é ativado e produz espécies citotóxicas capazes de destruir o tecido afetado.

Dentro dos FSs usuais, os corantes, em particular as cianinas esquarílicas (usadas neste estudo), são um grupo de compostos que têm vindo a despertar o interesse nesta área terapêutica pela eficácia fotossensibilizante que apresentam. Contudo, o conhecimento dos mecanismos subjacentes à ação destas moléculas fotossensibilizadoras em modelos biológicos ainda é escasso, pelo que constituem os objetivos principais desta dissertação.

Neste trabalho foram estudados alguns mecanismos de atuação de quatro cianinas esquarílicas assimétricas, sintetizadas previamente, quando excitadas a um comprimento de onda adequado usando modelos *in vitro* (células Caco-2, uma linha tumoral e uma linha de tecido normal, células HaCaT). Estudou-se o seu efeito na viabilidade celular, dependente de tempo de exposição, concentração e presença (ou não) de irradiação adequada, na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), na indução de fragmentação de DNA e na expressão de proteínas da apoptose.

Verificou-se que, de um modo geral, as cianinas estudadas promoveram a redução da viabilidade celular, quando ativadas pela luz, em ambas as linhas celulares, sendo essa redução de viabilidade dependente do tempo de exposição. A exposição das células aos FSs irradiados, promoveu o aumento da produção de ROS, (observado através da sonda 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA)), comparativamente aos ensaios não irradiados, sendo esse aumento maior quando se aplicaram as cianinas esquarílicas B e C (CEsq-B e C). Observou-se também um aumento na fragmentação de DNA (através da sonda Hoescht 33342) após a exposição das células aos FSs irradiados, verificando-se que a CEsq-C é a que provoca maior fragmentação de DNA em células Caco-2 ($80,37 \pm 9,56$ % de células com DNA fragmentado) e, em células HaCaT, a CEsq-B foi a que mais se destacou ($18,77 \pm 4,40$ % de células com DNA fragmentado). A expressão de AIF

(fator indutor de apoptose), proteína envolvida na indução da fragmentação de DNA e que também promove a apoptose, foi detetada por imunocitoquímica, apresentando maior expressão no citoplasma em células que foram expostas durante 1 hora à CEsq-A, que foi também esta a cianina que apresentou menos fragmentação de DNA. Nas células expostas às outras cianinas (CEsq-B, C e D), observou-se uma expressão de AIF a nível citoplasmático e nuclear, o que corrobora o fato de estas cianinas apresentarem níveis mais elevados de fragmentação de DNA.

Tendo em conta o coeficiente de partição (maiores que 1,0 para todas as cianinas), e ensaios de retenção dos FSs na membrana celular, foi possível concluir que os corantes são retidos nas células ficando em contacto direto com as membranas celulares. Contudo, o mecanismo que permite esta retenção não foi ainda esclarecido.

Os mecanismos de morte não foram completamente desvendados, dado que não foi possível concluir quanto à via de apoptose envolvida. Os resultados apontam para o possível envolvimento de outros mecanismos de morte celular, como a necrose e a autofagia, sendo necessários mais estudos para os esclarecer.

Palavras-chave: Células Caco-2; Células HaCaT; Cianinas Esquarílicas; Morte Celular, ROS; Fragmentação do DNA; Apoptose;

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is therapeutic technique based on a photochemical reaction that combines a photosensitizer molecule, molecular oxygen and light, being used in treatments of various diseases, not only as in such as some types of cancer, but also for non-malignant lesions. Introduced in the 20th century, it consists in the administration of a photosensitizer agent (FS) which, when irradiated at appropriate wavelengths and intensities, is activated and produces cytotoxic species capable of destroying the affected tissue.

Within the usual FSs, the dyes, in particular the squarylium cyanines (used in this study), are a group of compounds that have aroused interest in this therapeutic area due to the photosensitizing efficacy that they present. However, knowledge about the mechanisms underlying the action of these photosensitizer molecules in biological models is still scarce and therefore constitutes the main objectives of this dissertation.

In this work, we investigated some mechanisms of action of four unsymmetrical squarylium cyanines, previously synthesized, when excited at appropriate wavelengths using *in vitro* models (Caco-2 cells, a tumoral cell line and a non-tumoral cell line, HaCaT cells). Its effects on the production of reactive oxygen species (ROS), on DNA fragmentation induction and the on the expression of apoptotic proteins were studied.

It was observed that, in general, these cyanines promoted a time and concentration-dependent reduction on cell viability, when activated by light, in both cell lines. Cells exposure to the irradiated FSs promoted and increase in ROS production (observed through the DCFDA probe), when compared with the non-irradiated cells, and this increase was greater to CEsq-B and C. An increase in DNA fragmentation (through the Hoescht 33342 probe) was also observed after exposure of the cells to irradiated FSs, with CEsq-C causing the greatest fragmentation in Caco-2 cells ($80.37 \pm 9.56\%$ of cells with fragmented DNA) and CEsq-B the most prominent in HaCaT cells ($18.77 \pm 4.40\%$ of cells with fragmented DNA). Expression of AIF (apoptosis inducing factor), a protein related to DNA fragmentation and that promotes apoptosis, was also analysed, it was more expressed in the cytoplasm of the cells that were exposed for 1 hour to irradiated CEsq-A, but this cyanine sowed the less DNA fragmentation. In the cells exposed to the other cyanines, the expression of AIF was cytosolic and nuclear, and it is correlated with higher values of DNA fragmentation.

Regarding the partition coefficient (greater than 1.0 μM for all the cyanines), and the capacity of FSs retention in the cell's membranes, it was concluded that dyes are retained in the cells being in direct contact with cell membranes. However, the mechanisms responsible for that retention were not clarified yet.

The mechanisms of cell's death induced by exposure to cyanines have not yet been fully elucidated, as it was not possible to conclude on the apoptosis pathway involved. The results point to the possible involvement of other mechanisms of cell's death, such as necrosis and autophagy, requiring further studies to clarify them.

Keywords: Caco-2 cells; HaCaT cells; Squarylium cyanine dyes; Cell death; ROS; DNA fragmentation; Apoptosis

Índice Geral

Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice Geral.....	xv
Índice de Figuras.....	xix
Índice de Tabelas.....	xxi
Abreviaturas.....	xxiii
Capítulo I – Introdução.....	1
1.Terapia Fotodinâmica.....	3
1.1. História da PDT.....	3
1.2. Fotossensibilizadores (FSs).....	6
1.2.1. Porfirinas (PPs).....	7
1.2.2. Derivados da clorofila.....	9
1.2.3. Corantes.....	10
1.2.3.1. Cianinas.....	11
1.2.3.2. Cianinas Esquarílicas.....	12
1.3. Distribuição e acumulação dos FSs nos tecidos.....	13
1.4. Distribuição de luz.....	15
1.5. Mecanismos fotofísicos da PDT.....	16
1.6. Mecanismos de morte, induzidos pela PDT.....	17
1.6.1. Apoptose.....	18
1.6.1.1. Via Extrínseca.....	20
1.6.1.2. Via Intrínseca.....	21
1.6.2. Necrose e PDT.....	22
1.6.3. Apoptose <i>versus</i> necrose.....	22
1.6.4. Autofagia.....	23
1.7. Aplicações da PDT.....	25
1.7.1. PDT em oncologia.....	25
1.7.2. PDT em dermatologia.....	27
1.8. Objetivos.....	29
Capítulo II – Materiais e Métodos.....	31
2.1. Cianinas Esquarílicas (CEsq).....	33

2.2. Cultura de células e manutenção.....	34
2.2.1. Preparação das placas de cultura, para ensaios com as células.....	34
2.2.2. Aplicação das cianinas e irradiação das células.....	35
2.3. Ensaios de citotoxicidade.....	36
2.4. Avaliação da internalização das cianinas nas células.....	37
2.4.1. Determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água das cianinas esquarílicas.....	38
2.4.2. Acumulação dos corantes na estrutura celular.....	39
2.5. Avaliação dos processos celulares inerentes à morte celular induzida pela exposição das células às cianinas.....	39
2.5.1. Avaliação da produção de ROS.....	40
2.5.1.1. Avaliação da produção de ROS por microscopia de fluorescência.....	40
2.5.1.2. Avaliação da produção de ROS por citometria de fluxo.....	40
2.5.2. Avaliação da peroxidação lipídica.....	41
2.5.3. Avaliação do conteúdo em glutathiona (GSH) intracelular.....	41
2.5.4. Condensação da cromatina e fragmentação do DNA.....	42
2.5.5. Expressão de proteínas envolvidas na apoptose.....	42
2.5.5.1. <i>Western blot</i>	42
2.5.5.2. Imunocitoquímica.....	44
2.6. Análise Estatística.....	45
Capítulo III – Resultados e Discussão.....	47
3.1. Degradação das cianinas.....	49
3.2. Efeito citotóxico das cianinas esquarílicas em modelos celulares.....	50
3.2.1. Ação das cianinas que possuem o grupo dicianometileno em células Caco-2 e HaCaT.....	50
3.2.2. Ação das cianinas aminoesquarílicas em células Caco-2 e HaCaT.....	55
3.3. Determinação da internalização das cianinas a nível celular.....	59
3.3.1. Coeficiente de partição 1-octanol/água.....	59

3.3.2.Determinação da quantidade de cianinas acumuladas nas células	60
3.3.3.Coeficiente de partição <i>versus</i> retenção dos corantes nas células.....	62
3.4. Mecanismos inerentes à morte celular induzida pela ativação das cianinas após irradiação.....	64
3.4.1.Comparação da produção de ROS por células expostas a cianinas ativadas após irradiação e não expostas.....	64
3.4.1.1. Avaliação da produção de ROS por microscopia de fluorescência.....	64
3.4.1.2. Avaliação da produção de ROS por citometria de fluxo.....	68
3.4.2. A exposição das células às cianinas induz peroxidação lipídica..	69
3.4.3. A exposição das células às cianinas induz redução do conteúdo em GSH.....	71
3.4.4. Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose....	73
3.4.4.1. Vias ativadas após 1 hora de exposição.....	73
3.4.4.2. Após 24 horas de exposição.....	76
3.4.5. Fragmentação do DNA e condensação da cromatina.....	77
3.4.6. Expressão de AIF por imunocitoquímica em células HaCaT.....	81
Capítulo IV – Conclusões e perspectivas futuras.....	85
4.1. Conclusões.....	87
4.2. Perspectivas Futuras.....	91
Referências Bibliográficas.....	93

Índice de Figuras

Figura 1.1. Etapas envolvidas na PDT	3
Figura 1.2. Diagrama cronológico, o qual representa os eventos históricos que marcaram a história da PDT, até ao fim do século XX	5
Figura 1.3. Fórmula de estrutura do Photofrin®	6
Figura 1.4. Fórmula de estrutura do ALA	8
Figura 1.5. Conversão enzimática do ALA em PpIX, no ciclo Heme.	9
Figura 1.6. Fórmula de estrutura da mTHPC	10
Figura 1.7. Estrutura geral das cianinas.....	11
Figura 1.8. Estrutura geral de uma cianina esquarílica	13
Figura 1.9. Penetração da luz nos tecidos.	16
Figura 1.10. Diagrama de Jablonki simplificado.....	16
Figura 1.11. Efeito fotodinâmico.....	17
Figura 1.12. Ativação da via extrínseca da apoptose com a formação do complexo DISC	20
Figura 1.13. Via intrínseca e extrínseca da apoptose	21
Figura 1.14. Apoptose vs Necrose	23
Figura 1.15. Processo autofágico	24
Figura 3.1. Espectros do Vis obtidos para as cianinas esquarílicas em estudo, após diluição de uma solução mãe (em DMSO) em DMSO e DMEM.....	49
Figura 3.2. Viabilidade de células Caco-2 após exposição aos compostos CEsq-A e CEsq-B e para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos).	51
Figura 3.3. Viabilidade de células HaCaT após exposição aos compostos CEsq-A e CEsq-B e para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos).	54
Figura 3.4. Viabilidade de células Caco-2 após exposição à cianina CEsq-C, para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos).....	56
Figura 3.5. Viabilidade de células HaCaT após exposição aos compostos CEsq-C e CEsq-D e para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos).....	58
Figura 3.6. Correlação entre a retenção das cianinas pelas células em função da quantidade adicionada inicialmente (1 e 2 µM)	62
Figura 3.7. Correlação entre os valores de coeficiente de partição obtidos (A) e teóricos (B) com os valores de concentração de CEsq retidos pelas células	63

Figura 3.8. Avaliação da produção de ROS por células Caco-2 expostas a CEsq-A e CEsq-B.	65
Figura 3.9. Avaliação da produção de ROS por células Caco-2 expostas a CEsq-C e CEsq-D	66
Figura 3.10. Avaliação da produção de ROS por células HaCaT expostas a CEsq-A, CEsq-B e CEsq-D	67
Figura 3.11. Produção de ROS, por células HaCaT, pré-expostas às cianinas.	69
Figura 3.12. Resultados de PL, obtidos por citometria de fluxo, em células HaCaT. .	70
Figura 3.13. Interação das enzimas GPx, GR e GST e a sua ação na defesa antioxidante.	71
Figura 3.14. Resultados da quantidade de GSH, obtidos por citometria de fluxo, em células HaCaT.....	72
Figura 3.15. Expressão de proteínas da apoptose em células HaCaT, após 1 hora de exposição de CEsq-B e CEsq-D	74
Figura 3.16. Clivagem e ativação de caspases	74
Figura 3.17. Expressão de proteínas da apoptose para 24 horas de exposição de CEsq-B e CEsq-D, em células HaCaT	76
Figura 3.18. Avaliação da fragmentação de DNA em células Caco-2. Imagens representativas dos resultados obtidos em microscopia de fluorescência , para as CEsq-A e CEsq-B, usando a soda Hoescht 33342, com ampliação de 200 x	78
Figura 3.19. Avaliação da fragmentação de DNA em células Caco-2. Imagens representativas dos resultados obtidos em microscopia de fluorescência , para as CEsq-C e CEsq-D, usando a soda Hoescht 33342, com ampliação de 200 x	79
Figura 3.20. Avaliação da fragmentação de DNA em células HaCaT. Imagens representativas dos resultados obtidos em microscopia de fluorescência , para as CEsq-A e CEsq-B, usando a soda Hoescht 33342, com ampliação de 200 x	80
Figura 3.21. Percentagem de células Caco-2 marcadas positivamente para fragmentação de DNA.....	81
Figura 3.22. Percentagem de células HaCaT marcadas positivamente para fragmentação de DNA.....	81
Figura 3.23. Comparação da fragmentação de DNA observada pela sonda Hoescht, com a expressão do AIF, para a PDT com as cianinas em estudo, em células HaCaT, após 1 hora de exposição	83
Figura 3.24. Mecanismos que levam à fragmentação do DNA.....	844

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Propriedades de um FS ideal	7
Tabela 1.2. Famílias dos FSs e alguns compostos pertencentes a estas famílias	7
Tabela 1.3. FSs aprovados em PDT para o tratamento do cancro.....	27
Tabela 2.1. Cianinas esquarílicas assimétricas em estudo.....	33
Tabela 2.2. Especificações dos sistemas de LEDs utilizados e os compostos sujeitos a cada um dos sistemas.....	36
Tabela 2.3. Anticorpos primários e secundários, utilizados em <i>Western blot</i>	44
Tabela 3.1. IC ₅₀ obtidos para as CEsq-A e CEsq-B em células Caco-2, nas diferentes condições de irradiação	533
Tabela 3.2. IC ₅₀ obtidos para a CEsq-A e CEsq-B em células HaCaT, nas diferentes condições de irradiação	555
Tabela 3.3. IC ₅₀ obtidos para a CEsq-C em células Caco-2, para as várias condições.	577
Tabela 3.4. IC ₅₀ dos compostos CEsq-C e CEsq-D em células HaCaT, para as várias condições.	588
Tabela 3.5. Valores obtidos e valores teóricos de coeficientes de partição (log P) para cada uma das cianinas esquarílicas.....	60
Tabela 3.6. Quantidade de cianina retida dentro das células HaCaT, quando adicionado inicialmente 1 e 2 μ M.....	61

Abreviaturas

ϵ	Coeficiente de extinção molar
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
AB	Alamar Blue
ABC	Transportadores ABC (do inglês, <i>ATP-binding cassette</i>)
AIF	Fator indutor de apoptose (do inglês, <i>apoptosis inducing factor</i>)
ALA	Ácido aminolevulínico (do inglês, <i>aminolevulinic acid</i>)
AMPS	Persulfato de amônio
Apaf-1	Fator ativador 1 de proteases apoptóticas (do inglês, <i>apoptotic protease activating factor 1</i>)
ApoB/E	Apolipoproteína B/E
BID	BH3 interativo antagonista do domínio de morte (do inglês, <i>BH3 interactive death domain antagonist</i>)
BpD	Derivados de benzoporfirina
Caco-2	Linha celular tumoral, proveniente de adenocarcinoma coloretal humano
CAD	DNase ativada por caspases (do inglês, <i>Caspase activated DNase</i>)
CEsq	Cianina Esquarílica
DCFDA	2,7-diclorofluoresceína diacetato
DHPE	Sal trietilamônio de (<i>N</i> -fluoresceína-5-tiocarbamoil)-1,2-di-hexadecanoíl- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DIABLO	Proteína de ligação direta ao IAP com baixo ponto isoelétrico (do inglês, <i>direct IAP binding protein with low isoelectric point</i>)
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte (do inglês, <i>death-inducing signalling complex</i>)
DMEM	Meio de cultura utilizado (<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECF	Substrato de melhoramento da quimiofluorescência (do inglês, <i>Enhanced Chemofluorescence</i>)
EndoG	Endonuclease G

Fas	Primeiro sinal apoptóticos (do inglês, <i>First apoptotic signal</i>)
FasL	Ligando de Fas (do inglês, <i>Fas Ligand</i>)
FasR	Recetor de Fas (do inglês, <i>Fas Receptor</i>)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês, <i>fetal bovine serum</i>)
FLIP	Proteína inibitória de FLICE (do inglês, <i>FADD-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein</i>)
FS	Fotossensibilizador
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona dissulfeto
GST	Glutathiona-S-Transferase
HaCaT	Linha celular normal, proveniente de queratinócitos da pele de um humano adulto
HAL	Hexilaminolevulato
HP	Hematoporfirina
HpD	Derivados de hematoporfirina
IAP	Inibidor de proteínas da apoptose (do inglês, <i>inhibitor of apoptosis proteins</i>)
iCAD	Inibidor da CAD
Kow	Coeficiente de partição octanol/água
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>low-density lipoprotein</i>)
MAL	Metilaminolevulinato
MDA	Malondialdeído
MDR	Proteínas de multirresistência (do inglês, <i>multidrug resistance proteín</i>)
MDR/P-gp	P-glicoproteína de multirresistência (do inglês, <i>multidrug resistance P-glycoprotein</i>)
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa (do inglês, <i>Mithochondrial outer membrane permeabilization</i>).
mTHPC	m-tetrahidroxilfenilclorina
PB	Fotobranqueamento (do inglês, <i>Photobleaching</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate buffer saline</i>)
PDT	Terapia fotodinâmica (do inglês, <i>Photodynamic Therapy</i>)

PF	Photofrin®
PL	Peroxidação Lipídica
PP	Porfirina (do inglês, <i>porphyrin</i>)
PpIX	Protoporfirina IX
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Smac	Segundo ativador de caspases proveniente da mitocôndria (do inglês, <i>Second Mitochondria-derived activator of caspases</i>)
TBS	Tampão Tris salino (do inglês, <i>Tris Buffered Saline</i>)
TBS-T	Tampão Tris salino com Tween (do inglês, <i>Tris Buffered Saline – Tween</i>)
TEMED	1,2-bis(dimetilamino)etano
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis factor</i>)

Capítulo I

Introdução

1. Terapia Fotodinâmica (PDT)

1.1. História da PDT

A PDT tem sido reconhecida ao longo dos anos como sendo uma estratégia terapêutica não-invasiva, usada em alguns tipos de cancro e lesões não-tumorais, como por exemplo, a psoríase. É baseada na administração (tópica ou sistêmica) de um fármaco fotossensibilizador (FS) não tóxico (Fig.1.1) que, quando irradiado com uma luz de comprimento de onda adequado, preferencialmente no intervalo entre 600 a 900 nm (“janela terapêutica”) e interagindo com o oxigénio molecular tecidual, produz espécies citotóxicas, particularmente espécies reativas de oxigénio (ROS), resultando na morte celular e na destruição de tecido lesado (Agostinis *et al.*, 2011; Castano *et al.*, 2004; Moor, 2000).

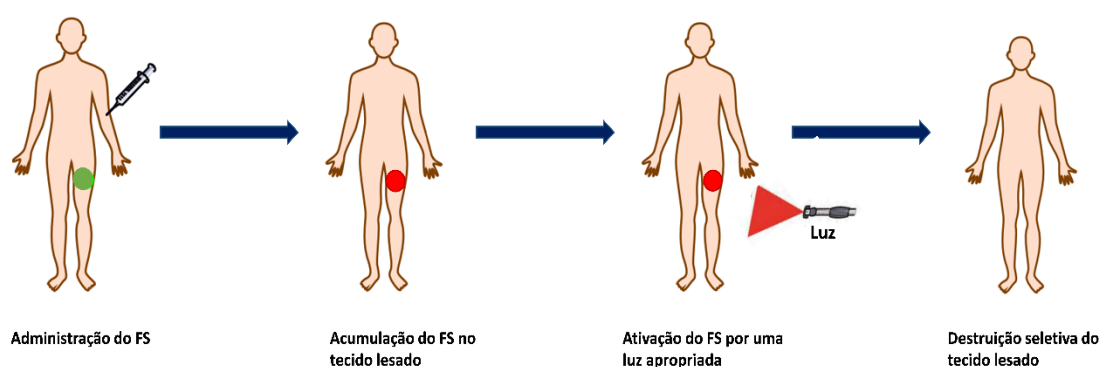


Figura 1.1. Etapas envolvidas na PDT (adaptado de Bastos *et al.*, 2012). Abreviaturas: FS – Fotossensibilizador

Desde o princípio do nosso Universo, a luz transmitida pelo Sol fornece à Terra energia em quantidades que permitem o desenvolvimento de vida. Culturas anciãs, como a cultura chinesa, indiana e egípcia, usavam o efeito terapêutico do Sol para curar várias doenças, como o vitiligo e a psoríase (Mitton & Ackroyd, 2008). Mas o uso terapêutico da luz como o conhecemos foi acidentalmente descoberto em 1900, quando Oscar Raab, um alemão, estudante de medicina, observou que a combinação de laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina) e luz podia destruir microrganismos (como paramécias, *Paramecium caudatum*) (Raab, 1900).

O termo “efeito fototerapêutico” foi primeiramente descrito por Von Tappeiner & Jodblauer (1904) após descobrirem que corantes derivados de anilina, aplicados

juntamente com fluorescência, em protozoários, produziam uma reação, dependente de oxigénio (Gold, 2011; Von Tappeiner & Joblauer, 1904). Em 1905, Jesionek & Von Tappeiner reportaram que as experiências envolvendo a aplicação tópica de eosina 5%, usada como FS e, combinada com luz artificial, era um sucesso no tratamento de cancro de pele do tipo não-melanoma, de *Lupus vulgaris* (ou tuberculose luposa) e *Condylomata lata* (sífilis secundária) em humanos (Gold, 2011; Jesionek & Von Tappeiner, 1905). Neste contexto, a eosina e o laranja de acridina, uma vez assimiladas pelas células, produzem uma reação citotóxica quando expostas simultaneamente a uma fonte de luz e oxigénio. Estas observações constituem os primeiros relatos de PDT e tornaram-se, de certa forma, num protótipo para estudos futuros em PDT (Gold, 2011).

A investigação na área da PDT tem-se dedicado à procura de novos potenciais FSs, maioritariamente moléculas relacionadas com porfirinas (PP). Em 1911, Hausman verificou que a hematoporfirina (HP), ativada pela luz, em condições apropriadas, conseguia fotossensibilizar os modelos animais (cobaia e ratos) com sucesso (Hausman, 2011; Gold, 2011). Dois anos mais tarde, estas observações encorajaram Meyer-Betz a injetar a HP em si próprio, constatando que quando as áreas injetadas foram expostas à luz estas ficaram inchadas e dolorosas, efeitos secundários estes que demoraram 2 meses a desaparecer, dificultando o seu uso como um FS normal (Meyer-Betz, 1913). Apesar de todas estas observações, Auler & Banzer (1942) observaram que a HP se distribuía em maiores concentrações em certos tumores dermatológicos do que nos tecidos ao redor da lesão, mas quando aplicada uma luz adequada ocorria necrose tumoral, demonstrando uma resposta fotodinâmica, por parte da HP (Auler & Banzer, 1942; Gold, 2011).

A partir das investigações clínicas descritas anteriormente, foi possível prever os princípios da PDT em células cancerígenas humanas. O princípio central é que um FS (como a HP) pode ser absorvido e concentrado maioritariamente em células cancerígenas e, quando ativado por uma fonte de luz apropriada (com comprimento de onda adequado) e em presença de oxigénio molecular, há produção de efeitos citotóxicos nas células (Agostinis *et al.*, 2011; Castano *et al.*, 2004; Gold, 2011). Em 1960, o campo da PDT despertou novamente o interesse após as observações relatadas por Lipson e Baldes (Lipson & Baldes, 1960), os quais trabalhavam na mesma clínica. Estes investigadores observaram que, após a administração de uma mistura de porfirinas (preparadas por Samuel Schwartz, colega de trabalho de Lipson e Baldes), o tecido tumoral (depois da cirurgia) apresentava fluorescência após irradiação com uma luz ultravioleta (UV). Observaram também que as impurezas presentes na HP comercial eram produtos que

localizavam melhor o tumor. Assim, Samuel Schwartz chamou a esta preparação de HP, derivados de hematoporfirina (HpD). A partir deste estudo, e de outros onde foi usado o HpD, Lipson também reconheceu que a HP e a HpD podem ser usadas como FSs para destruírem tecidos tumorais (Gold, 2011; MacDonald & Dougherty, 2001).

Dougherty *et al.* (1978) redescobriram a HpD e as suas aplicações em PDT ao observarem que, num grupo de 25 pacientes com diversos tipos de tumores, a aplicação intravenosa do FS, seguida de iluminação do tecido com luz vermelha, resultava numa resposta completa, ou parcial (desaparecimento total ou parcial de massa palpável e aparecimento de sinais de necrose tumoral, confirmada por biópsia), dentro das 24h iniciais, após o tratamento com a radiação. Estudos físico-químicos revelaram que o HpD tem um rendimento quântico de oxigénio singlete elevado, absorção máxima na região do vermelho, e que é seletivamente retido nos tecidos lesados (Dougherty *et al.*, 1978). Após muitos anos envolvidos na síntese, isolamento e identificação de frações ativas de HpD, foi obtida uma versão purificada, chamado Photofrin[®]. Nos anos 80, o uso de PF foi aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de cancro do pulmão em diversas fases (quer precoces quer tardias), como também para cancros esofágicos e displasias. A aplicação sistémica de HpD tornou-se o objetivo da pesquisa em PDT, e um variado número de usos clínicos para a PDT foi surgindo, tanto oncológicos como não oncológicos (MacDonald & Dougherty, 2001). A figura 1.2 representa um diagrama cronológico que resume os marcos que fizeram parte da história da PDT.

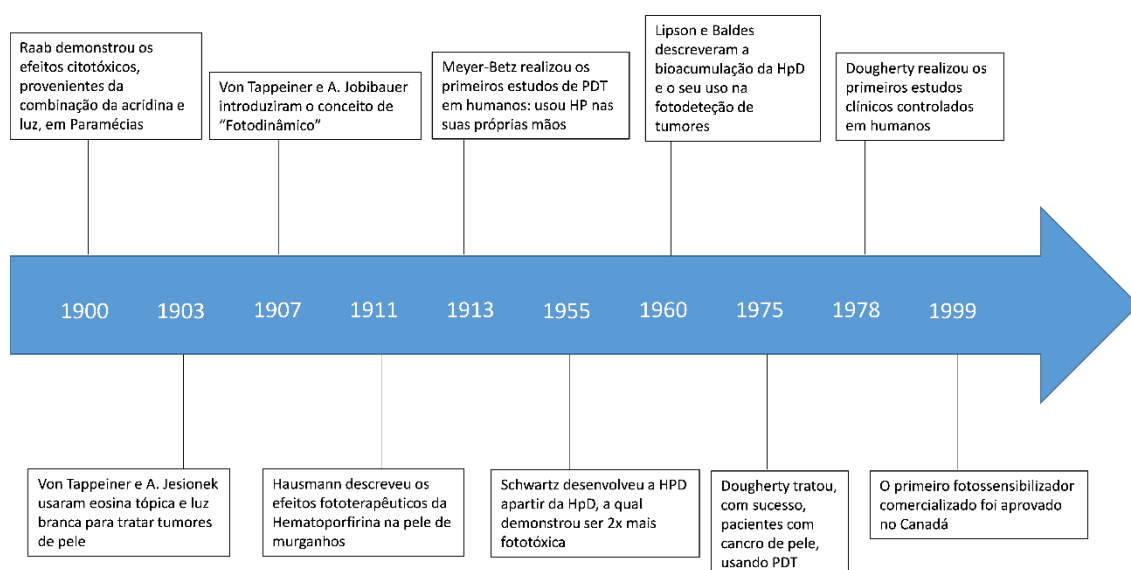


Figura 1.2. Diagrama cronológico, o qual representa os eventos históricos que marcaram a história da PDT, até ao fim do século XX (adaptado de Dolmans *et al.*, 2003).

1.2. Fotossensibilizadores (FSs)

Um FS é um composto que absorve energia da luz, com um determinado comprimento de onda, e usa essa energia para induzir reações de foto-oxidação (idealmente em tecidos lesados), na presença de oxigênio molecular (Agostinis *et al.*, 2011; Da Silva & Dos Santos, 2009). Provavelmente, é o componente mais importante em PDT e o resultado fototerapêutico é maioritariamente devido à sua estrutura química (Cândido, 2014).

Os FSs mais estudados, até à data, são os chamados FSs de primeira geração, que foram identificados a meio do século XIX, onde se inclui o HpD e o Photofrin[®] (PF), que foi o primeiro FS a ser aplicado clinicamente para a terapia do cancro (Dolmans *et al.*, 2013). O PF (Figura 1.3) continua a ser o FS mais usado, mas ainda apresenta algumas desvantagens, como a fotossensibilidade da pele por longos períodos de tempo, baixa seletividade para células neoplásicas e um $\lambda_{\text{máx}}$ relativamente baixo (a 630 nm). (Agostinis *et al.*, 2011; MacDonald & Dougherty, 2001).

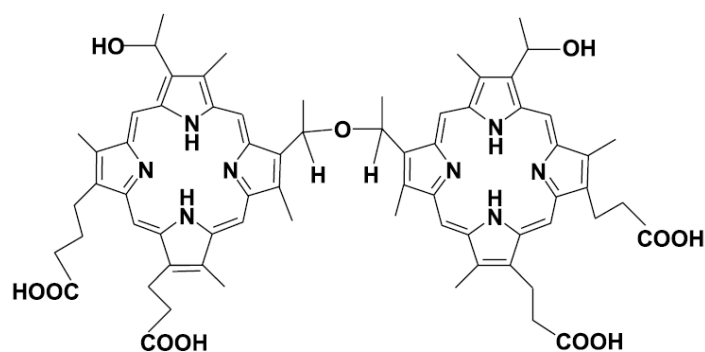


Figura 1.3. Fórmula de estrutura do Photofrin[®] (Símplicio *et al.*, 2002)

Assim, para ultrapassar algumas destas desvantagens, chegou-se à criação dos FSs de segunda geração, resultante de esforços feitos pelos investigadores nos últimos anos, que descobriram e propuseram várias centenas de novos compostos potencialmente úteis para PDT (Agostinis *et al.*, 2011; Da Silva & Dos Santos, 2009; MacDonald & Dougherty, 2001). Um vasto número de FSs tem vindo a ser testado em PDT (*in vitro* e *in vivo*, usando os mais diversos modelos celulares e animais), mas são poucos os que têm mostrado ter propriedades ideais e, por esta razão, estudos recentes têm-se focado no desenvolvimento e na eficácia de novos FSs (Castano *et al.*, 2004; Da Silva & Dos Santos, 2009; Detty *et al.*, 2004; Juarranz & Jaén, 2008).

Um FS ideal deve ter um conjunto de propriedades, como as que estão representadas na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Propriedades de um FS ideal (Castano *et al.*, 2004; Da Silva & Dos Santos, 2009; Detty *et al.*, 2004; Juarranz & Jaén, 2008).

Propriedades de um FS ideal	
Físico-químicas	• Ser quimicamente puro; • Ter um elevado coeficiente de extinção molar e $\lambda_{\text{máx}}$ no vermelho ou infravermelho próximo (600-900 nm); • Baixa tendência de formação de agregados;
Fotofísicas	• Ter elevado rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$, suficiente para matar as células lesadas.
Farmacológicas	• Ser preferencialmente acumulado e retido pelo tecido lesado; • Ser rapidamente excretados do organismo, de modo a que a toxicidade sistêmica seja mínima.
Fototerapêuticas	• Não ter efeitos secundários; • Ter mínima toxicidade no escuro e apenas apresentar citotoxicidade em presença de luz; • Não ter potencial carcinogénico e mutagénico.

Os FSs podem ser divididos em 3 famílias diferentes, as quais estão representadas na tabela 1.2.

Tabela 1.2. Famílias dos FSs e alguns compostos pertencentes a estas famílias (Allison *et al.*, 2004; Da Silva & Dos Santos, 2009).

Famílias de FSs	Compostos
Derivados da porfirina	HpD BPD ALA Texafirinas
Derivados da clorofila	Clorinas Bacterioclorinas Purpurinas
Corantes	Ftalocianinas Naftalocianinas

1.2.1. Porfirinas (PPs)

A primeira geração de FSs inclui os que foram descobertos na década de 70/80 e que são as porfirinas (PPs). Os FSs de segunda geração dizem respeito maioritariamente

a derivados de PPs ou a moléculas sintéticas criados a partir do fim da década de 80, como as clorinas e as ftalocianinas (Allison *et al.*, 2004).

Incluídos na família das PPs estão o HpD e o Photofrin[®], o pró-fármaco ácido 5-aminolevulínico (ALA), os derivados de benzoporfirina (BpD) e as texafirinas (Allison *et al.*, 2004; Da Silva & Dos Santos, 2009).

O ALA (Figura 1.4) é um pró-fármaco que, atualmente, é o mais usado no tratamento de cancro de pele não-melanoma (Agostinis *et al.*, 2011; Da Silva & Dos Santos, 2009).

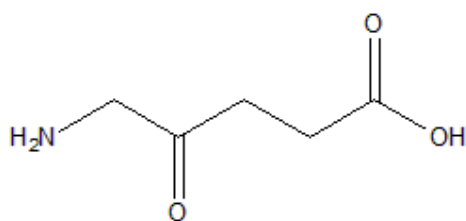


Figura 1.4. Fórmula de estrutura do ALA (Triesscheijn *et al.*, 2006).

O ALA é um aminoácido presente em todas as células humanas, que aparece na sua forma inativa, isto é, o ALA por si só não produz qualquer efeito fotodinâmico, contudo, quando aplicado, é enzimaticamente convertido na Protoporfirina IX (PpIX) durante a biossíntese do Heme (Figura 1.5), o qual provoca sensibilidade do tumor, quando acumulado nas células cancerígenas (Allison, 2014; Cândido, 2014; Da Silva & Dos Santos, 2009). Ao contrário do PF, o ALA tem sido comercializado sob a forma de medicamento de administração tópica, oral ou intravenosa. A administração tópica leva à fotossensibilidade apenas na zona da aplicação e não se observa qualquer fotossensibilidade sistémica com este método de aplicação. As administrações orais e intravenosas levam a uma fotossensibilidade sistémica que podem durar cerca de 24 a 72h, mas permite o tratamento de lesões mais profundas, por exemplo, lesões da cabeça e pescoço, pulmão e esófago (Allison, 2014). Este pró-fármaco é ativado a comprimentos de onda variáveis, desde o azul até ao vermelho sendo, por isso, clinicamente versátil. Tem também um rendimento quântico de ¹O₂ cerca de 10 vezes maior comparativamente com o PF, fazendo com o que o tempo de tratamento seja relativamente rápido (5 a 10 minutos), o que é clinicamente favorável. Assim, a formulação tópica tem ganho impacto na PDT em dermatologia. Porém, a aplicação tópica de ALA consegue penetrar nos tecidos apenas 1-2 mm, significando que só é possível tratar lesões superficiais. Modificações estruturais na molécula de ALA, resultando em metilaminolevulinato

(MAL) ou hexilaminolevulinato (HAL) foram feitas na tentativa de aumentar o alcance da penetração tópica, contudo foram conseguidos apenas mais 1-2 mm (Allison, 2014; Morton *et al.*, 2002)

O ALA está disponível no mercado sob o nome comercial Levulan[®] para o tratamento de queratose actínica (uma lesão pré-cancerosa da pele), carcinoma de células basais, linfomas de células T cutâneas e outras patologias dermatológicas (Lee & Baron, 2011). A forma metilada de ALA, o MAL, é comercializado sob o nome de Metvix[®] e é usado também no tratamento de melanomas não-melanocíticos, carcinomas de células basais e queratose actínica (Cândido, 2014; Da Silva & Dos Santos, 2009; Triesscheijn *et al.*, 2006).

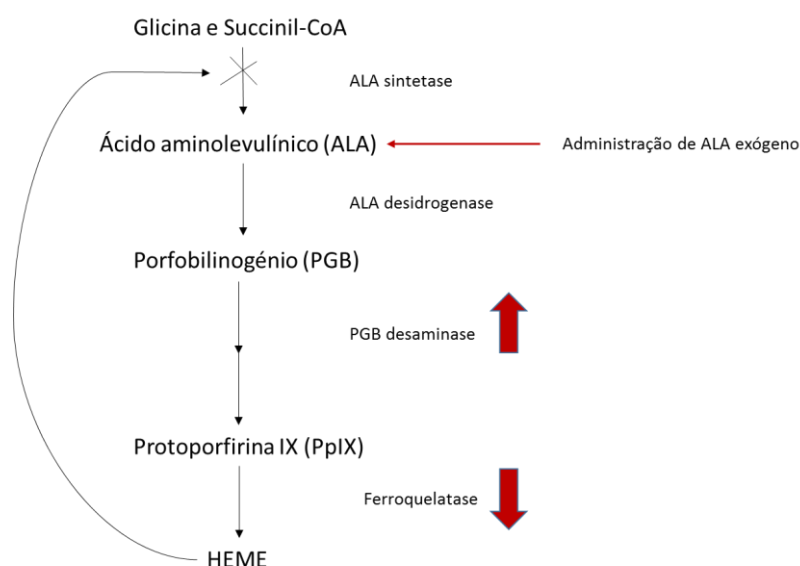


Figura 1.5. Conversão enzimática do ALA em PpIX, no ciclo Heme. O Heme é sintetizado a partir de glicina e succinil-CoA. O passo limitante na via biossintética é controlado por um mecanismo de feedback negativo no qual a concentração de heme regula a produção de ALA. Contudo, este feedback pode ser circundado pela adição excessiva de ALA exógeno às células. A resposta celular é a produção de PpIX a velocidades maiores das quais a ferroquelatase consegue converter em heme. Portanto, a PpIX tem uma atividade fotodinâmica que é ferroquelatase-dependente, enzima esta que por vezes está diminuída em células tumorais (adaptado de Da Silva & Dos Santos, 2009).

1.2.2. Derivados da clorina

A *m*-tetrahidroxilfenilclorina (*m*THPC), também designada por Temoporfin ou Foscan[®] (Figura 1.6) é um FS derivado da clorina com propriedades atrativas, como a pureza sintética e um rendimento quântico de formação de ¹O₂ elevado, o que faz com que a *m*THPC seja mais eficaz que o HpD e que o ALA. A *m*THPC apresenta também uma banda no seu espectro de absorção, centrado nos 652 nm, o que é mais satisfatório

relativamente aos FSs anteriormente descritos, permitindo irradiação com uma luz de maior comprimento de onda, aumentando o poder penetrante nos tecidos-alvo e requer menos quantidade de luz para obter o efeito fotodinâmico pretendido (Allison, 2014; Cândido, 2014). O Foscan[®] é atualmente aprovado na Europa, América do Sul e Ásia para cânceros escamosos da cabeça e pescoço que não tenham sido tratados com outros tipos de terapia. É frequentemente usado “*off-label*” como um tratamento primário de tumores de cabeça e pescoço em estágios iniciais, e também para cânceros da pele. Foi desenvolvido, em parte, para permitir uma sessão de PDT mais rápida e de forma a reduzir a fotossensibilidade à luz solar (Allison, 2014).

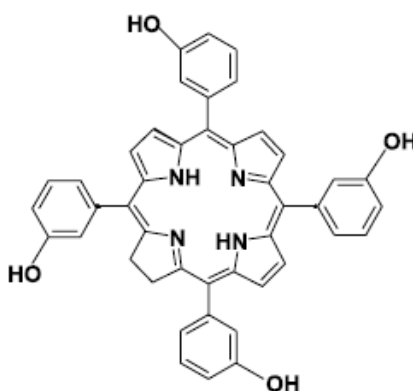


Figura 1.6. Fórmula de estrutura da mTHPC (Simplicio *et al.*, 2002).

1.2.3. Corantes

Desde as experiências feitas por Raab, os corantes têm sido um “foco” no desenvolvimento de FSs. De facto, muitos corantes presentes na composição das tintas são FSs eficazes. A maior parte do uso clínico de FSs da família dos corantes provém das ftalocianinas e derivados, como a naftalocianinas (Ben-Hur & Rosenthal, 1985). Estes compostos são ativados a comprimentos de onda entre 650 e 850 nm e com energias por volta dos 100 J/cm². A maioria dos corantes são lipofílicos (hidrofóbicos), requerendo agentes transportadores para o seu uso clínico, como por exemplo, preparações lipossomais. Alguns ligandos metálicos têm mostrado um aumento de eficácia na PDT, como o alumínio e o zinco. É interessante de notar que, até agora, os corantes com mais sucesso clínico têm estruturas similares à porfirina (Allen *et al.*, 2001; Allison *et al.*, 2004).

O Photosens[®] é uma ftalocianina que tem mostrado sucesso clínico no tratamento de um variado número de lesões cutâneas e endobronquiais, tendo sido usado também no tratamento de infecções e doenças malignas. O Photosens[®] mostrou ser bem-sucedido no tratamento de tumores de cabeça e pescoço, incluindo lábio, faringe, laringe e língua. Tumores que não foram tratados com uma terapia mais precoce, têm uma boa expectativa de cura com duas sessões de PDT. Resultados semelhantes foram observados em várias lesões cutâneas (Allison *et al.*, 2004).

1.2.3.1. Cianinas

As cianinas têm vindo a ser estudadas como potenciais ferramentas em PDT ao longo da última década devido à sua elevada eficácia como FSs (boas propriedades espectroscópicas e excelente interação com biomoléculas) e o facto de um grande número dos seus materiais de partida estarem comercialmente disponíveis (Avirah & Ramaiah, 2010; Avirah *et al.*, 2012; Delaey *et al.*, 2000).

Os corantes cianínicos pertencem à classe de corantes chamados polimetínicos. São moléculas planares, com ligações duplas conjugadas, compostas por dois anéis heterocíclicos, com átomos de carbono com hibridações sp^2 , ligados por uma cadeia polimetínica (sistema linear de conjugação- π , com número ímpar de átomos de carbono), como representado na figura 1.7 (Panigrahi *et al.*, 2012).

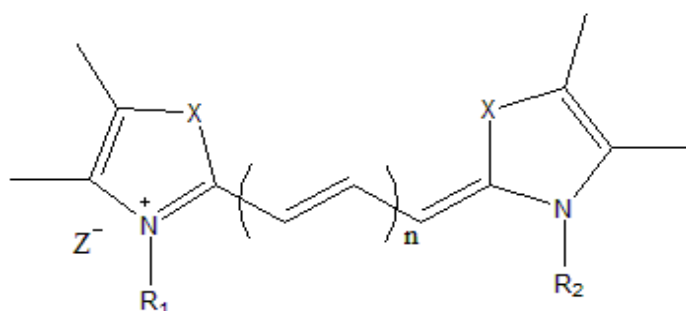


Figura 1.7. Estrutura geral das cianinas (Torres, 2010).

Como referido anteriormente, as propriedades fotoquímicas e fotofísicas das cianinas, proporcionadas pela flexibilidade da cadeia polimetínica têm despertado o interesse no seu estudo. Estas propriedades incluem a absorção com elevado coeficiente de extinção molar na região espectral do visível e infravermelho próximo (600-850 nm),

a sua capacidade de geração do estado tripleto, a fluorescência dependente do ambiente molecular, e um rendimento quântico de oxigênio singleto elevado. A ocorrência de vibrações e rotações (ou torções) das ligações polimetínicas, que podem acontecer quando as cianinas estão livres em solução, promovem a excitação da molécula e dissipação de energia não-radiativa. Contudo, quando a mobilidade é restrita, ocorrem processos como a fluorescência, um processo competitivo com os não-radioativos (Tarikolov, 2012).

Embora estes compostos apresentem diversas vantagens, também têm algumas desvantagens como a elevada propensão para sofrerem fotobranqueamento (“photobleaching”, PB) e baixa estabilidade química. Estes fatores levaram à necessidade de desenvolver corantes alternativos com absorção no infravermelho próximo e infravermelho (Avirah *et al.*, 2008).

1.2.3.2. Cianinas Esquarílicas (CEsq)

As cianinas esquarílicas (CEsq) são compostos análogos às cianinas, no que diz respeito à sua elevada capacidade em doar elétrons presentes nos sistemas conjugados dos grupos terminais. As CEsq podem ser distinguidas do resto do grupo das cianinas por possuírem um anel central de quatro membros (anel esquarílico), 1,3-dissubstituído, entre os anéis aromáticos heterocíclicos (Figura 1.8), o que dá uma elevada deslocalização de cargas e rigidez à molécula, reduzindo efetivamente a isomerização dos compostos. Estes corantes são conhecidos pelas suas formas de ressonância e estruturas zwitteriônicas, pelo elevado coeficiente de extinção molar, fotoestabilidade e também pelas suas bandas de absorção, estreitas e intensas na região do visível e infravermelho próximo, devido ao sistema de transferência de cargas dentro da própria molécula (Ananda Rao *et al.*, 2013; Avirah *et al.*, 2012). Tais propriedades permitem o seu uso num largo número de aplicações biológicas, tais como sensores de iões metálicos, detetores de grupos tióis, marcadores de fluorescência, eletrofotografia, armazenamento ótico de dados, painéis fotovoltaicos, entre outros (Arun *et al.*, 2011; Ramaiah *et al.*, 1997).

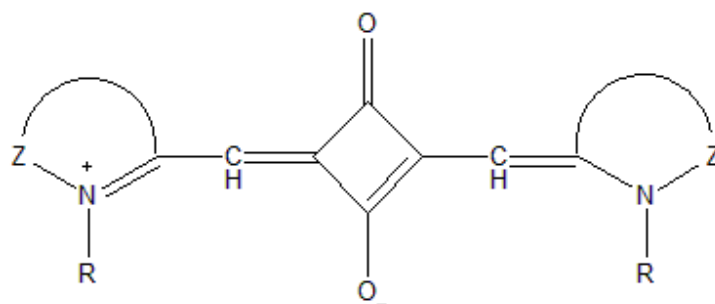


Figura 1.8. Estrutura geral de uma cianina esqarílica (Reis *et al.*, 2002).

Há certas propriedades das CESq que limitam o seu potencial uso como FSs. Estas incluem a sua propensão para formar agregados em meio aquoso, o que diminui substancialmente o tempo de vida do estado tripleto e reduzem o rendimento quântico de formação de oxigénio singlete (Avirah *et al.*, 2012; Alex *et al.*, 2007). A presença de grupos hidroxilo é também outro fator limitante, pois fazem com que o composto seja facilmente desprotonado e, portanto, o seu espetro de absorção vai ser altamente dependentemente do pH (Alex *et al.*, 2007).

Contudo, têm sido feitos esforços de forma a melhorar a estabilidade destes compostos no que diz respeito à decomposição fotoquímica, procedendo-se a alterações na sua estrutura. Porém, os métodos de síntese são complexos e não eficientes, mantendo a necessidade da procura de novos corantes e novos métodos de minimizar a fotodegradação destes (Zhang *et al.*, 2012).

1.3. Distribuição e acumulação dos FSs nos tecidos

O fator mais determinante para o resultado da PDT é a maneira como o FS interage com as células do tecido-alvo (Robertson *et al.*, 2009).

Um FS ideal, como já referido, deve ser acumulado preferencialmente nas células lesadas. Os mecanismos necessários para que tal aconteça são pouco conhecidos, porém, diversos autores desenvolveram estudos que apontam algumas hipóteses:

➤ Alguns dos compostos mais eficazes ligam-se preferencialmente a recetores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aparecem quase sempre sobre-expressas em células tumorais. Muitos tipos de células tumorais sobre-expressam o recetor de LDL apoB/E (Apolipoproteína B/E), que deverá fornecer uma resposta à biossíntese de lípidos necessários para a extensão acelerada das membranas celulares do qual depende o rápido crescimento tumoral. Além disso, os FSs podem ser também distribuídos diretamente aos

alvos celulares específicos, *via* sistemas especiais, como lipossomas, anticorpos, péptidos, proteínas (como a transferrina, fator de crescimento epidermal e insulina), ácido fólico e muitos outros;

➤ Há ainda autores que defendem que os FSs são mantidos próximos de outras macromoléculas no espaço extracelular, devido à pobre drenagem linfática dos tumores, ou pH reduzido, por vezes encontrado no citoplasma do tumor, serem responsáveis pela ionização dos FSs que assim se tornam mais hidrofílicos e são retidos dentro da célula (Agostinis *et al.*, 2011; Cândido, 2014; Moor, 2000; Simplicio *et al.*, 2002).

Sendo que os FSs de segunda geração tendem a ser compostos puros, e não misturas, a sua localização intracelular, pode, por vezes, ser identificada. A mitocôndria, lisossomas, membrana plasmática e o núcleo das células tumorais têm sido avaliados como potenciais alvos da PDT (Dougherty T. *et al.*, 1998). As ROS têm um tempo de meia-vida reduzido (0,01-0,04 μ s) e atuam perto do seu local de formação (0,01-0,02 μ m), devido à sua elevada reatividade. O tipo de foto-dano, que ocorre nas células com o FS acumulado e já ativado pela luz, depende da localização sub-celular exata do FS. O conhecimento da localização do FS é, portanto, importante para a escolha do FS mais eficaz para o tipo de aplicação específica. As localizações sub-celulares, observadas em cultura de células, têm sido determinadas para um vasta gama de FSs com diferentes estruturas (Calin & Parasca, 2006; Castano *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2009).

FSs hidrofóbicos e que têm duas ou menos cargas negativas conseguem difundir através da membrana plasmática e, depois, difundirem-se para outras membranas intracelulares. Estes FSs tendem também a ter a melhor captação pela célula *in vitro*, especialmente quando presentes em concentrações relativamente reduzidas no meio de cultura celular. A foto-oxidação de lípidos e proteínas da membrana celular resulta na ativação de fosfolipases pela membrana, o que leva a: alterações na permeabilidade da membrana, redução da sua fluidez e inativação dos sistemas enzimáticos e recetores. A inibição das enzimas mitocondriais foi apontada como sendo a chave para a morte celular por PDT. A inativação de sistemas de transporte membranar e a despolarização da membrana plasmática acontecem antes da inativação das enzimas citoplasmáticas, mitocondriais e lisossomais (Calin & Parasca, 2006; Robertson *et al.*, 2009).

FSs que são menos hidrofóbicos e têm menos que duas cargas negativas tendem a ser demasiado polares para se difundirem pela membrana e são, portanto, captados por endocitose (Calin & Parasca, 2006; Robertson *et al.*, 2009). FSs altamente aniónicos aparentam ser menos eficazes. Geralmente, a atividade fotodinâmica diminui com o

aumento do número de cargas negativas no grupo cromóforo, pois são eliminados rapidamente *in vivo*, embora haja casos em que, mesmo sendo menos eficazes, é o suficiente para produzir um efeito fototerapêutico, como é o caso do Photofrin. *In vitro*, os FSs catiónicos também mostraram ser seletivamente distribuídos, em elevadas concentrações, para a mitocôndria (MacDonald & Dougherty, 2001).

FSs hidrofílicos localizam-se preferencialmente nos lisossomas. Após a exposição à radiação, os lisossomas desintegram-se e as enzimas que contêm são espalhadas no citoplasma, levando à morte celular. A probabilidade de ocorrência de inativação celular é maior para os FSs lipofílicos do que os hidrofílicos, para a mesma dose de luz, o que significa que as estruturas membranares são mais vulneráveis (Calin & Parasca, 2006).

1.4. Distribuição de luz

Como acima referido, idealmente, o tecido lesado deve ser exposto à luz de um comprimento de onda apropriado, de modo a que o FS passe de um estado não-tóxico para um estado capaz de destruir células malignas. Por esta razão, a fonte de luz e a sua capacidade de penetrar nos tecidos são dois fatores importantes a ter em conta em PDT.

A penetração de luz nos tecidos diminui exponencialmente com a profundidade (Henderson & Dougherty, 1992). A luz azul tem mais dificuldade em penetrar os tecidos, comparativamente à luz vermelha e infravermelha, que conseguem chegar a maiores profundidades, como ilustrado na Figura 1.9.

É essencial compreender como a luz se propaga pelos tecidos e como é influenciada por processos de refração, reflexão, absorção e dispersão. Estes processos, nos sistemas biológicos, ocorrem simultaneamente. Contudo, a extensão de cada um depende do tipo de tecido e do comprimento de onda da fonte de luz. Os tecidos biológicos são meios turvos fazendo com que os feixes de luz sofram dispersão, alterando assim as suas direções. A absorção da radiação é maioritariamente devida a cromóforos endógenos presentes nos tecidos, como a hemoglobina, mioglobina e citocromos, os quais devem reduzir o efeito fotodinâmico pela competição com o FS no processo de absorção (Castano *et al.*, 2004; Henderson & Dougherty, 1992; Robertson *et al.*, 2009).

A escolha da fonte de luz depende da natureza e da localização da lesão. É de notar que o comprimento de onda de luz emitida tem de coincidir o melhor possível com o $\lambda_{\text{máx}}$ do fármaco em estudo para produzir uma máxima concentração de espécies citotóxicas (Mitton & Ackroyd, 2008; Robertson *et al.*, 2009). A eficácia clínica da PDT depende da

dosimetria de luz, o que se traduz na dose total de luz usada na irradiação do tecido, no tempo de exposição e no modo de irradiação (única, dividida ou metronómica), pois o fluxo de luz também afeta a resposta (Agostinis *et al.*, 2011).

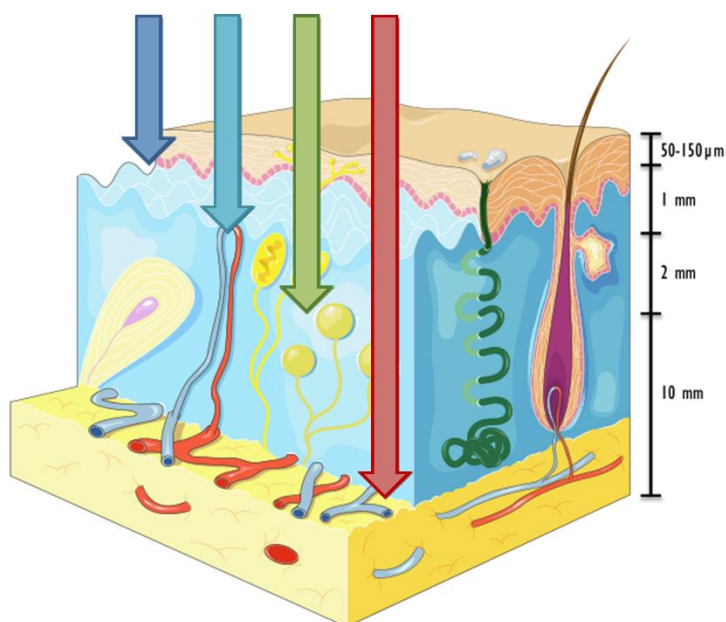


Figura 1.9. Penetração da luz nos tecidos. Este esquema representa a secção epiderme-derme. As setas representam o poder de penetração da luz em diferentes comprimentos de onda, desde a luz azul (440 a 485 nm) até à luz vermelha (625 a 740 nm) (adaptado de Agostinis *et al.*, 2011).

1.5. Mecanismos fotofísicos da PDT

Após a absorção de fotões, o FS sofre uma transição do seu estado fundamental para o estado singlete excitado, onde permanece durante um curto período de tempo (Figura 1.10) (Mroz *et al.*, 2011).

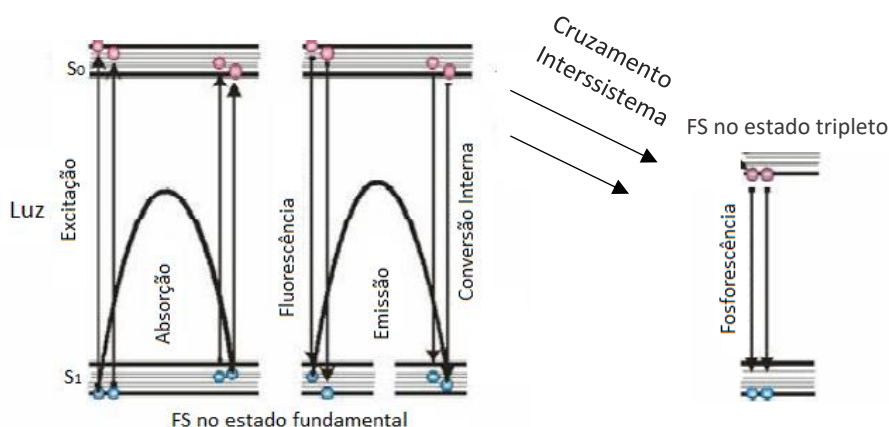


Figura 1.10. Diagrama de Jablonki simplificado (adaptado de Mroz *et al.*, 2011).

Por cruzamento intersistema, o FS decai para um estado tripleto excitado, a partir do qual pode entrar em dois mecanismos diferentes (Figura 1.11):

- i) Pode sofrer reações de transferência de elétrons ou prótons para o oxigênio ou para um substrato (como o NADH), produzindo radicais livres e outras ROS (Reação do tipo I);
- ii) Pode transferir diretamente a sua energia para o oxigênio, no estado tripleto fundamental, dando origem ao oxigênio singleto (Reação do tipo II) (Mroz *et al.*, 2011).

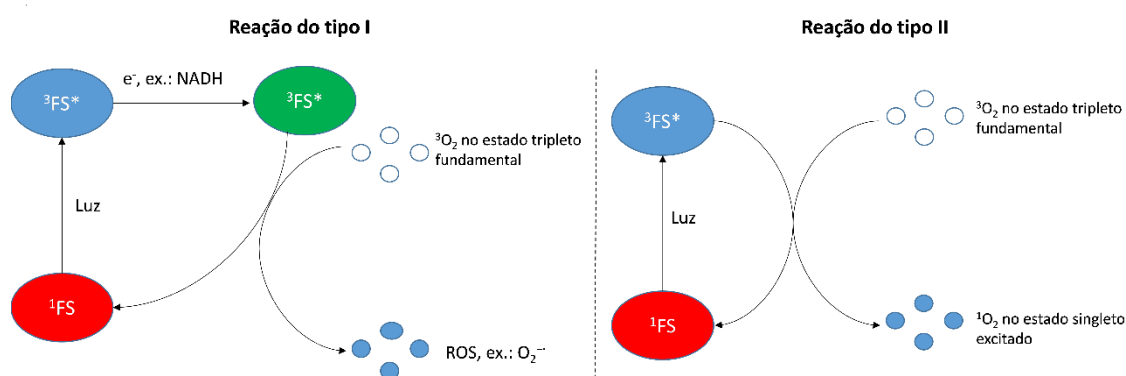


Figura 1.11. Efeito fotodinâmico (adaptado de Mroz *et al.*, 2011).

As espécies reativas formadas a partir destes mecanismos tendem a difundir-se para a vizinhança dos tecidos tratados, iniciando uma cadeia de reações bioquímicas que resultam em danos de diferentes proporções no tecido lesado, inviabilizando-o. Os locais ricos em elétrons tendem a ser modificados mais facilmente, como por exemplo a guanina, cadeias laterais de aminoácidos que contenham estruturas aromáticas e enxofre, e lípidos insaturados, o que provoca danos na membrana celular, mitocôndria e lisossomas, comprometendo a integridade destas estruturas. Os agentes fototerapêuticos podem ainda destruir o tumor indiretamente, provocando danos no endotélio vascular, levando à hipoxia e morte do tecido (Da Hora Machado, 2000).

1.6. Mecanismos de morte induzidos pela PDT

Embora a PDT possa induzir diversas alterações nas vias de sinalização celular e nas moléculas presentes nas células, o seu principal objetivo é induzir a morte celular. A concentração do FS, a sua sub-localização na célula e as suas propriedades físico-químicas, a concentração de oxigênio nos tecidos, condições de irradiação/ativação do

FS, bem como as propriedades do tipo de célula em estudo, influenciam o modo e a extensão de morte celular após PDT. Estudos mostram que a PDT pode levar aos três principais tipos de morte celular: a apoptose, a necrose e a autofagia. A apoptose é o mecanismo de morte mais estudado e, possivelmente, o mais recorrente em PDT (Agostinis *et al.*, 2011).

De seguida, serão discutidos, de uma forma geral, como ocorrem algumas vias celulares envolvidas nestes três tipos de morte celular.

1.6.1. Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo normal e único às células animais. Ocorre através de uma série de eventos, altamente organizados, levando à morte celular. Representa um mecanismo importante no controlo do número normal de células, na homeostase celular e eliminação de células inviáveis (células com danos genéticos e/ou morfológicos irreversíveis e eliminação de células que deixaram de ser necessárias, como os linfócitos T ativados que responderam, em tempos, a um agente infeccioso que já foi eliminado). Falhas neste processo estão relacionados com o aparecimento de várias doenças, como é o caso do cancro e de algumas doenças neurodegenerativas (como o Alzheimer e Parkinson). Assim, diversas doenças graves são originadas, tanto pela falha da apoptose quando é necessária (por exemplo, o cancro) como pela “apoptose excessiva” quando a eliminação de células não é apropriada (por exemplo, diabetes do tipo I) (Karp, 2013)

A apoptose é mediada por proteases, chamadas caspases, as quais clivam proteínas intracelulares específicas, o que leva à morte celular. As caspases estão presentes em todas as células animais nucleadas sob a forma de precursores inativos (procaspases). As caspases iniciadoras são ativadas após o contato com complexos iniciadores. Quando ativadas, estas proteases clivam e, consequentemente, ativam caspases executoras seguintes na via, que por sua vez, ativam várias proteínas-alvo na célula, resultando numa cascata proteolítica irreversível (Alberts *et al.*, 2015).

Duas vias apoptóticas têm sido descritas: a via intrínseca, associada com a mitocôndria, e a via extrínseca, associada com recetores de morte, presentes na membrana celular. É sabido que a PDT pode ativar estas duas vias, mas a hierarquia de eventos é controversa e pode ser diferente de acordo com a localização do FS e do protocolo de tratamento (Candido, 2014).

1.6.1.1. Via extrínseca

Proteínas extracelulares sinalizadoras, quando se ligam a “recetores de morte”, existentes na superfície da célula, desencadeiam a apoptose por via extrínseca. Os “recetores de morte” são proteínas transmembranares que contêm um domínio de ligação extracelular, um único domínio transmembranar, e um domínio de morte intracelular, o qual é essencial para os recetores ativarem o processo apoptótico. Os recetores são homotrímeros e pertencem à família de recetores do fator de necrose tumoral (TNF), a qual inclui um recetor para o próprio TNF e o recetor de morte Fas (primeiro sinal apoptótico, do inglês, *First apoptotic signal*). Os ligandos que ativam os recetores de morte são também homotrímeros. São estruturalmente relacionados entre si e pertencem à família de proteínas sinalizadoras TNF (Alberts *et al.*, 2015).

A via extrínseca da apoptose pode dar-se pela ativação do Fas na superfície da célula-alvo, pelo ligando Fas (FasL), uma proteína transmembranar da família TNF, expressa na membrana de linfócitos T (linfócitos citotóxicos). Quando ativado, o “domínio de morte” das caudas citosólicas do recetor Fas (FasR) liga proteínas adaptadoras intracelulares, que por sua vez, se ligam a caspases iniciadoras (caspase 8), formando o complexo DISC (complexo sinalizador indutor de morte, do inglês, *Death-inducing signaling complex*). Uma vez dimerizadas e ativas no complexo DISC, as caspases iniciadoras clivam as caspases vizinhas e ativam as caspases executoras, induzindo apoptose (Figura 1.12). Em algumas células, a via extrínseca acontece simultaneamente com a via intrínseca da apoptose, de modo a amplificar a cascata das caspases e provocar a morte celular. (Alberts *et al.*, 2015).

Muitas células produzem proteínas inibidoras que restringem a via extrínseca. Por exemplo, algumas células produzem a proteína FLIP (proteína inibitória de FLICE, do inglês, *FADD-like IL-1 β -converting enzyme-inhibitory protein*), a qual parece ser uma caspase iniciadora mas não tem atividade proteolítica pela falta da cisteína no seu local ativo. A FLIP dimeriza com a caspase 8 no DISC; embora a caspase 8 pareça estar ativa nesses heterodímeros, não está clivada no sítio correto, não tendo uma ativação estável, e o sinal apoptótico é bloqueado. Tais mecanismos inibitórios ajudam a prevenir a ativação inapropriada da via extrínseca da apoptose (Alberts *et al.*, 2015).

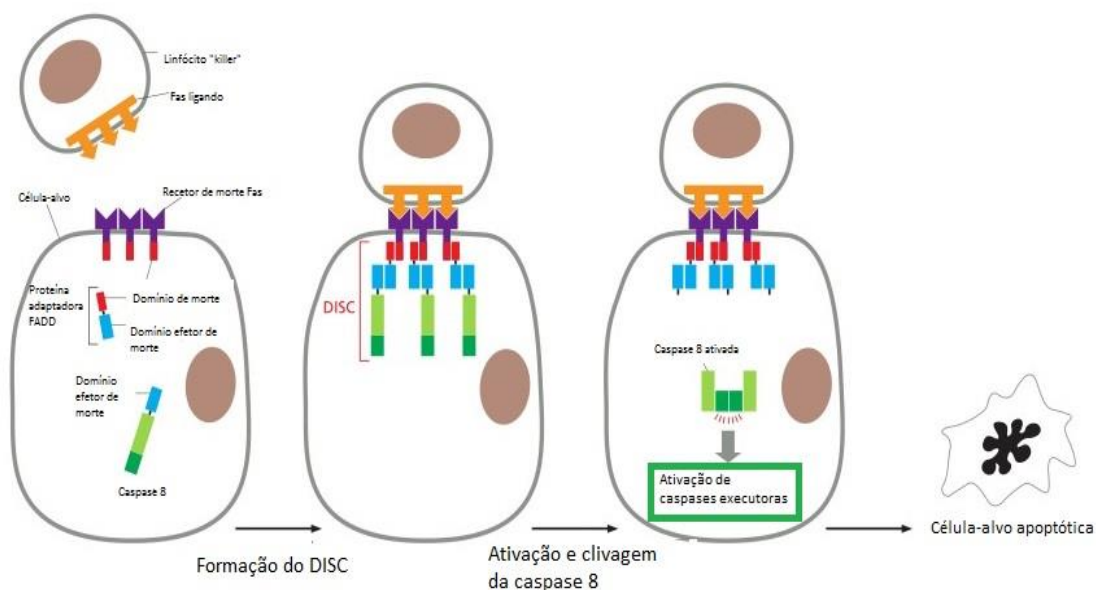


Figura 1.12. Ativação da via extrínseca da apoptose com a formação do complexo DISC (adaptado de Alberts *et al.*, 2015).

A via extrínseca da apoptose não requer a participação da mitocôndria, ao contrário do que acontece na via intrínseca. Porém, quando a formação do complexo DISC e a ativação das caspases 8 e 10 pela via extrínseca, estas podem ativar a proteína BID, da família Bcl-2, que por sua vez ativam a via intrínseca da apoptose, pela indução da liberação de citocromo c pela membrana mitocondrial externa. (Cândido, 2014; Lodish, 2008).

1.6.1.2. Via Intrínseca

A via da apoptose mediada por PDT é, predominantemente, a via intrínseca. Esta via pode ser induzida por vários fatores, entre os quais o próprio desenvolvimento celular, estímulos ambientais, stresse, danos no DNA, entre outros. Vários mecanismos da apoptose foram associados à ativação desta via pela PDT, sendo que alguns deles estão esquematizados na Figura 1.13. (Cândido, 2014).

A via intrínseca envolve a alteração da permeabilização de membrana mitocondrial externa (MOMP, do inglês *Mitochondrial outer membrane permeabilization*) e liberação de fatores apoptóticos presentes no espaço intermembranar mitocondrial para o citosol,

nomeadamente, o citocromo c, o Smac/DIABLO, o AIF (fator indutor da apoptose, do inglês *Apoptosis inducing factor*) e a endonuclease G (endoG). Após libertação no citoplasma, o citocromo c, associa-se a Apaf-1, com formação do apoptossoma que integra a pró-caspase 9, levando à sua clivagem e ativação. A ativação da caspase 9 leva à ativação de outras caspases a jusante na cascata sinalizadora, nomeadamente as caspases 3 e 7, que levam a cabo a apoptose. Ao mesmo tempo, as proteínas AIF, flavoproteína ancorada à membrana mitocondrial interna, e a endoG também contribuem para o processo apoptótico com translocação para o núcleo e mediação da condensação da cromatina (Cândido, 2014).

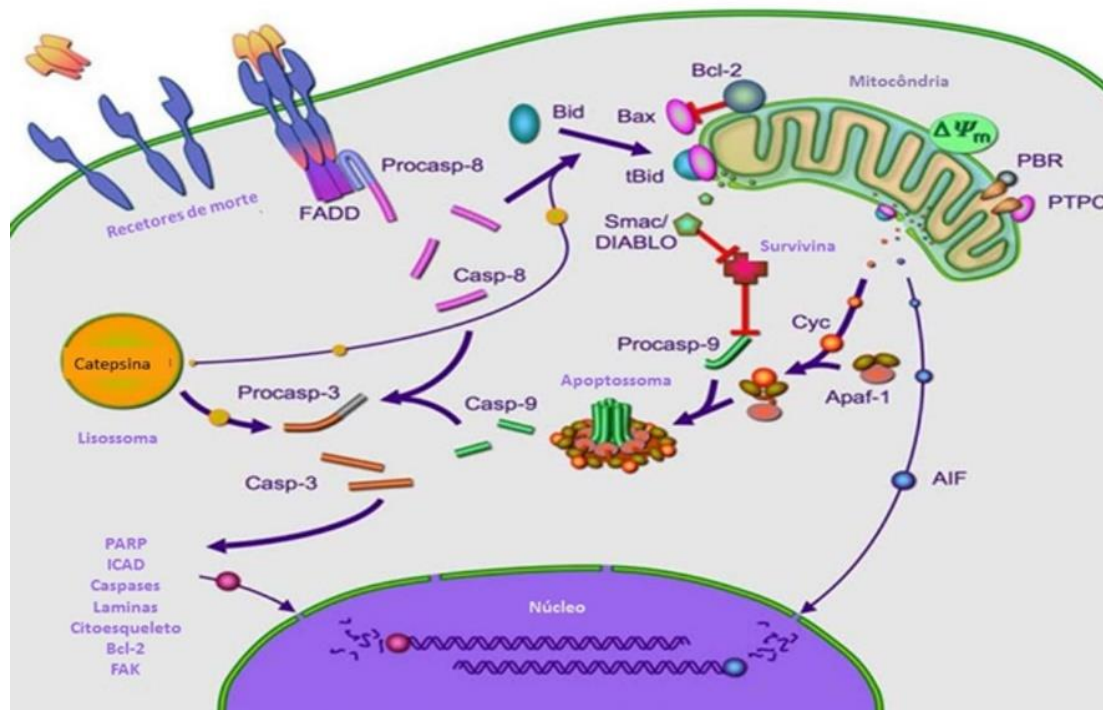


Figura 1.13. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose (adaptado de Ortel *et al*, 2009). Abreviaturas: Apaf-1, fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1, do inglês *apoptotic protease activating factor 1*; AIF, fator inibidor da apoptose, do inglês *apoptosis inhibiting factor*, Bcl-2, proteína de linfoma de células B 2, do inglês *B cell leukemia-2 protein*; BID e BAX: membros da família de proteínas Bcl-2; Casp, caspases; Cyc, citocromo C, do inglês *cytochrome C*; FADD, proteína associada ao Fas com um domínio de morte, do inglês *Fas-associated protein with death domain*, FAK, cinase de adesão focal 1, do inglês *focal adhesion kinase 1*; ICAD, inibidor da deoxiribonuclease ativada por caspase 3, do inglês *inhibitor of caspase 3 activated DNase*, PARP, poli-ADP ribose polimerase; Procasp, procaspase, PBR, recetor periférico da benzodiazepina, do inglês *peripheral benzodiazepine receptor*; PTPC, complexo do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, do inglês *permeability transition pore complex*; Smac/DIABLO, segundo ativador mitocondrial de caspase/ inibidor de ligação a proteínas inibidoras da apoptose com baixo ponto isoeletrico, do inglês *Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*; $\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial.

A integridade da membrana externa mitocondrial depende de proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2. Tanto as proteínas pró-apoptóticas como as anti-apoptóticas estão implicadas na apoptose induzida pela PDT. As proteínas anti-apoptóticas são particularmente sensíveis aos danos fototóxicos quando o retículo endoplasmático e a mitocôndria estão envolvidos. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 demonstrou ter propriedades protetoras em relação à apoptose induzida pela PDT e, a utilização de antagonistas da Bcl-2 associados ao tratamento fotodinâmico mostrou aumentar a eficiência da indução de apoptose. Perante esta observação, foi proposto que a família Bcl-2 pode constituir um alvo molecular da PDT servindo como mediadora do processo de morte celular (Cândido, 2014).

1.6.2. Necrose e PDT

A morte celular por necrose tem sido descrita como uma forma de degradação celular violenta e rápida, caracterizada por provocar o aumento (*swelling*) do citoplasma, destruição de organelos e disrupção na membrana plasmática, levando à libertação do conteúdo intracelular e consequente inflamação (Mroz *et al.*, 2011).

A necrose foi referenciada por ser um processo de morte celular accidental, causado por danos químicos e físicos e geralmente considerada como um processo não programado (Mroz *et al.*, 2011). Porém, estudos recentes mostram que isso não é verdade e que a necrose é, de facto, uma via regulada por um conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos. Diversos mediadores químicos, organelos e processos bioquímicos têm sido implicados neste tipo de morte, no entanto, não está estabelecido como se relacionam (Cândido, 2014).

Foi também reportado que, quer por concentração elevada de FS quer por elevado fluxo de luz ou ambas, a PDT tende a causar morte celular por necrose, enquanto a PDT administrada em doses baixas tende a predispor as células à morte por apoptose (Castano *et al.*, 2005; Mroz *et al.*, 2011).

1.6.3. Apoptose versus Necrose

Como já referido, a apoptose é um processo altamente organizado. No processo apoptótico, a apoptose provoca uma série de alterações morfológicas nas células, como a diminuição do volume do núcleo e da célula, perda de adesão com as células vizinhas, a

formação de “bolhas” à superfície da célula, fragmentação do DNA e rápida eliminação do corpo apoptótico por fagocitose (Karp, 2013).

Assim como a apoptose, a necrose é um processo regulado e programado, embora seja muito menos comum. É caracterizada pelo “swelling” quer da célula quer dos seus organelos, quebra da membrana, vazamento de conteúdo intracelular e a resultante indução de inflamação. Por ser um processo seguro e organizado, a apoptose pode ser comparada a uma implosão controlada de um edifício usando explosivos cuidadosamente colocados, enquanto a necrose é a explosão de uma estrutura, sem querer saber dos detritos que provoca e dos danos que podem provocar ao seu redor (Karp, 2013). Na figura 1.14 estão esquematizadas as alterações morfológicas ocorrentes nos processos de apoptose e necrose.

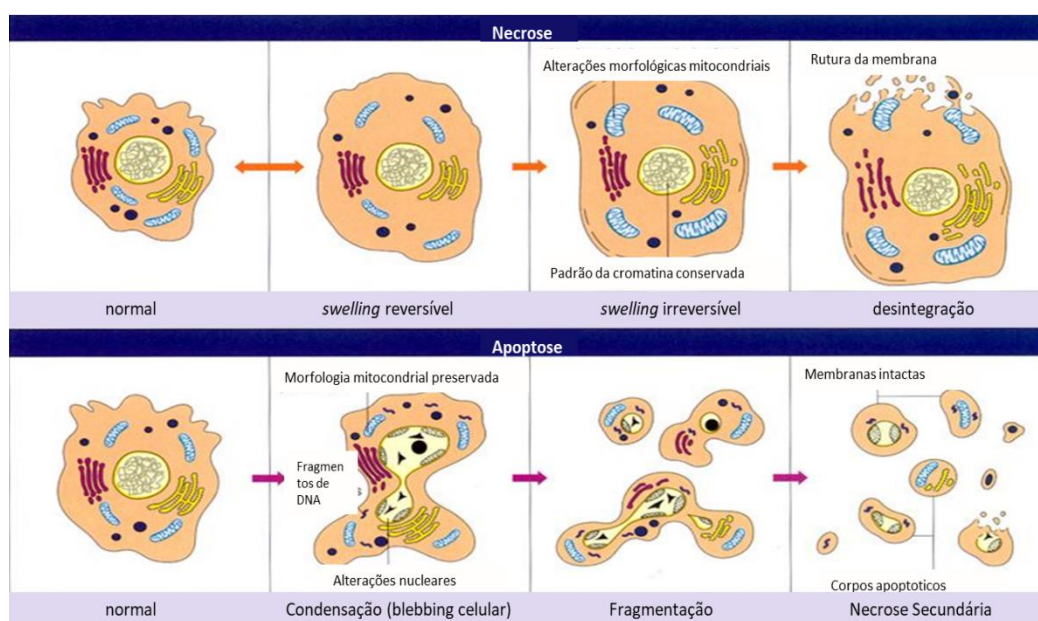


Figura 1.14. Apoptose vs Necrose (adaptado de Hans-Jürgen Rode, 2008).

1.6.4. Autofagia

A autofagia é um mecanismo celular catabólico que permite à célula manter o equilíbrio entre a síntese, degradação e reciclagem de produtos celulares. Existe uma grande variedade de processos autofágicos, que envolvem a degradação lisossomal de organelos celulares e proteínas. O mecanismo que é mais conhecido processa-se da seguinte maneira: uma estrutura de dupla membrana, chamada autofagossoma, rodeia o alvo, criando uma vesícula que separa o seu conteúdo do resto do citoplasma. Esta vesícula é depois transportada e fundida com o lisossoma, formando uma estrutura denominada autofagolisossoma, sendo o seu conteúdo, de seguida, degradado por

hidrolases lisossomais (Figura 1.15). Além de facilitar a destruição de proteínas não desejadas, organelos e microrganismos invasores, a autofagia permite à célula também deslocalizar os seus nutrientes, de processos desnecessários para os que são essenciais à vida, em tempos de fome e stresse (Mroz *et al.*, 2011).

Uma das primeiras doenças associadas com a autofagia foi o cancro. Foi descoberto que a Beclin-1, uma proteína essencial nos processos autofágicos, é também um supressor tumoral. Estudos posteriores no papel da autofagia no cancro, revelaram algumas propriedades interessantes da doença. Inicialmente, a autofagia suprime o crescimento do tumor através da produção da Beclin-1. Contudo, isso muda à medida que o tumor se torna mais avançado. A autofagia começa a promover o desenvolvimento do tumor, fornecendo nutrientes às células centrais, as quais são subnutridas, fazendo com que estas obtenham energia que precisam para permanecerem ativas. Foi também reportado que a autofagia bloqueia as vias apoptóticas, protegendo assim as células cancerígenas da destruição. Por outro lado, algumas terapias do cancro induzem a morte do tumor por autofagia. Esta “dupla face” da autofagia nos tumores pode ser explorada pelas terapias anticancerígenas, fornecendo um melhor tratamento para os pacientes (Mroz *et al.*, 2011).

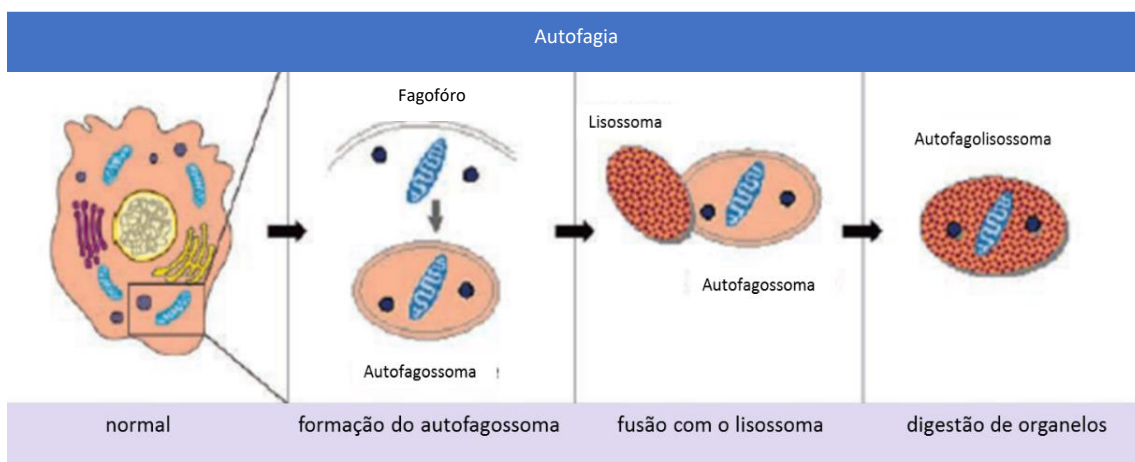


Figura 1.25. Processo autofágico (adaptado de Hans-Jürgen Rode, 2008).

A autofagia, que pode ser ativada por diversos sinais de stresse, incluindo stresse oxidativo, foi descrita como uma via de morte celular após a PDT. Na resposta à PDT, a autofagia deve ser um processo de sobrevivência sem sucesso na preservação da viabilidade. Este processo é iniciado na resposta à elevada reatividade das ROS produzidas, de forma a eliminar os organelos e agregados proteicos afetados, que não podem ser eliminados pela via da ubiquitina (Cândido, 2014).

A persistência da autofagia leva à falha energética e metabólica, e por consequência, à morte celular. Provavelmente, devido à importância atribuída à apoptose e à velocidade do processo, a autofagia como resposta à reação fotodinâmica foi postulada apenas recentemente (Cândido, 2014; Ortel *et al.*, 2009). Este processo torna-se mais prevalente e detetável onde a maquinaria apoptótica é comprometida ou quando são usadas doses de PDT reduzidas. Ainda não foi determinado se a autofagia é um processo regular em PDT ou quais os mecanismos de interação com a apoptose. Contudo, a autofagia tem potenciais implicações no desenvolvimento da imunidade tumoral após a PDT, pois a exposição do antígeno é uma consequência natural do processamento lisossomal (Cândido, 2014).

A autofagia pode ser ativada por FSs que se localizam nos lisossomas, retículo endoplasmático e mitocôndria. A dinâmica entre este processo e apoptose em PDT depende do tipo de célula, do tipo de FS e da dose de radiação (Cândido, 2014).

1.7. Aplicações da PDT

A PDT produz, maioritariamente, efeitos superficiais. Devido ao facto da penetração de luz nos tecidos ser limitada, a profundidade da destruição da lesão varia de poucos milímetros até 1 cm. Esta desvantagem aparente pode ser favoravelmente explorada no tratamento de doenças superficiais, como por exemplo as condições pré-malignas (displasia mucosa, queratose actínica), carcinoma *in situ*, ou tumores superficiais (como o mesotelioma maligno pleural ou a carcinomatose intraperitoneal disseminada). Além disso, a PDT pode ser usada como suplemento à cirurgia, para irradiar a zona da lesão, e para aumentar a probabilidade de controlo local da doença, a longo termo (Agostinis *et al.*, 2011).

1.7.1. PDT em oncologia

A terapia do cancro é uma prática recorrente nas últimas décadas e esforços árduos têm sido feitos na tentativa de descobrir novas soluções, eficazes e inofensivas. Hoje em dia, a quimioterapia, a cirurgia, a radioterapia e, mais recentemente, a PDT são destinadas a prolongar e dar uma melhor qualidade de vida aos pacientes diagnosticados com doenças neoplásicas.

A cirurgia é o tratamento de cancro mais antigo. No caso da existência de micro metástases, a cirurgia é obsoleta e a associação com outras técnicas, como a radioterapia, é necessária. Assim como a cirurgia, a radioterapia tem as suas limitações. Quando se lida com tumores de maiores dimensões, existe algum risco de as células que deram origem ao tumor não serem afetadas, o que leva a novas recorrências. Todos estes métodos são, por vezes, apenas paliativos, fazendo com que seja necessária a pesquisa constante dos mecanismos de desenvolvimento cancerígeno e de novas técnicas para lidar com isso. Tais pesquisas levaram, nos últimos anos, à fotoquimioterapia, ou PDT (Calin & Parasca, 2006).

Em comparação, os típicos regimes de tratamento por radioterapia abrangem aplicações de radioatividade diárias, para um total de 6-7 semanas (em casos ambulatoriais). A calendarização da quimioterapia varia, mas normalmente durante vários meses. A cirurgia, apesar de ser um procedimento único, requer uma anestesia geral e hospitalização por uma a várias semanas (tirando o facto de em alguns casos, ser necessária a associação com outras técnicas). A PDT provou ter uma boa relação custo-eficácia, como também fornece uma esperança de vida aumentada, comparada com outras opções de tratamento (Triesscheijn *et al.*, 2006).

A PDT é, até à data, adequada apenas para doenças localizadas. A luz utilizada na irradiação dos FSs atuais pode induzir necrose tecidular até a um máximo de 10 mm. Isto significa que, para iluminações superficiais, a indicação para a PDT como um tratamento primário deve ser limitada para tumores acessíveis e de reduzidas dimensões. Pode também ser dada a combinação com a cirurgia para o tratamento paliativo de tumores maiores. Uma grande vantagem da penetração de luz limitada é a proteção que é dada ao tecido saudável, localizado debaixo do tecido lesado, do efeito da fototoxicidade. A fibra-ótica moderna facilita a distribuição de luz, de comprimento de onda e fluxo apropriados, aos tumores localizados, virtualmente, em qualquer lado do corpo. A irradiação localizada, em conjunto com a proteção dos tecidos saudáveis, possibilita o tratamento de um tumor específico sem a destruição de tecidos normais importantes, fora da área tratada. Pelo contrário, a cirurgia e a radioterapia de tumores que se encontram juntos de estruturas críticas podem ser muito arriscados, podendo levar à danificação das mesmas. A PDT tem a vantagem que, embora haja uma severa ulceração da área irradiada imediatamente após o tratamento, a fibrose de longo termo é mínima, resultando na recuperação funcional sem cicatrização. A PDT poupa as propriedades estruturais do tecido, favorecendo uma matriz para a regeneração do tecido normal, porque não danifica

o colagénio e a elastina sub-epitelial e há uma preservação de elementos de suporte não-celulares (Triesscheijn *et al.*, 2006).

Outra vantagem da PDT é que o tratamento pode ser repetido em caso de recorrência ou em caso de novo tumor num local que já tenha sido previamente tratado. Tal re-tratamento é extremamente difícil, quer para cirurgia quer para radioterapia, sem o risco de danos severos ao tecido normal (Triesscheijn *et al.*, 2006).

Na tabela 1.3 estão representados os FSs aprovados para o tratamento do cancro, em PDT.

Tabela 1.3. FSs aprovados em PDT para o tratamento do cancro (Agostinis *et al.*, 2011; Alisson, 2014; Calin & Parasca, 2006; Triesscheijn *et al.*, 2006).

Tipos de Cancro	FS aprovados
Cancro da cabeça e pulmão	Foscan
Cancro cervical	Photofrin
Cancro da mama	Purlytin
Cancro da pele	Levulan, Metvix, Purlytin, Verteporfin
Cancro do cérebro	Photofrin, Levulan, Foscan
Cancro do pulmão	Photofrin, Foscan
Cancro endobronquial	Photofrin
Cancro esofágico	Photofrin, Levulan
Cancro gástrico	Photofrin
Cancro oftálmico	Verteporfin
Carcinoma de células basais	Metvix
Esófago de Barrett	Photofrin
Queratose actínica	Levulan, Metvix
Tumores de bexiga, na fase inicial	Photofrin

1.7.2. PDT em dermatologia

Foi só em 1990 que a pesquisa de PDT em dermatologia foi estimulada, pela disponibilidade de uma técnica simples, segura e eficaz, baseada na aplicação tópica de ALA e, desde o fim da década de 90, do seu éster metílico (MAL), a partir dos quais se obteve uma resposta fotodinâmica limitada e localizada. Com este desenvolvimento, muitas das limitações da PDT foram diminuídas (como a fotossensibilidade prolongada, resultante da ação dos FSs sistémicos), e o tratamento tornou-se muito mais conveniente.

Ao mesmo tempo, os FSs de segunda geração (como as ftalocianinas, clorinas, entre outros) foram desenvolvidos. Estes corantes sintéticos são quimicamente puros e, a sua distribuição tópica ou sistémica provou ser altamente eficiente, seletivo e seguro, enquanto oferece a vantagem de reduzir a fotossensibilidade generalizada da pele (Calzavara-Pinton *et al.*, 2007; MacCormack, 2008).

A PDT é uma modalidade segura e não-invasiva que permite o tratamento de grandes áreas, normalmente, com excelente aspeto cosmético. O atual uso tem como alvo primário o tratamento de dano actínico e cancro de pele não-melanocíticos em estados iniciais, mesmo que trabalhos recentes suportem o seu uso para um grande número de neoplasias e condições infecciosas e inflamatórias (Lee & Baron, 2011; MacCormack, 2008). Comparada com outras terapias convencionais, a PDT é associada a recuperações mais rápidas e resultados de excelente cosmética. Devido a estes benefícios, a PDT tem sido avaliada como uma potencial opção de tratamento para várias condições dermatológicas e tem mostrado ser eficaz para certos cancros de pele do tipo não-melanoma. Embora a pesquisa seja ainda limitada, a PDT pode também ter um benefício terapêutico em linfomas de células T cutâneas, acne, psoríase, leishmaniose e verrugas, entre outros (Lee & Baron, 2011).

1.8. Objetivos

Devido à constante procura de novos compostos que apresentem um ótimo efeito terapêutico e um reduzido efeito colateral faz com que o estudo de novos FSs seja de grande importância. Neste sentido, e na tentativa de encontrar novos compostos orgânicos com propriedades de FS, tem-se verificado um crescente interesse na investigação dos mesmos a fim de se conseguir um composto eficiente que respeite todos os parâmetros descritos indicativos de FS ideal. A ação celular desse FS ideal deveria centrar-se na destruição do tecido tumoral e ao mesmo tempo não danificar o tecido normal, pelo que o estudo da ação de FS em células normais e tumorais é importante para se conhecerem os mecanismos de ação à escala celular.

Assim, o objetivo geral para este estudo é estudar a citotoxicidade de quatro cianinas escuras assimétricas, previamente sintetizadas por Martins (2016), em duas linhas celulares (Caco-2 e HaCaT), sendo uma delas tumoral e outra não-tumoral. Para isso pretende-se:

- Comparar a toxicidade das diferentes cianinas, no escuro, para os 2 tipos de células;
- Comparar o efeito citotóxico após irradiação das células previamente expostas a concentrações definidas dos corantes;
- Caracterizar estes compostos relativamente ao seu coeficiente de partição 1-octanol-água;
- Estudar a capacidade de internalização dos compostos pelas células e correlacioná-los com os pontos anteriores;
- Avaliar e comparar a ação destes compostos nos processos que levam à morte celular (antes e após irradiação) estudando os seguintes parâmetros:
 - Produção de espécies reativas de oxigénio (ROS);
 - Produção de fragmentação de DNA e condensação da cromatina;
 - Ação oxidante de lípidos e proteínas celulares, avaliando a peroxidação lipídica e quantificação de grupos tióis;
- Quantificação do grau de expressão de proteínas envolvidas na apoptose;

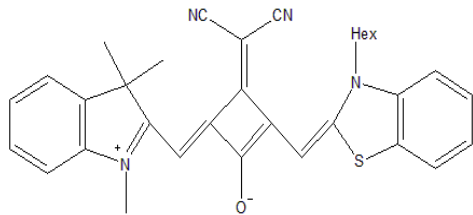
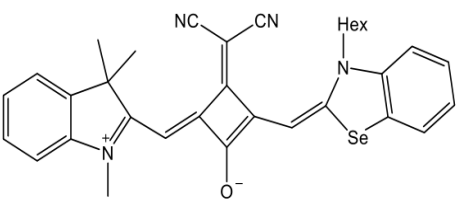
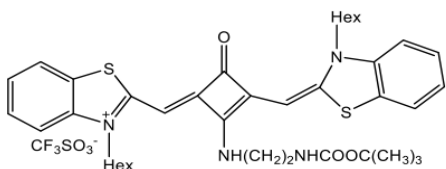
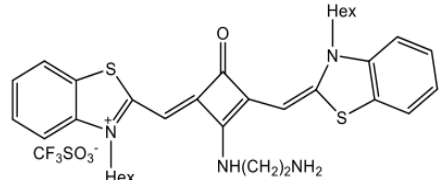
Capítulo II

Materiais e Métodos

2.1. Cianinas esquarílicas (CEsq)

Neste estudo foram usadas quatro cianinas esquarílicas assimétricas que foram previamente sintetizadas e caracterizadas na dissertação de Mestrado em Bioquímica de Martins (2016), estando as suas estruturas representadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Cianinas esquarílicas assimétricas em estudo.

Composto	Fórmula de estrutura	Nome IUPAC
A		3-dicianometileno-2-[(3-hexilbenzotiazol-2(3 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-[(1,3,3-trimetilindolil-2-il-3-io)metilideno]ciclobut-1-en-1-olato
B		3-dicianometileno-2-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-[(1,3,3-trimetilindolil-2-il-3-io)metilideno]-ciclobut-1-en-1-olato
C		trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-{3-(3-hexilbenzotiazol-2(3 <i>H</i>)-ilidenometil)-2-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)etilamino]-4-oxociclobut-2-enilidenometil}-benzotiazól-3-io
D		trifluorometanossulfonato de 2-[(2-aminoetilamino)-3-(3-hexilbenzotiazol-2(3 <i>H</i>)-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzotiazól-3-io

Foram preparados 10 mL de soluções stock, a concentrações conhecidas, dissolvendo 2,0 mg de cada composto em DMSO (dimetilsulfóxido), a partir das quais se preparam soluções com as concentrações finais de 0,1, 1,0, 2,5 e 5,0 μM , em meio de cultura sem soro.

2.2. Cultura de células e manutenção

Os compostos foram testados em duas linhas celulares diferentes: uma linha celular tumoral com características de enterócitos humanos, derivada de um adenocarcinoma de colon (Caco-2, CLS, Germany), e uma linha não-tumoral, linha celular imortal de queratinócitos humanos, obtidos de pele de adulto (HaCaT, (Boukamp *et al.*, 1988), CLS, Germany). As células HaCaT foram usadas em todos os ensaios realizados neste trabalho e as células Caco-2 apenas usadas nos ensaios de viabilidade celular pelo método do Alamar Blue e nos ensaios da observação da produção de ROS e fragmentação de DNA, por microscopia de fluorescência.

Para todos os procedimentos que envolveram manuseamento das duas linhas celulares, utilizou-se sempre material esterilizado e descartável e, todo o processo foi efetuado em câmara de fluxo laminar (Classe II), para evitar possíveis contaminações.

As células HaCaT e Caco-2 foram mantidas, em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e 1 mM L-glutamina numa incubadora com um ambiente de 5% CO₂/95% ar, à temperatura de 37°C e humidade controlada. O crescimento e confluência celular, quando observado, são indicadores de que as células estão prontas a ser utilizadas para novos ensaios (Andreani *et al.*, 2014; Domínguez-Perles *et al.*, 2016).

2.2.1. Preparação das placas de cultura, para ensaios com células

Como referido, quando confluentes, as células podem ser recolhidas para novos ensaios. Para tal, o meio de cultura com soro foi removido dos frascos de cultura usando uma pipeta de Pasteur estéril descartável. Foi, de seguida, adicionado a cada frasco 1,0 mL de Versene (Gibco), para remover as células mortas em suspensão e para remover os vestígios de soro e cálcio presentes no meio. Depois da lavagem e da eliminação do Versene, foi adicionado 1,0 mL de Tripsina-EDTA 0,05 % (Gibco) a cada frasco. Os frascos foram colocados na incubadora a 37°C, durante aproximadamente 8 minutos, dando tempo para que ocorra a reação com a tripsina, controlando sempre o estado das células ao microscópio.

Posteriormente, os frascos foram retirados da incubadora e acrescentou-se 1,5 mL de meio DMEM com soro para inibir a ação da tripsina e, com a ajuda de uma pipeta de

Pasteur, promoveu-se a desagregação das células ainda aderentes ao frasco, com aspirações suaves e sucessivas. Removeu-se aproximadamente 2 mL da suspensão para um tubo de centrifuga de 2 mL (previamente esterilizado por autoclavagem), procedendo-se posteriormente à contagem das células, após a ressuspensão. A contagem foi feita com o auxílio de um contador de células automático (TC10 Automated Cell Counter 145-0001, BIO-RAD) e após a contagem, calculou-se o fator de diluição para obter a densidade celular pretendida para o ensaio (células/mL) e procedeu-se à diluição da suspensão. As células diluídas à densidade celular pretendida (em meio de cultura completo) foram então plantadas em microplacas, de 96 (4×10^4 células/mL; 100 μ L/poço), 12 ou 6 poços (1×10^5 células/mL; 750 ou 1500 μ L/poço, respetivamente), consoante o tipo de ensaio pretendido. Às células que ficaram no frasco de cultura, adicionou-se 5 mL de meio com soro e estas foram recolocadas na incubadora de CO₂ para voltarem a crescer e dividir-se (subcultura) (Andreani *et al.*, 2014; Doktorovova *et al.*, 2014).

2.2.2. Aplicação das cianinas e irradiação das células

Passadas, aproximadamente, 72 h da adesão das células às microplacas, estas foram retiradas da incubadora e o meio de cultura com soro foi retirado dos poços com ajuda de uma micropipeta multicanal (Tipor, Orange Scientific), seguindo-se a adição das soluções dos corantes a testar, dissolvidos em meio de cultura sem soro, nas concentrações pretendidas (ver secção 2.1). Em cada ensaio, foram sempre deixados vários controlos, células mantidas nas mesmas condições, mas só expostas a meio de cultura sem soro. As placas foram novamente colocadas na incubadora durante mais 24 horas, até se proceder à irradiação.

Após as 24 horas de exposição das células aos corantes, as placas foram retiradas da incubadora de CO₂ e irradiadas com os sistemas de LEDs, construídos com base no comprimento de onda adequado para cada um dos compostos, nomeadamente centrados a 620 e 660 nm (comprimentos de onda utilizados com base nos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos nos espectros UV/Vis, em DMEM). Na tabela 2.2 estão representados os LEDs utilizados e as suas características assim como os compostos que foram irradiados com cada um dos sistemas de LEDs.

Estes sistemas foram utilizados para irradiar diferentes placas durante 7 ou 14 minutos, no caso dos ensaios de viabilidade pelo método do Alamar Blue, e 7 minutos

nos restantes ensaios, tendo o cuidado de evitar manter as placas expostas ao ar e consequente contaminação. Em todos os ensaios realizados que envolveram irradiação, foi sempre feito um controlo não-irradiado. Este consistiu numa placa que era retirada da incubadora durante o tempo de irradiação das outras, mas que em vez de irradiada, permaneceu no escuro.

Tabela 2.2. Especificações dos sistemas de LEDs utilizados e os compostos sujeitos a cada um dos sistemas. Os LEDs designados por 620 e 660 emitem radiação centrada a 621 e 651 nm, respetivamente. P designa a potência.

LEDs	λ (nm)	P (mW)	Tempo de irradiação (min)	Energia (J)	Compostos sujeitos ao sistema
620	$621,3 \pm 1,0$	$1,9 \pm 0,1$	7	0,80	C
			14	1,60	
660	$651,6 \pm 1,8$	$3,4 \pm 0,3$	7	1,43	A, B e D
			14	2,86	

2.3. Ensaios de citotoxicidade

O efeito citotóxico dos compostos foi avaliado pelo método da redução do Alamar Blue (AB). Esta técnica baseia-se num indicador redox, o AB, cuja forma oxidada, resasurina, de cor azul permeia as células e é reduzida a resurofina, de cor rosa, por células metabolicamente ativas. As formas redox deste indicador conferem características colorimétricas em resposta ao metabolismo de células ativas, sendo seguida por uma alteração da absorvância medida a 570 (forma oxidada) e 620 (forma reduzida) nm (Andreani *et al.*, 2014; Doktorovova *et al.*, 2014)

Uma hora após a irradiação descrita na secção 2.2.2, numa metade da placa, o meio contendo o composto foi substituído com meio de cultura sem soro suplementado com 10% (v/v) de AB e, passadas 5 h, procedeu-se à leitura das absorvâncias num espectrofotómetro de microplacas Multiskan EX (MTX Labsystems, USA), a 570 e 620 nm. A outra metade da placa sofreu o mesmo procedimento passadas 24 h após a irradiação. A percentagem de redução do AB foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de redução do AB} = \frac{(\varepsilon_{ox}\lambda_2)(A\lambda_1) - (\varepsilon_{ox}\lambda_1)(A\lambda_2)}{(\varepsilon_{red}\lambda_1)(\tilde{A}\lambda_2) - (\varepsilon_{red}\lambda_2)(\tilde{A}\lambda_1)} \times 100$$

onde, $\varepsilon_{ox}\lambda_1$ é o coeficiente de extinção molar do AB oxidado a 570 nm, $\varepsilon_{ox}\lambda_2$ é o coeficiente de extinção molar do AB oxidado a 620 nm, $\varepsilon_{red}\lambda_1$ é o coeficiente de extinção molar do AB reduzido a 570 nm, $\varepsilon_{red}\lambda_2$ é o coeficiente de extinção molar do AB reduzido a 620 nm, $A\lambda_1$ e $A\lambda_2$ são as absorvâncias dos poços lidos, aos comprimentos de onda 570 e 620 nm, respetivamente, e $\tilde{A}\lambda_1$ e $\tilde{A}\lambda_2$ são as absorvâncias dos poços correspondentes ao controlo negativo (meio com AB, sem células) a 570 e 620 nm, respetivamente (Andreani *et al.*, 2014).

Tendo em conta a equação apresentada em cima, foi calculada a percentagem de redução do AB para cada poço, sendo depois esses dados normalizados com o controlo (células não expostas a corantes que sofreram os mesmos procedimentos). Os dados são apresentados em viabilidade celular (% controlo) $\pm$ D.P. (n=4). Em cada ensaio, calcularam-se os valores de IC₅₀ dos compostos (concentração de composto que inibe 50% do crescimento celular, em relação ao controlo), para cada tempo de irradiação e para os diferentes tempos de contacto do composto irradiado com as células (1 ou 24 horas). Esta análise foi feita com o auxílio de ferramentas associadas ao *software* GraphPad Prism 5.

2.4. Avaliação da internalização das cianinas nas células

De forma a esclarecer os mecanismos de ação dos corantes em estudo e o seu potencial efeito fotodinâmico, é crucial avaliar a sua capacidade de internalização nas células. Com este objetivo, a assimilação/internalização dos compostos pelas células foi estudada através de dois métodos diferentes:

- Determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água;
- Estudo da acumulação dos corantes na estrutura celular, usando um método adaptado da literatura (Delaey *et al.*, 2000).

2.4.1. Determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água das cianinas esquarílicas

O coeficiente de partição 1-octanol/água (K_{ow} , normalmente expresso por $\log K_{ow}$) é um modelo usado para descrever a potencial transferência de uma substância de um ambiente aquoso para um organismo (ou simplesmente uma estrutura membranar; e.g. micela, lipossoma) e a sua potencial bioacumulação. É usado, por exemplo, em testes de biodisponibilidade, em farmacodinâmica (na indústria farmacêutica e cosmética) e para avaliar a toxicidade de contaminantes (Leo *et al.*, 1971; Neely *et al.*, 1974).

Neste ensaio, o procedimento utilizado foi baseado no método “*shake-flask*” e foi usada como fase orgânica o 1-octanol porque as suas propriedades são as que melhor mimetizam as dos lípidos da bicamada fosfolipídica (USEPA, 1996). Em consequência, foi sugerido que a distribuição dos produtos químicos em 1-octanol simula, até certo ponto, a sua capacidade de se difundirem passivamente através de membranas biológicas (Sangster, 1997). Como fase aquosa, foi usado o PBS pH=7,4 (Tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate buffered saline*, é um tampão constituído por 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 e 2 mM de KH_2PO_4).

O 1-octanol foi primeiramente purificado, misturando-o com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 1 N, seguido de lavagens com água destilada até ficar com pH neutro. A quatro tubos de ensaio com tampa de rosca foram adicionados volumes iguais de cada fase, neste caso 2 mL, as quais foram seguidamente misturadas até não haver separação de fases. Quando atingido este ponto, foi adicionado um volume de composto que correspondesse a 5 μM nos 4 mL totais, presentes no tubo. Os tubos foram posteriormente agitados manualmente e vigorosamente durante 5 minutos, ao fim deste tempo foram centrifugados 10 minutos a 500 $\times g$. No fim da centrifugação, esperou-se alguns minutos até haver uma completa separação das fases. As fases foram então recolhidas (a fase aquosa fica em baixo e a fase orgânica em cima) e foram adicionados 200 μL /poço, numa placa de 96 poços, em duplicado, que foram depois lidas num espectrofotómetro, a comprimentos de onda que correspondem ao pico máximo de absorção dos respetivos compostos (para cada solvente em cada uma das fases), sendo que a concentração de cada composto foi depois calculada com o auxílio de uma curva padrão. Para a preparação da curva padrão, adicionaram-se 200 μL de soluções dos corantes, a concentrações conhecidas, previamente preparadas em 1-octanol ou em PBS, a uma placa de 96 poços. Foi de seguida corrido um espectro, de 400 a 900 nm, de modo

a retirarmos o comprimento de onda onde apareceu a absorvância máxima e construiu-se uma curva de calibração (concentração vs absorvância). A partir da equação da reta, e tendo a absorvância das amostras, calculou-se a concentração do corante em cada uma das fases.

2.4.2. Acumulação das cianinas na estrutura celular

Este método foi adaptado da literatura (Delaey *et al.*, 2000) e consiste, de um modo geral, na medição da quantidade de composto que fica retido nas células após a sua exposição aos compostos (a concentrações pretendidas), a remoção de todo o sobrenadante (no final do tempo de exposição pretendido), lavagem das células com PBS, tripsinização das células e sua dissolução em DMSO. Para isso foram plantadas células em caixas de 12 poços e, quando confluentes, foi adicionado 1 μ M e 2 μ M de cada cianina (a poços diferentes), em duplicados. Passadas 24 horas de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e depois tripsinizadas. Depois, raspou-se o fundo dos poços (usando um raspador de células; Orange Scientific), de modo a soltar todas as células existentes para o meio. As suspensões celulares foram então transferidas para tubos de centrífuga de 2 mL, sendo de seguida centrifugadas a 700 $\times g$, durante 5 minutos. Descartou-se todo o sobrenadante, guardou-se o sedimento, ao qual foi adicionado 1 mL de DMSO. Levou-se ao banho de água com ultrassons, durante 3 minutos. No final deste tempo, as suspensões celulares foram centrifugadas (10000 rpm, durante 7 minutos (centrifuga Hettich MIKRO 200R, rotor Hettich 2424)), e foram, de seguida, lidas no espectrofotómetro, de onde se tirou a absorvância ao $\lambda_{\text{máx}}$ para cada cianina, e os valores das concentrações foram calculados através do coeficiente de extinção molar, conhecido previamente (Martins, 2016).

2.5. Avaliação dos processos celulares inerentes à morte celular induzida pela exposição das células às cianinas

Para testar a eficiência das cianinas, enquanto FSs, é essencial que os mecanismos celulares subjacentes à sua ação sejam conhecidos. Assim, foi avaliado:

- Produção de ROS;
- Peroxidação lipídica e quantificação dos grupos tióis, de modo a testar a ação oxidante das cianinas nos lípidos e proteínas celulares;

- Fragmentação de DNA/condensação da cromatina;
- Expressão de proteínas envolvidas na apoptose (caspase 3, Bax, Bcl-2 e AIF).

2.5.1. Avaliação da produção de ROS

As ROS estão muitas vezes associadas com a PDT, uma vez que a radiação provoca alterações nos FSs, que ao interagirem com o oxigénio tecidual, dão origem a estas espécies citotóxicas (ver secção 1.5). Deste modo, é importante conhecermos a capacidade dos nossos compostos de produzirem ROS.

A avaliação da capacidade das cianinas produzirem ROS foi realizada recorrendo a dois ensaios diferentes, um por microscopia de fluorescência e outro por citometria de fluxo, usando em ambos os ensaios a sonda DCFDA (2',7'- diclorofluoresceína diacetato; Sigma).

2.5.1.1. Avaliação da produção de ROS por microscopia de fluorescência

Neste ensaio, células HaCaT foram plantadas em caixas de 12 poços que, após adesão celular, foram expostas a uma concentração correspondente ao IC₅₀ de cada composto, sendo irradiados durante 7 minutos, 24 h depois de se ter adicionado os corantes. Após 24 h de exposição aos compostos irradiados, o meio das células foi retirado e, após 2 lavagens com PBS, foram adicionados 400 µL de uma solução de DCFDA (20 µM; λ_{exc} = 495 nm; λ_{em} = 527 nm) em meio de cultura sem soro. A sonda foi incubada durante 45 minutos, a 37°C. Ao fim deste tempo, o sobrenadante foi substituído por PBS e as células foram observadas ao microscópio de fluorescência (Olympus IX50), usando o filtro do FITC e uma objetiva apropriada para fluorescência (20x ou 100x, conforme indicado nas legendas das imagens).

2.5.1.2. Avaliação da produção de ROS por citometria de fluxo

Para citometria de fluxo, células HaCaT foram plantadas em caixas de 6 poços e incubadas, com os corantes a concentrações iguais às do valor do IC₅₀ de cada composto, durante 24 h, após as quais foram irradiadas, durante 7 minutos, ao comprimento de onda máximo de cada corante. 24 h após a irradiação, as células foram lavadas com PBS e

foram tripsinizadas e recolhidas para tubos de centrífuga de 2 mL, e posteriormente centrifugadas, 5 min, a 500 xg (para eliminar a tripsina). O sobrenadante foi eliminado e o sedimento foi ressuspenso em PBS. Estes passos foram utilizados para todos os ensaios de citometria de fluxo. 45 minutos antes de serem utilizadas, as amostras foram incubadas com a sonda DCFDA a 37°C.

As amostras foram depois processadas no citómetro de fluxo (BD Accuri™ C6) e, para cada uma, foram adquiridos “eventos”, até a um máximo de 5000. Os dados foram analisados recorrendo ao BD Accuri™ C6 Software, versão 1.0.264.21 (Becton Dickinson, CA, USA).

2.5.2. Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliar o grau de peroxidação lipídica provocada pela ação das cianinas nas membranas celulares recorreu-se também à citometria de fluxo e ao uso de uma sonda fluorescente adequada. No caso da peroxidação lipídica, foi usada a sonda lipofílica DHPE-FITC (sal trietilamónio de (*N*-fluoresceína-5-tiocarbamoil)-1,2-di-hexadecanoíln-glicero-3-fosfoetanolamina) que perde a sua fluorescência após entrar em contacto com radicais peroxilo (resultantes da peroxidação lipídica) (Dominguez-Perles *et al.*, 2016; Maulik *et al.*, 1998).

As células foram tratadas tal como descrito no ponto anterior. Após eliminar a tripsina, por centrifugação, a cada tubo de centrífuga de 2 mL, foi adicionada uma solução de DHPE-FITC (5 µM) e as células foram incubadas, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e num ambiente ausente de luz.

2.5.3. Avaliação do conteúdo em glutathiona (GSH) intracelular

Para quantificar o conteúdo intracelular de GSH recorreu-se à sonda fluorescente Mercury Orange ([1-(4-cloro-mercúrio-fenil-azo-2-naftol)], normalmente usada para quantificar a glutathiona reduzida (GSH). As amostras foram incubadas com uma solução de 40 µM de Mercury Orange durante 5 minutos (du Plessis *et al.*, 2010).

2.5.4. Condensação da cromatina e fragmentação do DNA

A fragmentação do DNA é um indicador de morte celular, e como referido anteriormente, alguns FSs conseguem interferir diretamente com o DNA, danificando-o. Assim, para este ensaio foi usado a sonda Hoescht 33342 ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$), uma sonda que permeabiliza a membrana celular entrando na célula e intercala-se na cadeia de DNA, permitindo visualizar a cromatina, apresentando fluorescência na região do azul e que é visível usando o filtro do DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*).

Foram plantadas células Caco-2 e HaCaT em caixas de 12 poços, assim como no ensaio da avaliação de produção de ROS. Estas sofreram tratamento idêntico, no que diz respeito à exposição a corantes e irradiação. Após irradiação e lavagem com PBS, foi adicionada uma solução 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de Hoescht em PBS às células, que foram incubadas durante 15 minutos, à temperatura ambiente, num local isento de luz. De seguida, foram vistas ao microscópio Olympus IX50 e fotografadas.

2.5.5. Expressão de proteínas envolvidas na apoptose

Com o objetivo de desvendar os mecanismos envolvidos da ação dos nossos corantes, realizou-se a quantificação de algumas proteínas da apoptose, usando duas técnicas: *Western blot*, onde marcámos Bax, Bcl-2, caspase 3 clivada e AIF, tendo a β -actina como proteína controlo; e a técnica de imunocitoquímica, onde se realizou a imunomarcagem da proteína AIF, e comparar a sua expressão com os dados obtidos anteriormente com as sondas DCFDA e Hoescht.

2.5.5.1. Western Blot

Neste ensaio, foram plantadas células HaCaT em caixas de 6 poços e, 24 h depois, foram incubadas com os compostos B e D (concentração correspondente ao IC_{50}), em duplicados. As células foram tratadas de modo idêntico ao descrito anteriormente, 24 h após a irradiação, as células foram colhidas com tripsina, centrifugadas durante 15 min a 500 $\times g$, à temperatura de 4°C, e os sobrenadantes foram eliminados. O sedimento com as células foi lisado com uma solução contendo 0,125 M de tampão Tris-HCl (pH = 7,4), 10 % (v/v) glicerol, 4 % (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), 4 M ureia, 10 % (v/v) β -

mercaptoetanol e 0,001 % (v/v) de azul de bromofenol. Depois deste tratamento, as amostras foram aquecidas a 95°C, durante 5 minutos, e novamente centrifugadas, a 9500 *xg*, durante 5 minutos (De Luna *et al.*, 2006).

Simultaneamente, dois géis foram preparados para a eletroforese. O “*loading gel*”, poliacrilamida (10%) foi preparado, para um volume final de 10,0 mL, usando 3,95 mL de água destilada, 3,35 mL de 30% acrilamida/bis, 2,5 mL de tampão 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8), 0,1 mL de SDS a 10% (m/v), 0,1 mL de persulfato de amónio (AMPS) a 10% (m/v) e 0,004 mL de 1,2-bis(dimetilamino)etano (TEMED). Para 5,0 mL de “*stacking gel*” misturou-se 2,8 mL de água destilada, 0,85 mL de 30% acrilamida/bis, 1,25 mL do tampão 1,5M Tris-HCl (pH=6,8), 0,05 mL de SDS a 10% (m/v), 0,05 mL de AMPS a 10% (m/v) e 0,01 mL de TEMED.

As amostras, depois de arrefecidas, foram dispostas nos poços do gel (30 µL de cada), assim como 12 µL de *ladder* (*Prestained protein marker, Broad Range*, Cell Signalling Technology) que irá servir de indicador do peso molecular de cada banda. Uma primeira corrida foi feita, a 60 V durante 10 minutos, usando o Mini-Protean Tetra cell (BioRad, Portugal), seguida da corrida principal, durante 90 minutos a 100 V. No fim da eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas Hybond®- Fluoreto de polivinilideno (PVDF, GE Amersham, adquiridas à VWR), que foram previamente ativadas com metanol, lavadas com água destilada e equilibradas com tampão de transferência. Para a transferência ocorrer, fez-se uma corrida durante 2 horas a 100 V, em gelo.

Após obtermos a membrana com a proteína, procedeu-se ao bloqueio da mesma, como uma solução de 5% (m/v) leite magro em pó, em tampão TBS-T (tampão Tris salino - Tween, do inglês *Tris Buffered Saline - Tween*), pH=7,6 (20 mM Tris-HCl, 137 mM de NaCl, 0,1 % Tween-20). Ao fim de uma hora, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e incubadas com cada um dos anticorpos primários, durante 2 horas à temperatura ambiente (ou foram deixadas a ocorrer durante a noite, a 4°C, sempre em constante agitação). Após esta incubação, as membranas foram novamente lavadas 3x com TBS-T e foram de seguida incubadas com os anticorpos secundários durante 1 hora. De seguida, as membranas foram novamente lavadas e procedeu-se à revelação das bandas, usado uma gota do substrato ECF (substrato de melhoramento da quimiofluorescência, do inglês *Enhanced Chemofluorescence*), sendo visualizadas num Gel Doc™EZ Gel Documentation System (BioRad, Portugal) e analisada usando o *software* Image Lab 5.1 (BioRad Laboratórios, Portugal).

Os anticorpos primários utilizados, assim como os anticorpos secundários, encontram-se descritos na tabela 2.3.

Tabela 2.3. Anticorpos primários e secundários utilizados em *Western blot*.

Anticorpos Primários			
Alvo	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor
Bax (<i>anti-human</i>)	<i>Rabbit</i>	1:250	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Bcl-2 (<i>anti-human</i>)	<i>Mouse</i>	1:350	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Caspase-3 (<i>anti-human</i>)	<i>Rabbit</i>	1:2000	<i>Cell Signaling Technology</i>
AIF (<i>anti-human</i>)	<i>Rabbit</i>	1:1000	<i>Cell Signaling Technology</i>
B-actina (<i>anti-human</i>)	<i>Mouse</i>	1:750	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Anticorpos Secundários			
Alvo	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor
<i>Anti-rabbit IgG + IgM (H+L)</i>	<i>Goat</i>	1:10000	<i>GE Healthcare</i>
<i>Anti-mouse IgG + IgM (H+L)</i>	<i>Goat</i>	1:10000	<i>GE Healthcare</i>

2.5.5.2. Imunocitoquímica

As células HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988) foram plantadas em lamelas circulares, previamente esterilizadas por autoclavagem, colocadas dentro de caixas de 6 poços e incubadas com as cianinas à concentração igual ao IC₅₀ obtido nos resultados de viabilidade. Após a irradiação, e ainda dentro das caixas, as lamelas foram lavadas com PBS e de seguida transferidas para caixas de Petri, tendo atenção para as lamelas não secarem. As células foram, posteriormente, fixadas com paraformaldeído (4% em PBS) durante 15 minutos, à temperatura ambiente. As lamelas foram lavadas 3x com PBS frio (~4°C, arrefecido em gelo) e de seguida permeabilizadas por adição de Triton X-100 (0,2 % em PBS), durante 5 minutos. Após nova lavagem, procedeu-se ao bloqueio com solução de 3% (w/v) BSA em glicina e PBS, durante meia hora. Foi feita depois uma incubação com o anticorpo primário *Rabbit anti-human AIF antibody*, diluído 1:1000 (Cell Signaling Technology), lavado, e posteriormente outra incubação com o anticorpo secundário *Goat anti-rabbit IgG FITC*, diluído 1:250 (Santa Cruz Biotechnology) e lavado uma última vez. No fim da marcação com os anticorpos, as lamelas foram colocadas, com as células viradas para baixo, em cima de uma gota de meio de montagem (ProLong Gold, Molecular Probes) que estava sobre uma lâmina de vidro e foram, depois de secas, seladas com verniz (Silva *et al.*, 2008). As lâminas foram, no dia seguinte, visualizadas ao microscópio de fluorescência (Olympus IX50).

2.6. Análise estatística

Os resultados de viabilidade são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi feita com a análise de variância (ANOVA) usando o Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., USA). Foi usado o One-way ANOVA, comparando as diferentes amostragens na mesma condição, e os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de p menores que 0,05.

Capítulo III

Resultados e Discussão

3.1. Degradação das cianinas

Como referido no ponto 2.1., as cianinas esquarílicas usadas neste estudo foram sintetizadas e caracterizadas previamente (Martins, 2016). Desde a sua síntese até ao início deste estudo passou cerca de um ano, pelo que foi imprescindível realizar novos espectros de absorção das referidas cianinas, em DMSO e em DMEM, para verificar se houve algum tipo de degradação, com o tempo, nomeadamente dos picos máximos de absorvância.

A análise quantitativa foi realizada a partir de uma solução-mãe (previamente preparada em DMSO). Após realizar os espectros quantitativos das cianinas dissolvidas em DMSO e a partir dos coeficientes de extinção molar calculados previamente (Martins, 2016), procedeu-se à averiguação da possível degradação das cianinas e se, conseqüentemente, houve alteração da concentração da solução-mãe, pelo que a intensidade dos espectros e os valores de absorção máxima foram tomados em consideração (Rodger, 2013).

Na figura 3.1 encontram-se representados os espectros qualitativos obtidos para soluções das cianinas esquarílicas diluídas em DMSO e em DMEM.

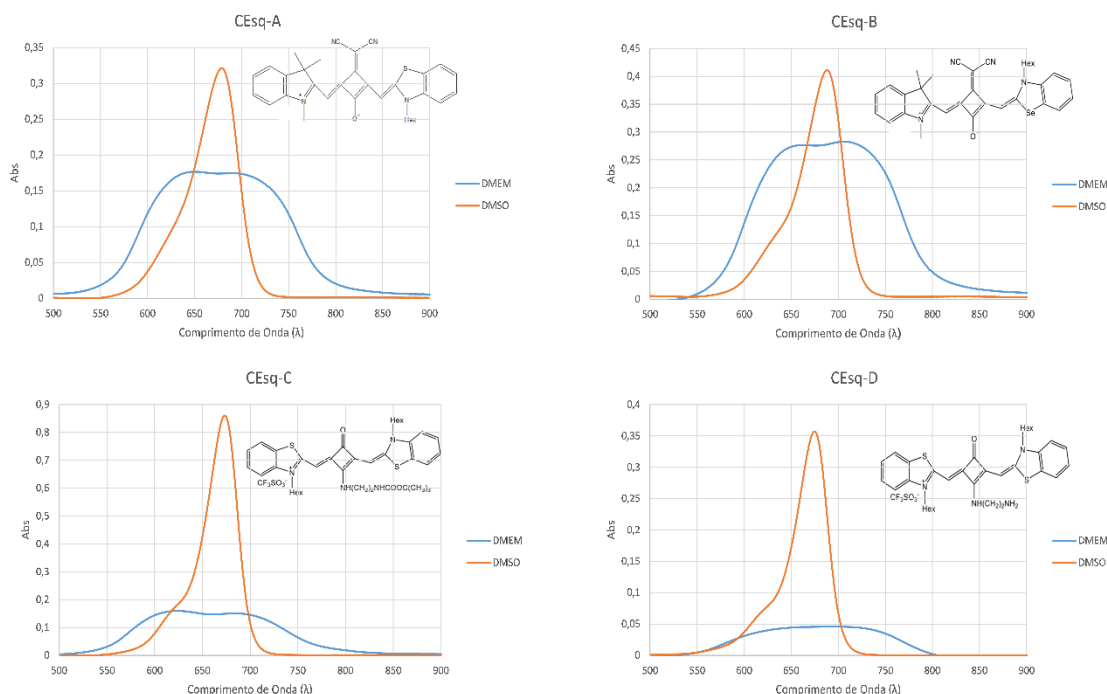


Figura 3.1. Espectros no Vis obtidos para as cianinas esquarílicas em estudo, após diluição de uma solução mãe (em DMSO) em DMSO e em DMEM.

Relativamente à concentração das soluções-mãe, verificou-se que, no geral, não houve modificações na concentração dos compostos, evidenciando que não houve degradação e indicando a estabilidade destes compostos em solução (DMSO) com o tempo. Contudo, relativamente ao máximo de absorção, observou-se apenas uma ligeira diferença no espectro da CEsq-D em DMEM, em comparação ao obtido por Martins (2016), onde o pico máximo de absorção se encontra próximo de 660 nm e não a 621 nm, como inicialmente reportado.

3.2. Efeito citotóxico das cianinas esquarílicas em modelos celulares

A ação das cianinas esquarílicas na viabilidade celular, foi avaliada pelo método do Alamar Blue (AB; ver secção 2.3), comparando células expostas a diferentes concentrações de compostos por tempos de exposição diferentes com células não expostas, mas manuseadas da mesma forma.

As cianinas em estudo podem ser divididas em duas famílias: a que possui o grupo dicianometileno, constituída por a CEsq-A e a CEsq-B (duas cianinas esquarílicas assimétricas que possuem o grupo dicianometileno), e as cianinas aminoesquarílicas, formadas pelas CEsq-C e CEsq-D (cianinas esquarílicas assimétricas que possuem um grupo amino ligado ao anel central de quatro membros). Por isso, os resultados da viabilidade serão apresentados por famílias.

Neste ponto, será comparado o tempo de exposição das células às cianinas, de modo a avaliar o efeito do tempo de contacto das células com os compostos ativados pela luz (1 h ou 24 h de exposição, conforme indicado nos gráficos). Comparamos também os resultados para os vários tempos de irradiação (0 minutos (não irradiadas), e 7 ou 14 minutos de irradiação ao comprimento de onda selecionado), de modo a esclarecer o potencial efeito do tempo de ativação dos compostos pela luz.

3.2.1. Ação das cianinas que possuem o grupo dicianometileno em células Caco-2 e HaCaT

As CEsq-A e CEsq-B são bastante semelhantes estruturalmente, como se pode ver na Figura 3.1. A única diferença reside na alteração do átomo de enxofre (S) da CEsq-A por um átomo de selénio (Se), obtendo-se a CEsq-B.

Na figura 3.2 encontram-se representados os resultados da viabilidade de células Caco-2, após exposição a CEsq-A e CEsq-B a diferentes concentrações, para os vários tempos de irradiação.

Na figura 3.2E e F, os resultados apresentados são para um intervalo de concentrações diferentes relativamente aos apresentados na Figura 3.2D, isto é, mais estreito, pelo facto de se ter registado toxicidade elevada para concentrações acima de 1 μ M (dados não mostrados). Esta gama de concentrações permite calcular o IC₅₀ com mais rigor.

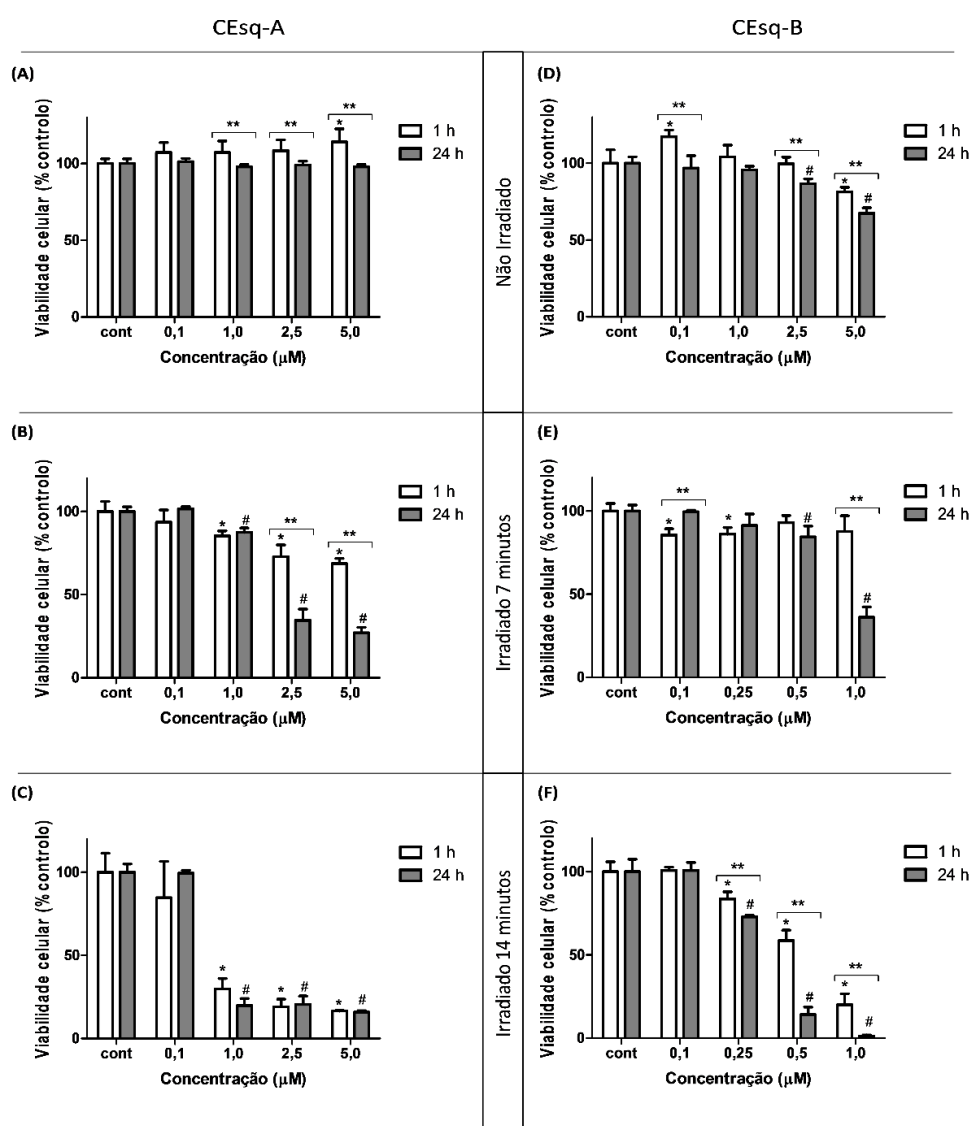


Figura 3.2. Viabilidade de células Caco-2 após exposição aos compostos CEsq-A e CEsq-B e para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos). A viabilidade está representada em % de controlo (média $\pm$ S.D., n=4). Ambos os compostos foram irradiados a 660 nm. Os * representam as concentrações que são estatisticamente diferentes em relação ao controlo para 1 h de exposição à cianina ativada pela luz, de comprimento adequado. O mesmo está representado com # para as 24 h de exposição. O ** significa diferença estatística entre o grupo de dados do ensaio de 1 h e 24 h de exposição. São consideradas diferenças estatísticas significativas quando $p < 0,05$.

Pela análise dos gráficos podemos verificar que ocorreu uma diminuição da viabilidade celular nos ensaios irradiados, proporcional ao aumento da concentração de composto, sendo essa diminuição, numa maneira geral, maior nos grupos que ficaram expostos mais tempo ao corante ativado pela luz, de comprimento de onda adequado (em ambos os casos, a 660 nm), porém, em algumas concentrações, essa diferença não é estatisticamente significativa. Observa-se também que o tempo da irradiação é um fator importante pois quanto mais tempo os compostos são irradiados, maior é a redução da viabilidade celular (Figura 3.2C e F).

É visível que, no ensaio de irradiação de 7 minutos, até à concentração de 1,0 μM , a CEsq-B (Figura 3.2E) tem um padrão de viabilidade mais ou menos semelhante à CEsq-A (Figura 3.2B), quando as células são expostas durante 1 h, mantendo-se perto dos 100 % de viabilidade. No entanto, quando as células são expostas durante 24 h à cianina ativada pela luz os resultados são bastante diferentes, onde podemos ver que a CEsq-A não provoca uma grande diminuição do número de células biologicamente ativas, em relação ao ensaio da 1 h (viabilidade de $87,4 \pm 2,63$ % para 24 h, idêntica à de 1 h, $p > 0,05$), enquanto a CEsq-B apresenta um decréscimo de viabilidade significativo (viabilidade de $36,10 \pm 6,28$ %; redução de aproximadamente 54%, $p < 0,05$).

No ensaio de 14 minutos a observação anterior repete-se. A 1 h de exposição, e à concentração de 1,0 μM , os compostos provocam a morte celular numa proporção relativamente semelhante e, após 24 h de exposição, a CEsq-B reduziu a viabilidade para $1,29 \pm 0,55$ % (% do controlo), e CEsq-A para $15,89 \pm 0,90$ %. Assim, podemos então afirmar que a CEsq-B tem efeitos mais eficazes que a CEsq-A, apesar de ser necessária uma exposição mais prolongada das células à cianina.

Esta diferença entre os dois corantes poderá ser devido à alteração do átomo de enxofre, presente num dos anéis heterocíclicos laterais da CEsq-A, por um átomo de selénio, que constitui a CEsq-B. O selénio é um nutriente antioxidante, essencial na dieta e foi demonstrado que este apresenta propriedades anticancerígenas e apresenta efeitos eficazes contra a leucemia, cancro do colon, pâncreas, ovários, pulmão, pele entre outros (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008). Por outro lado, compostos de selénio podem também provocar danos agudos às cadeias de DNA, através da formação de elevados teores de superóxido (Letavayová *et al.*, 2006). Kim e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento de células tumorais com selénio a baixas concentrações, estimulam a apoptose e, a altas concentrações, o selénio tem o efeito tóxico pro-oxidante devido à sua capacidade de fragmentação do DNA. Concluíram também que o tratamento

das células tumorais TC-1 com Radaclorina em conjunto com selênio leva à inibição do crescimento tumoral, induz alterações morfológicas associadas à apoptose e provoca alterações na expressão de genes, nomeadamente genes responsáveis pela formação de tumores, resultando numa supressão cancerígena eficaz (Kim *et al.*, 2012).

Com os resultados da viabilidade celular, calculou-se o valor do IC₅₀, que é a concentração de composto que mata 50 % de células. Estes valores de concentração serão usados nos ensaios posteriores. Os valores de IC₅₀ para as células Caco-2 estão indicados na tabela 3.1, onde se pode confirmar a maior citotoxicidade de CEsq-B, dado que nas mesmas condições apresenta um IC₅₀ menor. Para estes compostos, na condição não-irradiada os IC₅₀ foram superiores à concentração mais elevada utilizada, como pode ser observado na figura 3.2.

Tabela 3.1. IC₅₀ obtidos para as CEsq-A e CEsq-B em células Caco-2, nas diferentes condições de irradiação.

IC ₅₀ para as células Caco-2 (μM)							
CEsq-A				CEsq-B			
7 minutos		14 minutos		7 minutos		14 minutos	
1 h	24 h	1 h	24 h	1h	24 h	1 h	24 h
> 5,0	2,12 ± 0,15	0,86 ± 0,12	0,79 ± 0,13	> 1,0	0,98 ± 0,07	0,78 ± 0,08	0,49 ± 0,12

Na figura 3.3 apresentam-se os resultados obtidos para as células HaCaT, expostas a CEsq-A e a CEsq-B.

Quanto ao ensaio no escuro, verificou-se que a CEsq-A não é tóxica para células HaCaT (Figura 3.3A), para qualquer uma das concentrações, o que não acontece no caso da CEsq-B (Figura 3.3D), que produz uma redução de viabilidade celular significativa, na concentração de 5,0 μM (78,84 ± 7,46 % de viabilidade após 1 h de contacto). Assim como ocorrido nas células Caco-2 (Figura 3.2), também nas células HaCaT se observa uma maior toxicidade nos ensaios irradiados, sendo a CEsq-B a que provoca um efeito mais acentuado e, onde esta redução de viabilidade é proporcional ao aumento da concentração e ao tempo de exposição das células à cianina (Figura 3.3).

A Figura 3.3C, para a CEsq-A, aos 14 minutos de irradiação, mostra uma particularidade: a partir da concentração de 1,0 μM a percentagem de viabilidade permanece relativamente constante, tanto para a 1 h de exposição como para as 24 h, o que poderá sugerir que, mesmo aumentando a concentração, as células não conseguem assimilar mais quantidade de composto, e por isso, esse será o máximo de morte celular

que poderá provocar, ou que o efeito produzido é imediato e então independente do tempo de exposição das células às cianinas irradiadas.

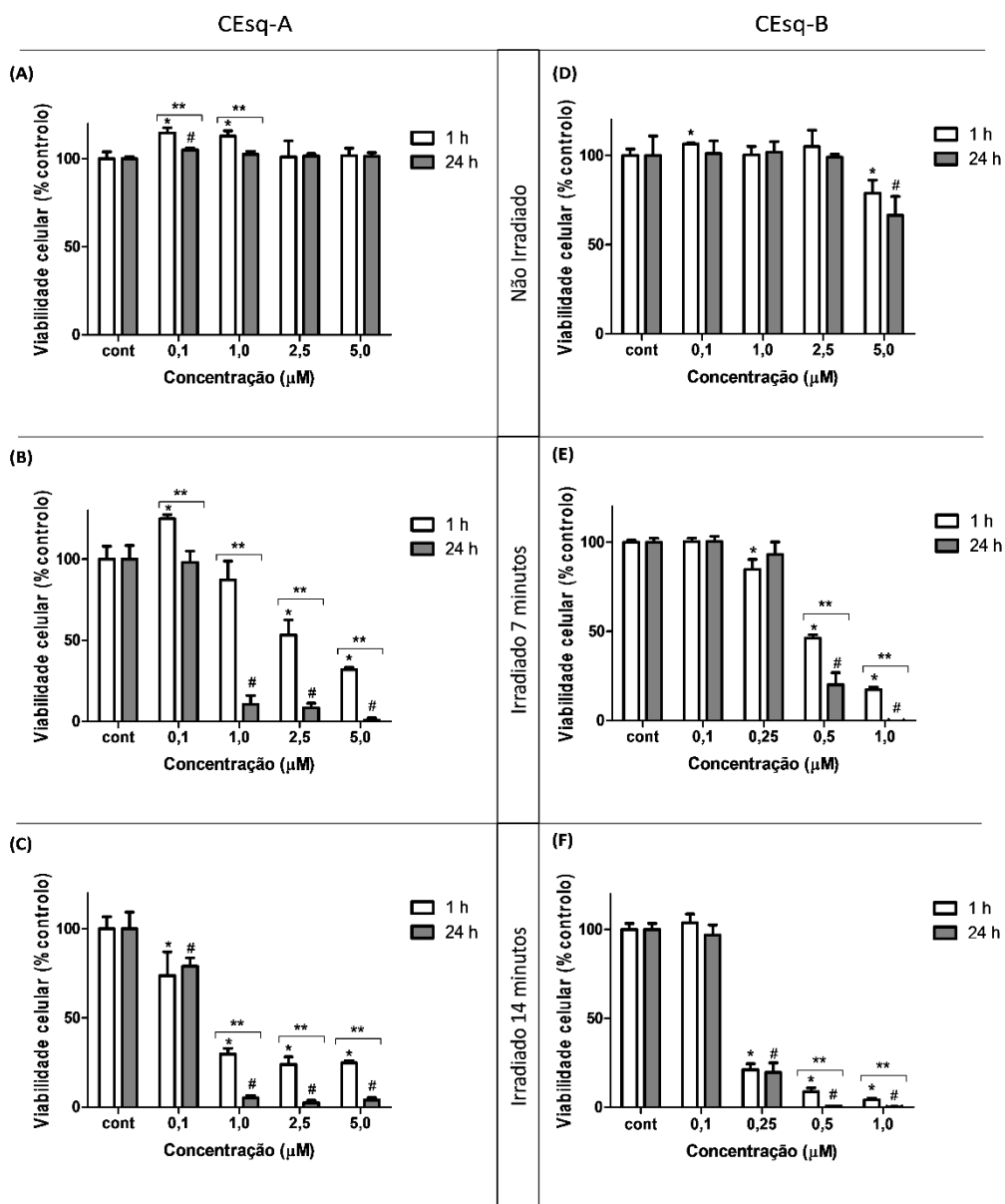


Figura 3.3. Viabilidade de células HaCaT após exposição aos compostos CEsq-A e CEsq-B e para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos). A viabilidade está representada em % de controle (média ± S.D., n=4). Ambos os compostos foram irradiados a 660 nm. Os * representam as concentrações que são estatisticamente diferentes em relação ao controle para 1 h de exposição à cianina ativada pela luz, de comprimento adequado. O mesmo está representado com # para as 24 h de exposição. O ** significa diferença estatística entre o grupo de dados do ensaio de 1 h e 24 h de exposição. São consideradas diferenças estatísticas significativas quando $p < 0,05$.

Na tabela 3.2 estão representados os valores de IC_{50} obtidos após a aplicação das CEsq A e B, em células HaCaT.

Tabela 3.2. IC₅₀ calculado para a CEsq-A e CEsq-B em células HaCaT, nas diferentes condições de irradiação.

IC ₅₀ para as células HaCaT (μM)							
CEsq-A				CEsq-B			
7 minutos		14 minutos		7 minutos		14 minutos	
1 h	24 h	1 h	24 h	1h	24 h	1 h	24 h
2,55±0,20	0,71±0,12	0,73±0,13	0,62±0,12	0,74±0,08	0,57±0,13	0,31±0,14	0,25±0,17

Comparando estes resultados com os dados obtidos nas células Caco-2 (Tabela 3.1) deparamo-nos com o facto de que, para ambos os compostos, a redução de viabilidade nas células HaCaT é mais elevada, isto é, os compostos aparentam ser mais tóxicos para as células normais do que para as células tumorais (valores de IC₅₀ menores nas células HaCaT, comparando com os das Caco-2, nas mesmas condições). Mas há algumas considerações que temos de ter em conta. As células Caco-2 são provenientes de um carcinoma colo-retal e assim, têm propriedades do colon, que por si só, já são mais resistentes que as células da pele, de onde são provenientes as HaCaT. Os enterócitos estão equipados com várias proteínas transportadoras da família ABC (*ATP-binding cassette*), como a P-glicoproteína de multirresistência (MDR1/P-gp, *multidrug resistance P-glycoprotein*) e as proteínas de multirresistência MDR1 e MDR2 (MDR, *multidrug resistance proteins*), e portanto aptas a bombear para o exterior os xenobióticos (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Naruhashi *et al.*, 2011) que assim não lesam a célula. Por outro lado, as células tumorais dividem-se muito mais e a uma velocidade maior do que as células normais, ou seja, as células que sobreviveram vão continuar a dividir-se, o que pode ser traduzido num aumento da viabilidade, que contrasta com a redução da mesma pelo efeito dos compostos.

3.2.2. Ação das cianinas aminoesquarílicas em células Caco-2 e HaCaT

A CEsq-C e CEsq-D são semelhantes entre si, no que toca à estrutura. Porém, a CEsq-C contém um grupo amida na cadeia terminal da amina que está ligada ao anel central de quatro membros e a CEsq-D tem uma amina primária ligada à referida cadeia (Figura 3.1).

Na figura 3.4 estão representados os resultados da viabilidade celular de células Caco-2 expostas à cianina CEsq-C. Apenas são mostrados os resultados obtidos para a

CEsq-C, uma vez que houve um problema de contaminação com esta linha celular, o que a inviabilizou, não sendo possível terminar o ensaio para a CEsq-D.

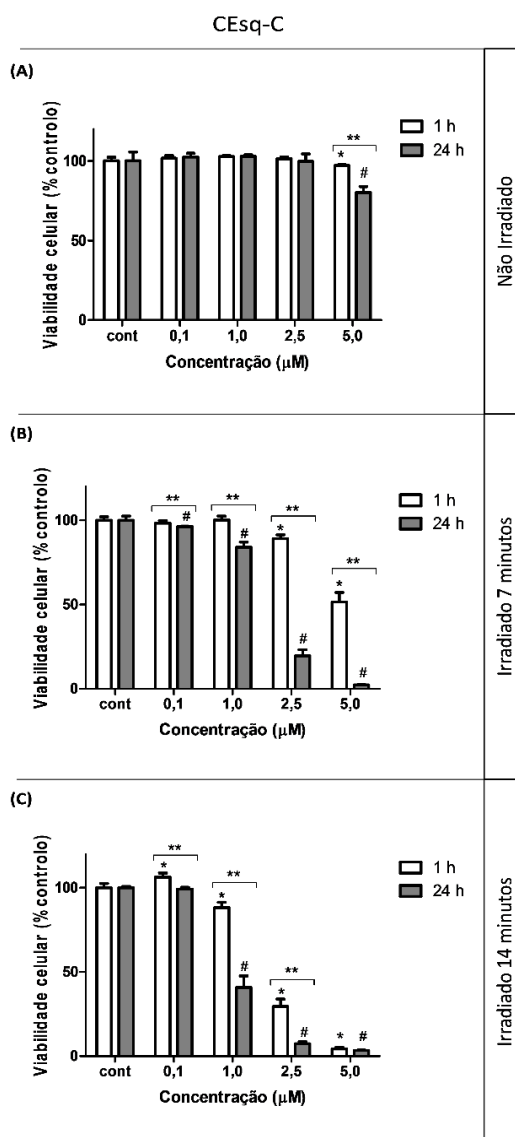


Figura 3.4. Viabilidade de células Caco-2 após exposição à CEsq-C, para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos). A viabilidade está representada em % de controle (média $\pm$ S.D., n=4). Ambos os compostos foram irradiados a 660 nm. Os * representam as concentrações que são estatisticamente diferentes em relação ao controle para 1 h de exposição à cianina ativada pela luz, de comprimento adequado. O mesmo está representado com # para as 24 h de exposição. O ** significa diferença estatística entre o grupo de dados do ensaio de 1 h e 24 h de exposição. São consideradas diferenças estatísticas significativas quando $p < 0,05$.

Através da análise dos gráficos, podemos ver que, no caso do ensaio no escuro (Figura 3.4A), apenas se nota uma ligeira redução na viabilidade celular na concentração maior (viabilidade de $80,08 \pm 3,79$ %).

No ensaio irradiado durante 7 minutos (Figura 3.4B), até à concentração de 2,5 μM não se produz morte celular, quando as células são expostas durante 1 h. No entanto, quando expostas durante 24 h, a viabilidade celular reduz para valores de ~25% do controlo, nesta concentração.

Na tabela 3.3 encontram-se os IC_{50} obtidos após exposição de células Caco-2 à CEsq-C irradiada.

Tabela 3.3. IC_{50} do composto CEsq-C em células Caco-2, para as várias condições de irradiação.

IC_{50} para as células Caco-2 (μM)			
CEsq-C			
7 minutos		14 minutos	
1 h	24 h	1 h	24 h
> 5,0	1,64 $\pm$ 0,07	2,10 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,08

A figura 3.5 mostra a viabilidade celular (em relação ao controlo), após a exposição de células HaCaT às cianinas CEsq-C e CEsq-D, nas diversas condições. Assim como no caso da CEsq-B, houve aqui a necessidade de se utilizarem concentrações intermédias, entre 0,1 e 1,0 μM para a CEsq-C, nos ensaios irradiados, pelo facto de haver uma drástica redução de viabilidade celular de 0,1 (~100%) para 1,0 μM (~0%), o que dificultava o cálculo do IC_{50} com rigor (dados não mostrados).

Nos ensaios no escuro, podemos ver que a CEsq-C produz uma taxa de viabilidade muito reduzida nas concentrações a partir de 1,0 μM , sendo a viabilidade reduzida quase totalmente aos 5,0 μM , o que constitui uma grande desvantagem para este composto e significa que, para ser utilizado como FS em PDT teria que ser usado em concentrações mínimas. Já a CEsq-D não apresenta grande efeito citotóxico até 5 μM (Figura 3.5D).

Para ambos os corantes, após 7 minutos de irradiação, a redução de viabilidade é mais acentuada, comparando com o escuro. A CEsq-C tem um efeito citotóxico maior que a CEsq-D em células normais, o que, possivelmente significa que a CEsq-D é mais favorável como FS em PDT. Este efeito pode ter a ver com a alteração do grupo funcional.

Mais uma vez, comparando os resultados de viabilidade celular da CEsq-C em HaCaT e Caco-2 verifica-se que o efeito citotóxico continua a ser maior na primeira, devido à maior sensibilidade destas células relativamente às células tumorais.

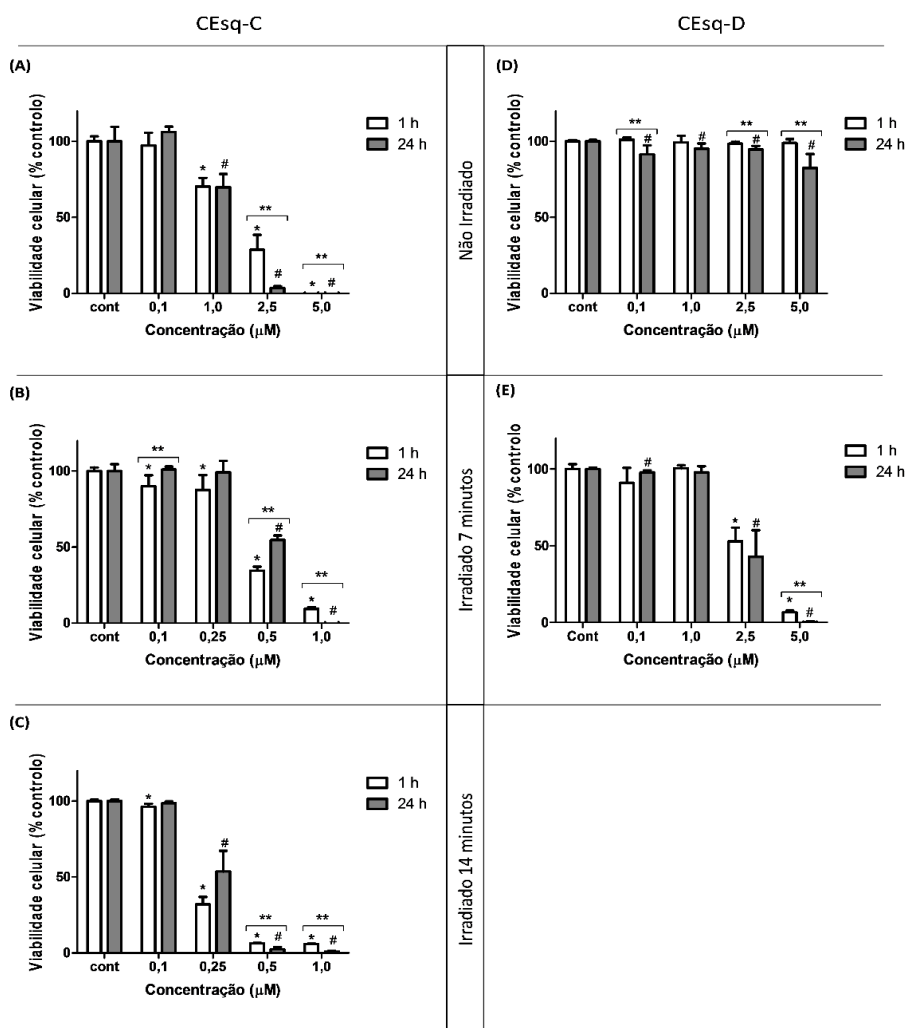


Figura 3.5. Viabilidade de células HaCaT após exposição aos compostos CESq-C e CESq-D e para cada tempo de irradiação em estudo (0, 7 e 14 minutos). A viabilidade está representada em % de controle (média $\pm$ S.D., n=4). Ambos os compostos foram irradiados a 660 nm. Os * representam as concentrações que são estatisticamente diferentes em relação ao controle para 1 h de exposição à cianina ativada pela luz, de comprimento adequado. O mesmo está representado com # para as 24 h de exposição. O ** significa diferença estatística entre o grupo de dados do ensaio de 1 h e 24 h de exposição. São consideradas diferenças estatísticas significativas quando $p < 0,05$.

Na tabela 3.4 estão representados os valores de IC_{50} calculados a partir dos gráficos de viabilidade, das CESq-C e CESq-D quando irradiadas e aplicadas em células HaCaT.

Tabela 3.4. IC_{50} dos compostos CESq-C e CESq-D em células HaCaT, para as várias condições.

IC_{50} para as células HaCaT (μM)							
CESq-C						CESq-D	
Não-Irradiada		7 minutos		14 minutos		7 minutos	
1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
1,70 $\pm$ 0,13	1,40 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,13	2,45 $\pm$ 0,08	2,25 $\pm$ 0,08

Durante a realização dos ensaios de viabilidade celular, aquando da visualização das células ao microscópio notou-se nalguns casos o aparecimento de pequenos grânulos azulados (cor das cianinas), mesmo após a lavagem destas com PBS, o que indicou que pudesse haver acumulação do corante no interior das células, ou na membrana plasmática, e que esta acumulação não era igual para todos os compostos. Assim, surgiu a ideia de se determinar o valor do coeficiente de partilha dos corantes e de correlacionar os valores obtidos com a quantidade de corante internalizado. Os próximos ensaios visam esclarecer este assunto.

3.3. Determinação da internalização das cianinas a nível celular

Antes de passar à determinação da quantidade de cianina acumulada nas células, procedeu-se à determinação do coeficiente de partição das cianinas usando a mistura 1-octanol/água, um método adaptado de USEPA, 1996.

3.3.1. Coeficientes de partição 1-octanol/água

Os coeficientes de partição 1-octanol/água, ou neste caso, os coeficientes de distribuição 1-octanol/PBS (P) foram calculados, como descrito anteriormente (secção 2.4.1), pelo cálculo da concentração dos compostos em ambos os solventes e utilizando a seguinte equação:

$$\log P = \log \frac{\text{Concentração da cianina em octanol}}{\text{Concentração da cianina em PBS}}$$

Como as cianinas não são muito solúveis em PBS, é de esperar que os valores de P sejam relativamente elevados. Devido a esta fraca solubilidade, a realização de uma curva de calibração em PBS foi mais difícil, pelo facto de os compostos tenderem a precipitar em PBS, impossibilitando uma medição muito exata no espectrofotómetro. Por este motivo, serão apresentadas duas formas diferentes de obter os valores de P , um calculado através dos valores que foram obtidos durante o ensaio, e um valor teórico, pressupondo que a concentração em PBS seja igual à diferença entre a concentração total de composto adicionado à mistura dos solventes e a concentração de composto calculada em 1-octanol. Os valores de P apresentam-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5. Valores obtidos e valores teóricos de coeficientes de partição ($\log P$) para cada uma das cianinas esquarílicas. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão, obtidos para um $n=2$. O n.d. significa que não foi possível calcular o P nas 2 repetições e (*) significa que não foi possível calcular o P para uma das repetições, impossibilitando o cálculo do desvio padrão.

	log P obtido	log P teórico
CEsq-A	1,36 $\pm$ 0,09	1,17 (*)
CEsq-B	2,90 (*)	0,98 $\pm$ 0,22
CEsq-C	1,68 $\pm$ 0,12	0,59 $\pm$ 0,15
CEsq-D	n.d.	0,57 $\pm$ 0,15

Todas as cianinas apresentam $\log P > 0$, o que significa que todas as cianinas têm maior tendência a ficarem retidas na fase orgânica, o que já era pressuposto, tendo em conta a natureza e a estrutura das moléculas (Tabela 2.1). Quanto maior o $\log P$ maior será a hidrofobicidade do composto, por isso, tendo em conta os valores teóricos indicados em cima, a CEsq-A, à partida, é mais hidrofóbica e, conseqüentemente, tem maior tendência em ficar retida na fase orgânica relativamente às restantes cianinas. Contudo, a CEsq-B, apresenta um valor teórico cujo intervalo não é diferente da CEsq-A. Relativamente aos valores obtidos, a CEsq-B apresenta a maior hidrofobicidade. Atendendo a estes resultados, seria de esperar que os compostos CEsq-A e CEsq-B tivessem uma maior interação com as membranas celulares, indicando que podem por um lado causar toxicidade no escuro, e por outro, que após irradiados podem ter uma maior capacidade de exercer os seus efeitos biológicos, nomeadamente induzir morte celular.

3.3.2. Determinação da quantidade de cianinas acumulada nas células

Este ensaio, adaptado de (Delaey *et al.*, 2000) com algumas modificações (secção 2.4.2), permite-nos saber a quantidade de corante que fica retido nas membranas plasmáticas ou no interior das células, tendo em conta a quantidade inicial adicionada. Assim, após adição de 1 ou 2 μM de cada corante, e incubação das células na sua presença, os sobrenadantes foram removidos, e os sedimentos contendo as células foram lavados usando PBS para remover eventuais cristais formados. Após a “solubilização” das células em DMSO, e conseqüente dissolução dos corantes nelas inseridos, foi medida a absorbância no máximo de absorvância de cada cianina e procedeu-se ao cálculo da quantidade de cianina retida nas células (secção 2.4.2).

Na tabela 3.6 encontram-se as concentrações de cada cianina, presente no interior das células, quando é adicionado inicialmente 1 e 2 μM .

Tabela 3.6. Quantidade de cianina retida dentro das células HaCaT, quando adicionado inicialmente 1 e 2 μM .

	1 μM		2 μM	
	[CEsq] retida (μM)	% de retenção (%)	[CEsq] retida (μM)	% de retenção (%)
CEsq-A	0,314	31,4	0,328	16,4
CEsq-B	0,34	34	0,405	20,25
CEsq-C	0,24	24	0,591	29,53
CEsq-D	0,111	11,1	0,195	9,73

Pela análise da tabela anterior, parece existir um limite de concentração de cianinas retida pelas células, isto é, parece haver uma quantidade máxima, na qual as células atingem um ponto de saturação. Isto porque, se observarmos as concentrações de cianina retida pelas células, quando se adiciona 1,0 μM e depois 2,0 μM , verificamos que não existe grandes diferenças, à exceção da CEsq-C, onde o aumento entre os dois ensaios ainda foi considerável. Para confirmarmos esta suposição, na figura 3.6 encontra-se o gráfico que esquematiza a tabela anterior, de modo a verificar a tendência na retenção das cianinas pelas células.

Com base neste gráfico, podemos então observar que a CEsq-A e a CEsq-B apresentam um ponto a partir do qual a concentração retida pelas células se mantém constante, enquanto a CEsq-C tem tendência a aumentar a concentração retida, quanto maior for a concentração adicionada inicialmente. No entanto, não quer dizer que esta não apresente também um ponto de saturação, simplesmente o mesmo não é observado nas duas concentrações iniciais testadas. O mesmo se passa com a CEsq-D, a qual se comporta da mesma forma que a CEsq-C, embora seja de uma forma menos acentuada, pois é a CEsq que é menos retida pelas células e também aquela que apresentou o menor valor de $\log P$ (tabela 3.5), o que indica correlação entre os dados.

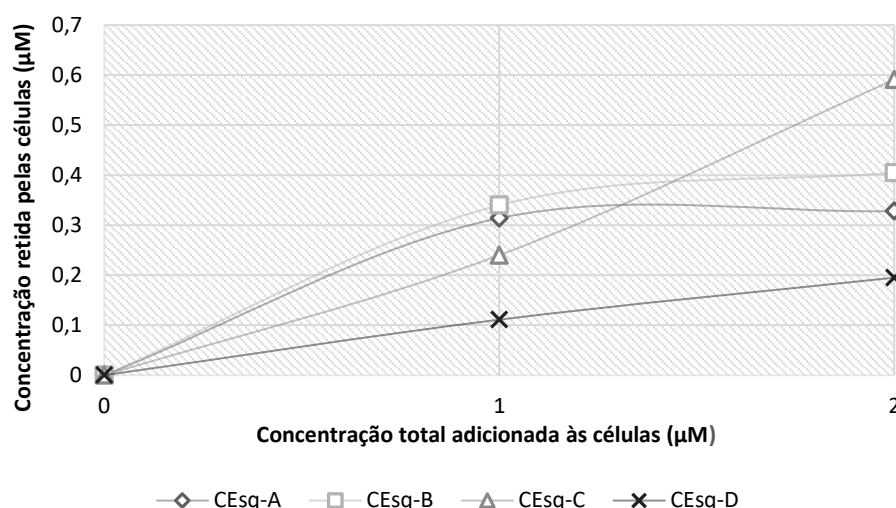


Figura 3.6. Correlação entre a retenção das cianinas pelas células em função da quantidade adicionada inicialmente (1 ou 2 μM).

Tendo em conta estes dados, pode dizer-se que a hidrofobicidade dos corantes (maiores valores de $\log P$) se correlaciona com a maior afinidade dos corantes pelas membranas celulares, havendo retenção membranar. Contudo, a presença de pontos azulados no interior das células pode fazer prever um outro mecanismo de internalização dos compostos nas células, mas que com estes ensaios é difícil saber o mecanismo exato envolvido na retenção destas cianinas pela célula e a sua incorporação em vesículas intracelulares. No entanto, esta retenção pode ser feita através de agentes transportadores, como por exemplo lipoproteínas, ou mesmo serem internalizadas nas células através de recetores membranares (Robertson *et al.*, 2009), um mecanismo para explorar em investigação futura.

3.3.3. Coeficiente de partição *versus* retenção das cianinas nas células

O coeficiente de partição, como já referido, indica a hidrofobicidade do composto, isto é, se os compostos em estudo têm mais afinidade para fases aquosas ou para fases orgânicas. Assim, quanto maior o coeficiente de partição, maior será a afinidade para a fase orgânica, e mais facilmente será retido pela membrana celular.

Assim, na figura 3.7 apresentam-se dois gráficos, que comparam os resultados da retenção das CEsq nas células com os coeficientes de partição obtidos e teóricos, de modo a verificar a correlação destes dois métodos.

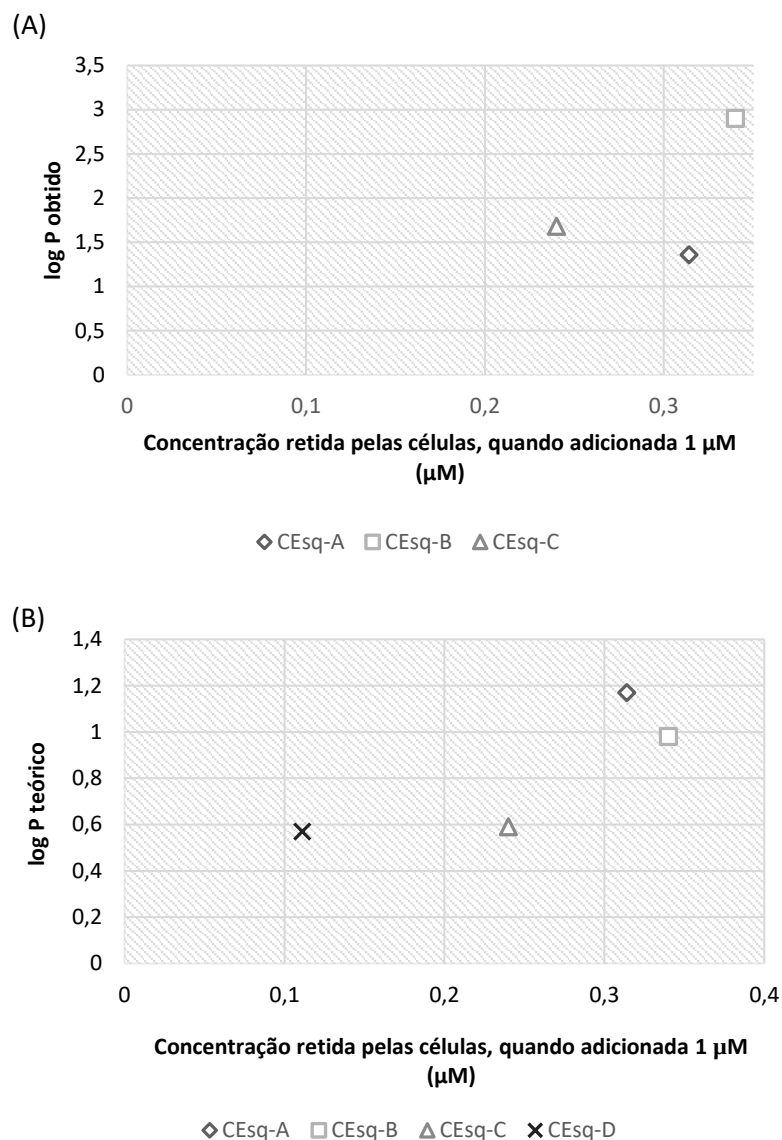


Figura 3.7. Correlação entre os valores de coeficiente de partição obtido (A) e teórico (B) com os valores de concentração de CEsq retidos pelas células.

Com base na Figura 3.7, verifica-se que o coeficiente de partição teórico é o que melhor se correlaciona com a concentração de CEsq retida pelas células (Figura 3.7B). Assim, as CEsq que apresentam maior coeficiente de partição teórica são as que foram mais retidas pelas células, com a exceção da CEsq-A, que teoricamente, é a CEsq que tem maior coeficiente de partição, mas não é a cianina que foi mais retida, apresentando um ligeiro decréscimo de retenção relativo àquela mais retida. Porém, o coeficiente de partição para a CEsq-A resultou apenas duma medição, enquanto nas outras cianinas o coeficiente de partição considerado foi a média de duas medições. Para avaliar a

correlação entre estes dois fatores, traçou-se uma linha de tendência onde se obteve a seguinte equação: $y = 3,1869x$ (com $r^2 = 0,8561$) o que indica uma boa correlação entre os dois fatores.

3.4. Mecanismos inerentes à morte celular induzida pela ativação das cianinas após irradiação

3.4.1. Comparação da produção de ROS por células expostas a cianinas ativadas após irradiação e não expostas

Neste ensaio, pretendeu-se avaliar a eficácia das cianinas irradiadas no processo de produção de ROS pelas células, em comparação com células com as cianinas não irradiadas, e ainda se as cianinas por si só são indutores da produção de ROS, neste caso compararam-se os resultados com células não expostas a cianinas.

A avaliação da produção de ROS foi feita através de uma sonda, a DCFDA (2', 7'-dicloro-fluoresceína diacetato), que é convertida em 2', 7'-dicloro-fluoresceína (DCF) a qual foi observada por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo. Esta sonda é permeabilizada pela célula e é clivada nos grupos diacetato pelas esterases intracelulares. Estando nesta forma, DCFH₂, torna-se mais polar e impermeável à membrana celular, sendo retida nas células. Após o contato da sonda com as ROS (radicais peróxido, hidróxido, ou outro) presentes na célula, a sonda é oxidada e convertida em DCF, um subproduto fluorescente da sonda. Esta molécula, mais pequena pode depois atravessar a membrana, escapando da célula, resultando numa perda de fluorescência basal, ou se exposta à luz pode sofrer fotobranqueamento da sonda com o tempo (Eruslanov & Kusmartsev, 2009). Assim, quanto maior for a intensidade de fluorescência, maior é a quantidade de sonda que foi oxidada a DCF e, consequentemente, maior será a quantidade de ROS presente nas células.

3.4.1.1. Avaliação da produção de ROS por microscopia de fluorescência

Os FSs para serem eficazes, e tendo em conta os mecanismos fotofísicos provocados pela PDT, espera-se que após irradiação produzam uma quantidade de ROS

nas células que seja maior que nas células controle (não irradiadas).

Na figura 3.8 são mostradas algumas imagens, obtidas por microscopia de fluorescência, usando o filtro FITC, para as CESq-A e B, em comparação com o controle.

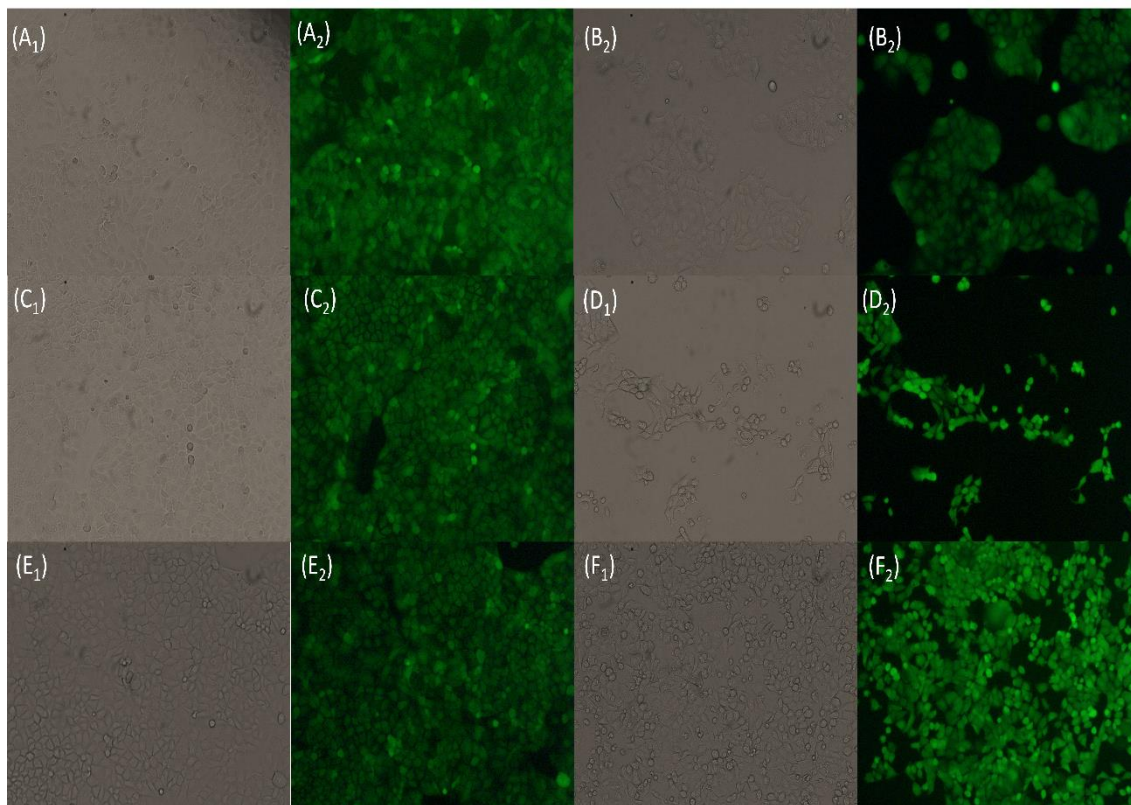


Figura 3.8. Avaliação da produção de ROS por células Caco-2 pré-expostas a CESq-A e CESq-B. Os números 1 e 2 dizem respeito às imagens de campo-claro e às imagens de fluorescência do DCF (usando o filtro FITC), respectivamente. Legenda: A – Controle não irradiado; B – Controle irradiado; C – CESq-A não irradiado; D – CESq-A irradiado; E – CESq-B não irradiado; F – CESq-B irradiado. Ampliação de 200x.

Uma das vias de produção de ROS é um processo fisiológico envolvido nas cadeias respiratórias. Assim, todas as células, normais ou cancerígenas, possuem uma certa quantidade de ROS basal, daí a necessidade de se usar um controle, para distinguir uma produção de ROS basal, envolvida nos processos normais das células, e a produção de ROS influenciado pela ação das cianinas por si só ou pela ação fotossensibilizadora das mesmas.

Na figura 3.8, podemos verificar que, após exposição das células a CESq-A irradiado (Figura 3.8D2) e CESq-B irradiado (Figura 3.8F2) aumenta a quantidade de células marcadas com maior intensidade da fluorescência, em relação ao controle (expostas a sonda não irradiada, Figura 3.8C2 e E2, respectivamente). As células expostas a cianinas não irradiadas, apresentam quantidades de ROS muito próximos ao controle

(células não expostas a corantes). Isto significa que a produção de ROS, originada pela presença das cianinas, se dá maioritariamente quando estas são ativadas pela luz, sendo uma mais valia para o uso destas cianinas como FSs.

A figura 3.9 mostra imagens representativas de células Caco-2 expostas às CESq-C e CESq-D, em comparação com o controlo.

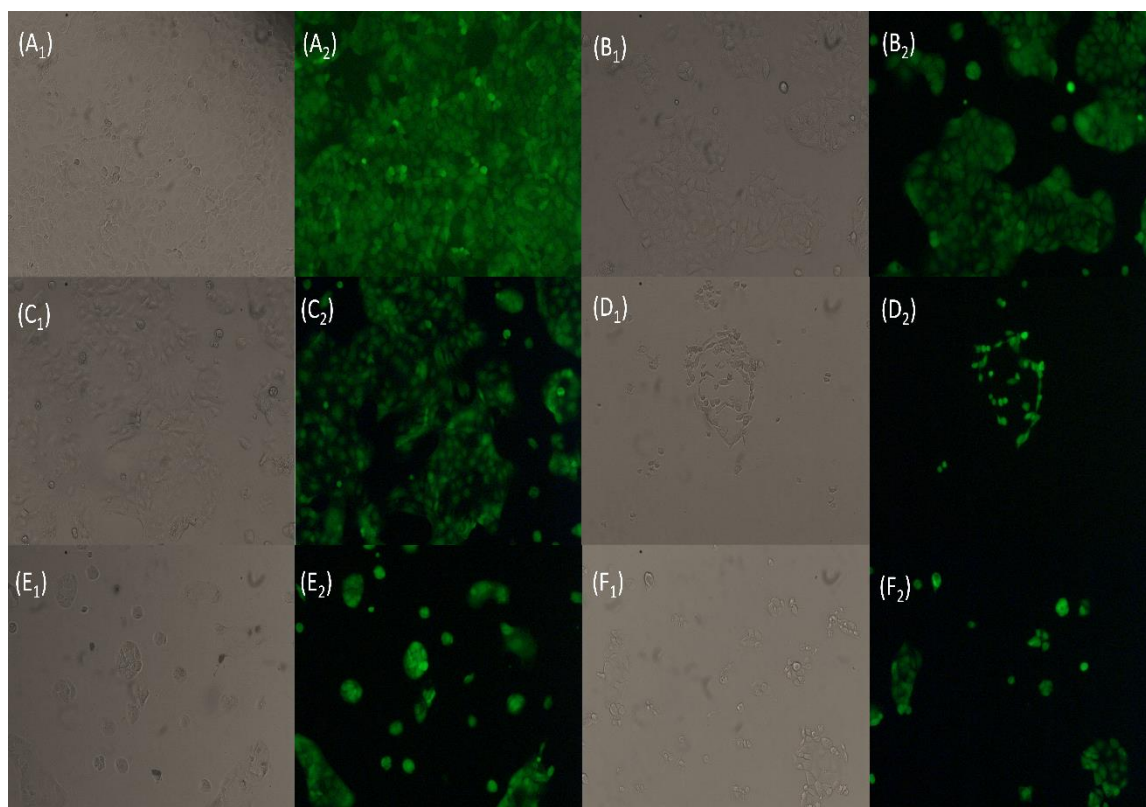


Figura 3.9. Avaliação da produção de ROS por células Caco-2 pré-expostas a CESq-C e CESq-D. Os números 1 e 2 dizem respeito às imagens de campo-claro e às imagens de fluorescência do DCF (usando o filtro FITC), respetivamente. Legenda: A – Controlo não irradiado; B – Controlo irradiado; C – CESq-C não irradiado; D – CESq-C irradiado; E – CESq-D não irradiado; F – CESq-D irradiado. Ampliação de 200x.

Assim como nas CESq-A e CESq -B, observa-se também um aumento de fluorescência na CESq-C irradiada, relativamente ao controlo e ao ensaio não irradiado. O mesmo parece não se verificar com exposição das células a CESq-D, onde parece não haver grande diferença de fluorescência entre as células irradiadas e não irradiadas, sendo que as células não irradiadas apresentam um aumento de fluorescência relativamente ao controlo, o que poderá significar que a cianina, mesmo sem ser ativada pela luz, provoca a formação de ROS que excedem os parâmetros ditos normais.

A produção de ROS por exposição às 4 cianinas foi também avaliada por microscopia de fluorescência, em células HaCaT que foram sujeitas aos mesmos tratamentos que os descritos para as células Caco-2.

A figura 3.10 mostra imagens representativas dos resultados que foram obtidos com a sonda DCFDA para as CEsq-A, B e D, em células HaCaT.

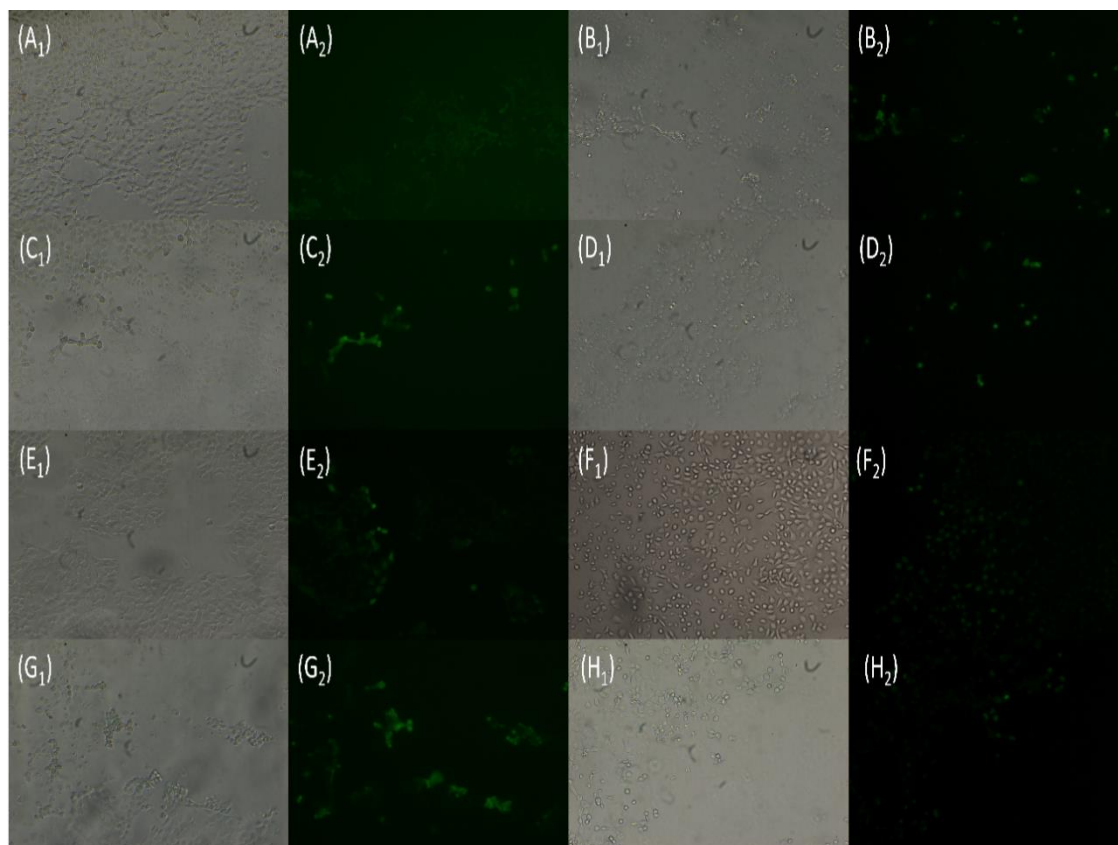


Figura 3.10. Avaliação da produção de ROS por células HaCaT pré-expostas a CEsq-A, CEsq-B e CEsq-D. Os números 1 e 2 dizem respeito às imagens de campo-claro e às imagens de fluorescência do DCF (usando o filtro FITC), respetivamente. Legenda: A – Controlo não irradiado; B – Controlo irradiado; C – CEsq-A não irradiado; D – CEsq-A irradiado; E – CEsq-B não irradiado; F – CEsq-B irradiado; G – CEsq-D não irradiado; H – CEsq-D irradiado. Ampliação de 200x.

De acordo com o ilustrado na figura 3.10, foi verificado que não há grandes diferenças entre a fluorescência das células nos ensaios não irradiados e irradiados, para as três cianinas, o que também acontece em relação aos controlos. Este facto pode indicar que estas células têm maior capacidade de eliminar as ROS produzidas ou que à partida resistem mais à ação das cianinas e por isso produzem menos ROS. São queratinócitos, e, portanto, células que naturalmente sofrem muitas agressões que levariam à produção de ROS (e.g. radiação, ação de agentes químicos). Estes resultados poderão sugerir que as vias de morte responsáveis pela morte das células HaCaT, evidenciada nos ensaios de

citotoxicidade (Figuras 3.3 e 3.5), não tenha como via principal produção de ROS. Pelo que outras vias podem ser ativadas e, por isso, exploradas.

Comparando as duas figuras anteriores, para células Caco-2 (Figuras 3.8 e 3.9) e para HaCaT (Figura 3.10), pode observar-se que no geral as células Caco-2 se apresentam com maior intensidade de fluorescência quer no controlo quer após exposição às cianinas. Este facto pode sugerir que o nível de ROS basal é maior nas células Caco-2, que as células Caco-2 têm uma maior quantidade de esterases citosólicas e, portanto, a clivagem dos grupos acetato de DCFDA é mais eficaz ou que efetivamente as células HaCaT têm uma maior capacidade de eliminar as ROS. Assim sendo, os resultados da figura 3.10 até podem ter diferenças de fluorescência, mas como a análise é qualitativa, essas diferenças podem não ser evidentes.

3.4.1.2. Avaliação da produção de ROS por citometria de fluxo

Recorreu-se à citometria de fluxo que permite fazer uma análise quantitativa da intensidade de fluorescência e avaliar se há ou não diferenças de fluorescência resultantes da produção de ROS em células HaCaT, pré-expostas às cianinas. Pelo facto de ter ocorrido um problema com as células Caco-2 (já referido anteriormente), neste ensaio só foi possível usar células HaCaT. Na figura 3.11 estão representados os resultados para a produção de ROS em células HaCaT, quando expostas às cianinas em estudo, por citometria de fluxo.

Quando a razão entre a intensidade de fluorescência das células no ensaio irradiado e a intensidade de fluorescência das células no ensaio não-irradiado é superior a 1 (acima da linha “efeito neutro”), podemos afirmar que a fluorescência é maior após irradiação, ou seja, que as células HaCaT produzem mais ROS quando a CEsq aplicada é irradiada. Assim, podemos verificar que as únicas cianinas que provocam um aumento na produção de ROS, quando irradiadas, e acima do controlo (ver linha controlo), são as CEsq-B e CEsq-C, enquanto as outras cianinas praticamente não apresentam diferenças em relação ao controlo e após a irradiação.

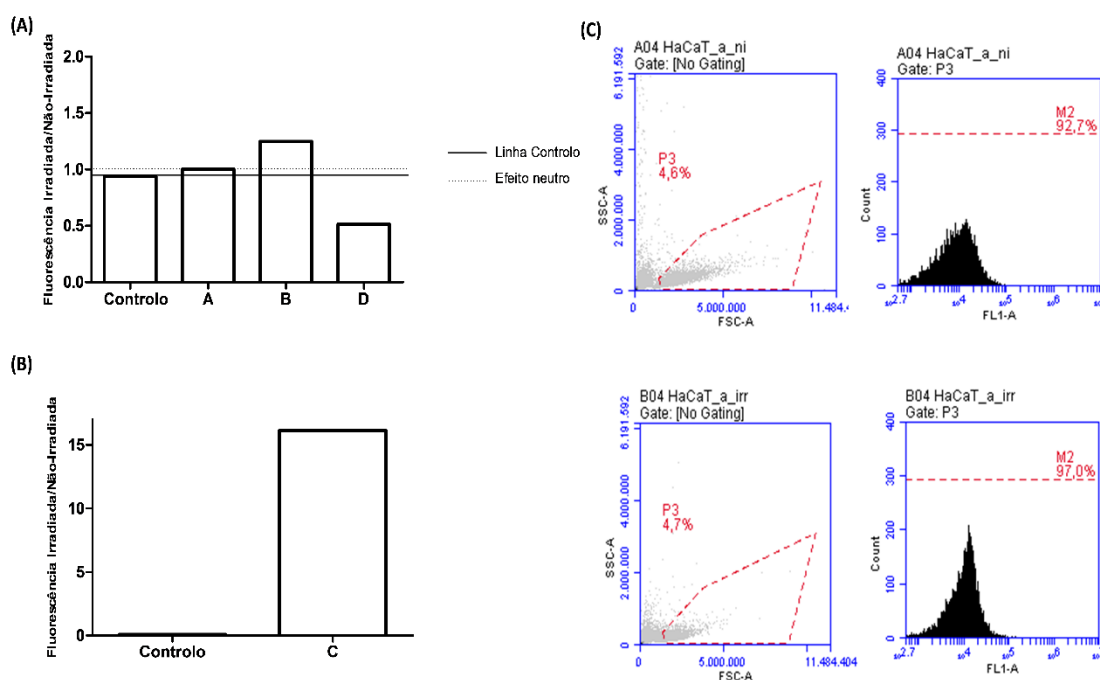


Figura 3.11. Produção de ROS, por células HaCaT pré-expostas às cianinas. **A)** Razão entre a intensidade de fluorescência medida por citometria de fluxo no ensaio irradiado e no não-irradiado para o controlo e para as cianinas A, B e D. **B)** Razão entre a intensidade de fluorescência emitida pelas células no ensaio irradiado e não-irradiado para o controlo e a CEsq-C. **C)** Exemplo dos gráficos registados com o software B6 Accuri, nos quais se retirou a intensidade média de fluorescência, usada para a análise dos dados (neste caso, os gráficos apresentados dizem respeito à CEsq-A).

Assim, os resultados obtidos para as CEsq-A e CEsq-D, por citometria de fluxo, estão concordantes com os resultados obtidos por microscopia de fluorescência, apresentadas anteriormente (Figura 3.10), onde não se verificaram grandes diferenças entre os ensaios das células expostas às CEsq A, B e D.

3.4.2. A exposição das células às cianinas induz peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (PL), como dito anteriormente, foi quantificada através da marcação das células com a sonda DHPE-FITC. Esta sonda, sendo lipofílica é incorporada nas membranas celulares e quando entra em contato com os subprodutos da peroxidação lipídica (e.g., hidroperóxidos lipídicos que depois se degradam formando cetonas e aldeídos, entre os quais o malondialdeído, MDA), reage com estes e perde fluorescência. Portanto, quanto maior a fluorescência, menor o grau de peroxidação (Maulik *et al.*, 1998).

Na figura 3.12 estão representados os dados obtidos para a PL das células HaCaT, provocada pela ação fotossensibilizadora das cianinas.

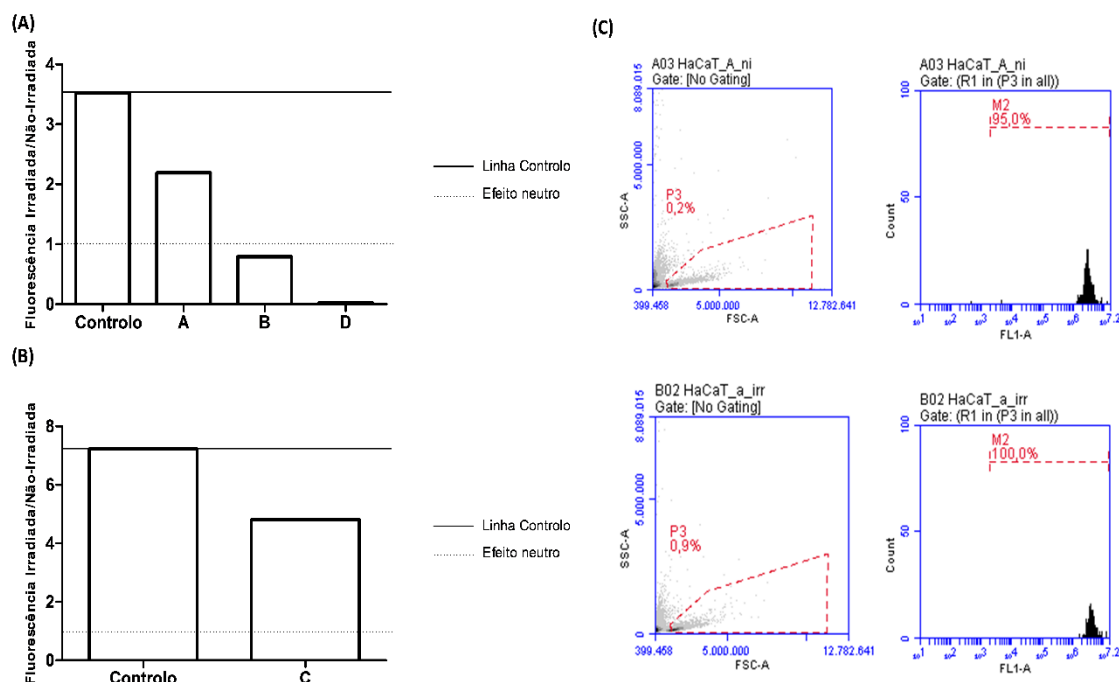


Figura 3.12. Resultados da PL, obtidos por citometria de fluxo, em células HaCaT. **A)** Razão entre a intensidade de fluorescência no ensaio irradiado e não-irradiado para o controlo e para as cianinas A, B e D. A linha controlo ajuda-nos a perceber qual a diferença entre as cianinas e o controlo. A linha “efeito neutro” é a linha razão =1, permitindo-nos avaliar qual o efeito da irradiação na PL. **B)** Razão entre a fluorescência no ensaio irradiado e não-irradiado para o controlo e a CESq-C. **C)** Exemplo dos gráficos observados com o software B6 Accuri, nos quais se retirou a intensidade média de fluorescência, usada para a análise dos dados (neste caso, os gráficos apresentados dizem respeito à CESq-A).

É interessante verificar que, de acordo com a análise apresentada, houve um aumento da intensidade de fluorescência, após irradiação, nas células do controlo e nas expostas às CESq-A e C, comparando com as células nas mesmas condições mas não sujeitas a radiação. Contudo, verifica-se que no geral, as células expostas às cianinas perdem muita fluorescência relativamente ao controlo, indicando que houve PL, corroborando o observado na produção de ROS. Como as ROS, quantificadas no ensaio anterior (secção 3.4.1) se encontram no citoplasma, podem não ser um contributo direto para a PL, que ocorre na membrana, podendo ser a mais afetada a plasmática, pelo facto destas cianinas entrarem em contacto com a membrana celular, e como tal, provocam peroxidação desta. Para as CESq-B e D verificou-se aumento da PL pela exposição das células às cianinas, e que foi muito aumentada quando estas são ativadas pela luz. Apesar da CESq-D ser a que menos provocou a produção de ROS, quando irradiada, é a que mais

parece aumentar a PL. Isto pode ser devido ao facto desta cianina, ao contrário das CEsq-A e C, atuar essencialmente na membrana plasmática.

3.4.3. A exposição das células às cianinas induz redução do conteúdo em glutathiona

O conteúdo intracelular em glutatião reduzido (GSH) foi medido por citometria de fluxo recorrendo à sonda Mercury Orange. A GSH é um antioxidante intracelular não enzimático e substrato de algumas enzimas do stresse oxidativo, como a glutathiona-S-transferase (GST) e a glutathiona peroxidase (GPx). (Valko *et al.*, 2006). A GST participa na metabolização de diversos xenobióticos, originando compostos menos tóxicos (Huber *et al.*, 2008). A GPx cataliza a transformação de H_2O_2 em H_2O , usando a GSH como cofator, oxidando-a a glutathiona dissulfeto (GSSG), enquanto que a glutathiona redutase (GR) regenera GSH a partir da sua forma oxidada, GSSG (Figura 3.13) (Doktorovová *et al.*, 2014).

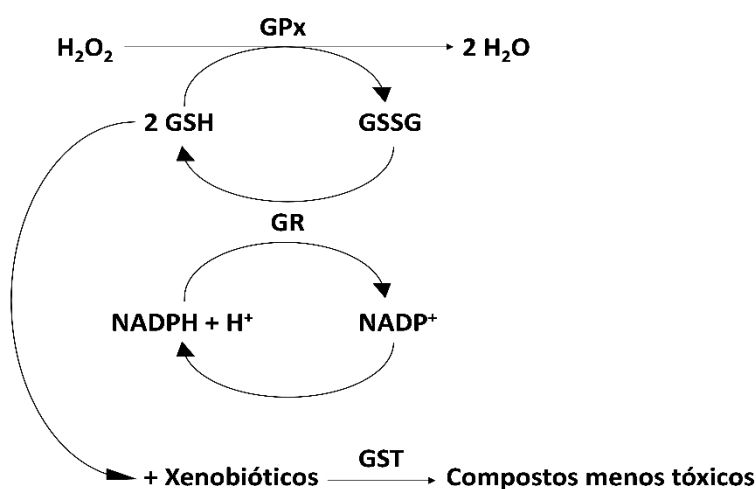


Figura 3.13. Interação das enzimas GPx, GR e GST e a sua ação na defesa antioxidante (adaptado de Doktorovová *et al.*, 2014).

Assim, quando diminui a quantidade de GSH na célula pode significar que está a ser consumida pelas enzimas, como a GPx e GST como mecanismo de defesa para combater os ROS existentes na célula. Por isso, é esperado que nos momentos iniciais após o estímulo oxidativo, ocorra diminuição de GSH. Porém, pode chegar a um ponto em que célula ainda continua com quantidades elevadas de ROS e, por sua vez, quantidades insuficientes de GSH, levando a célula a produzir mais, para se proteger, sendo então quantificado o aumento de GSH.

Na figura 3.14 encontram-se os resultados obtidos da quantificação de GSH em células HaCaT, quando tratadas com as cianinas e comparadas com os seus controlos.

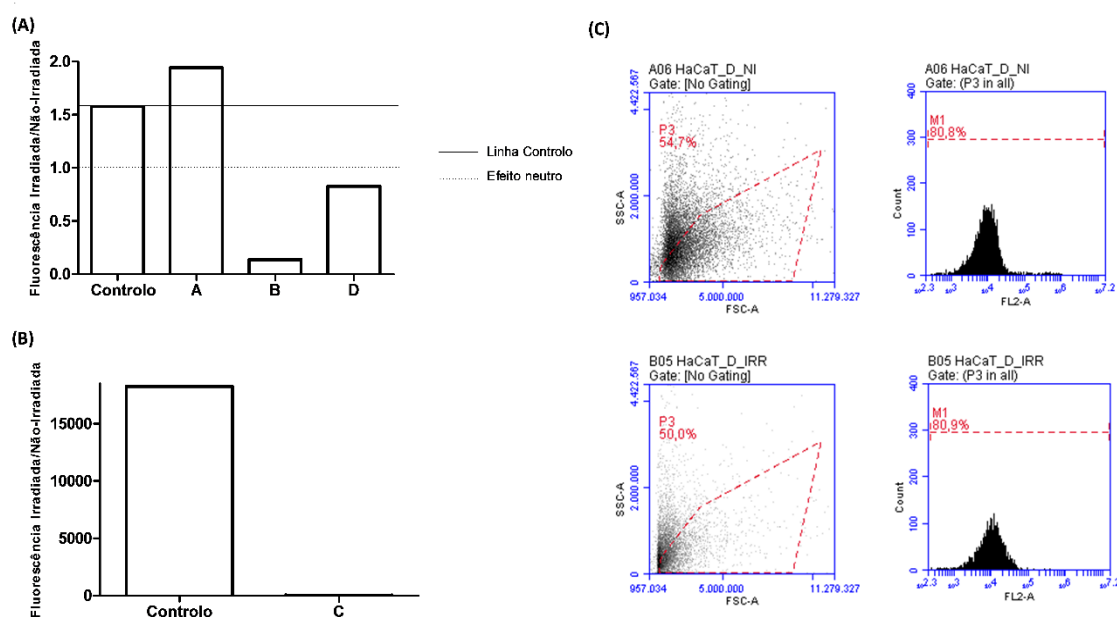


Figura 3.14. Resultados da quantidade de GSH, obtidos por citometria de fluxo, em células HaCaT. **A)** Razão entre a intensidade de fluorescência no ensaio irradiado e não-irradiado para o controlo e para as cianinas A, B e D. A linha controlo ajuda-nos a perceber qual a diferença entre as cianinas e o controlo. A linha “efeito neutro” é a linha razão =1, permitindo-nos avaliar qual o efeito da irradiação na quantidade de GSH. **B)** Razão entre a fluorescência no ensaio irradiado e não-irradiado para o controlo e a CESq-C. **C)** Exemplo dos gráficos observados com o software B6 Accuri, nos quais se retirou a intensidade média de fluorescência, usada para a análise dos dados (neste caso, os gráficos apresentados dizem respeito à CESq-D).

Verificou-se um ligeiro aumento da quantidade de GSH nos controlos e na CESq-A, após a ativação pela luz. Tendo em conta que a GSH é um antioxidante importante, pode querer dizer que este aumento serviu como um mecanismo de proteção, por parte da célula, devido à quantidade de ROS formada com a irradiação.

No caso das CESq-B e D ocorreu um decréscimo do teor de GSH. De notar que a CESq-B elevou o conteúdo em ROS (Figura 3.11), sugerindo que esse aumento levou a célula a ativar as suas defesas antioxidantes, consumindo GSH. A CESq-D induziu PL (Figura 3.12), o que poderá significar que a GSH consumida não foi suficiente para eliminar as ROS produzidas pela presença das cianinas, provocando a ocorrência de danos celulares, como a peroxidação lipídica.

Assim, o conteúdo em GSH deve refletir a necessidade da célula em colmatar o excesso de ROS e garantir a sua sobrevivência.

3.4.4. Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose

Para conhecermos melhor os mecanismos subjacentes à morte celular, induzida pelos nossos potenciais FSs, foi necessária a avaliação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose. As proteínas por nós quantificadas foram a caspase-3, a Bcl-2, a Bax e a AIF, usando-se como padrão proteico a β -actina. A avaliação da expressão destas proteínas foi realizada por *Western blot*, usando anticorpos apropriados para tal efeito, (ver métodos, secção 2.5.5.1). Neste ensaio, foi avaliada também a variável “tempo de exposição”, 1 hora e 24 horas, assim como nos ensaios de viabilidade, sendo por isso discutidos em separado.

Este ensaio apenas foi realizado na linha celular HaCaT, por uma questão de tempo e de custos associados

3.4.4.1. Vias ativadas, após 1 hora de exposição

Para este ensaio, apenas foi observada expressão de duas proteínas envolvidas nas vias da apoptose: a caspase-3 e a Bcl-2. Na figura 3.15 encontram-se os gráficos que relacionam a intensidade das bandas obtidas para ambas as proteínas, em células expostas às cianinas CEsq-B e a CEsq-D. Dado que os resultados anteriores para as CEsq- A e C foram muito idênticos aos da CEsq-B (apesar de mostrarem intensidades diferentes) a esta altura por questão de tempo e custos só se usaram as CEsq-B e a CEsq-D.

A caspase-3, como referido anteriormente, é uma proteína pertencente à família das caspases, que consistem em proteases que clivam proteínas intracelulares específicas, com o intuito de destruir a célula. As caspases existem em todas as células animais nucleadas, sob a forma inativa. As caspases iniciadoras são ativadas após contato com complexos iniciadores. Após a ativação, estas caspases vão clivar e, consequentemente, ativar caspases executoras seguintes na via, que por sua vez ativam outras proteínas-alvo na célula (Figura 3.16), dando origem a uma cascata proteolítica irreversível, resultando na morte celular (Li *et al.*, 1997). Sendo que o anticorpo utilizado nesta técnica apenas se liga à caspase-3 clivada, podemos afirmar que toda a caspase-3 detetada neste ensaio está ativa, o que sugere que está a decorrer a cascata proteolítica, indicadora de apoptose.

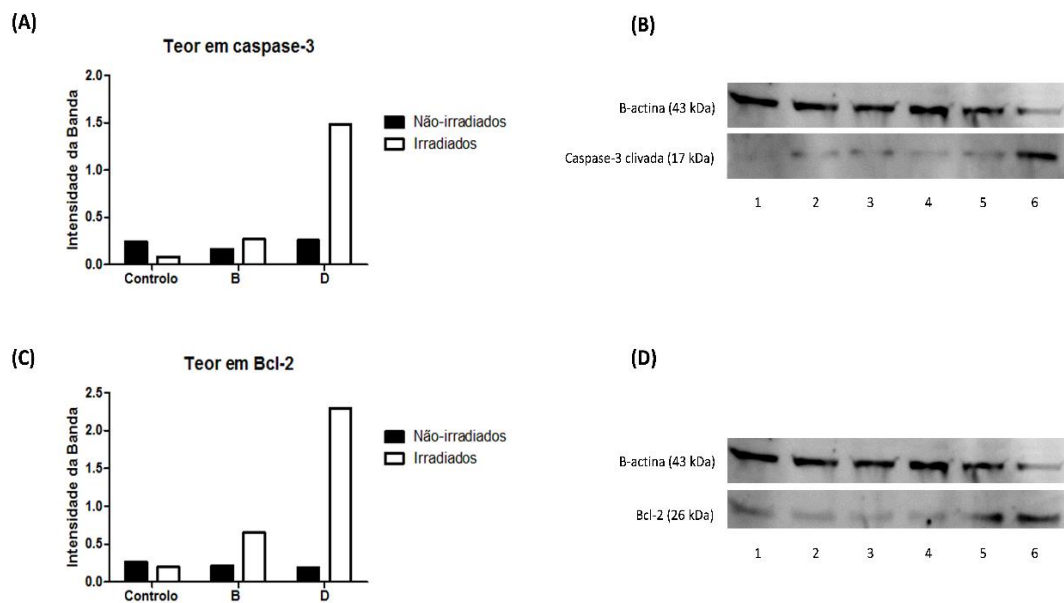


Figura 3.15. Expressão de proteínas da apoptose em células HaCaT para 1 hora de exposição a CESq-B e CESq-D. **Legenda:** **A)** Intensidade da expressão da caspase-3 clivada, normalizada com a β -actina, para as cianinas testadas. **B)** Bandas de caspase-3 clivada e β -actina, observadas após revelação da membrana de *Western blot*. **C)** Intensidade da expressão de Bcl-2, normalizada com a β -actina, para as cianinas testadas. **D)** Bandas de Bcl-2 e β -actina, observadas após revelação da membrana de *Western blot*. 1 – Controlo não irradiado. 2 – CESq-B não irradiada. 3 – CESq-D não irradiada. 4 – Controlo irradiado. 5 – CESq-B irradiado. 6 – CESq-D irradiado.

Com base na figura 3.15A, podemos verificar que a expressão de caspase-3 clivada aumenta quando existe a irradiação dos corantes, sendo maior esta expressão nas células expostas a CESq-D, relativamente às expostas a CESq-B.

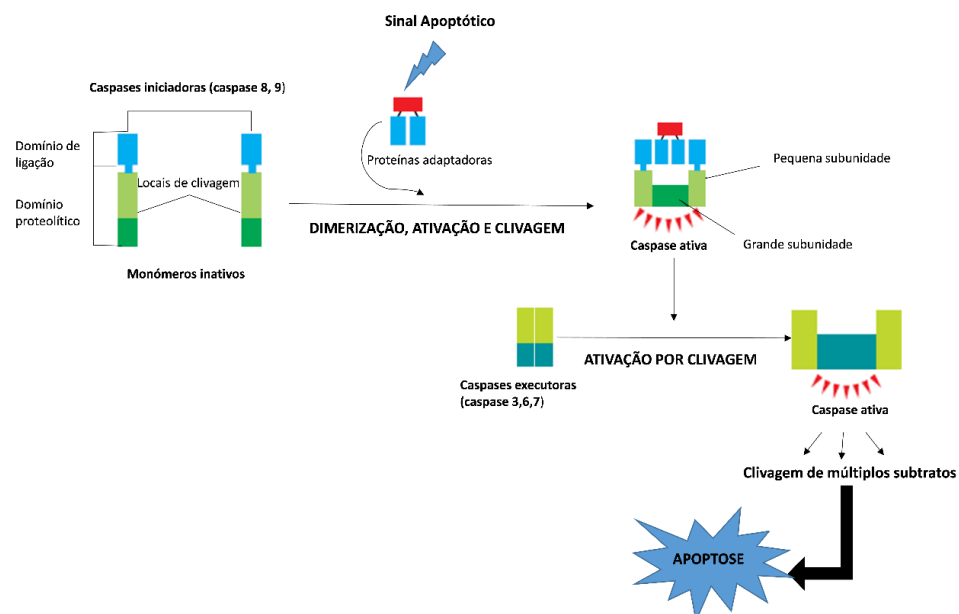


Figura 3.16. Clivagem e ativação de caspases (adaptado de Alberts *et al.*, 2015).

A Bcl-2 é uma proteína da família proteica com o mesmo nome, Bcl-2, que é responsável pela regulação da via intrínseca da apoptose. Esta família de proteínas regula esta via apoptótica, essencialmente, através do controlo da libertação de citocromo c e outras proteínas mitocondriais (intramembranares) para o citoplasma.

Algumas proteínas desta família são pró-apoptóticas (e.g. a Bax, a Bad e a Bid); outras são anti-apoptóticas (e.g. Bcl-2) e permitem ou bloqueiam a libertação das proteínas pela mitocôndria, respetivamente. As proteínas pró- e anti-apoptóticas podem ligar-se umas às outras, em várias combinações, formando heterodímeros que se inibem entre si. O balanço entre as atividades destas duas classes funcionais de proteínas Bcl-2 influencia diretamente se a célula morre ou sobrevive pela via intrínseca da apoptose (Fulda & Debatin, 2006)

Assim, a Bcl-2 anti-apoptótica atua, principalmente, ligando-se e inibindo as proteínas pró-apoptóticas da mesma família, como a Bak, impedindo que esta se oligomerize e, conseqüentemente, que haja libertação de citocromo c e das restantes proteínas mitocondriais (Murphy *et al.*, 2000). Esta proteína, assim como a caspase-3 clivada, aumentam com a irradiação (Figura 3.16). Já a Bax (proteína pró-apoptótica pertencente à família Bcl-2) não foi expressa à 1 h de exposição, sugerindo que a concentração de Bcl-2 produzida pelas células foi suficiente para inibir a expressão da Bax, impedindo que ocorresse apoptose pela via intrínseca.

Apesar da PDT, na maior parte dos casos, provoca morte celular através da via intrínseca da apoptose, foi descrito que também pode desencadear a via extrínseca, sendo o fator decisivo a sub-localização dos FS's na célula (Ortel *et al.*, 2009). A proteína anti-apoptótica Bcl-2 demonstrou ter um efeito muito protetor, em relação à apoptose induzida pela PDT, pelo que a utilização de antagonistas da Bcl-2 associados ao tratamento fotodinâmico mostrou aumentar a eficiência da indução da apoptose. Quando a PDT envolve a mitocôndria e o retículo endoplasmático, esta proteína anti-apoptótica é particularmente sensível ao dano fotodinâmico (He *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 2008), como foi observado em Bcl-2 e Bcl-xL, em várias linhas celulares humanas de cancro, quando tratadas com o FS PC 4 (do inglês, *phthalocyanine 4*), que se liga preferencialmente à mitocôndria e retículo endoplasmático. Um análogo deste FS, que se localiza nos lisossomas, causou danos inferiores na Bcl-2 nas células MCF-7c3, verificando-se o aumento dos níveis desta proteína (Yoo & Ha, 2012).

A proteína Bcl-2 apenas está envolvida na via intrínseca da apoptose, sendo que a caspase-3 pode estar envolvida tanto na intrínseca como na extrínseca. Assim, enquanto

a via intrínseca está a ser suprimida pela Bcl-2, poderá estar a ocorrer apoptose pela via extrínseca, através de uma cascata proteolítica. Para melhor comprovarmos esta afirmação, seriam necessários ensaios complementares, como por exemplo a medição da expressão da caspase-8, da proteína Bid (conhecida por ligar a via extrínseca e a via intrínseca da apoptose) e o estudo dos recetores de morte. De referir que as células podem morrer por outros processos de morte, como a necrose e a autofagia, processos estes que, não foram estudados, no âmbito desta dissertação de mestrado.

3.4.4.2. Após 24 horas de exposição

Na figura 3.17, está representada a expressão das proteínas da apoptose, marcadas, por *Western blot*, após 24 horas de exposição de células HaCaT às CEsq-B e D.

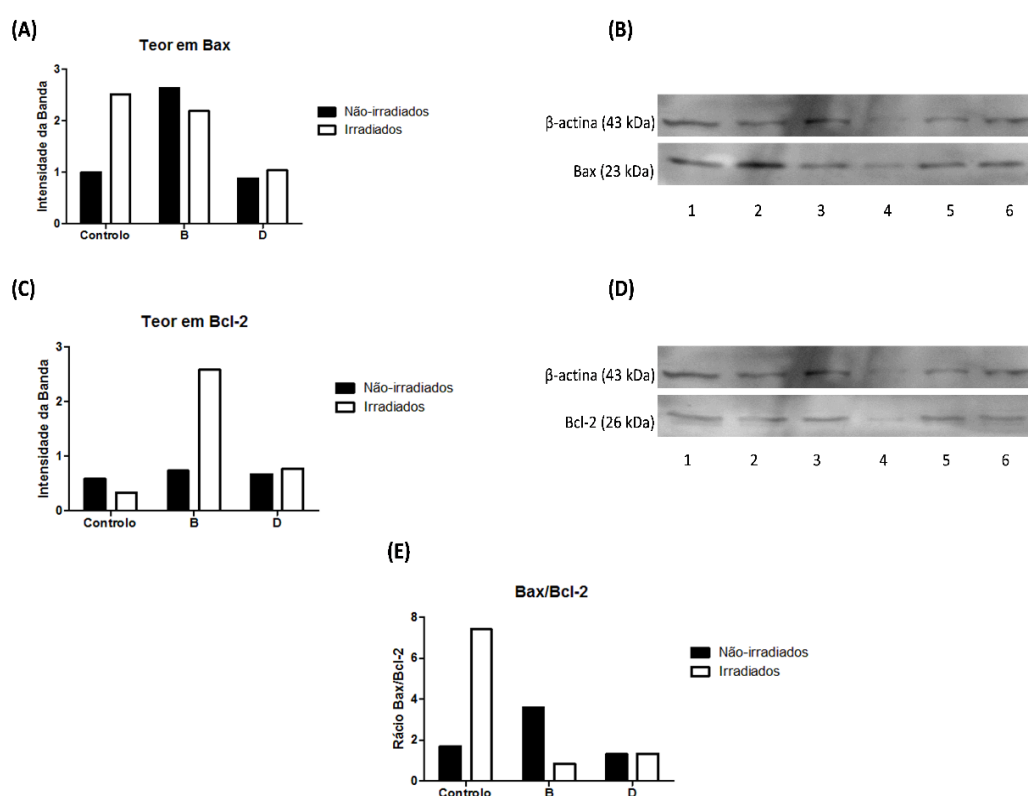


Figura 3.17. Expressão de proteínas da apoptose para 24 horas de exposição de CEsq-B e CEsq-D em células HaCaT. **Legenda:** **A)** Esquematização gráfica da intensidade da expressão de Bax, normalizada com a β-actina, para as cianinas testadas. **B)** Bandas de Bax e β-actina, observadas após revelação da membrana de *Western blot*. **C)** Esquematização gráfica da intensidade da expressão de Bcl-2, normalizada com a β-actina, para as cianinas testadas. **D)** Bandas de Bcl-2 e β-actina, observadas após revelação da membrana de *Western blot*. **E)** Rácio Bax/Bcl-2 apresentado pelas células controlo e pelas células tratadas com as cianinas. **1** – Controlo não irradiado. **2** – CEsq-B não irradiada. **3** – CEsq-D não irradiada. **4** – Controlo irradiado. **5** – CEsq-B irradiado. **6** – CEsq-D irradiado.

Às 24 horas de exposição apenas foi visível por *Western blot* a expressão da proteína Bax e da Bcl-2, ambas da família Bcl-2. A Bax é uma proteína pró-apoptótica, que permite a permeabilização da membrana externa mitocondrial e, consequentemente, a libertação de citocromo c e outras proteínas para o citoplasma (Murphy *et al.*, 2000). E, como já referido no ponto anterior, a Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica, que funciona inibindo a Bax e outras proteínas pró-apoptóticas (Fulda & Debatin, 2006)

Podemos ver que a Bax aumenta no ensaio controlo quando irradiado (Figura 3.17A), enquanto a Bcl-2 diminui, o que nos leva a crer que, possivelmente, a própria irradiação desencadeia uma reação nefasta na célula, ao ponto de esta entrar em apoptose. Em relação aos nossos corantes, encontramos diferentes resultados entre eles e bastante interessantes. Ao que tudo indica, houve um ligeiro decréscimo de Bax do não-irradiado para o irradiado e um crescimento acentuado de Bcl-2, o que mais uma vez, sugere que a apoptose pela via intrínseca parece estar inibida, para a CEsq-B. Assim, o mecanismo de morte provocada por esta cianina parece não ser totalmente explicado pela apoptose, uma vez que não foi detetada expressão de caspase-3 clivada mensurável neste ensaio, eventualmente ao fim deste tempo esta proteína já havia sido removida do citosol. Por isso, outro mecanismo possível seriam a necrose e/ou a autofagia. No caso da CEsq-D podemos verificar que não há praticamente diferenças entre os grupos não-irradiado e irradiado e a quantidade de Bcl-2 e Bax parece ser semelhante (constatação esta comprovada pelo rácio de Bax/Bcl-2, que é pouco maior que 1).

3.4.5. Fragmentação do DNA e condensação da cromatina

A exposição da célula a agentes que promovem a produção de ROS, induz LP, redução nos níveis de GSH e, portanto, aumenta os danos celulares que se podem traduzir em danos a nível de várias proteínas reguladoras ou no DNA, condicionando a expressão de genes, e por fim induzir a apoptose (Montjean *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2015). No sentido de verificar se a exposição das células a estas cianinas, na ausência e na presença de irradiação, produz danos no DNA, realizou-se um ensaio para avaliar o grau de fragmentação do DNA que foi conseguido recorrendo à sonda fluorescente Hoescht 33342, e a sua fluorescência foi avaliada usando a microscopia de fluorescência.

A figura 3.18 mostra imagens, obtidas em células Caco-2 expostas a CEsq-A e a CEsq-B.

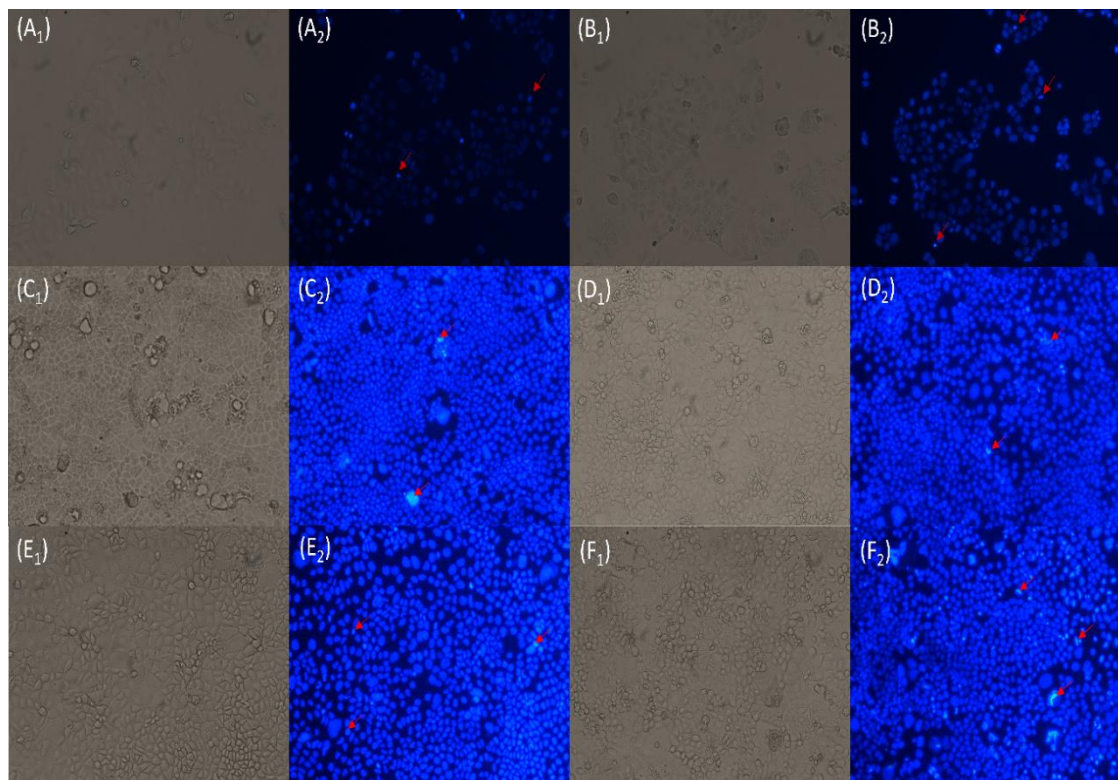


Figura 3.18. Avaliação da fragmentação de DNA em células Caco-2. Imagens representativas dos resultados obtidos em microscopia de fluorescência, para as CESq-A e CESq-B, usando a sonda Hoescht 33342, com ampliação de 200x. As setas a vermelho indicam exemplos de fragmentação do DNA. Os números 1 e 2 dizem respeito às imagens em campo-claro e às imagens no filtro DAPI, respetivamente. Legenda: A – Controlo não irradiado; B – Controlo irradiado; C – CESq-A não irradiado; D – CESq-A irradiado; E – CESq-B não irradiado; F – CESq-B irradiado.

A figura 3.19 mostra as imagens visualizadas das células expostas a CESq-C e CESq-D, por microscopia de fluorescência.

Pela visualização das figuras 3.18 e 3.19, podemos verificar que o corante que provoca uma maior fragmentação do DNA é a CESq-C. A CESq-A e a CESq-B não parecem apresentar diferenças muito grandes, relativamente ao controlo. Assim, os resultados sugerem que a família das cianinas aminoesquarílicas afetam mais profundamente o DNA, comparativamente às cianinas esquarílicas que possuem o grupo dicianometileno.

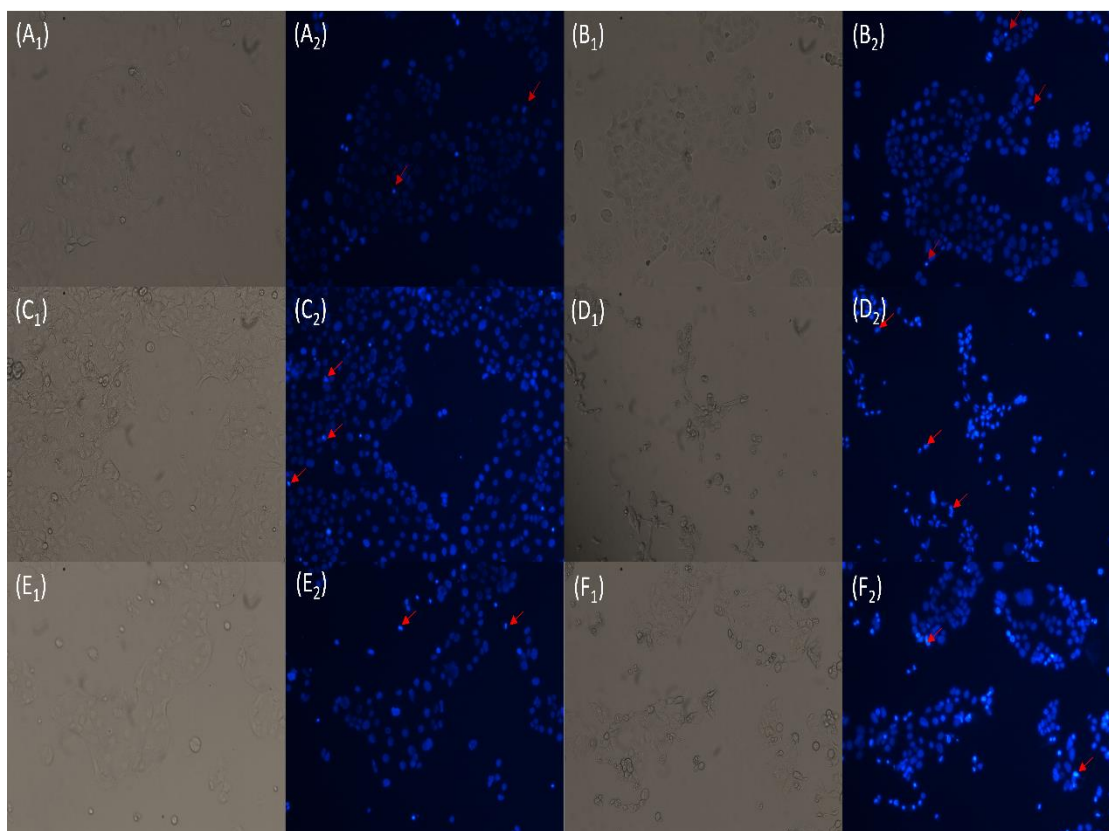


Figura 3.19. Avaliação da fragmentação de DNA em células Caco-2. Imagens representativas dos resultados obtidos em microscopia de fluorescência, para as CESq-C e CESq-D, usando a sonda Hoescht 33342, com ampliação de 200x. As setas a vermelho indicam exemplos de fragmentação do DNA. Os números 1 e 2 dizem respeito às imagens em campo-claro e às imagens no filtro DAPI, respetivamente. Legenda: A – Controlo não irradiado; B – Controlo irradiado; C – CESq-C não irradiado; D – CESq-C irradiado; E – CESq-D não irradiado; F – CESq-D irradiado.

Nas células HaCaT foram apenas usadas as CESq-A e a CESq-B pois, devido a problemas ocorrentes durante a preparação deste ensaio não nos foi possível realizar este ensaio para as restantes cianinas, e desde então até à data o microscópio de fluorescência ainda não foi reparado. Na figura 3.20 estão então apresentadas as imagens obtidas para estas duas cianinas.

Com base nas imagens de fluorescência em células HaCaT (figura 3.20), podemos verificar que ambas as cianinas apresentam pouco mais fragmentação, relativamente ao controlo, destacando-se mais a CESq-B ($18,77 \pm 4,40$ %) (ver figura 3.22).

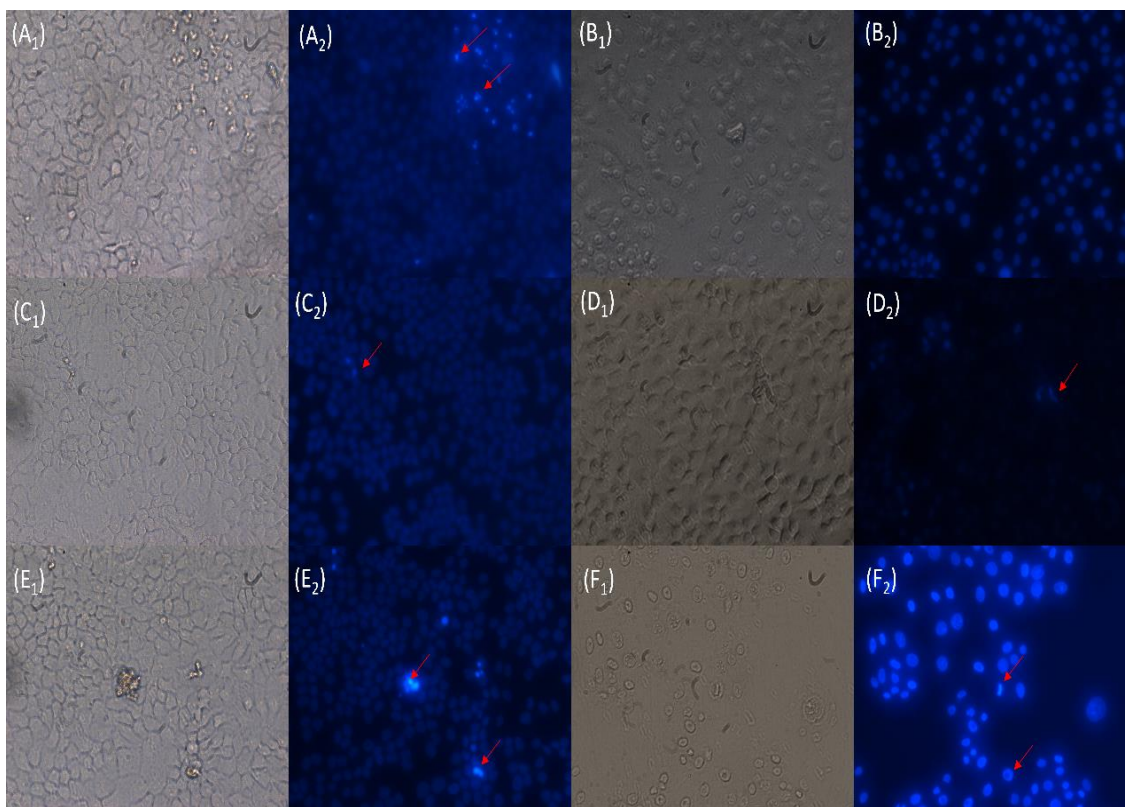


Figura 3.20. Avaliação da fragmentação de DNA em células HaCaT. Imagens representativas dos resultados obtidos em microscopia de fluorescência, para as CESq-A e CESq-B, usando a sonda Hoescht 33342, com ampliação de 200x. As setas a vermelho indicam exemplos de fragmentação do DNA. Os números 1 e 2 dizem respeito às imagens em campo-claro e às imagens no filtro DAPI, respetivamente.
Legenda: A – Controlo não irradiado; B – Controlo irradiado; C – CESq-A não irradiado; D – CESq-A irradiado; E – CESq-B não irradiado; F – CESq-B irradiado.

Em cada ensaio, várias fotos foram retiradas de campos diferentes de forma a realizar uma amostragem estatística da percentagem de núcleos fragmentados por condição, relativamente ao total de células. Na figura 3.21, encontram-se os resultados que representam a percentagem de células que apresentam notoriamente fragmentação de DNA, em células Caco-2.

Os resultados mostrados na Figura 3.21 comprovam as conclusões que foram possíveis de retirar das imagens de fluorescência (Figura 3.18 e 3.19). A CESq-C e a CESq-D são as que mais provocam fragmentação de DNA em células Caco-2, sendo essa fragmentação mais acentuada para a CESq-C ($80,37 \pm 9,56 \%$), o que poderá sugerir que o fator que explica esta diferença entre as CESq-C e D é, mais uma vez, a diferença estrutural que existem entre elas.

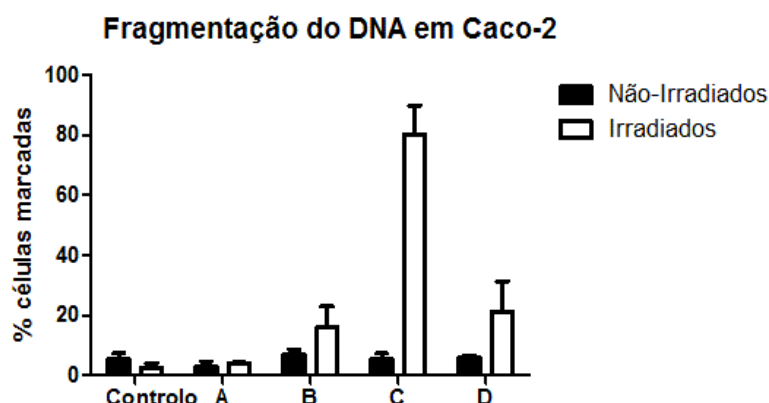


Figura 3.21. Percentagem de células Caco-2 marcadas positivamente para fragmentação de DNA. Dados resultantes da análise de imagens idênticas às apresentadas nas figuras 3.18 e 3.19.

Na figura 3.22, encontram-se os resultados que representam a percentagem de células que apresentam fragmentação de DNA, em células HaCaT.

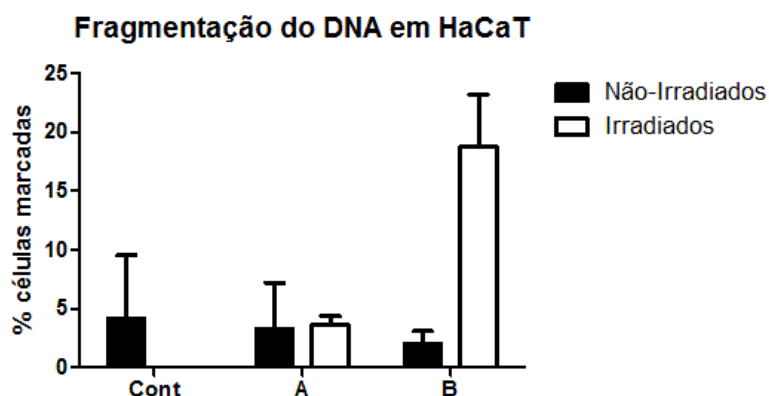


Figura 3.22. Percentagem de células HaCaT marcadas positivamente para fragmentação de DNA. Dados resultantes da análise de imagens idênticas às apresentadas na figura 3.20.

3.4.6. Avaliação da expressão de AIF em células HaCaT

Nos ensaios feitos para a fragmentação de DNA, foi possível notar que algumas das cianinas testados tinham a capacidade de induzir fragmentação do DNA. A fragmentação do DNA está muitas vezes ligada à expressão da AIF, que após ser libertado migra para o núcleo induzindo a fragmentação do DNA. Contudo, após várias tentativas, não foi possível detetar esta proteína pela técnica de *Western blot*. Assim, procedeu-se à sua deteção pela técnica de imunocitoquímica.

A AIF é uma flavoproteína que, aquando a permeabilização da membrana externa mitocondrial, ocorrente nos processos iniciais da apoptose, é translocada para o núcleo e induz a condensação da cromatina periférica com fragmentação de DNA de alto peso molecular, de um modo independente das caspases. A AIF pode ser ativada por diversos fatores: stresse oxidativo, níveis irregulares de cálcio no espaço intramembranar mitocondrial, hipóxia e isquemia, stresse ao nível do retículo endoplasmático e pela PDT (Buytaert *et al.*, 2007; Yoo & Ha, 2012).

Após o tratamento adequado das células, com as cianinas, procedeu-se à imunomarcação do AIF (ver métodos, secção 2.4.5.2), e antes de selar as lâminas com o meio de montagem, as células foram marcadas também com Hoescht para poder correlacionar os resultados da imunomarcação com a fragmentação do DNA.

Na figura 3.23 mostram-se imagens obtidas por microscopia de fluorescência, comparando as imagens visualizadas no filtro DAPI (com a sonda Hoescht) e no filtro FITC (AIF). As imagens apresentadas são apenas para a 1 hora de exposição. Às 24 h de exposição não foi possível detetar AIF, provavelmente por o AIF ser transitório e só ocorre no início do processo, logo após a irradiação.

Foi possível observar que a fragmentação de DNA, marcada pela Hoescht, é normalmente acompanhada pelo aumento de expressão de AIF. Neste ensaio, a cianina que induziu a maior expressão celular de AIF no citoplasma e à volta do núcleo parece ser a CEsq-A, apesar de este corante ser o que menos revelou fragmentação de DNA nos ensaios feitos anteriormente (secção 3.4.5). Eventualmente, esta cianina produz um mecanismo mais lento de indução do AIF. Para as outras cianinas, observa-se que a fluorescência do AIF é mais difusa e parece também já esta concentrada no núcleo, daí que com estas se observe maior fragmentação.

As cianinas que mais induziram fragmentação do DNA apresentam menos expressão do AIF. Outro fator que também pode justificar estes resultados é o facto que, apesar da fragmentação do DNA ser uma consequência da expressão do AIF, pode ocorrer devido a outros fatores. Jänicke e colaboradores (1998) sugerem que a caspase-3 é necessária para ocorrer fragmentação do DNA pois esta liga-se ao inibidor da DNase ativada por caspases (iCAD, do inglês *Caspase-activated DNase inhibitor*), promovendo a separação entre este e a DNase ativada por caspases (CAD, do inglês *Caspase-activated DNase*), e consequentemente, a translocação da CAD para o núcleo, o que provoca a fragmentação do DNA (Jänicke *et al.*, 1998). Foi sugerido também que a PDT não só pode ativar processos dependentes de caspases como também processos independentes,

quando as caspases são inexistentes, ou ambos simultaneamente (figura 3.24). Contudo, estes mecanismos não coincidem com todos os tipos de células nem com todas as condições de PDT, sugerindo que estes mecanismos estão dependentes de múltiplos fatores (Yoo & Ha, 2012).

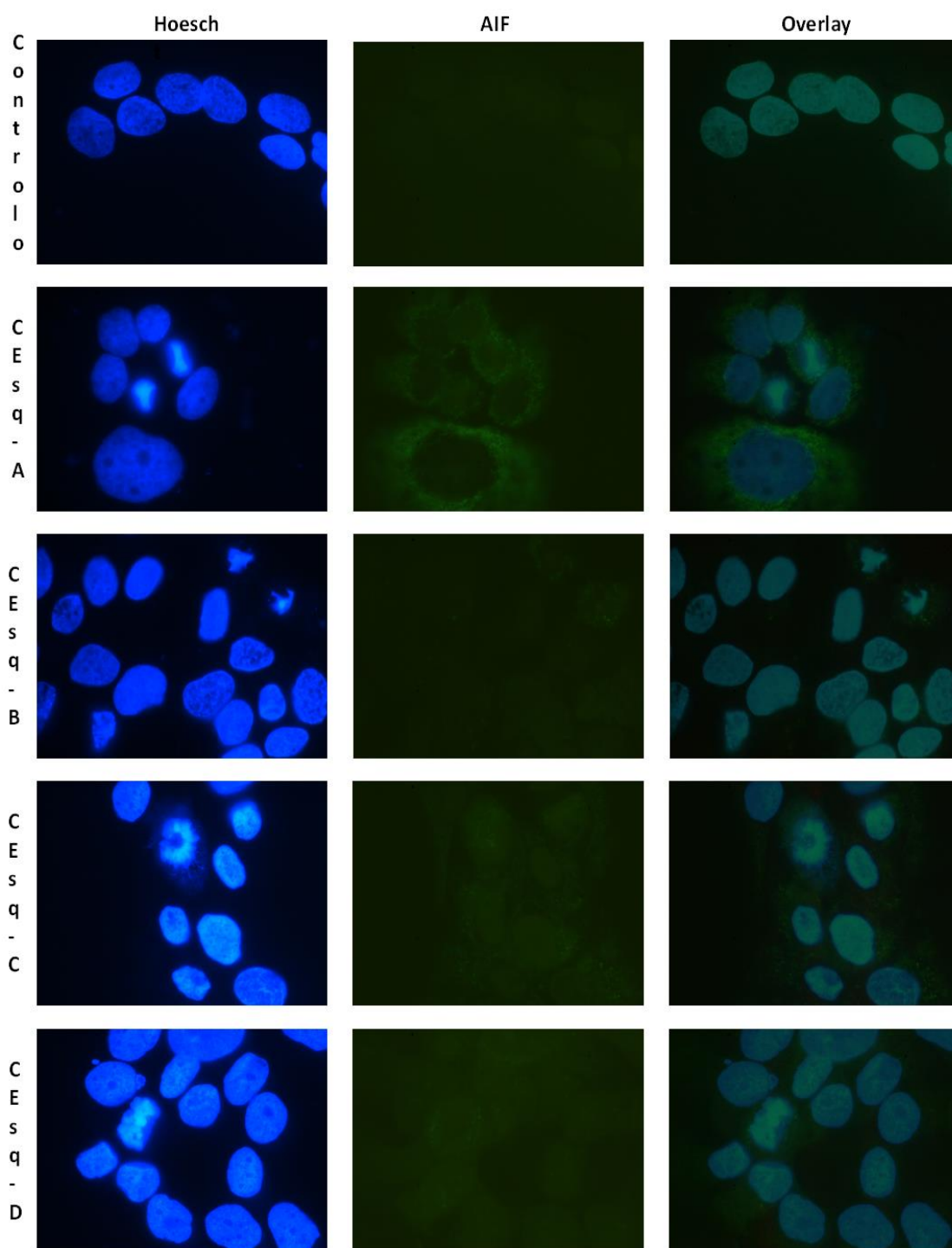


Figura 3.23. Comparação da fragmentação de DNA observada pela sonda Hoescht, com a expressão do AIF, para a PDT com as cianinas em estudo, em células HaCaT, após 1h de exposição. As imagens obtidas têm ampliação de 1000x.

No nosso caso particular, não podemos estabelecer uma correlação direta entre os mecanismos dependentes de caspases e os independentes. Para isso seria necessário verificar a existência de CAD ativado e verificar a sua translocação para o núcleo, de forma a provocar a fragmentação do DNA. No entanto, estes dois mecanismos podem estar a ocorrer em simultâneo, explicando o porquê das cianinas que mais provocam a fragmentação do DNA apresentarem uma expressão reduzida de AIF, comparativamente à CEsq-A, que foi a que evidenciou menos fragmentação.

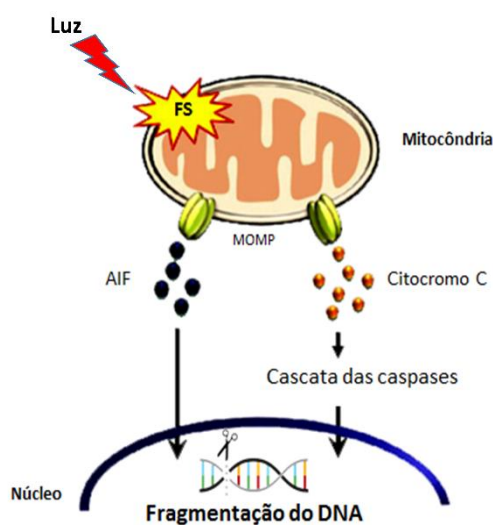


Figura 3.24. Mecanismos que levam à fragmentação do DNA (adaptado de Yoo & Ha, 2012)

Capítulo IV

Conclusões e Perspetivas Futuras

4.1. Conclusões

As cianinas esquarílicas utilizadas foram sintetizadas previamente com o objetivo de avaliar o seu potencial como FSs. Para esse fim, foram usadas as linhas Caco-2 (tumoral) e HaCaT (não-tumoral). Assim, avaliou-se os mecanismos de toxicidade provocada pelas cianinas nestas duas linhas celulares, a capacidade de internalização nas células e os mecanismos de morte que as cianinas desencadeiam de modo a levar a cabo o efeito terapêutico pretendido.

Verificou-se que os corantes em solução (DMSO) não sofrem degradação (ou degradação significativa), mantendo-se inalterado o seu espectro UV-Vis, e a concentração, com o tempo. Foi observada uma diferença, na CEsq-D, onde o máximo de absorção agora registado se encontra próximo de 660 nm e não de 621 nm, como inicialmente reportado.

Quando avaliada a citotoxicidade das cianinas em células Caco-2 e HaCaT, observou-se, no geral, que quando ativadas pela luz, as cianinas aumentavam a sua capacidade citotóxica, relativamente à condição de não ativação pela luz. Observou-se que a redução de viabilidade é dependente do tempo de irradiação e do tempo de exposição das células às cianinas (irradiados ou não irradiados). As quatro cianinas, foram organizadas em duas famílias, as que possuem o grupo dicianometileno (CEsq-A e CEsq-B) e as aminoesquarílicas (CEsq-C e CEsq-D), tendo os resultados sido comparados separadamente. Assim, para a família que possuiu o grupo dicianometileno foi possível concluir que:

i) No escuro, as cianinas praticamente não desenvolvem citotoxicidade, para ambas as linhas celulares. Contudo, notou-se uma ligeira diminuição de viabilidade das células HaCaT, quando estas foram expostas a 5,0 μ M de CEsq-B (a concentração mais elevada);

ii) Após a ativação pela luz, a CEsq-B foi a que mais reduziu a viabilidade, tanto em células Caco-2 como em HaCaT, evidenciado pelos menores valores de IC₅₀ (comparando com a CEsq-A). A diferença de efeito citotóxico entre as duas cianinas desta família pode ser explicada pelas diferenças estruturais entre ambas, que reside apenas num átomo de selénio;

iii) A redução de viabilidade provocada por ambas as cianinas é maior em células HaCaT do que em células Caco-2.

Para a família das aminoesquarílicas, verificou-se que:

i) No escuro, apenas se registou citotoxicidade em células HaCaT, quando tratadas com a CEsq-C;

ii) Em células Caco-2, a CEsq-C apenas reduziu a viabilidade celular para valores inferiores a 50% do controlo, quando irradiada durante 7 minutos e após 24 horas em contacto com as células. Nesta condição obteve-se um valor de IC_{50} de $1,64 \pm 0,07 \mu M$. Quando irradiadas durante 14 minutos, o IC_{50} obtido logo após 1 hora de exposição, foi de $2,10 \pm 0,06 \mu M$;

iii) Comparando entre as duas cianinas, a CEsq-C foi a que produziu menor IC_{50} em células HaCaT, em todas as condições estudadas, revelando uma maior toxicidade, quando comparada com a CEsq-D;

iv) A redução de viabilidade provocada pela CEsq-C é maior em células HaCaT do que em células Caco-2.

Quanto à internalização das cianinas, foi verificado que a retenção das cianinas em células HaCaT foi a seguinte: $CEsq-B > CEsq-A > CEsq-C > CEsq-D$. Apesar de se ficar a conhecer a afinidade das cianinas para as membranas celulares e a capacidade retenção nas células, o modo da internalização e transporte das cianinas, bem como as suas sub-localizações nas células, não foi aqui estudado ou evidenciado.

Foi observado que apenas as CEsq-B e CEsq-C produziram um aumento significativo de ROS entre os ensaios não irradiados e irradiados, enquanto as outras cianinas não produziram diferenças significativas.

Verificou-se que nas células controlo e nas expostas a CEsq-A e CEsq-C não houve diferenças significativas na PL entre os ensaios não irradiados e os sujeitos a uma radiação. Para as CEsq-B e D verificou-se aumento da PL pela exposição das células às cianinas, e que foi muito aumentada quando estas são ativadas pela luz. Apesar da CEsq-D ser a que menos provocou a produção de ROS, quando irradiada, é a que apresenta maior PL, o que pode ser devido ao facto desta cianina, ao contrário das CEsq-A e C, atuar essencialmente na membrana plasmática. Outro fator que corrobora esta hipótese é que esta cianina foi a que menos se encontrava retida no interior das células, como se verificou no ensaio da acumulação celular, podendo estar retida na membrana.

Quando avaliado o conteúdo intracelular em GSH, verificou-se que houve um aumento nos controlos e nas células expostas a CEsq-A após irradiação, o que pode revelar um meio de proteção por parte da célula no combate da produção de ROS provocada pela irradiação. Houve um decréscimo do conteúdo em GSH nas células tratadas com as cianinas CEsq-B e D.

Foi avaliada a expressão de proteínas envolvidas nas vias da apoptose, onde foi verificado que após 1 hora de exposição das células HaCaT às CEsq-B e D, irradiadas (7 minutos), houve um aumento da expressão de caspase-3 clivada e de Bcl-2, sendo esse aumento maior nas células tratadas com CEsq-D. A proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) apenas está envolvida na via intrínseca da apoptose, sendo que a caspase-3 pode estar envolvida tanto na via intrínseca como na via extrínseca. Assim, enquanto a via intrínseca está a ser suprimida pela Bcl-2, poderá estar a ocorrer apoptose pela via extrínseca, através de uma cascata proteolítica. Para melhor comprovarmos esta afirmação, seriam necessários ensaios complementares.

Já no caso das 24 horas de exposição, observou-se um aumento de Bax (proteína pró-apoptótica da via intrínseca) no controlo irradiado, simultaneamente à diminuição de Bcl-2, evidenciando uma reação nefasta na célula, causada apenas pela irradiação. Houve um ligeiro decréscimo de Bax do não-irradiado para o irradiado e um aumento acentuado de Bcl-2, o que mais uma vez, sugere que a apoptose pela via intrínseca parece estar inibida, em células tratadas com CEsq-B. Assim, o mecanismo de morte provocada por esta cianina parece não ser totalmente explicado pela apoptose, uma vez que não foi detetada expressão de caspase-3 clivada mensurável neste ensaio, eventualmente ao fim deste tempo esta proteína já havia sido removida do citosol. Por isso, outros mecanismos possíveis seriam a necrose e/ou a autofagia, mecanismos esses não estudados neste trabalho. No caso da CEsq-D podemos verificar que não houve praticamente diferenças entre os grupos não-irradiado e irradiado e que a quantidade de Bcl-2 e Bax parece ser semelhante.

No geral as cianinas promovem a fragmentação do DNA das células Caco-2 e das HaCaT, em ensaios de 24 h de exposição às cianinas irradiadas.

i) Nas células Caco-2 verificou-se haver diferenças na capacidade destas cianinas em promover a fragmentação, sendo na condição irradiada, a seguinte sequência: CEsq-C > CEsq-D > CEsq-B > CEsq-A. Na condição não irradiada verificou-se que a CEsq-D > outras (~iguais entre si).

ii) Nas células HaCaT, verificou-se a seguinte sequência: CEsq-B > CEsq-A, com intensidades idênticas às observadas nas células Caco-2.

Quando avaliada a expressão de AIF (imunocitoquímica), a qual está envolvida com a fragmentação de DNA, foi observado que a cianina que, com o mesmo tempo de exposição, induz mais expressão desta proteína foi a CEsq-A, a qual foi a que menos fragmentação de DNA induziu. A CEsq-B, a CEsq-C e a CEsq-D foram as que mais

provocaram fragmentação do DNA, porém são as que, neste ensaio, menos expressaram AIF, sugerindo que eventualmente os mecanismos induzidos por estas cianinas têm escalas temporais diferentes. Contudo, outros fatores podem estar a provocar a fragmentação do DNA, como a interação iCad/caspase-3 ou, possivelmente, tanto a expressão de AIF como a translocação de CAD para o núcleo podem estar a ocorrer em simultâneo. Porém, seriam necessários mais ensaios para a comprovação deste facto.

4.2. Perspetivas Futuras

As cianinas esquarílicas demonstraram ser um grupo de compostos com grande potencial para o uso em PDT. Em especial, as cianinas estudadas nesta dissertação, apesar de ainda não serem ideais (e tendo em conta que até aos dias de hoje, não surgiu nenhum que o fosse), muitos mecanismos continuam por elucidar, mecanismos esses que poderão, quiçá, despertar o interesse do seu uso pela indústria farmacêutica.

Dentro dos ensaios que poderão ser feitos com o objetivo de aumentar o conhecimento acerca destas cianinas, estão, por exemplo:

- Fazer ensaios de citotoxicidade em mais linhas celulares, de modo a ficar a conhecer quais os tecidos onde estas cianinas atuam melhor;
- Realizar testes de sub-localização, de modo a conhecer melhor os mecanismos de ação das cianinas e para melhor desvendar as interações que estas podem sofrer com determinados organelos;
- Avaliação mais pormenorizadamente as vias da apoptose, como a expressão e libertação de citocromo c, a expressão de p53 e CAD, medição do potencial de membrana mitocondrial externa, medição das quantidades de Ca^{2+} , atividade dos recetores de morte, entre outros;
- Avaliar outras formas de morte celular, como a necrose e a autofagia;
- Quantificar algumas enzimas do stresse oxidativo, como a superóxido dismutase (SOD), GST, catálase (CAT), entre outras;
- Estudar os mecanismos de depuração das cianinas, após a ação fototerapêutica.

Referências Bibliográficas

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A.W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* 6th Edition. Garland, United States of America. ISBN 978-0-8153-4432-2

Alex, S., Basheer, M. C., Arun, K. T., Ramaiah, D., & Das, S. (2007). Aggregation properties of heavy atom substituted squaraine dyes: Evidence for the formation of J-type dimer aggregates in aprotic solvents. *Journal of Physical Chemistry A*, 111(17), 3226–3230.

Allen, C. M., Sharman, W. M., & Van Lier, J. E. (2001). Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5(2), 161–169.

Allison, R. R. (2014). Photodynamic therapy: oncologic horizons. *Future Oncology (London, England)*, 10(1), 123–142.

Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X.-H., Childs, C. J., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 27–42.

Ananda Rao, B., Kim, H., & Son, Y. A. (2013). Synthesis of near-infrared absorbing pyrylium-squaraine dye for selective detection of Hg^{2+} . *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 188, 847–856.

Andreani, T., Kiill, C. P., Souza, A. L. R., Fanguero, J. F., Fernandes, L., Doktorovová, S., Santos, D. L., Garcia, M. L., Gremião, M. P. D., Souto, E. B., Silva, A. M. (2014). Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: Characterization and cell toxicity studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 916–923.

Arun, K. T., Jayaram, D. T., Avirah, R. R., & Ramaiah, D. (2011). β -Cyclodextrin as a Photosensitizer Carrier: Effect on Photophysical Properties and Chemical Reactivity of Squaraine Dyes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(21), 7122–7128.

Auler, H., & Banzer G. (1942). Untersuchungen ueber die rolle der porphyrine bei geschwulstkranken menschen und tieren. *Zeitschrift Fur Krebsforschung*, 53, 65–68.

Avirah, R. R., Jayaram, D. T., Adarsh, N., & Ramaiah, D. (2012). Squaraine dyes in PDT: from basic design to in vivo demonstration. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10(5), 911–920.

Avirah, R. R., Jyothish, K., & Ramaiah, D. (2008). Infrared Absorbing Croconaine Dyes: Synthesis and Metal Ion Binding Properties. *The Journal of Organic Chemistry*, 73(1), 274–279.

Avirah, R. R., & Ramaiah, D. (2010). Synthesis and Study of Photophysical and Metal Ion Binding Properties of a Few Novel Semisquaraine and Croconaine Dyes. National Institute for Interdisciplinary Science & Technology. pp.170.

Bastos, Boechat, Gomes, A. T. P. C., Neves, M. G. P. M. S., & Cavaleiro, J. A. S. (2012). O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. *Revista Virtual de Química*, 4(3), 257–267.

Bhattacharjee, S., van Opstal, E. J., Alink, G. M., Marcelis, A. T. M., Zuilhof, H., & Rietjens, I. M. C. M. (2013). Surface charge-specific interactions between polymer nanoparticles and ABC transporters in Caco-2 cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(6), 1-14.

Ben-Hur, E., & Rosenthal, I. (1985). The phthalocyanines: a new class of mammalian cells photosensitizers with a potential for cancer phototherapy. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, 47(2), 145–147.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761–771.

Buytaert, E., Dewaele, M., & Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1776(1), 86–107.

Calin, M. A. & Parasca, S. V. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 8(3), 1173–1179.

Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., & Sala, R. (2007). Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 21(3), 293–302.

Cândido, M. (2014). Fotossensibilizadores para terapia e imagem em oncologia. Tese de Doutorado em Ciências da Saúde, Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal. pp. 264.

Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 279–293.

Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, 1-23.

Da Hora Machado, A. E. (2000). Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial De Aplicação E Perspectivas. *Química Nova*, 23(2), 237–243.

Da Silva, E., & Dos Santos, E. (2009). Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. *Revista Brasileira Farmacologia*, 90(3), 211–217.

De Luna, N., Gallardo, E., Soriano, M., Dominguez-Perles, R., De La Torre, C., Rojas-García, R., García-Vergudo, J. M., Illa, I. (2006). Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation “in vitro.” *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17092–17098.

Delaey, E., Van Laar, F., De Vos, D., Kamuhabwa, A., Jacobs, P., & De Witte, P. (2000). A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 55(1), 27–36.

Detty, M. R., Gibson, S. L., & Wagner, S. J. (2004). Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(16), 3897–3915.

Doktorovová, S., Santos, D. L., Costa, I., Andreani, T., Souto, E. B., & Silva, A. M. (2014). Cationic solid lipid nanoparticles interfere with the activity of antioxidant enzymes in hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1–2), 18–27.

Dolmans, D., Fukumura, D., & Jain, R. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 380-387.

Domínguez-Perles, R., Guedes, A., Queiroz, M., Silva, A. M., & Barros, A. I. R. N. A. (2016). Oxidative stress prevention and anti-apoptosis activity of grape (*Vitis vinifera* L.) stems in human keratinocytes. *Food Research International*, 87, 92–102.

Dougherty T., Gomer C., Henderson B., Jori G., Kessel D., Korbélik M., Moan J., P. Q. P. therapy. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889–905.

Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., & Mittleman, A. (1978). Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Research*, 38(8), 2628–2635.

du Plessis, L., Laubscher, P., Jooste, J., du Plessis, J., Franken, A., van Aarde, N., & Eloff, F. (2010). Flow cytometric analysis of the oxidative status in human peripheral blood mononuclear cells of workers exposed to welding fumes. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 7(6), 367–374.

Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2009). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, 594, 57–72.

Gold, M. H. (2011). Photodynamic Therapy in Dermatology. Springer New York ISBN 978-1-4419-1297-8.

Hans-Jürgen Rode. (2008). Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. *Roche Brochure, Roche Diagnostics GmbH*, 1–186.

Hausman, W. (1911) Die sensibilisierende wirkung des hamatoporphyrins. *Biochemische Zeitschrift*, 30, 276–316.

He, J., Agarwal, M. L., Larkin, H. E., Friedman, L. R., Xue, L., & Olelnick, N. L. (1996). The Induction of Partial Resistance to Photodynamic Therapy by the Protooncogene BCL-2. *Photochemistry and Photobiology*, 64(5), 845–852.

Henderson, B. W., & Dougherty, T. J. (1992). How does photodynamic therapy work?. *Photochemistry and Photobiology*, 55(1), 145–157.

Huber, P. C., Almeida, W. P., & Fátima, Â. de. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170–1179.

Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9357–9360.

Jesionek, A., Von Tappeiner, H. (1905). Behandlung der hautcarcinome mit fluoreszierenden stoffen. *Deutsches Archiv Für Klinische Medizin*, 85, 223–227.

Juarranz, Á., & Jaén, P. (2008). Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10, 148-154.

Karp, G. (2013). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, 7th Edition. Wiley, United States of America. ISBN 978-1118-20763-7

Kim, Y.-W., Bae, S. M., Liu, H.-B., Kim, I.-W., Chun, H.-J., & Ahn, W. S. (2012). Selenium enhances the efficacy of Radachlorin mediated-photodynamic therapy in TC-1 tumor development. *Oncology Reports*, 28(2), 576–584.

Lee, Y., & Baron, E. D. (2011). Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 30(4), 199–209.

Leo, A., Hansch, C., & Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*, 71(6), 525–616.

Letavayová, L., Vlcková, V., & Brozmanová, J. (2006). Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, 227(1–2), 1–14.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, 91(4), 479–489.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Hidde, P., Amon, A., & Matthew, P. S. (2008). *Molecular cell biology*, 7th Edition. William H. Freeman, New York. ISBN 978-1-4292-3413-9

MacCormack, M. A. (2008). Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 27(1), 52–62.

MacDonald, I. J., & Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5(2), 105–129.

Martins, Tiago (2016). Síntese, caracterização espectral de corantes escurilícos e avaliação da sua citotoxicidade em células Caco-2 e HepG2. *Dissertação em Mestrado em Bioquímica*, Vila Real, Portugal. pp. 1-179.

Maulik, G., Kassis, A. I., Savvides, P., & Makrigrigios, G. M. (1998). Fluoresceinated phosphoethanolamine for flow-cytometric measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(6), 645–653.

Meyer-Betz, F. (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. *Deutsches Archiv für Klinische Medizin*, 112, 476–503.

Mitton, D., & Ackroyd, R. (2008). A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 5(2), 103–111.

Montjean, D., Ménéz, Y., Benkhalifa, M., Cohen, M., Belloc, S., Cohen-Bacrie, P., & de Mouzon, J. (2010). Malonaldehyde formation and DNA fragmentation: two independent sperm decays linked to reactive oxygen species. *Zygote*, 18(3), 265–268.

Moor, A. (2000). Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 57, 1-13.

Morton, C. A., Brown, S. B., Collins, S., Ibbotson, S., Jenkinson, H., Kurwa, H., Langmack, K., McKenna, K., Moseley, H., Pearse, A. D., Stringer, M., Taylor, D. K., Wong, G., & Rhodes, L. E. (2002). Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *The British Journal of Dermatology*, 146(4), 552–567.

Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G., & Hamblin, M. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3, 2516-2539.

Murphy, K. M., Ranganathan, V., Farnsworth, M. L., Kavallaris, M., & Lock, R. B. (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death and Differentiation*, 7(1), 102–111.

Naruhashi, K., Kurahashi, Y., Fujita, Y., Kawakita, E., Yamasaki, Y., Hattori, K., Nishimura, A., & Shibata, N. (2011). Comparison of the expression and function of ATP binding cassette transporters in Caco-2 and T84 cells on stimulation by selected endogenous compounds and xenobiotics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26(2), 145–153.

Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. *The Science of the Total Environment*, 400(1–3), 115–141.

Neely, W. B., Branson, D. R., & Blau, G. E. (1974). Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environmental Science & Technology*, 8(13), 1113–1115.

Ortel, B., Shea, C. R., & Calzavara-Pinton, P. (2009). Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 4157–4172.

Panigrahi, M., Dash, S., Patel, S., & Mishra, B. K. (2012). Syntheses of cyanines: a review. *Tetrahedron*, 68(3), 781–805.

Raab, O. (1900). Ueber die wirkung fluoreszierenden stoffe auf infusorien. *Zeitschrift Fur Biologie*, 39, 524-526.

Ramaiah, D., Joy, A., Chandrasekhar, N., Eldho, N. V., Das, S., & George, M. V. (1997). Halogenated Squaraine Dyes as Potential Photochemotherapeutic Agents.

Synthesis and Study of Photophysical Properties and Quantum Efficiencies of Singlet Oxygen Generation. *Photochemistry and Photobiology*, 65(5), 783–790.

Reis L.V., Serrano J.P.C., Almeida P., Santos P.F., 2002. New synthetic approach to aminosquarylium cyanines dyes, *Synlett* 10, 1617-1620.

Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1–8.

Rodger, A. (2013). Concentration Determination Using Beer-Lambert Law. In *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 360-361.

Sangster, J. (1997). Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Volume 2. Wiley Series in Solution Chemistry. John Wiley & Sons, Chichester. ISBN 978-0-471-97397-3.

Silva, A. M., Rodrigues, R. J., Tomé, Â. R., Cunha, R. A., Misler, S., Rosário, L. M., & Santos, R. M. (2008). Electrophysiological and Immunocytochemical Evidence for P2X Purinergic Receptors in Pancreatic β Cells. *Pancreas*, 36(3), 279–283.

Simplicio, F., Maionchi, F., & Hioka, N. (2002). Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, 25(5), 801-807.

Soares, J. P., Silva, A. M., Oliveira, M. M., Peixoto, F., Gaivão, I., & Mota, M. P. (2015). Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. *Age*, 37(3), 61.

Tatikolov, A.S. (2012). Polimethyne dye as a spectral-fluorescent probe for biomacromolecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(1), 55-90.

Torres E. (2010). Fotoquímica e caracterização espectroscópica de novos corantes cianínicos. *Dissertação de Mestrado em Análises Laboratoriais*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M., & Stewart, F. A. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *The Oncologist*, 11(9), 1034–1044.

USEPA (1996). Product properties test guidelines. OPPTS 830.7550: Partition coefficient (n-octanol/water), shake-flask method, 712-C-96-038. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.

Von Tappeiner, H., Jodblauer, A. (1904). Über die wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Deutsches Archiv Für Klinische Medizin*, 80, 427–487.

Xue, L., Chiu, S., Azizuddin, K., Joseph, S., & Oleinick, N. L. (2008). Protection by Bcl-2 against apoptotic but not autophagic cell death after photodynamic therapy. *Autophagy*, 4(1), 125–127.

Yoo, J. O., & Ha, K. S. (2012). New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. *International Review of Cell Death*, 295, 139–174.

Zhang, M., Liu, L., Gao, C., Sun, R., & Wang, Q. (2012). Enhancing photostability of cyanine dye of cucurbituril encapsulation. *Dyes and Pigments*, 94(2), 266-270.