

Filomena José Pereira da Silva Grilo da Silva

**Acitretina e isotretinoína: estudos mitocondriais, celulares e de citogenotoxicidade. Ação combinada com antiestrogénios, NBUVB ou PUVA**

Dissertação de Doutoramento na área de Ciências e Tecnologias da Saúde, especialidade de Bioquímica, orientada pelo Prof. Doutor José B. A. Custódio e pela Prof<sup>a</sup> Doutora Petronila Rocha-Pereira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



**Filomena José Pereira da Silva Grilo da Silva**

**Acitretina e isotretinoína: estudos mitocondriais, celulares e de  
citogenotoxicidade. Ação combinada com antiestrogénios,  
NBUVB ou PUVA**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Tecnologias da Saúde,  
especialidade de Bioquímica.

**Orientação: Professor Doutor José B. A. Custódio**

**Professora Doutora Petronila Rocha-Pereira**

Faculdade de Farmácia

Universidade de Coimbra

Coimbra, 2013





# FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (bolsa SFRH/BD/37686/2007), cofinanciado pelo Fundo Social Europeu (FSE) no âmbito do Programa Operacional Potencial Humano (POPH) do QREN.

Este estudo foi realizado sob a orientação de:

- Professor Doutor José B. A. Custódio
- Professora Doutora Petronila Rocha-Pereira
- Professora Doutora Alice Santos-Silva

E com o apoio do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia e Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Universidade de Coimbra; Laboratório de Análises Clínicas da Covilhã, SA; Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia e Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto.



## Declaração

Declara-se que fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Silva FS, Ribeiro MP, Santos MS, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Custódio JB. The antiestrogen 4-hydroxytamoxifen protects against isotretinoin-induced permeability transition and bioenergetic dysfunction of liver mitochondria: comparison with tamoxifen. *J. Bioenerg. Biomemb.* 2013; doi: 10.1007/s10863-013-9517-9. [Epub ahead of print].

Silva FS, Ribeiro MP, Santos MS, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Custódio JB. Acitretin affects bioenergetics of liver mitochondria and promotes mitochondrial permeability transition: Potential mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicology* 2013; 306: 93-100. doi: 10.1016/j.tox.2013.01.020.

Silva FS, Oliveira H, Moreiras A, Fernandes JC, Bronze-da-Rocha E, Figueiredo A, Custódio JB, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A. The *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of isotretinoin assessed by cytokinesis blocked micronucleus assay and comet assay. *Toxicol. in Vitro* 2013; 27 (2): 900-907. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.002.

Silva FS, Oliveira H, Moreiras A, Fernandes JC, Bronze-da-Rocha E, Figueiredo A, Custódio JB, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A. Cytotoxic and genotoxic effects of acitretin, alone or in combination with psoralen-ultraviolet A or narrow-band ultraviolet B-therapy in psoriatic patients. *Mutat. Res.* 2013; 753 (1): 42-47. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.12.017.





## Agradecimentos

Ao Professor Doutor José B. A. Custódio quero agradecer toda a sua orientação e toda a confiança que sempre depositou no meu trabalho. Agradeço-lhe ainda todos os conhecimentos que me transmitiu, bem como toda a disponibilidade que demonstrou, sem os quais não teria sido possível a realização desta dissertação.

À Professora Doutora Alice Santos-Silva agradeço a coorientação deste trabalho, todos os conhecimentos transmitidos, assim como todo o incentivo, empenho, e a grande disponibilidade e amizade que sempre me demonstrou.

À Professora Doutora Petronila Rocha-Pereira agradeço a coorientação desta dissertação, todos os ensinamentos transmitidos, e acima de tudo por me ter incentivado a fazer doutoramento em Coimbra, tornando todo este trabalho possível. Agradeço-lhe ainda a grande amizade demonstrada ao longo destes anos e todo o apoio laboratorial.

Ao Professor Doutor Américo Figueiredo e ao Dr. Hugo Oliveira agradeço todo o apoio clínico que deram ao longo deste trabalho, a colaboração na seleção dos doentes, assim como toda a disponibilidade prestada.

À Doutora Sancha quero agradecer a ajuda laboratorial nalgumas técnicas, a disponibilidade e a amizade que demonstrou.

À Doutora Teresa Serafim, à Doutora Vilma Sardão e ao Doutor Paulo Oliveira agradeço os ensinamentos laboratoriais, toda a disponibilidade, apoio e a grande amizade que sempre me evidenciaram.

À Doutora Susana Rocha, ao Doutor João Fernandes, ao Dr. Henrique Ferrão e à Dr<sup>a</sup> Sandra Ribeiro quero agradecer todo o companheirismo, interajuda, ensinamentos laboratoriais e a grande amizade sem os quais este trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNBC), bem como do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço todo o apoio, boa disposição e amizade que demonstraram.

## Agradecimentos

Agradeço ao Serviço de Dermatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, particularmente aos elementos da equipa de enfermagem pelo apoio concedido na colheita das amostras.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Covilhã, SA agradeço toda a colaboração prestada.

A todos os doentes agradeço pela grande disponibilidade e empenho que sempre demonstraram para participar no estudo, sem o qual parte deste trabalho não teria sido possível.

Agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (SFRH/BD/37686/2007) pelo financiamento deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia e Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto agradeço a disponibilidade da utilização dos equipamentos e das instalações.

Agradeço aos meus amigos pela força, pela amizade e compreensão.

Agradeço aos meus Avós pelos ensinamentos da vida, pelos valores transmitidos, acima de tudo pelo seu amor incondicional e por terem feito de mim aquilo que sou hoje.

E por último um agradecimento Muito Especial aos meus Pais por estarem sempre presentes com o seu enorme amor ao longo de todo este tempo.

## Resumo

A acitretina e a isotretinoína são retinoides frequentemente utilizados no tratamento de algumas doenças inflamatórias da pele, constituindo também uma estratégia promissora na quimioprevenção do cancro. A associação dos retinoides com os antiestrogénios tem vindo a ser estudada, de forma a minimizar os efeitos adversos e a aumentar a eficácia terapêutica. No entanto, os mecanismos de ação farmacológica e toxicológica destes retinoides individualmente ou em associação com os antiestrogénios permanecem por esclarecer, e pouco é conhecido acerca dos seus efeitos secundários em associações terapêuticas com a fototerapia com radiação UVB de banda estreita (NBUVB) ou com a fototerapia com radiação UVA e psoraleno (PUVA), usadas no tratamento de doenças inflamatórias da pele.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios tamoxifeno (TAM) e 4-hidroxitamoxifeno (OHTAM) em mitocôndrias de fígado de rato e em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama. Foram também avaliados os efeitos citogenotóxicos *in vitro* da acitretina e da isotretinoína, bem como os efeitos da acitretina em associação com o TAM e com o OHTAM em culturas de sangue de voluntários saudáveis. Adicionalmente, foram estudados os efeitos citogenotóxicos *in vivo* e as alterações hematológicas e bioquímicas induzidas pela acitretina e isotretinoína em monoterapia ou em associação com a NBUVB ou com a PUVA, em doentes com psoríase *vulgaris* e com acne *vulgaris*.

Os estudos em mitocôndrias demonstraram que a acitretina e a isotretinoína (5 nmoles/mg proteína) diminuíram a produção de energia e aumentaram a sensibilidade das mitocôndrias hepáticas para a permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ , como consequência da interação destes retinoides com o transportador de nucleótidos de adenina (ANT). A diminuição do conteúdo de ANT sugere que os mecanismos de apoptose e de toxicidade hepática induzidos pela acitretina e pela isotretinoína ocorrem, possivelmente, através de disfunções mitocondriais, devido a interações com o ANT.

Além disso, observámos que o TAM e o OHTAM (10 nmoles/mg proteína ou 5  $\mu\text{M}$ ) inibiram a MPT induzida pela acitretina e pela isotretinoína, o que contribui para diminuir

## Resumo

a toxicidade induzida por estes retinoides, provavelmente por impedirem as mudanças conformacionais do ANT envolvidas na indução da MPT.

Estudos em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama demonstraram que a acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) e a isotretinoína (0,5  $\mu\text{M}$ ) em associação com o TAM ou com o OHTAM (5 e 7,5  $\mu\text{M}$ ) aumentaram sinergicamente os efeitos antiproliferativos de cada composto individualmente. O efeito antiproliferativo destas associações, observado na linha celular de melanoma, não se deve a mecanismos de morte celular sendo uma consequência da paragem do ciclo celular na fase G0/G1. A associação da acitretina ou da isotretinoína com o OHTAM apresentou um maior efeito antiproliferativo do que a associação do TAM devido, provavelmente, à maior afinidade para os recetores de estrogénio (ERs).

Os estudos de genotoxicidade *in vitro* demonstraram que a acitretina e a isotretinoína (1,2 – 20  $\mu\text{M}$ ), bem como a acitretina em associação com os antiestrogénios não apresentaram efeitos genotóxicos.

Relativamente, aos estudos de genotoxicidade *in vivo*, verificou-se que as terapêuticas com acitretina (monoterapia ou em associação com a NBUVB) ou com isotretinoína (monoterapia) não induziram efeitos genotóxicos. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer o potencial genotóxico da terapêutica com acitretina + PUVA ou com isotretinoína + NBUVB.

Os estudos *in vivo* incluíram também a avaliação das alterações bioquímicas e hematológicas induzidas por estas terapêuticas em doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris*. Verificámos que a acitretina (em monoterapia ou associada com PUVA) ou a isotretinoína (em monoterapia ou associada com NBUVB), após 12 semanas de tratamento não induziram toxicidade renal. No entanto, os doentes tratados com acitretina + NBUVB, após 12 semanas, apresentaram um aumento nos níveis de creatinina, sugerindo uma possível toxicidade renal.

A terapêutica com acitretina (em monoterapia ou associada com NBUVB ou com PUVA), ou com isotretinoína (em monoterapia ou em associação com NBUVB), após 12 semanas, não induziram alterações no metabolismo da glucose. Contudo, verificou-se uma diminuição da sensibilidade à insulina, após um tratamento prolongado com acitretina (24 e 36 semanas) ou com isotretinoína (24 semanas).

Verificámos que a terapêutica com acitretina (em monoterapia ou associada com NBUVB ou PUVA) ou com isotretinoína (em monoterapia ou em associação com NBUVB), após 12 semanas, não induziram toxicidade hepática. No entanto, uma

terapêutica prolongada com acitretina (24 ou 36 semanas) ou com isotretinoína (24 semanas), induziu toxicidade hepática e disfunção muscular.

Em conclusão, este estudo sugere que a acitretina ou a isotretinoína associadas com os antiestrogénios apresentam uma potencial aplicação na quimioprevenção do melanoma e do cancro da mama, sendo a associação com o OHTAM a que tem uma maior eficácia no tratamento do melanoma. A associação com os antiestrogénios pode fornecer uma poderosa estratégia para ultrapassar a toxicidade destes retinoides, sem efeitos genotóxicos. Por outro lado, os estudos em doentes sugerem que a acitretina e a isotretinoína individualmente ou em associação com NBUVB ou PUVA não induzem alterações significativas nos biomarcadores clínicos, exceto para a função hepática, muscular e para o metabolismo da glucose.

**Palavras-chave:** Acitretina, isotretinoína, antiestrogénios, cancro, citogenotoxicidade.



## Abstract

Acitretin and isotretinoin are retinoids frequently used to treat some inflammatory skin disorders, and are also a promising strategy for cancer chemoprevention. The combination of retinoids with antiestrogens has been studied to minimize side effects and to achieve a higher efficacy. However, the mechanisms underlying the pharmacological and toxicological effects of these retinoids individually or in combination with antiestrogens remain unclear, and little is known about their adverse effects in combined therapies with narrow-band UVB (NBUVB) or with psoralen associated to UVA irradiation (PUVA), used to treat inflammatory skin disorders.

The aim of this work was to study the effects of acitretin and isotretinoin individually or in combination with the antiestrogens tamoxifen (TAM) and 4-hydroxytamoxifen (OHTAM), in rat liver mitochondria and in melanoma and breast cancer cell lines. We also evaluated the *in vitro* cytogenotoxic effects of acitretin and isotretinoin, as well as the effects of acitretin in combination with TAM and OHTAM, using blood cultures from healthy volunteers. Moreover, we studied the *in vivo* cytogenotoxic effects and the hematological and biochemical changes induced by acitretin and isotretinoin in monotherapy or combined with NBUVB or with PUVA, in patients with psoriasis *vulgaris* and acne *vulgaris*.

The mitochondrial studies showed that acitretin and isotretinoin (5 nmol/mg protein) decreased the energy production and increased the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition (MPT), as a consequence of the interaction of those retinoids with the adenine nucleotide translocase (ANT). The reduced ANT content suggests that the mechanisms of apoptosis and hepatotoxicity induced by acitretin and isotretinoin occur, possibly, through mitochondrial dysfunction, due to interactions with ANT.

Moreover, we observed that TAM and OHTAM (10 nmol/mg protein or 5  $\mu\text{M}$ ) inhibited the MPT induced by acitretin and isotretinoin, contributing to decrease the toxicity induced by these retinoids, probably by preventing the ANT conformational changes involved in MPT induction.

The studies in melanoma and breast cancer cell lines showed that acitretin (5  $\mu\text{M}$ ) and isotretinoin (0.5  $\mu\text{M}$ ) in combination with TAM or with OHTAM (5 and 7.5  $\mu\text{M}$ ) increased synergistically the anti-proliferative effects of each compound individually. The

## Abstract

anti-proliferative effect of these combinations, observed in melanoma cell lines, is not due to cell death mechanisms and seems to be a consequence of cell cycle arrest in G0/G1 phase. Acitretin and isotretinoin combined with OHTAM presented a higher anti-proliferative effect than the combination with TAM, probably due to its higher affinity to estrogen receptors (ERs).

The *in vitro* genotoxic studies showed that acitretin and isotretinoin (1.2 to 20  $\mu$ M), as well as acitretin in combination with antiestrogens did not present genotoxic effects.

Concerning the *in vivo* genotoxic studies, we found that the therapies with acitretin (monotherapy or combined with NBUVB) or with isotretinoin (monotherapy) did not induce genotoxic effects. However, further studies are needed to clarify the genotoxic potential of therapy with acitretin + PUVA or with isotretinoin + NBUVB.

The *in vivo* studies included also the evaluation of biochemical and hematological changes induced by those therapies in patients with psoriasis *vulgaris* and acne *vulgaris*. We found that acitretin (monotherapy or combined with PUVA) or isotretinoin (monotherapy or combined with NBUVB), after 12 weeks of therapy did not induce renal toxicity. However, patients treated with acitretin + NBUVB, after 12 weeks, showed an increase in serum creatinine levels, suggesting a possible renal toxicity.

The therapy with acitretin (monotherapy or combined with NBUVB or with PUVA) or with isotretinoin (monotherapy or combined with NBUVB), after 12 weeks, did not alter the glucose metabolism. However, we found a decrease of insulin sensitivity after a prolonged therapy with acitretin (24 to 36 weeks) or with isotretinoin (24 weeks).

We showed that the therapy with acitretin (monotherapy or combined with NBUVB or PUVA) or with isotretinoin (monotherapy or combined with NBUVB), after 12 weeks, did not induce hepatic toxicity. However, a longer therapy with acitretin (24 or 36 weeks) or with isotretinoin (24 weeks), induced hepatic toxicity and muscle dysfunction.

In conclusion, this study suggests that acitretin and isotretinoin combined with antiestrogens have a potential application in the chemoprevention of melanoma and breast cancer; the combination with OHTAM seems to have a higher efficacy in the treatment of melanoma. The combination with antiestrogens can provide a powerful strategy to overcome the toxicity of these retinoids, without genotoxic effects. On the other hand, the studies in patients suggest that acitretin and isotretinoin individually or in combination



with NBUVB or PUVA did not induce significant changes in clinical biomarkers, except for liver and muscle functions, and for glucose metabolism.

**Key-words:** Acitretin, isotretinoin, antiestrogens, cancer, cytogenotoxicity.



# Índice

<b>Resumo</b>	ix
<b>Abstract</b>	xiii
<b>Índice</b>	xvii
<b>Índice de Figuras</b>	xxiii
<b>Índice de Tabelas</b>	xxxv
<b>Abreviaturas</b>	xxxvii
<b>Capítulo I – Introdução geral</b>	
<b>1. Retinoides</b>	3
1.1 Metabolismo e transporte	4
1.2 Efeitos fisiológicos	5
1.3 Mecanismos de ação dependentes dos recetores dos ácidos retinoicos	8
1.3.1 Importância dos recetores dos ácidos retinoicos na hematopoiese e no sistema imune	9
1.3.1.1 Regulação da granulocitopoiese	9
1.3.1.2 Regulação da eritropoiese	11
1.3.1.3 Regulação da monocitopoiese e da linfocitopoiese	11
1.3.2 Importância dos recetores dos ácidos retinoicos na regulação celular	12
1.4 Efeitos farmacológicos dos retinoides de 1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> geração	13
1.5 Isotretinoína: aplicação terapêutica e metabolismo	15
1.6 Acitretina: aplicação terapêutica e metabolismo	16
<b>2. Fármacos antiestrogénicos</b>	17
2.1 Metabolismo do tamoxifeno	17
2.2 Mecanismos de ação do tamoxifeno e dos seus metabolitos	18
2.3 Associação terapêutica dos retinoides com os antiestrogénicos	19

## Índice

<b>3. Toxicidade mitocondrial dos retinoides e antiestrogénios</b>	20
3.1 Estrutura e morfologia das mitocôndrias	21
3.2 Função bioenergética das mitocôndrias	22
3.3 Mecanismos de transporte através das membranas mitocondriais	26
3.4 Importância da mitocôndria na regulação do cálcio	28
3.5 Importância da permeabilidade transitória mitocondrial	29
3.6 A mitocôndria como alvo terapêutico e de toxicidade	33
3.6.1 A mitocôndria como alvo da ação de fármacos antineoplásicos	34
3.6.2 Toxicidade mitochondrial	34
3.7 Efeitos dos retinoides e dos antiestrogénios a nível mitocondrial	35
<b>4. Genotoxicidade dos retinoides e antiestrogénios</b>	37
4.1 Ensaio do micronúcleo	38
4.2 Ensaio do cometa	41
4.3 Efeito genotóxico dos retinoides e antiestrogénios	42
<b>5. Retinoides e antiestrogénios na terapêutica do melanoma e do cancro da mama</b>	44
5.1 Melanoma	44
5.1.1 Expressão dos recetores dos ácidos retinoicos e dos estrogénios e sua função no melanoma	45
5.2 Cancro da mama	47
5.2.1 Expressão dos recetores de estrogénios e dos ácidos retinoicos e sua ação no cancro da mama	47
5.2.2 Efeitos dos retinoides em associação com os antiestrogénios	49
<b>6. Os retinoides na terapêutica da psoríase e da acne</b>	50
6.1 Etiologia e apresentação clínica da psoríase	50
6.2 Fisiopatologia da psoríase	51
6.3 Comorbilidades associadas à psoríase	52

---

6.4 Terapêutica da psoríase	53
6.4.1 Efeitos dos retinoides sistêmicos	55
6.4.2 A fototerapia e a fotoquimioterapia	56
6.4.3 Associações terapêuticas	58
6.5 Etiologia e fisiopatologia da acne	59
6.6 Terapêutica da acne	61
<b>7. Objetivos e plano de trabalho</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo II – Efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios TAM e OHTAM em mitocôndrias de fígado</b>	
<b>1. Introdução</b>	<b>69</b>
<b>2. Materiais e métodos</b>	<b>71</b>
2.1 Reagentes	71
2.2 Isolamento de mitocôndrias	71
2.3 Avaliação da permeabilidade transitória mitocondrial	73
2.3.1 Determinação do potencial de membrana	73
2.3.2 Determinação dos fluxos de $\text{Ca}^{2+}$	74
2.4 Avaliação da bioenergética mitocondrial	75
2.4.1 Determinação do consumo de oxigénio	75
2.4.2 Determinação do potencial de membrana	76
2.4.3 Determinação da concentração dos nucleótidos de adenina por HPLC	77
2.4.4 Determinação do conteúdo do transportador de nucleótidos de adenina	78
2.5 Análise estatística	79
<b>3. Resultados</b>	<b>79</b>
3.1 Efeitos da acitretina na bioenergética e na permeabilidade transitória mitocondrial: associação com o TAM e o OHTAM	79
3.1.1 Resultados	79

## Índice

3.1.2 Discussão	89
3.2 Efeitos da isotretinoína na permeabilidade transitória e na bioenergética mitocondrial: associação com o TAM e o OHTAM	92
3.2.1 Resultados	92
3.2.2 Discussão	105
<b>Capítulo III –Efeitos antiproliferativos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios TAM e OHTAM em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama</b>	
<b>1. Introdução</b>	111
<b>2. Materiais e métodos</b>	112
2.1 Reagentes	112
2.2 Cultura celulares	113
2.3 Avaliação da viabilidade e morte celular	113
2.3.1 Ensaio da sulforrodamina B	113
2.3.2 Ensaio de exclusão do azul de tripano	115
2.3.3 Determinação da lactato desidrogenase	115
2.3.4 Ensaio de coloração com Hoechst	116
2.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	117
2.5 Análise estatística	118
<b>3. Resultados</b>	118
3.1 Efeito antiproliferativo da acitretina individualmente ou em associação com os antiestrogénios em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama.	118
3.1.1 Resultados	118
3.1.2 Discussão	125
3.2 Efeito antiproliferativo da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama.	127
3.2.1 Resultados	127
3.2.2 Discussão	133

**Capítulo IV – Efeito citogenotóxico dos retinoides**

<b>1. Introdução</b>	137
<b>2. Materiais e métodos</b>	138
2.1 Reagentes	138
2.2 Caraterização dos doentes	139
2.3 Avaliação da citogenotoxicidade	143
2.3.1 Ensaios <i>in vitro</i>	143
2.3.2 Ensaios <i>in vivo</i>	144
2.3.3 Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)	144
2.3.4 Ensaio do cometa	145
2.4 Análise estatística	146
<b>3. Resultados</b>	147
3.1 Efeito citogenotóxico da acitretina individualmente ou em associação com antiestrogénios, fotoquimioterapia ou com fototerapia de banda estreita	147
3.1.1 Resultados	147
3.1.2 Discussão	155
3.2 Efeito citogenotóxico da isotretinoína individualmente ou em associação com fototerapia de banda estreita	159
3.2.1 Resultados	159
3.2.2 Discussão	165

**Capítulo V – Avaliação hematológica e bioquímica de doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris*, tratados com retinoides**

<b>1. Introdução</b>	173
<b>2. Materiais e métodos</b>	175
2.1 Reagentes	175
2.2 Caraterização dos doentes	175
2.3 Estudo bioquímico e hematológico	176

## Índice

2.4 Análise estatística	179
<b>3. Resultados</b>	<b>180</b>
3.1 Efeitos da acitretina individualmente ou em associação com a fotoquimioterapia e a fototerapia de banda estreita nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de doentes com psoríase <i>vulgaris</i>	180
3.1.1 Resultados	180
3.1.2 Discussão	191
3.2 Efeitos da isotretinoína individualmente ou em associação com a fototerapia de banda estreita nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de doentes com psoríase <i>vulgaris</i> e acne <i>vulgaris</i>	196
3.2.1 Resultados	196
3.2.2 Discussão	203
<b>Capítulo VI – Discussão geral e conclusões</b>	<b>205</b>
<b>Capítulo VII – Bibliografia</b>	<b>213</b>



## Índice de Figuras

- Figura 1.1** - Estrutura química dos retinoides naturais (A) e sintéticos (B). 3
- Figura 1.2** - Metabolismo e ativação transcricional dos retinoides. CRABP: proteínas celulares de ligação ao ácido retinoico; CRBP: proteínas celulares de ligação ao retinol; RA: ácido retinoico; RBP: proteínas séricas de ligação ao retinol; TTR transtirretina. Adaptado de (Bushue e Wan, 2010). 4
- Figura 1.3** - Efeitos fisiológicos dos ácidos retinoicos (RA). Os RA nas células alvo podem ligar-se aos heterodímeros recetor do ácido retinoico/recetor X do retinoide (RAR/RXR) e desencadear respostas genómicas clássicas, ou respostas não genómicas. Os RA podem também ligar-se a outros heterodímeros, tais como o recetor da tiroide (TR)/RXR, recetor da vitamina D (VDR)/RXR e recetor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)/RXR ou atuarem através de mecanismos independentes dos recetores. CRABP: proteínas celulares de ligação ao ácido retinoico; FABP 5: proteínas de ligação aos ácidos gordos 5; RBP: proteínas séricas de ligação ao retinol; TTR: transtirretina. 8
- Figura 1.4** - Efeitos dos ácidos retinoicos (RA) na hematopoiese e no sistema imunitário. EPO: eritropoietina, RAR: recetor do ácido retinoico, RXR: recetor X do retinoide, *PML*: gene da leucemia promielocítica. Adaptado de (Duong e Rochette-Egly, 2011). 10
- Figura 1.5** - Metabolismo do tamoxifeno. Adaptado de (Kiyotani *et al.*, 2012). 17
- Figura 1.6** - Estrutura da mitocôndria visualizada por tomografia eletrónica. OMM: membrana mitocondrial externa, IMM: membrana mitocondrial interna. Adaptado de (Lizana *et al.*, 2009). 22
- Figura 1.7** - Representação esquemática do sistema de oxidação fosforilativo constituído pelos complexos I, II, III, IV e V com os seus substratos e cofatores; bem como o transportador de nucleótidos de adenina (ANT) e o transportador de fosfato (PiC). Cit *c*: citocromo *c*;  $\Delta\psi$ : potencial de membrana; IMM: membrana mitocondrial interna; mtDNA: DNA mitocondrial;  $\text{NAD}^+$ : nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada); NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida); Pi: fosfato inorgânico; UQ: coenzima Q ou ubiquinona, UQH<sub>2</sub>: ubiquinol. Adaptado de (Smith *et al.*, 2012). 23

## Índice de Figuras

**Figura 1.8** - Esquema representativo do processo de permeabilidade transitória mitocondrial (MPT). ANT: transportador de nucleótidos de adenina; BPR: recetor periférico das benzodiazepinas; CphD: ciclofilina D;  $\Delta\psi$ : potencial de membrana; OMM: membrana mitocondrial externa; PTP: poro da permeabilidade transitória mitocondrial; ROS: espécies reativas de oxigénio; VDAC: canais aniónicos dependentes de voltagem. Adaptado de (Fulda *et al.*, 2010). 30

**Figura 1.9** - Ilustração de linfócitos mononucleados (A), binucleados (B), multinucleados (C), necróticos (D), apoptóticos (E), binucleados com micronúcleo (F), binucleados com micronúcleo e com uma ponte de cromatina (G) e binucleados contendo “nuclear buds” (H). Adaptado de (Fenech, 2006). 39

**Figura 1.10** - Representação de um “cometa”. O DNA foi corado com SyberGreen e visualizado numa microscópio de epifluorescência. (Adaptado de <http://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-and-slides>). 42

**Figura 1.11** - Terapêuticas utilizadas para o tratamento da psoríase ligeira, moderada e grave. 54

**Figura 2.1** - Efeitos da acitretina no consumo de  $O_2$  e índices de ICR e ADP/O em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato. A velocidade de consumo de  $O_2$  das mitocôndrias foi avaliada no estado 3 (círculos fechados), no estado 4 (triângulos abertos), no estado 4 oligomicina (estado 4 olig) (triângulos fechados) e no estado 4-FCCP (quadrados fechados) (A). Os índices respiratórios ICR (círculos fechados) e ADP/O (círculos abertos) (B) foram determinados como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais (quando as barras de erro não estão visíveis, o SEM está contido no tamanho dos símbolos). \*\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparado com o controlo (na ausência de acitretina); ++ $p < 0,01$  quando o estado 4 de oligomicina foi comparado com o estado 4 da respiração. 80

**Figura 2.2** – Efeitos da acitretina no potencial de membrana ( $\Delta\psi$ )- dependente de glutamato/malato em mitocôndrias de fígado de rato. Os traços representam registos típicos de experiências realizadas nas condições descritas nos Materiais e métodos. As setas indicam as adições de glutamato/malato (Glu/Mal) 5 mM/2,5 mM, 150 nmoles de ADP/mg proteína (ADP), e os números à direita dos traços representam as concentrações de acitretina. Os resultados da tabela abaixo são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais. \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,5$  versus controlo (na ausência de acitretina). 82

**Figura 2.3** - Efeito da acitretina no conteúdo do transportador de nucleótidos de adenina (ANT). As experiências foram realizadas como descrito nos Materiais e métodos e os resultados são expressos em pmol de carboxiatractilosídeo (CAT) por mg de proteína mitocondrial. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências independentes, utilizando diferentes preparações mitocondriais. \*\*\* $p < 0,001$  versus controlo (na ausência de acitretina). 84

**Figura 2.4** - Efeitos da acitretina individualmente e em associação com os antiestrogénios, TAM ou OHTAM (A), ligandos do transportador de nucleótidos de adenina (ANT), ADP ou ATP, agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes (B) na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT), avaliados pela dissipação do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ). As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200  $\mu\text{M}$ , N-acetilcisteína (NAC) 200  $\mu\text{M}$ , ascorbato (Asc) 1 mM, glutathione (GSH) 1 mM, ADP 75  $\mu\text{M}$ , ATP 150  $\mu\text{M}$ , ciclosporina A (CyA) 1  $\mu\text{M}$ , 10 nmoles de TAM/mg proteína, 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro preparações mitocondriais diferentes. 86

**Figura 2.5** - Efeitos dos antiestrogénios (TAM ou OHTAM) e ADP na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) induzida pela acitretina foram avaliados pelos fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$ . As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200  $\mu\text{M}$ , N-acetilcisteína (NAC) 200  $\mu\text{M}$ , ascorbato (Asc) 1 mM, glutathione (GSH) 1 mM, ADP 75  $\mu\text{M}$ , ciclosporina A (CyA) 1  $\mu\text{M}$ , 10 nmoles de TAM/mg proteína e de 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro ensaios mitocondriais independentes. 87

**Figura 2.6** - Efeitos da acitretina individualmente e em associação com os antiestrogénios no consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato. A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> no estado 3 (A), no estado 4 e no estado 4 oligomicina (estado 4 olig) (B), no estado 4-FCCP (C), no índice de controlo respiratório (ICR) (D) e no quociente ADP/O (E) de mitocôndrias foi determinada como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências, com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,5, quando comparado com o controlo (na ausência de acitretina); ++p <0,01 e +p <0,05 quando comparado com a acitretina. 88

**Figura 2.7** – Efeitos da isotretinoína individualmente e em associação com os antiestrogénios, TAM ou OHTAM (A), ligandos do transportador de nucleótidos de adenina (ANT), ADP ou ATP, agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes (B) na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT), avaliados pela dissipação do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ). As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles Ca<sup>2+</sup>/mg proteína (Ca<sup>2+</sup>), ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200 µM, N-acetilcisteína (NAC) 200 µM, ascorbato (Asc) 1 mM, glutationa (GSH) 1 mM, ADP (ADP) 75 µM, ATP (ATP) 150 µM, ciclosporina A (CyA) 1 µM, 10 nmoles de TAM/mg proteína, 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro preparações mitocondriais diferentes. 93

**Figura 2.8** – Efeitos dos antiestrogénios (TAM ou OHTAM) e ADP na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) induzida pela isotretinoína foram avaliados pelos fluxos de Ca<sup>2+</sup>. As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles Ca<sup>2+</sup>/mg proteína (Ca<sup>2+</sup>), ADP (ADP) 75 µM, ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200 µM, N-acetilcisteína (NAC) 200 µM, ascorbato (Asc) 1 mM, glutationa (GSH) 1 mM, ciclosporina A (CyA) 1 µM, 10 nmoles de TAM/mg proteína e de 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro ensaios mitocondriais independentes. 94

**Figura 2.9** – Efeitos da isotretinoína no consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato (A) e succinato (B). A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias foi avaliada no estado 3 (círculos fechados), no estado 4 (triângulos abertos), no estado 4 oligomicina (estado 4 olig) (triângulos fechados) e no estado 4-FCCP (quadrados fechados). Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais (quando as barras de erro não estão visíveis, o SEM está contido no tamanho dos símbolos). \*\*\*p <0,001 e \*\*p <0,01 quando comparado com o controlo (na ausência de isotretinoína) no estado 3 da respiração. \$\$\$p < 0.01 *versus* respectivo controlo no estado 4 da respiração; ###p<0.001 e ##p < 0.01 *versus* controlo no estado 4-FCCP; ++p < 0.01 e +p < 0.05 quando o estado 4 de oligomicina foi comparado com o estado 4 da respiração.

95

**Figura 2.10** – Efeitos da isotretinoína nos índices respiratórios em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato (A) e succinato (B): índice de controlo respiratório (ICR) (círculos fechados) e ADP/O (círculos abertos) foram determinados como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais (quando as barras de erro não estão visíveis, o SEM está contido no tamanho dos símbolos). \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,5 *versus* controlo (na ausência de isotretinoína).

97

**Figura 2.11** – Efeitos da isotretinoína no potencial de membrana ( $\Delta\psi$ )- dependente de glutamato/malato em mitocôndrias de fígado de rato. Os traços representam registos típicos de experiências realizadas nas condições descritas nos Materiais e métodos. As setas indicam as adições de glutamato/malato (Glu/Mal) 5 mM/2,5 mM, 150 nmoles de ADP/mg proteína (ADP), e os números à direita dos traços representam as concentrações de isotretinoína. Os resultados da tabela abaixo são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,5 *versus* controlo (na ausência de isotretinoína).

99

## Índice de Figuras

**Figura 2.12** – Efeitos da isotretinoína no potencial de membrana ( $\Delta\psi$ )- dependente de succinato em mitocôndrias de fígado de rato. Os traços representam registos típicos de experiências realizadas nas condições descritas nos Materiais e métodos. As setas indicam as adições de succinato (Suc) 5 mM, 150 nmoles de ADP/mg proteína (ADP), e os números à direita dos traços representam as concentrações de isotretinoína. Os resultados da tabela abaixo são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001 e \*p <0,5 *versus* controlo (na ausência de isotretinoína). 100

**Figura 2.13** – Efeito da isotretinoína no conteúdo do transportador de nucleótidos de adenina (ANT). As experiências foram realizadas como descrito nos Materiais e métodos e os resultados são expressos em pmoles de carboxiatractilosídeo (CAT) por mg de proteína mitocondrial. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências utilizando diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001 e \*\*p <0,01 *versus* controlo (na ausência de isotretinoína). 101

**Figura 2.14** – Efeitos da isotretinoína individualmente e em associação com os antiestrogénios no consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato. A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> no estado 3 (A), no estado 4 e no estado 4 oligomicina (estado 4 olig) (B), no estado 4-FCCP (C), no índice de controlo respiratório (ICR) (D) e no quociente ADP/O (E) de mitocôndrias foi avaliada como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências, usando diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,5, quando comparado com o controlo (na ausência de isotretinoína); +++p <0,001 e ++p <0,01 quando comparado com a isotretinoína. 103

**Figura 3.1** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em cultura de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio da sulforrodamina B. As células foram incubadas com a acitretina (A), o TAM (B) ou o OHTAM (C) individualmente durante 24, 48 e 72 horas e com a acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM durante 72 horas (D). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; T24: 24 horas; T48: 48 horas; T72: 72 horas; Acit: acitretina; \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,05 *versus* C(-); +++p <0,001 e ++p <0,05 *versus* acitretina; \$\$\$p <0,001 *versus* TAM; ###p <0,001 *versus* OHTAM. 119

**Figura 3.2** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de cancro da mama MCF-7, utilizando o ensaio da sulforrodamina B. As células foram incubadas com a acitretina (A), o TAM (B), o OHTAM (C) individualmente e com a acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM (D), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; Acit: acitretina; \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,05 *versus* C(-); +++p <0,001 e ++p <0,01 *versus* acitretina; #p <0,05 *versus* OHTAM. 121

**Figura 3.3** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio de exclusão do azul de tripano. As células foram incubadas com acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM, durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): controlo negativo; Acit: acitretina; \*\*\*p <0,001 e \*\*p <0,01 *versus* C(-); +++p <0,001 *versus* acitretina; ##p <0,01 *versus* OHTAM. 122

**Figura 3.4** – Imagens de fluorescência de culturas de células de melanoma K1735-M2 incubadas com acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM. As células foram coradas com o corante específico de DNA Hoechst 33258 e incubadas na ausência de compostos (A), na presença de acitretina (B), TAM (C), acitretina + TAM (D), OHTAM (E) e acitretina + OHTAM (F), durante 72 horas. Todas as imagens foram adquiridas com uma ampliação de 400x. 123

**Figura 3.5** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nas fases do ciclo celular em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o iodeto de propídeo. As células foram incubadas com acitretina individualmente e em associação com o TAM (A) ou com o OHTAM (B), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): controlo negativo; Acit: acitretina; \*\*\*p <0,001 e \*\*p <0,01 *versus* C(-); +p <0,05 *versus* acitretina; \$\$\$p <0,001 e \$\$p <0,01 *versus* TAM; ##p <0,01 *versus* OHTAM. 124

## Índice de Figuras

**Figura 3.6** – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em cultura de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio da sulforradamina B. As células foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas com a isotretinoína individualmente (A) e em associação com o TAM (B) ou com o OHTAM (C), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; T24: 24 horas; T48: 48 horas; T72: 72 horas; Iso: isotretinoína; \*\*\* $p < 0.001$  e \*\* $p < 0.01$  versus controlo negativo; +++ $p < 0.001$  e + $p < 0.05$  versus isotretinoína; \$\$\$ $p < 0.001$  versus TAM; ### $p < 0.001$  versus OHTAM. 128

**Figura 3.7** – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de cancro da mama MCF-7, utilizando o ensaio da sulforradamina B. As células foram incubadas com a isotretinoína individualmente (A) e em associação com o TAM (B) ou com o OHTAM (C), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; T72: 72 horas; Iso: isotretinoína; \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  versus C(-); +++ $p < 0,001$  versus isotretinoína; \$ $p < 0,05$  versus TAM; # $p < 0,05$  versus OHTAM. 129

**Figura 3.8** - Efeito da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio de exclusão do azul de tripano. As células foram incubadas com a isotretinoína individualmente e em associação com o TAM (A) ou com o OHTAM (B), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): Controlo negativo; Iso: isotretinoína; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  versus C(-); + $p < 0,05$  versus isotretinoína. 130

**Figura 3.9** - Imagens de fluorescência de culturas de células de melanoma K1735-M2 incubadas com isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM. As células foram coradas com o corante específico de DNA Hoechst 33258 e incubadas na ausência de compostos (A), na presença de isotretinoína (B), TAM (C), isotretinoína + TAM (D), OHTAM (E) e isotretinoína + OHTAM (F), durante 72 horas. Todas as imagens foram adquiridas com uma ampliação de 400x. 131



**Figura 3.10** - Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nas fases do ciclo celular em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o iodeto de propídeo. As células foram incubadas com isotretinoína individualmente e em associação com o TAM (A) ou com o OHTAM (B), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): controlo negativo; Iso: isotretinoína; \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,05 versus C(-); +++p <0,001, ++p <0,01 e +p <0,05 versus isotretinoína; \$\$\$p <0,001 e \$\$p <0,01 versus TAM; ###p <0,001 e #p <0,05 versus OHTAM. 132

**Figura 4.1** - Frequência de micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) observada nos estudos *in vivo* em doentes com psoríase *vulgaris*, de acordo com o tratamento instituído (A), e em estudos *in vitro*, de acordo com a concentração de acitretina (B). Para o controlo negativo [C(-)] e para o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9  $\mu$ M; Acit: acitretina; ReNBUVB: acitretina + NBUVB; RePUVA: acitretina + PUVA; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; \*\*\*p <0,001 e \*p <0,05 versus C(-). Controlo histórico de nosso laboratório para a frequência de MN do controlo negativo (n = 36): 3,00 (2,00-3,00). 148

**Figura 4.2** - Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) observado nos estudos *in vivo* em doentes com psoríase *vulgaris*, de acordo com o tratamento instituído (A) e em estudos *in vitro* com diferentes concentrações de acitretina (B). O controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram preparados com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9  $\mu$ M. Acit: Acitretina; ReNBUVB: Acitretina + NBUVB; RePUVA: Acitretina + PUVA; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento \*\*p <0,01 versus C(-); ++p <0,01 versus T0. Controlo histórico de nosso laboratório para os valores de CBPI do controlo negativo (n = 36): 1,63 (1,61-1,64). 150

## Índice de Figuras

**Figura 4.3** - Percentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) observada nos estudos *in vivo* em doentes com psoríase *vulgaris*, de acordo com a terapêutica, e a percentagem de células apoptóticas (C) e necróticas (D) em estudos *in vitro* com diferentes concentrações de acitretina. O controlo negativo [C(-)] foi preparado com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); Acit: Acitretina; ReNBUVB: Acitretina + NBUVB; RePUVA: Acitretina + PUVA; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01, \*p <0,05 *versus* C(-);<sup>+</sup>p <0,05 *versus* T0; #p <0,05 *versus* 1,2 µM acitretina. Controlo histórico do nosso laboratório da percentagem de células apoptóticas e necróticas do controlo negativo (n = 36): 2,16 (1,71-2,93) e 2,36 (1,90-3,28), respetivamente. 151

**Figura 4.4** – Frequência de micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) observada em estudos *in vitro* com acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM. Para o controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9 µM; Acit: acitretina;\*\*\*p < 0,001 *versus* C(-). 152

**Figura 4.5** – Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) observado em estudos *in vitro* com acitretina (5 µM) em associação com o TAM ou com o OHTAM (5 e 10 µM). O controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram preparados com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9 µM; Acit: acitretina; \*p <0,05 *versus* C(-). 154

**Figura 4.6** - Percentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) observada nos estudos *in vitro* com acitretina (5 µM) associada com o TAM (5 e 10 µM), e percentagem de células apoptóticas (C) e necróticas da acitretina (5 µM) associada com o OHTAM (5 e 10 µM) (D). O controlo negativo [C(-)] foi preparado com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); Acit: acitretina; \*\*\*p <0,001 *versus* C(-); +++p <0,001 e +p <0,05 *versus* acitretina; \$\$\$p <0,001 e \$p <0,05 *versus* TAM; #p <0,05 *versus* OHTAM. 155

**Figura 4.7** - Frequência de micronúcleos (MN) em linfócitos binucleadas (BN) observada em estudos *in vitro* com isotretinoína (A) e em estudos *in vivo* com cinco doentes, de acordo com o tratamento instituído (B). Para o controlo negativo [C(-)] e para o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9 µM. ISO1: doente 1; ISO2: doente 2; ISO3: doente 3; ReNBUVB4: doente 4; ReNBUVB5: doente 5 (ver Tabela 4.2); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; \*\*\*p <0,001 *versus* C(-). Controlo histórico de nosso laboratório para a frequência de MN do controlo negativo (n = 36): 3,00 (2,00-3,00). 160

**Figura 4.8** - Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) observado em estudos *in vitro* com isotretinoína (A) e em estudos *in vivo* com cinco doentes, de acordo com o tratamento instituído (B). O controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram preparados com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9 µM. ISO1: doente 1; ISO2: doente 2; ISO3: doente 3; ReNBUVB4: doente 4; ReNBUVB5: doente 5 (ver Tabela 4.2); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento. Controlo histórico do nosso laboratório para os valores de CBPI dos controlos negativos (n = 36): 1,63 (1,61-1,64). 163

**Figura 4.9** - Percentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) observadas em estudos *in vitro* com isotretinoína, e percentagem de células apoptóticas (C) e necróticas (D) em estudos *in vivo* com cinco doentes, de acordo com a terapêutica. O controlo negativo [C(-)] foi preparado com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); ISO1: doente 1; ISO2: doente 2; ISO3: doente 3; ReNBUVB4: doente 4; ReNBUVB5: doente 5 (ver Tabela 4.2); T0: antes do início a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; \*\*\*p <0,001 e \*p <0,05 *versus* C(-). Controlo histórico do nosso laboratório da percentagem de células apoptóticas e necróticas do controlo negativo (n = 36): 2,16 (1,71-2,93) e 2,36 (1,90-3,28), respetivamente. 164

**Figura 5.1** – Frequência de efeitos adversos referidos pelos doentes com psoríase de acordo com o tempo de terapêutica. T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; T36: após 36 semanas de tratamento; D.: dores; \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01, \*p <0,05 *versus* T0. 181

## Índice de Figuras

- Figura 5.2** - Valores médios de creatinina cinase (CK) em doentes com psoríase ao longo do tratamento. 184
- Figura 5.3** - Correlação observada entre o índice de severidade e área psoriática (PASI) e os níveis de glucose antes de iniciar a terapêutica (T0). 186
- Figura 5.4** - Valores de glucose e hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) apresentados por um doente com psoríase tratado, com acitretina + PUVA ao longo de 12 semanas, e com acitretina em monoterapia, por mais 54 semanas de tratamento. 187
- Figura 5.5** - Valores de proteína C-reativa (PCR) ao longo do tempo de tratamento. 190  
#p <0,05 *versus* T24.

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> - Efeito da acitretina nos níveis de ATP e ADP em mitocôndrias energizadas com glutamato/malato.	83
<b>Tabela 2.2</b> – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nos níveis de ATP e ADP em mitocôndrias energizadas com glutamato/malato.	104
<b>Tabela 3.1</b> – Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nos níveis de LDH, após 72 horas de incubação.	122
<b>Tabela 3.2</b> – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nos níveis de LDH, após 72 horas de incubação.	130
<b>Tabela 4.1</b> – Dados demográficos e clínicos dos doentes com psoríase <i>vulgaris</i> , tratados com acitretina em monoterapia ou em associação com irradiação com NBUVB ou com irradiação com PUVA.	141
<b>Tabela 4.2</b> – Dados demográficos e clínicos dos cinco doentes com psoríase <i>vulgaris</i> e com acne <i>vulgaris</i> tratados com isotretinoína em monoterapia ou em associação com irradiação com NBUVB.	142
<b>Tabela 4.3</b> – Análise do ensaio do cometa em doentes com psoríase <i>vulgaris</i> , de acordo com a terapêutica instituída, e em estudos <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de acitretina.	149
<b>Tabela 4.4</b> - Análise do ensaio do cometa, de cinco experiências <i>in vitro</i> com acitretina em associação com os antiestrogénios, TAM e OHTAM.	153
<b>Tabela 4.5</b> – Análise do ensaio do cometa, de cinco experiências <i>in vitro</i> independentes, com diferentes concentrações de isotretinoína, e de cinco doentes avaliados, de acordo com a terapêutica instituída.	162
<b>Tabela 5.1</b> – Estudo da função renal dos doentes em estudo, de acordo com a terapêutica instituída.	182

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 5.2</b> – Estudo da função hepática dos doentes em estudo, de acordo com a terapêutica instituída.	183
<b>Tabela 5.3</b> – Estudo lipídico e do metabolismo da glucose, de acordo com a terapêutica instituída.	185
<b>Tabela 5.4</b> – Estudo eritrocitário, de acordo com a terapêutica instituída.	188
<b>Tabela 5.5</b> – Contagem total e diferencial de leucócitos, de acordo com a terapêutica instituída.	189
<b>Tabela 5.6</b> – Estudo da função renal, de acordo com a terapêutica instituída.	197
<b>Tabela 5.7</b> – Estudo da função hepática, de acordo com a terapêutica instituída.	198
<b>Tabela 5.8</b> – Estudo lipídico e metabolismo da glucose, de acordo com a terapêutica instituída.	200
<b>Tabela 5.9</b> - Estudo eritrócitário, de acordo com a terapêutica instituída.	201
<b>Tabela 5.10</b> – Contagem total e diferencial de leucócitos, de acordo com a terapêutica instituída.	202

**Abreviaturas**

ADP/O	Quociente entre as nanomoles de ADP fosforiladas e os nanoátomos de oxigénio consumidos
all- <i>trans</i> -RA	Ácido all- <i>trans</i> -retinoico também denominado tretinoína
ALP	Fosfatase alcalina
ALS	<i>Alkali-labile sites</i>
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina ( <i>adenine nucleotide translocase</i> )
APL	Leucemia promielocítica aguda ( <i>acute promyelocytic leukemia</i> )
Asc	Ascorbato
ATR	Atractilosídeo
BBUVB	Fototerapia com radiação UVB de banda larga ( <i>broad-band UVB</i> )
Bd3	Monómeros da proteína banda 3
BSA	Albumina bovina sérica ( <i>bovine serum albumin</i> )
CAT	Carboxiatractilosídeo
CBMN	Micronúcleo com bloqueio de citocinese ( <i>cytokinesis-blocked micronucleus</i> )
CBPI	Índice de proliferação com bloqueio de citocinese ( <i>cytokinesis-blocked proliferation index</i> )
CHGM	Concentração da hemoglobina globular média
CI	Índice de combinação
9- <i>cis</i> -RA	Ácido 9- <i>cis</i> -retinoico também denominado alitretinoína
13- <i>cis</i> -RA	Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico também denominado isotretinoína
CK	Creatina cinase
CphD	Ciclofilina D
CRABP-I e II	Proteínas celulares de ligação ao ácido retinoico ( <i>cellular retinoic acid-binding proteins</i> )
CRBP-I e II	Proteínas celulares de ligação ao retinol ( <i>cellular retinol-binding proteins</i> )
CyA	Ciclosporina A
Cys	Cisteína

## Abreviaturas

Cyt-B	Citocalasina B
DCV	Doenças cardiovasculares
DLQI	Índice de qualidade de vida para doenças dermatológicas ( <i>dermatology life quality index</i> )
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
DTT	Ditiotreitol
$\Delta\psi$	Potencial de membrana
$\Delta p$	Força protomotriz
$\Delta pH$	Gradiente de pH
$\Delta\mu H^+$	Gradiente electroquímico de prótons
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EDX	Endoxifeno
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter) N,N,N',N'-tetracético
EPO	Eritropoietina
ERs	Recetores de estrogénio
ER(-)	Células sem recetores de estrogénio
ER(+)	Células com recetores de estrogénio
EREs	Elementos de resposta dos recetores de estrogénio
FABP 5	Proteínas de ligação aos ácidos gordos 5 ( <i>fatty acid binding protein 5</i> )
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de flavina e adenina (forma reduzida)
FBS	Soro bovino fetal ( <i>fetal bovine serum</i> )
FCCP	Carbonildiciano- <i>p</i> -trifluoro-metoxifenilhidrazona
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência ( <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
GB	Glóbulos brancos
GSH	Glutationa
$\gamma$ -GT	Gama-glutamyl-transferase
GV	Glóbulos vermelhos
Hb	Hemoglobina
HbA <sub>1C</sub>	Hemoglobina glicada
HbLM	Hemoglobina ligada à membrana



---

HDL <sub>C</sub>	Colesterol das lipoproteínas de alta densidade ( <i>high-density lipoprotein cholesterol</i> )
HEPES	Ácido N-2-hidroxietil- piperazina-N-2-etanossulfónico
HGM	Hemoglobina globular média
HMWAg	Agregados de alto peso molecular da proteína banda 3
HOMA-IR	Resistência à insulina pelo modelo de avaliação da homeostase ( <i>homeostasis model of assessment - insulin resistance</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HSCs	Células indiferenciadas pluripotentes ( <i>hematopoietic stem cells</i> )
Ht	Hematócrito
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
ICR	Índice de controlo respiratório
IMAC	Canal aniónico da membrana interna ( <i>inner membrane anion channel</i> )
IMC	Índice de massa corporal
IMM	Membrana mitocondrial interna
LDH	Lactato desidrogenase
LDL <sub>C</sub>	Colesterol das lipoproteínas de baixa densidade ( <i>low-density lipoprotein cholesterol</i> )
MN	Micronúcleos
Mops	Ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico
MPT	Permeabilidade transitória mitocondrial ( <i>mitochondrial permeability transition</i> )
mtDNA	DNA mitocondrial
NAC	N-acetilcisteína
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
NBUDs	<i>Nuclear buds</i>
NBUVB	Fototerapia com radiação UVB de banda estreita ( <i>narrow-band UVB</i> )
NEM	N-etilmaleimida
NPBs	Pontes de cromatina ( <i>nucleoplasmic bridges</i> )

## Abreviaturas

OHTAM	4-hidroxitamoxifeno
OMM	Membrana mitocondrial externa ( <i>outer mitochondrial membrane</i> )
P. acnes	<i>Propionibacterium acnes</i>
PASI	Índice de severidade e área psoriática ( <i>psoriasis area and severity index</i> )
PBS	Tampão de fosfato isotónico
PBST	PBS com Tween
PCR	Proteína C-reativa
PFrag	Fragmentos proteolíticos da proteína banda 3
PHA	Fito-hemaglutinina
PI	Iodeto de propídeo
Pi	Fosfato inorgânico
PiC	Transportador de fosfato ( <i>phosphate inorganic carrier</i> )
PML	Gene da leucemia promielocítica ( <i>promyelocytic leukemia</i> )
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfóxido
PPARs	Recetores ativados por proliferadores de peroxissoma ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> )
PSA	Persulfato de amónio
PUVA	Fototerapia com radiação UVA e psoraleno ( <i>psoralen associated to UVA</i> )
QUICKI	Índice de verificação quantitativa da sensibilidade à insulina ( <i>quantitative insulin sensitivity check index</i> )
RA	Ácido retinoico
RARs	Recetores dos ácidos retinoicos
RAREs	Elementos de resposta dos ácidos retinoicos ( <i>retinoic acid response elements</i> )
RBP	Proteínas séricas de ligação ao retinol ( <i>retinol-binding proteins</i> )
RDW	Coeficiente de variação eritrocitária ( <i>red cell distribution width</i> )
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RXRs	Recetores X dos retinoides
SD	Desvio padrão

---

SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SEM	Erro padrão da média
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SRB	Sulforrodamina B
TAM	Tamoxifeno
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TG	Triglicéridos
TGO	Transaminase glutâmico-oxaloacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TL	Comprimento da cauda ( <i>tail length</i> )
TM	<i>Tail moment</i>
TPP <sup>+</sup>	Tetrafenilfosfónio
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
TTR	Transtirretina
UCP 1-5	Proteínas dissociadoras ( <i>uncoupling proteins</i> )
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
VDAC	Canais aniônicos dependentes de voltagem ( <i>voltage-dependent anion channels</i> )
VGM	Volume globular médio



# **Capítulo I**

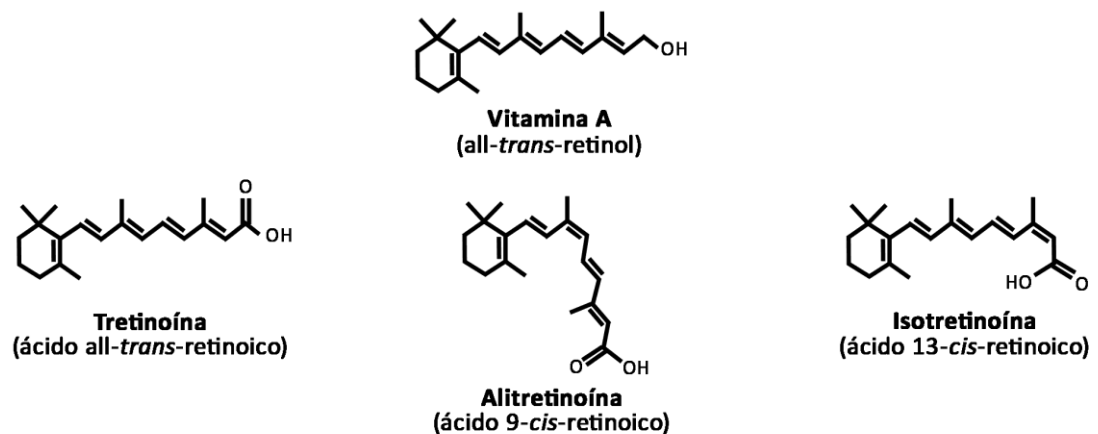
## **Introdução geral**



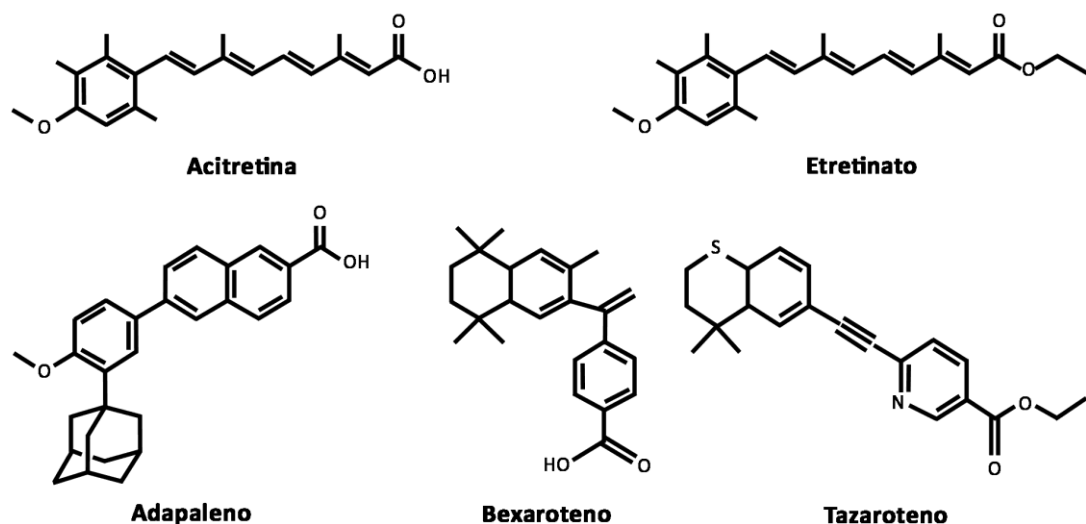
## 1. Retinoides

A família dos retinoides é constituída por uma grande variedade de compostos naturais (Fig. 1.1A) e pelos seus análogos sintéticos (Fig. 1.1B), que apresentam em comum uma semelhança estrutural com a vitamina A (*all-trans*-retinol). Os retinoides são constituídos por três domínios estruturais distintos: um grupo cíclico, uma cadeia poli-insaturada e um grupo polar na região terminal, que pode apresentar diferentes estados de oxidação, desde o retinol, até ao ácido retinoico (RA) (Noy, 2010; Tang e Gudas, 2011) (Fig. 1.1).

### A



### B

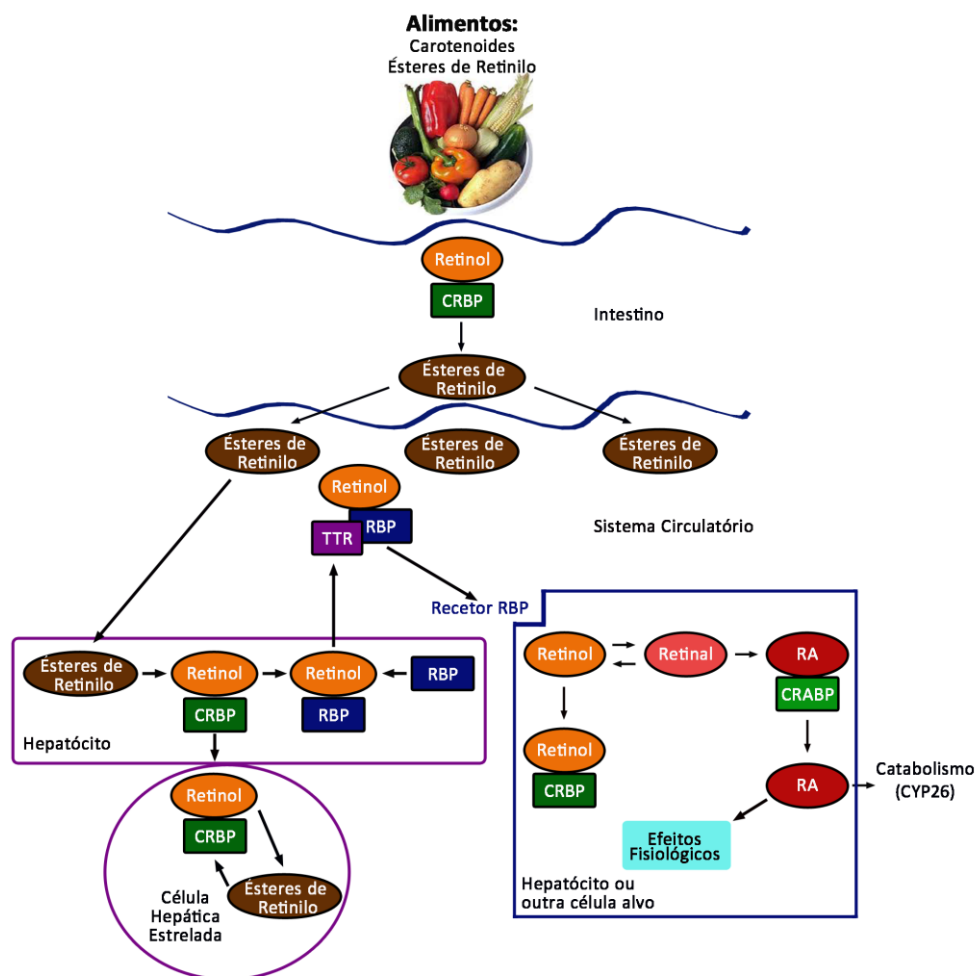


**Figura 1.1** - Estrutura química dos retinoides naturais (A) e sintéticos (B).

## 1.1 Metabolismo e transporte

A vitamina A é fornecida pelos alimentos e absorvida a nível intestinal. Os carotenoides e os ésteres de retinilo, presentes nos alimentos, são convertidos em retinol, o qual se liga às proteínas celulares de ligação ao retinol (CRBP-I e CRBP-II) no lúmen do intestino. O retinol é posteriormente convertido em ésteres de retinilo para ser transportado pelo sistema circulatório até aos hepatócitos e outras células alvo (Bushue e Wan, 2010; Theodosiou *et al.*, 2010).

Nos hepatócitos, os ésteres de retinilo são hidrolisados e o retinol é transportado para as células hepáticas estreladas, que são as principais células de armazenamento dos retinoides no fígado (Shirakami *et al.*, 2012) (Fig. 1.2).



**Figura 1.2** - Metabolismo e ativação transcricional dos retinoides. CRABP: proteínas celulares de ligação ao ácido retinoico; CRBP: proteínas celulares de ligação ao retinol; RA: ácido retinoico; RBP: proteínas séricas de ligação ao retinol; TTR: transtirretina. Adaptado de (Bushue e Wan, 2010).



O retinol pode também ligar-se às proteínas séricas de ligação ao retinol (RBP), nos hepatócitos, e ser transferido posteriormente para o sistema circulatório, onde este complexo se associa com a transtirretina (TTR), para prevenir a sua eliminação nos rins e assegurar a entrada do retinol nas células alvo. Assim, o recetor de superfície celular das proteínas RBP liga-se especificamente ao complexo retinol/TTR/RBP e medeia a captação do retinol nas células alvo (Theodosiou *et al.*, 2010) (Fig. 1.2).

Uma vez nas células alvo, o retinol associado ao CRBP serve como substrato para várias enzimas citosólicas ou microssomais, denominadas de retinol desidrogenases que oxidam o retinol a retinaldeído. O retinaldeído por ação das retinaldeído desidrogenases é posteriormente oxidado a ácido retinoico (Fig. 1.2). De referir que o ácido *all-trans*-retinoico (*all-trans*-RA, também denominado tretinoína), é o principal ácido retinoico a ser sintetizado a nível fisiológico. No entanto, também se podem formar outros ácidos retinoicos, tais como o ácido *9-cis*-retinoico (*9-cis*-RA ou alitretinoína) e o ácido *13-cis*-retinoico (*13-cis*-RA ou isotretinoína), quer diretamente através do *all-trans*-RA, quer por processos sequenciais de oxidação a partir do retinol (Theodosiou *et al.*, 2010).

Os RA ligam-se às proteínas celulares de ligação ao RA (CRABP-I e CRABP-II) e podem entrar no núcleo para ativar o processo de transcrição ou ser transportados para uma célula alvo próxima (Bushue e Wan, 2010) (Fig.1.2).

O balanço entre a síntese e o catabolismo dos RA permite um rigoroso controlo dos seus níveis celulares. O sistema enzimático do citocromo P450, principalmente a família de enzimas CYP26 (Fig. 1.2), parece ser um dos principais responsáveis pelo metabolismo oxidativo dos RA em condições nutricionais e farmacológicas. Assim, o *all-trans*-RA é oxidado, formando-se os seus metabolitos 4-hidroxi-RA e 4-oxo-RA, principalmente por ação da enzima CYP26A1, ocorrendo posteriormente uma etapa de conjugação por ação da uridina 5'-difosfato-glucoronosil transferase (Ross e Zolfaghari, 2011). Contudo, na ausência do CYP26A1, as isoformas CYP3A são também responsáveis pela oxidação do *all-trans*-RA (Thatcher *et al.*, 2010).

## 1.2 Efeitos fisiológicos

Os RA desempenham um papel preponderante na regulação da embriogénese, influenciando também o crescimento e a diferenciação de células específicas no organismo adulto. Os efeitos fisiológicos destes compostos estão maioritariamente dependentes da sua

ligação a duas famílias de recetores nucleares, os recetores dos ácidos retinoicos (RARs) e os recetores X dos retinoides (RXRs), que formam heterodímeros (Samarut e Rochette-Egly, 2012).

Os RARs e os RXRs, tal como todos os recetores nucleares, exibem uma estrutura composta por 5 ou 6 regiões homólogas (designadas de A a F, da região N-terminal à região C-terminal) com funções específicas. A estrutura dos RARs e dos RXRs é bastante semelhante, diferindo na região F, que está ausente nos recetores X dos retinoides (Bastien e Rochette-Egly, 2004).

Os RARs podem ser de três subtipos,  $\alpha$  (NR1B1),  $\beta$  (NR1B2) e  $\gamma$  (NR1B3), que são codificados por diferentes genes (Duong e Rochette-Egly, 2011; Tang e Gudas, 2011). O RAR $\alpha$  tem uma expressão ubíqua, contrariamente ao RAR $\beta$ , que é apenas expresso no córtex cerebral, na próstata e nos rins, e ao RAR $\gamma$ , que é maioritariamente expresso na pele e nas células do sistema hematopoiético (Dolle, 2009).

Os RXRs também apresentam três subtipos,  $\alpha$  (NR2B1),  $\beta$  (NR2B2) e  $\gamma$  (NR2B3) (Duong e Rochette-Egly, 2011; Tang e Gudas, 2011). O RXR $\alpha$  está presente predominantemente na epiderme, no intestino, rins e fígado; a expressão de RXR $\beta$  é ubíqua; o RXR $\gamma$  é expresso principalmente no cérebro, no músculo e em pequenas quantidades no tecido adiposo (Dawson e Xia, 2012).

Cada uma destes subtipos pode ainda ter diferentes isoformas, como resultado de “splicings” alternativos. Tem sido referido que existem duas isoformas para os recetores RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  e RXR $\gamma$  e quatro isoformas para o recetor RAR $\beta$ . Assim, a combinação de 8 isoformas dos RARs com 6 isoformas dos RXRs pode resultar na formação de 48 heterodímeros diferentes, com uma grande variedade de funções fisiológicas (Chambon, 1996). Contudo, estudos mais recentes têm referido a existência de mais duas isoformas do RAR $\beta$ , que ainda estão pouco estudadas relativamente às suas funções (Swift *et al.*, 2008; Christov, 2009).

Além dos heterodímeros RAR/RXR, os RXRs podem também formar heterodímeros com outros recetores nucleares, tais como os recetores da hormona da tiroide, os recetores da vitamina D ou os recetores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), entre outros, desempenhando também diferentes funções fisiológicas (Dawson e Xia, 2012).

Os RARs são ativados predominantemente pelo *all-trans*-RA e pelo seu isómero *9-cis*-RA. No entanto, os RXRs são ativados apenas pelo *9-cis*-RA (Bastien e Rochette-Egly, 2004). Vários autores têm proposto que os RXRs atuam sob subordinação ou silenciamento, ou seja apenas os ligandos dos RARs podem ativar os heterodímeros. Os

ligandos dos RXRs só podem ativar os heterodímeros, quando os RARs tenham sido previamente ativados (Rochette-Egly e Germain, 2009).

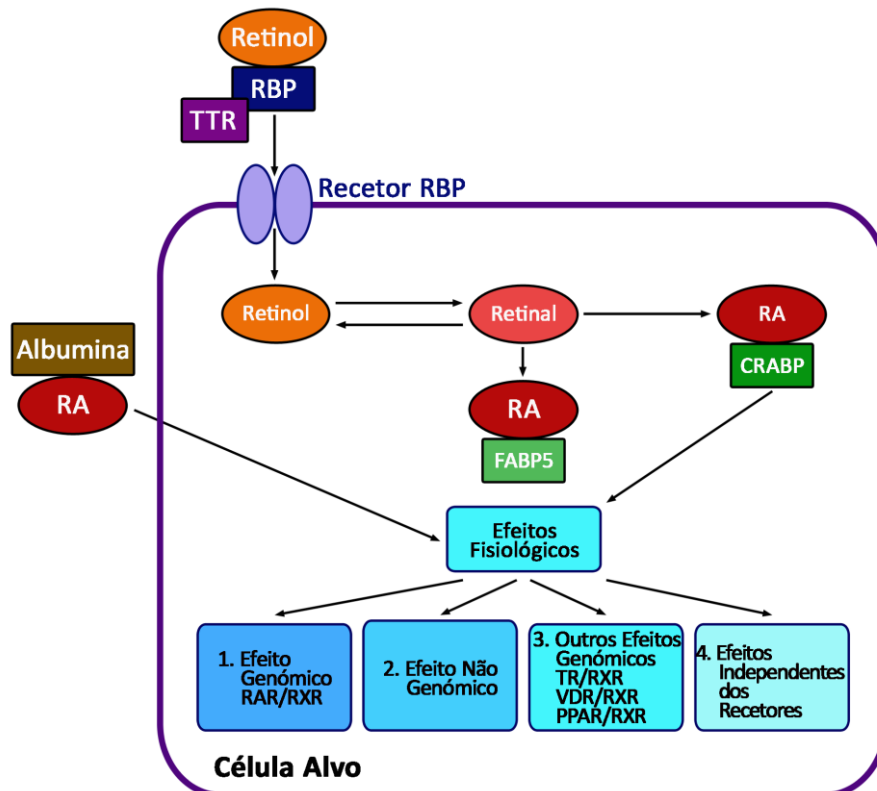
Na ausência de ligandos, os heterodímeros RAR/RXR ligam-se aos elementos de resposta dos RA (RAREs) e estão associados a um grande complexo proteico de correpressores que mantém a estrutura da cromatina compacta e permitem uma repressão transcricional. Contudo, tem também sido sugerido que na ausência de ligandos, apenas uma pequena fração dos heterodímeros está ligada aos RAREs. Quando se combinam com o ligando, os recetores sofrem alterações conformacionais, que resultam na dissociação dos correpressores e recrutamento de proteínas coativadoras, que após associação com a cromatina originam a sua descompactação repressiva e facilitam o processo de transcrição (Bastien e Rochette-Egly, 2004; Samarut e Rochette-Egly, 2012) (Fig. 1.3).

Para além dos efeitos genómicos clássicos, tem sido descrito que a ligação aos RARs induz também respostas não genómicas (Fig. 1.3), tais como uma rápida e transitória ativação de várias cascatas de cinases. Assim, os RA podem também ligar-se a uma subpopulação de RARs ancorados na membrana celular e desencadear a ativação de diversas vias de sinalização celular, contudo pouco se sabe acerca destes mecanismos (Masia *et al.*, 2007; Bruck *et al.*, 2009).

A sinalização dos RA pode também ser mediada por outros recetores que formem dímeros com os RXRs, tais como os PPAR $\beta/\delta$  (Samarut e Rochette-Egly, 2012) (Fig. 1.3).

Atualmente, sabe-se que a ligação dos RA com os PPAR $\beta/\delta$  é mediada pelas proteínas de ligação aos ácidos gordos 5 (FABP 5), que tal como as CRABP-II, são proteínas de ligação específicas que funcionam como transportadores dos RA do citosol para o núcleo, permitindo que estes se liguem aos PPAR $\beta/\delta$  ou aos RARs, respetivamente. Uma vez que a afinidade de ligação dos RA com o complexo CRABP-II/RAR é muito maior que a do complexo FABP 5/PPAR $\beta/\delta$ , o processo dependente dos RARs está predominantemente ativo na maioria das células (Schug *et al.*, 2007). Contudo, nas células com uma elevada razão FABP 5/CRABP-II, os PPAR $\beta/\delta$  são ativados predominantemente, desencadeando atividades antiapoptóticas que superam as atividades inibitórias do crescimento celular dependente dos RARs (Wolf, 2008). Quando os RA se ligam ao PPAR $\beta$  induzem a expressão de genes que afetam a homeostase dos lípidos e da glucose (Bushue e Wan, 2010; Theodosiou *et al.*, 2010).

Na última década tem também sido referido que os RA podem ainda atuar de forma independente dos recetores (Sabichi *et al.*, 2003), contudo pouco se conhece acerca destes mecanismos (Fig. 1.3).



**Figura 1.3** - Efeitos fisiológicos dos ácidos retinoicos (RA). Os RA nas células alvo podem ligar-se aos heterodímeros recetor do ácido retinoico/recetor X do retinoide (RAR/RXR) e desencadear respostas genômicas clássicas, ou respostas não genômicas. Os RA podem também ligar-se a outros heterodímeros, tais como o recetor da tiroide (TR)/RXR, recetor da vitamina D (VDR)/RXR e recetor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)/RXR ou atuarem através de mecanismos independentes dos recetores. CRABP: proteínas celulares de ligação ao ácido retinoico; FABP 5: proteínas de ligação aos ácidos gordos 5; RBP: proteínas séricas de ligação ao retinol; TTR: transtirretina.

### 1.3 Mecanismos de ação dependentes dos recetores dos ácidos retinoicos

Os RARs, uma vez ativados, desencadeiam eventos transcricionais de ativação ou repressão dos genes alvo envolvidos nos mecanismos de diferenciação celular, proliferação e apoptose. Os genes alvo são os iniciadores de uma cascata de ativação de vários outros genes que têm um papel preponderante numa grande variedade de processos biológicos. De referir que já foram identificados mais de 500 genes regulados pelos RA sob várias condições fisiológicas (Balmer e Blomhoff, 2002).

Neste sentido, os RARs parecem desempenhar funções essenciais numa grande variedade de processos biológicos, dos quais se podem destacar a embriogénese, a hematopoiese, a regulação do sistema imunitário e a homeostase celular (Duong e Rochette-Egly, 2011; Samarut e Rochette-Egly, 2012).

A expressão dos recetores RARs e RXRs parece estar associada às sucessivas etapas da embriogénese, desde as fases iniciais de desenvolvimento embrionário até às etapas finais da diferenciação dos vários sistemas de órgãos (Dolle, 2009; Samarut e Rochette-Egly, 2012).

### **1.3.1 Importância dos recetores dos ácidos retinoicos na hematopoiese e no sistema imune**

Os RAR $\alpha$  e RAR $\gamma$  estão expressos em diferentes linhagens celulares do sistema hematopoiético e desempenham um papel importante a nível da hematopoiese (Duong e Rochette-Egly, 2011). De facto, verifica-se que a perda dos RAR $\gamma$  resulta numa redução do número de células indiferenciadas pluripotentes (HSCs), e numa maior diferenciação celular. Contrariamente, a ativação destes recetores origina um aumento na renovação das células HSCs, sugerindo que os RAR $\gamma$  são reguladores críticos no balanço entre a renovação e a diferenciação das células HSCs (Fig. 1.4) (Purton *et al.*, 2006).

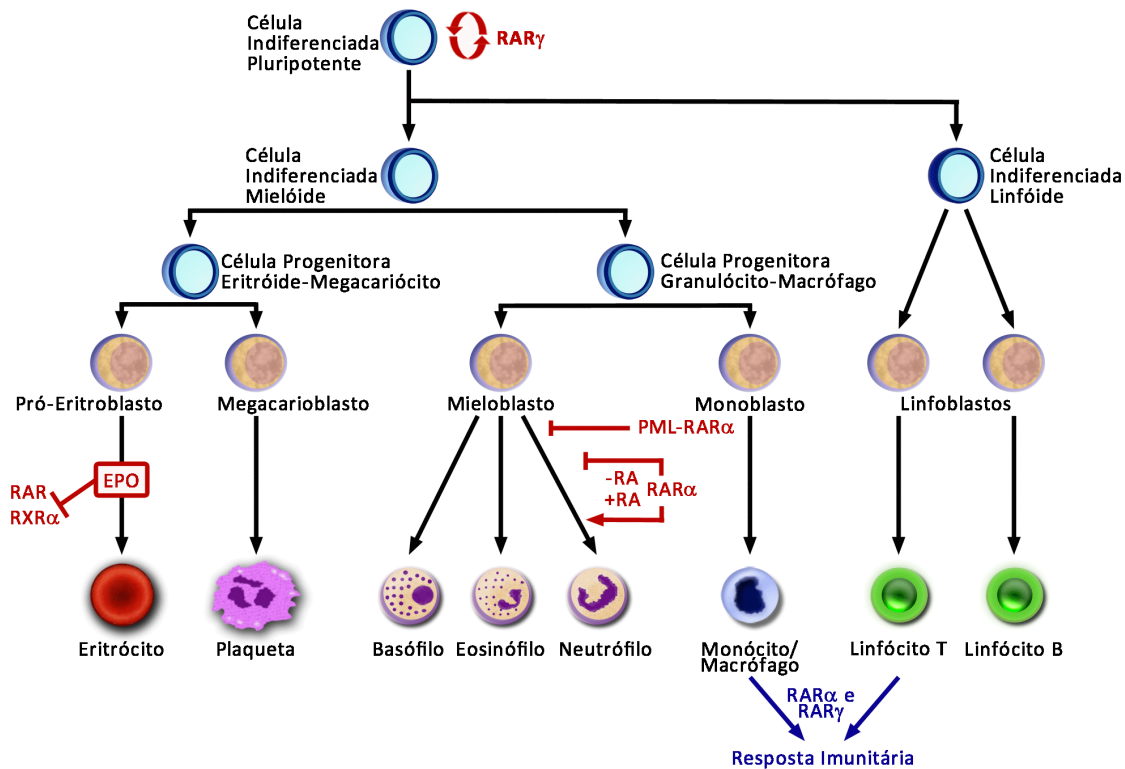
#### **1.3.1.1 Regulação da granulocitopoiese**

Estudos em doentes com leucemia promielocítica aguda (APL) têm revelado um papel crucial dos RARs no processo de maturação terminal dos neutrófilos (Yoo, 2011).

Este tipo de leucemia é caracterizado por uma expansão seletiva de precursores mieloides imaturos, bloqueados no estadio promielocítico da granulocitopoiese. Esta patologia deve-se frequentemente à translocação que ocorre nas células APL entre os cromossomas 15 e 17 t(15;17), que resulta na fusão entre o gene da leucemia promielocítica (*PML*) presente no cromossoma 15 e o gene do *RAR $\alpha$*  presente no cromossoma 17. Esta translocação determina que as células APL expressem invariavelmente a proteína de fusão PML-RAR $\alpha$ . A formação desta proteína de fusão

altera a normal função dos RARs, prevenindo a ativação dos genes alvo e bloqueando a transcrição e diferenciação dos granulócitos (Evans, 2005).

Doses farmacológicas de all-*trans*-RA aumentam a expressão dos genes alvo do *RARα* e permitem a normal diferenciação dos granulócitos, sugerindo que os genes *RARα* podem estar envolvidos na regulação da granulocitopoiese, particularmente no estadiio terminal da diferenciação (Yoo, 2011) (Fig. 1.4).



**Figura 1.4** - Efeitos dos ácidos retinoicos (RA) na hematopoiese e no sistema imunitário. EPO: eritropoietina, RAR: recetor do ácido retinoico, RXR: recetor X do retinoide, *PML*: gene da leucemia promielocítica. Adaptado de (Duong e Rochette-Egly, 2011).

De facto, sabe-se que os genes *RARα* e *RARγ* estão expressos nas linhagens de granulócitos e estão envolvidos no processo de granulocitopoiese, atuando através de fatores de transcrição para regular a expressão de genes alvo específicos. A diferenciação dos neutrófilos é regulada essencialmente pelos *RARα*, que têm um papel bidirecional, inibindo a diferenciação quando não ligados ou ligados aos antagonistas, e promovendo a

diferenciação quando ligados aos RA ou a agonistas específicos dos RAR $\alpha$  (Kastner *et al.*, 2001) (Fig. 1.4).

Um estudo mais recente (Thomas *et al.*, 2012) refere também a importância dos RXRs no desenvolvimento da APL, sendo ainda pouco conhecido o seu mecanismo de ação.

### 1.3.1.2 Regulação da eritropoiese

Durante o desenvolvimento embrionário, na eritropoiese hepática, a expressão genética da eritropoietina (EPO) parece ser regulada pelos recetores dos ácidos retinoicos, principalmente pelo RXR $\alpha$  (Fig. 1.4). O gene da EPO contém uma sequência homóloga DR2 que representa um sítio de ligação para os recetores dos ácidos retinoicos e um elemento de resposta transcricional para estes recetores, o que permite a regulação da expressão da EPO (Makita *et al.*, 2001; Evans, 2005).

A hipoxia é o principal estímulo de produção da EPO, em que os fatores de transcrição induzíveis por hipoxia atuam como reguladores transcricionais por se ligarem a sequências homólogas DR2 (Haase, 2010). No entanto, Okano *et al.* (1994) referiram que os RA estimulam a produção de EPO *in vivo* através de um processo independente da hipoxia, cujo mecanismo não é conhecido.

### 1.3.1.3 Regulação da monocitopoiese e da linfocitopoiese

Durante muito tempo verificou-se que os RA desempenhavam um papel preponderante na resposta do sistema imunitário, desconhecendo-se contudo as suas principais funções. Estudos mais recentes têm sugerido que os RARs têm um papel importante na resposta inata e adaptativa do sistema imunitário, bem como na tolerância imunológica, dado que a deficiência em vitamina A parece estar associada a várias doenças autoimunes e inflamatórias (Manicassamy e Pulendran, 2009).

A função dos RARs na regulação das células mieloides e dendríticas está ainda pouco esclarecida, no entanto é aceite que os heterodímeros RAR $\alpha$ /RXR desempenham um importante papel na diferenciação dos monócitos em células dendríticas (Fig. 1.4). De facto, os RA em conjunto com o fator estimulador de colónias de granulócitos e

macrófagos aumentam a diferenciação dos monócitos em células dendríticas, desempenhando um importante papel na regulação das funções das células apresentadoras de antígeno no intestino, iniciando uma resposta imunitária inata contra agentes patogênicos (Pino-Lagos *et al.*, 2008).

Os RA atuam nos monócitos e macrófagos inibindo a produção de citocinas que favorecem a produção de células Th1 e aumentando a produção de citocinas que favorecem a produção de células Th2 (Pino-Lagos *et al.*, 2008).

Vários estudos têm evidenciado o importante papel dos RARs na regulação dos linfócitos. Os RAR $\alpha$ 1 e RAR $\gamma$ 1 são expressos nos linfócitos humanos B e T, sugerindo que a sinalização dos RA controla o destino dos linfócitos através dos RAR $\alpha$  e RAR $\gamma$  (Ballow *et al.*, 2003). Contudo, os genes alvo que estão envolvidos nos mecanismos de regulação dos linfócitos dependentes dos RA não são ainda conhecidos (Gudas, 2012).

Os RAR $\gamma$  parecem desempenhar um papel importante na regulação dos linfócitos a nível do timo (Gordy *et al.*, 2009). Além disso, tem também sido descrito que as células “naive” T CD4<sup>+</sup> expressam RAR $\alpha$  e RAR $\gamma$  (Hall *et al.*, 2011b) e que os RAR $\alpha$  desempenham um papel importante no processo de ativação das células T CD4<sup>+</sup> (Hall *et al.*, 2011a). Por outro lado, o RAR $\gamma$  desempenha uma importante função na resposta citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Dzhagalov *et al.*, 2007). Todavia, apesar de não se conhecer muito bem o mecanismo de regulação das células T, é possível que os RA regulem o sistema imunitário adaptativo através de um duplo papel, isto é, por um lado promovendo a iniciação da diferenciação das células T efetoras e, por outro lado, diminuindo a resposta das células T inflamatórias nos tecidos (Hall *et al.*, 2011b). Assim, os RA direcionam a resposta de células T de um fenótipo inflamatório Th1/Th17 para uma resposta Th2 (Pino-Lagos *et al.*, 2008). Por outro lado, tem sido referido que os RA impedem o desenvolvimento das células Th17, por aumentarem o desenvolvimento das células T reguladoras, desempenhando um importante papel na regulação da tolerância periférica (Mucida *et al.*, 2007).

### **1.3.2 Importância dos recetores dos ácidos retinoicos na regulação celular**

A ativação dos RARs pelos ligandos desencadeia eventos transcricionais para a ativação ou repressão dos genes alvo envolvidos na diferenciação celular, proliferação e apoptose. As diferentes mutações que ocorrem nos RARs e a fusão com outras proteínas,



alteram o nível de expressão dos RARs ou desencadeiam modificações pós-translacionais que resultam na alteração de funções e desregulação da homeostase celular, com repercussões em diferentes patologias, principalmente no cancro. De facto, verifica-se que os processos iniciais de carcinogénese estão frequentemente associados a uma expressão ou função alterada dos RARs, comprometendo assim as vias de sinalização dos RA (Duong e Rochette-Egly, 2011). De entre os RARs, o RAR $\beta$  é o mais importante na mediação do efeito inibidor dos RA na proliferação celular. A perda ou a redução da expressão dos recetores RAR $\beta$ 2 (Tang e Gudas, 2011) e RAR $\beta$ 5 (Christov, 2009) durante a carcinogénese está frequentemente associada à resistência aos RA, o que sugere que estas duas isoformas podem mediar os efeitos dos RA e atuar como supressores da tumorigénese.

#### 1.4 Efeitos farmacológicos dos retinoides de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração

Na década de 80 foram sintetizados vários retinoides, denominados de retinoides sintéticos, com diferentes aplicações terapêuticas. Os retinoides sintéticos foram classificados em 3 gerações, com base nas suas estruturas químicas. Apesar dos retinoides sintéticos apresentarem algumas características estruturais comuns, diferem entre eles no seu espetro de eficácia clínica, na sua toxicidade e na sua farmacocinética.

Atualmente, os retinoides sintéticos são utilizados como agentes terapêuticos tópicos e sistémicos numa grande variedade de patologias. No entanto, a sua eficácia terapêutica está associada a diversos efeitos adversos que limitam a sua utilização clínica. Os retinoides tópicos podem causar xerose, irritação, eritema e descamação. A terapêutica com retinoides sistémicos pode causar alterações como: queilite, secura das mucosas e fotossensibilidade, bem como hipertrigliceridemia e teratogenicidade, entre outras (Chapman, 2012).

Os retinoides de primeira geração incluem três fármacos, que são constituídos por um grupo cíclico de 6 carbonos, uma cadeia poli-insaturada e um grupo polar na região terminal: a tretinoína (*all-trans*-RA), a isotretinoína (*13-cis*-RA) e a alitretinoína (*9-cis*-RA) (Fig.1.1A). Estes três retinoides são também RA endógenos, que estão presentes no organismo humano em condições fisiológicas, embora em concentrações muito mais baixas que as utilizadas na terapêutica.

## Introdução Geral

A tretinoína tópica é utilizada no tratamento da acne e fotoenvelhecimento (Chapman, 2012). A sua aplicação sistémica é bastante limitada, utilizando-se quase exclusivamente nos casos de APL (Yoo, 2011). De referir que apenas a tretinoína tópica é comercializada em Portugal.

A isotretinoína é o isómero quiral da tretinoína, sendo fisiologicamente interconvertível. A isotretinoína de aplicação tópica e de administração sistémica é utilizada como terapêutica preferencial no tratamento da acne (Rigopoulos *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2011b), sendo também utilizada no tratamento da psoríase e de outras doenças dermatológicas (Ellis e Krach, 2001).

A alitretinoína pode ser administrada oralmente para o tratamento da dermatite crónica das mãos e a nível tópico pode ser utilizada para o tratamento do fotoenvelhecimento da pele, e no linfoma cutâneo das células T (Cheng *et al.*, 2008). Contudo, este retinoide não é comercializado em Portugal.

Os retinoides de 2ª geração são constituídos por uma estrutura aromática, que veio substituir o anel cíclico presente nos retinoides de primeira geração: o etretinato e a acitretina (Fig.1.1B). Foram ambos aprovados para o tratamento sistémico da psoríase. O etretinato é altamente lipofílico e apresenta um tempo de semi-vida de mais de 120 dias, podendo detetar-se no soro em quantidades vestigiais durante 3 anos após o término da terapêutica. Por este motivo, o etretinato foi substituído pela acitretina no tratamento da psoríase, pelo que já não é comercializado em Portugal.

A acitretina apresenta uma eficiência terapêutica semelhante ao etretinato e tem um tempo de semi-vida de cerca de 2 dias, o que permite a sua utilização no tratamento da psoríase (Roche, 2008). A acitretina é também utilizada em distúrbios de queratinização, em certas dermatoses (como é o caso do líquen plano, lúpus eritematoso) e em linfomas cutâneos (Pastuszka e Kaszuba, 2011).

Os retinoides de terceira geração permitem uma resposta mais seletiva e com maior segurança terapêutica. Estes, são constituídos por uma estrutura poliaromática: o tazaroteno, o adapaleno e o bexaroteno.

O tazaroteno (Chandraratna, 1998) e o adapaleno (Shroot e Michel, 1997) ligam-se seletivamente ao RAR $\beta$  e ao RAR $\gamma$ , apresentando pouca afinidade para os RXRs, enquanto o bexaroteno se liga seletivamente aos RXRs fazendo parte da classe dos retinoides (Gniadecki *et al.*, 2007).

O tazaroteno e o adapaleno são utilizados como agentes tópicos no tratamento da psoríase e da acne, sendo apenas o adapaleno comercializado em Portugal.

O bexaroteno é utilizado no tratamento sistémico do linfoma cutâneo das células T do adulto (Gniadecki *et al.*, 2007), contudo também não é comercializado em Portugal.

### 1.5 Isotretinoína: aplicação terapêutica e metabolismo

A isotretinoína de aplicação tópica e sistémica é atualmente utilizada com elevada eficácia terapêutica no tratamento da acne. Inicialmente, o seu uso terapêutico foi limitado aos casos mais severos de acne nódulo-quística (Figueiredo *et al.*, 2011b). Contudo, atualmente, a isotretinoína é também prescrita em casos moderados de acne, que sejam resistentes a terapêuticas convencionais (Rigopoulos *et al.*, 2010).

A isotretinoína apresenta uma biodisponibilidade de cerca de 40%, quando ingerida com alimentos. Após administração oral, o pico de concentração plasmática da isotretinoína é atingido em cerca de 2 a 4 h, apresentando um tempo de semi-vida de cerca de 20 h (Wiegand e Chou, 1998).

No plasma, 99% da isotretinoína liga-se a proteínas, principalmente à albumina (Wiegand e Chou, 1998). As concentrações de isotretinoína no sangue são de cerca de 200-600 ng/mL (1-2  $\mu$ M), após a administração oral de 10-20 mg isotretinoína/dia (Gronhoj Larsen *et al.*, 2009), sendo a concentração máxima tolerada de 5 a 10  $\mu$ M (Armstrong *et al.*, 2005).

A isotretinoína é metabolizada pelo sistema enzimático do citocromo P450. Os principais metabolitos da isotretinoína, após a sua administração farmacológica, são o ácido 13-*cis*-4-oxo-retinoico, o all-*trans*-RA, o ácido all-*trans*-4-oxo-retinoico, o 9-*cis*-RA e o ácido 9-*cis*-4-oxo-retinoico. Estes metabolitos podem ainda sofrer processos de glucoronização. Assim, quando se consideram os efeitos fisiológicos e farmacológicos da isotretinoína, têm também de se considerar as ações biológicas dos diferentes metabolitos, que contribuem para a ação biológica conjunta da isotretinoína (Layton, 2009).

Durante a terapêutica, a isotretinoína e os seus principais metabolitos são excretados em quantidades semelhantes na urina e nas fezes e são geralmente eliminados do organismo após duas semanas do término da terapêutica (Wiegand e Chou, 1998).

No entanto, pouco se conhece acerca das funções fisiológicas e farmacológicas da isotretinoína. A isotretinoína apresenta uma afinidade de ligação com os recetores dos ácidos retinoicos mais baixa do que a tretinoína e a alitretinoína; tem sido proposto que a isotretinoína pode atuar como um precursor destes RA na ativação dos processos

transcricionais (Blaner, 2001). Contudo, alguns estudos têm sugerido que a isotretinoína pode atuar por mecanismos independentes dos RARs, quer na indução de mecanismos de inibição celulares dependentes das mitocôndrias (Guruvayoorappan *et al.*, 2008; Vuletic *et al.*, 2010), quer em diferentes efeitos adversos, observados em doentes tratados com isotretinoína (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011).

### **1.6 Acitretina: aplicação terapêutica e metabolismo**

A acitretina é um retinoide sintético de segunda geração, monoaromático, que substituiu o etretinato no tratamento da psoríase.

A biodisponibilidade da acitretina é de cerca de 60%, quando administrada com alimentos. Atinge o pico de concentração plasmática em cerca de 1 a 5 h e apresenta um tempo de semi-vida de cerca de 48 h (Roche, 2008).

À semelhança da isotretinoína, 99% da acitretina encontra-se ligada a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. A concentração plasmática máxima é de cerca de 196-728 ng/mL (média de 416 ng/mL) após a administração oral de 50 mg de acitretina (Roche, 2008).

O metabolismo primário da acitretina envolve um processo de isomerização com formação do seu principal metabolito, o 13-*cis*-acitretina. Posteriormente, sofre processos de glucoronização e clivagem da cadeia lateral, sendo estes produtos excretados nas fezes (35 a 45%) e na urina (48 a 61%). Pequenas quantidades de acitretina são convertidas a etretinato, em caso de consumo de álcool (Roche, 2008).

Vários estudos referem que a acitretina se liga às CRABP, sendo transportada para o núcleo das células (Pastuszka e Kaszuba, 2011). A acitretina tem também capacidade de ativar todos os RARs, embora não apresente uma elevada capacidade de ligação (LeMotte *et al.*, 1996). Outros estudos têm também referido que a acitretina induz mecanismos de morte celular dependentes das mitocôndrias (Ran *et al.*, 2005), sem contudo se conhecerem os seus mecanismos de ação mitocondrial.

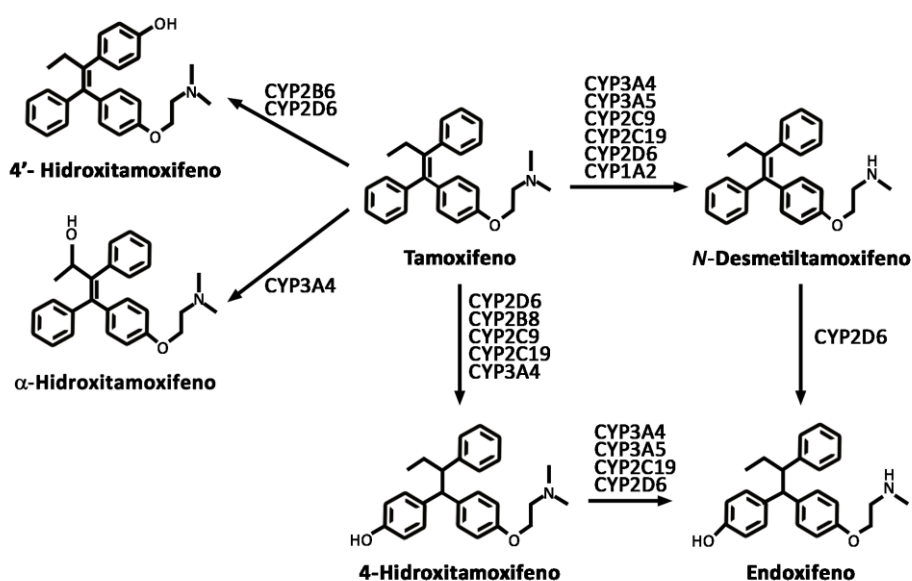
## 2. Fármacos antiestrogénicos

O tamoxifeno (TAM) é um antiestrogénio não-esteróide utilizado no tratamento e na prevenção do cancro da mama (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012).

O metabolismo do TAM é importante para a atividade biológica deste fármaco, dado que os seus metabolitos são em grande parte responsáveis pelos seus efeitos farmacológicos.

### 2.1 Metabolismo do tamoxifeno

O TAM tem sido considerado um "pró-fármaco", que exige ativação metabólica para ter atividade farmacológica. É metabolizado por enzimas hepáticas da fase I e II, incluindo o sistema enzimático do citocromo P450, sulfotransferases e uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferases (Fig. 1.5). O TAM é metabolizado por ação do sistema enzimático do citocromo P450, (CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, CYP1A2 e CYP2B8) em diferentes metabolitos: N-desmetiltamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno (OHTAM),  $\alpha$ -hidroxitamoxifeno e 4'-hidroxitamoxifeno. O N-desmetiltamoxifeno pode ainda ser metabolizado pela CYP2D6 em endoxifeno (EDX), assim como o OHTAM em EDX, por ação das enzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19 e CYP2D6 (Kiyotani *et al.*, 2012).



**Figura 1.5** - Metabolismo do tamoxifeno. Adaptado de (Kiyotani *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm sugerido que existem vários polimorfismos nos genes *CYP2D6* e *CYP3A4* que influenciam as concentrações plasmáticas dos metabolitos ativos do TAM. Esta variabilidade genética pode também ocorrer nos genes das sulfotransferases e uridina 5'-difosfato-glucoronosiltransferases, o que poderá explicar a variabilidade da eficácia e/ou toxicidade do tratamento com o TAM (Damodaran *et al.*, 2012; Kiyotani *et al.*, 2012).

### **2.2 Mecanismos de ação do tamoxifeno e dos seus metabolitos**

Durante muito tempo considerou-se que a atividade antiestrogénica do TAM no cancro da mama se devia à sua grande afinidade para os recetores de estrogénio (ERs) (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), membros da superfamília de recetores nucleares. Considerava-se que a atividade antiestrogénica do TAM era exclusivamente mediada pela inibição competitiva dos estrogénios para os ERs. Contudo, atualmente, sabe-se que os seus metabolitos ativos têm maior afinidade de ligação para os ERs do que o TAM. O OHTAM possui uma afinidade 30 a 100 vezes mais elevada para os ERs e uma maior potência na inibição da proliferação celular, do que o TAM. Muitos estudos evidenciaram que o OHTAM é o metabolito ativo do TAM e é frequentemente utilizado para caracterizar a atividade do TAM *in vitro* (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012).

O EDX tem afinidade de ligação para os ERs, inibe o crescimento das células com recetores de estrogénio [ER(+)] de forma semelhante ao OHTAM, e está presente no plasma em concentrações até 10 vezes superiores ao OHTAM (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012). Por outro lado, alguns estudos sugerem que o TAM e os seus metabolitos ativos podem atuar por vias independentes dos ERs. De facto tem-se verificado que o TAM (Kallio *et al.*, 2005; Siedlakowski *et al.*, 2008) e o OHTAM (Charlier *et al.*, 1995) têm atividade antiproliferativa e pró-apoptótica em células sem recetores de estrogénio [ER(-)] do cancro da mama.

O TAM e o OHTAM são moléculas altamente hidrofóbicas, que se incorporam fortemente nas membranas celulares (Custodio *et al.*, 1991). De facto, ambos se ligam fortemente às proteínas membranares e distribuem-se de forma distinta na bicamada lipídica das membranas, o que contribui para modular a fluidez membranar e influenciar a ação citostática destes dois fármacos (Custodio *et al.*, 1993a; Custodio *et al.*, 1993b; Kazanci e Severcan, 2007). O TAM acumula-se nas mitocôndrias das células de cancro da mama ER(+) (Theodossiou *et al.*, 2012) e induz mecanismos de morte celular programada

por mecanismos dependentes de vias mitocondriais (Kallio *et al.*, 2005; Siedlakowski *et al.*, 2008), que podem contribuir para explicar a ação antiproliferativa independente dos ERs.

A aplicação clínica do TAM é limitada por alguns efeitos adversos, tais como trombose venosa, embolia pulmonar, acidente vascular cerebral (Wong e Ellis, 2004), anemia hemolítica (Cruz Silva *et al.*, 2000) e lesões hepáticas e cardíacas (Kargacin *et al.*, 2000), que podem ocorrer em doentes sob terapêutica com este antiestrogénio. O OHTAM poderá ser usado como alternativa terapêutica ao TAM, por ter uma menor toxicidade (Cruz Silva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002b), maior tolerabilidade (Sauvez *et al.*, 1999) e apresentar uma maior afinidade de ligação com os ERs e um maior potencial antiproliferativo no cancro da mama (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012).

### **2.3 Associação terapêutica dos retinoides com os antiestrogénios**

Os retinoides além de apresentarem uma elevada eficácia terapêutica no tratamento de algumas doenças inflamatórias da pele, têm também um efeito promissor na quimioprevenção do cancro. No entanto, os seus numerosos efeitos adversos e a resistência terapêutica que ocorre, geralmente a longo prazo, limita muitas vezes a sua utilização clínica. Neste sentido, torna-se imprescindível o estudo de novas associações terapêuticas, que permitam uma maior eficiência na quimioprevenção do cancro e no tratamento da psoríase e da acne.

As associações terapêuticas permitem habitualmente aumentar a eficácia terapêutica, por utilizarem agentes farmacológicos com mecanismos de ação complementares, e também por minimizarem os efeitos adversos de cada um individualmente, uma vez que se usam em concentrações terapêuticas mais baixas que as usadas em monoterapia.

A associação terapêutica dos retinoides com os antiestrogénios tem sido utilizada em ensaios clínicos, com bastante sucesso. De facto, alguns estudos têm mostrado que a tretinoína em associação com o TAM inibe sinergisticamente o crescimento de algumas linhas celulares de cancro da mama (Searovic *et al.*, 2009; Koay *et al.*, 2010). Contudo, os mecanismos de ação conjuntos, destas duas famílias de fármacos, permanecem em grande parte por esclarecer.

A associação terapêutica dos retinoides com o OHTAM poderá constituir uma alternativa ao uso do TAM, devido à sua maior eficácia antiestrogénica (Goetz *et al.*, 2008;

Kiyotani *et al.*, 2012), à sua menor toxicidade (Cruz Silva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002b) e maior tolerabilidade (Sauvez *et al.*, 1999), constituindo uma associação terapêutica bastante promissora na quimioprevenção do cancro.

### **3. Toxicidade mitocondrial dos retinoides e antiestrogénios**

As mitocôndrias são organelos intracelulares que apresentam um papel preponderante na manutenção da homeostase celular. Têm importantes funções a nível metabólico, sendo consideradas a principal fonte de energia celular. Por outro lado, as mitocôndrias desempenham também importantes funções na homeostase e sinalização do cálcio, na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e na regulação de processos apoptóticos e necróticos (Heller *et al.*, 2012; Pizzo *et al.*, 2012).

As alterações nas funções mitocondriais podem estar associadas a diferentes patologias. Contudo, o grupo de doenças mitocondriais é altamente heterogéneo e inclui vários fenótipos clínicos, o que torna muitas vezes difícil o seu diagnóstico. Os diferentes fenótipos devem-se frequentemente ao diferente número de mitocôndrias presente em cada célula, que depende das necessidades energéticas e, conseqüentemente, do tipo de célula. Os órgãos metabolicamente ativos, tais como o fígado, o cérebro, o músculo cardíaco e esquelético são os primeiros órgãos a serem afetados pelas disfunções mitocondriais. As disfunções mitocondriais estão principalmente relacionadas com doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (Heller *et al.*, 2012; Shoshan-Barmatz e Ben-Hail, 2012).

As doenças mitocondriais incluem muitas vezes disfunções causadas por mutações no DNA nuclear ou no DNA mitocondrial (mtDNA), que afetam principalmente as proteínas do sistema transportador de eletrões e, conseqüentemente, a produção de energia, produção de ROS e homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas doenças exibem frequentemente características miopáticas e neurológicas, nomeadamente ataxia, convulsões, demência, fraqueza muscular, nefropatia sensorial e atraso no desenvolvimento. A intolerância ao exercício físico, cardiomiopatias, atrofia ótica, acidose láctica e diabetes *mellitus* são também atualmente reconhecidas como fenótipos clínicos comuns de doenças mitocondriais (Heller *et al.*, 2012).



As disfunções mitocondriais estão também frequentemente relacionadas com múltiplos mecanismos de carcinogénese. As mutações no DNA nuclear ou no mtDNA que afetem componentes do sistema transportador de eletrões resultam numa ineficiente produção de ATP, aumento da produção de ROS e danos oxidativos na mitocôndria e noutras macromoléculas (incluindo DNA, que provavelmente favorece a instabilidade cromossómica e os processos de carcinogénese). De facto, vários polimorfismos genéticos e mutações no mtDNA estão correlacionados com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças malignas, tais como o cancro da mama, da próstata e da tiroide (Fulda *et al.*, 2010; Scatena, 2012).

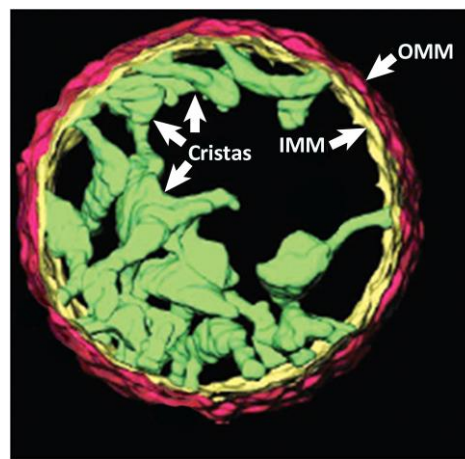
### 3.1 Estrutura e morfologia das mitocôndrias

As mitocôndrias apresentam características estruturais únicas, que diferem dos outros organelos intracelulares principalmente por apresentarem uma dupla membrana e material genómico. As mitocôndrias são formadas por uma membrana mitocondrial externa (OMM), topologicamente simples, permeável a pequenas moléculas e iões, que se movem livremente através de canais transmembranares formados por uma família de proteínas denominadas canais aniónicos dependentes de voltagem (VDAC). A membrana mitocondrial interna (IMM) separa o espaço intermembranar da matriz mitocondrial e apresenta estruturas idênticas a vilosidades, denominadas de cristas, que permitem aumentar a sua área de superfície. Contrariamente à OMM, a IMM apresenta uma baixa permeabilidade a iões e solutos, permitindo um fluxo altamente regulado por uma série de canais e transportadores mitocondriais. Na IMM localizam-se os complexos do sistema transportador de eletrões e do sistema fosforilativo. A matriz mitocondrial contém enzimas envolvidas em diferentes processos metabólicos, tais como a gluconeogénese, o ciclo do ácido cítrico, a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, a síntese do grupo heme, aminoácidos, hormonas esteroides, o ciclo do ferro e o ciclo da ureia. A matriz mitocondrial contém também o mtDNA que consiste num pequeno cromossoma circular, que não apresenta histonas, não tem intrões e tem uma fraca capacidade de reparação (Detmer e Chan, 2007; Rasola e Bernardi, 2007).

O tradicional conceito da mitocôndria como uma estrutura redonda, estática e autónoma, tem vindo a mudar nos últimos anos (Fig. 1.6). Estudos recentes têm mostrado que a estrutura mitocondrial é altamente dinâmica. A forma, tamanho e número das

## Introdução Geral

mitocôndrias nas células é variável, podendo mudar de estruturas pequenas, esferas individuais e pequenas barras para longos túbulos e complexas estruturas de rede interconectadas, em resposta ao estado fisiológico. A morfologia da mitocôndria depende do balanço entre os processos de fusão e de fissão. Quando este balanço é comprometido, ocorrem grandes mudanças na forma mitocondrial. Um aumento da fissão desencadeia um processo de fragmentação, enquanto que um aumento da fusão desencadeia um processo de alongação. Além dos processos de fusão e fissão as mitocôndrias são transportadas ativamente nas células, apresentando uma distribuição subcelular, que permite o recrutamento das mitocôndrias para as regiões mais ativas das células (Detmer e Chan, 2007; Heller *et al.*, 2012).



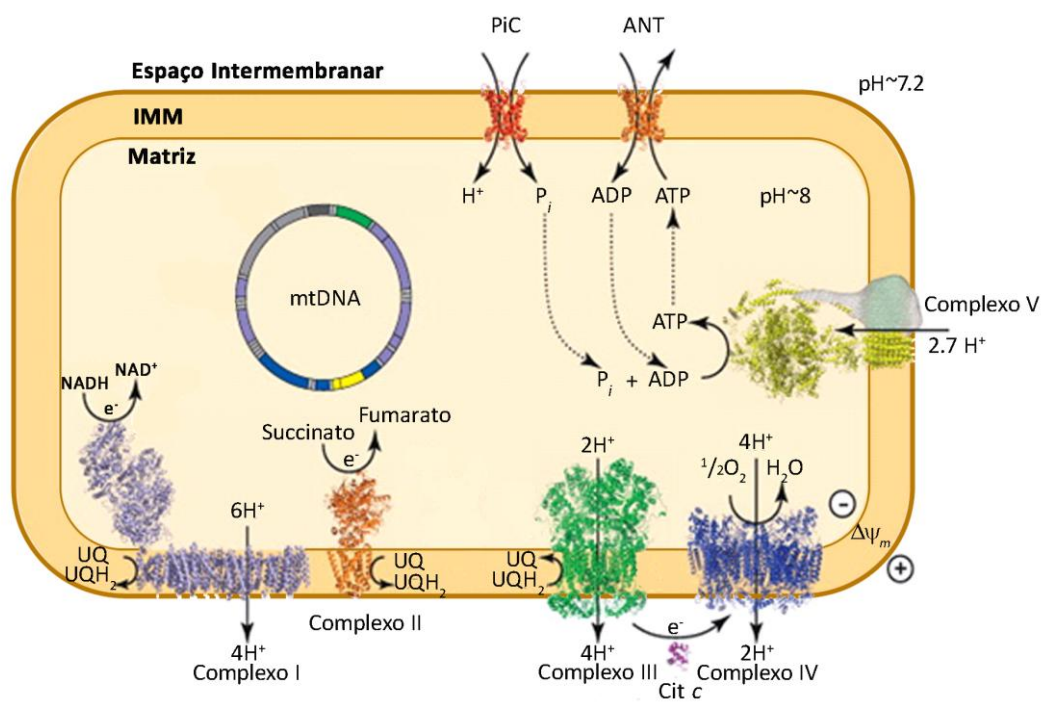
**Figura 1.6** - Estrutura da mitocôndria visualizada por tomografia eletrônica. OMM: membrana mitocondrial externa, IMM: membrana mitocondrial interna. Adaptado de (Lizana *et al.*, 2009).

### **3.2 Função bioenergética das mitocôndrias**

Nas células eucarióticas, a síntese de ATP proveniente da fosforilação oxidativa representa cerca de 80-90% do ATP produzido a nível celular. Na fosforilação oxidativa, os equivalentes redutores na forma de cofatores reduzidos [nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e dinucleótido de flavina e adenina (FADH<sub>2</sub>)] provenientes da oxidação do piruvato, do catabolismo dos ácidos gordos e aminoácidos e, por último, do ciclo de Krebs, doam os elétrons para o sistema de transporte. A fosforilação oxidativa envolve o transporte de elétrons, através do sistema de transporte, que se deve a uma diferença de potencial redox, que por sua vez ativa as bombas de prótons presentes na

IMM, permitindo a formação de potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) que é usado pelo sistema fosforilativo para sintetizar ATP (Kadenbach, 2003).

O sistema transportador de elétrons consiste em quatro complexos designados como complexo I (NADH-UQ redutase, NADH-ubiquinona oxidoreductase ou NADH desidrogenase), complexo II (succinato-UQ redutase, succinato-ubiquinona oxidoreductase ou succinato desidrogenase), complexo III (ubiquinol citocromo *c* redutase, ubiquinol citocromo *c* oxidoreductase), complexo IV (citocromo *c* oxidase) e por duas moléculas redox ativas, a coenzima Q ou ubiquinona, que está na bicamada lipídica da IMM e o citocromo *c*, que está localizada na superfície externa da IMM. Associado ao sistema de transporte de elétrons existe o sistema fosforilativo constituído pelo complexo V (ATP sintase ou F1FoATPase), pelo transportador de nucleótidos de adenina (ANT) e pelo transportador de fosfato (PiC) (Kadenbach, 2003; Lenaz e Genova, 2009) (Fig. 1.7).



**Figura 1.7** - Representação esquemática do sistema de oxidação fosforilativo constituído pelos complexos I, II, III, IV e V com os seus substratos e cofatores; bem como o transportador de nucleótidos de adenina (ANT) e o transportador de fosfato (PiC). Cit *c*: citocromo *c*;  $\Delta\psi$ : potencial de membrana; IMM: membrana mitocondrial interna; mtDNA: DNA mitocondrial;  $\text{NAD}^+$ : nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada); NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida);  $\text{P}_i$ : fosfato inorgânico; UQ: coenzima Q ou ubiquinona,  $\text{UQH}_2$ : ubiquinol. Adaptado de (Smith *et al.*, 2012).

O complexo I oxida o NADH e catalisa dois processos simultaneamente, a transferência de um hidreto para a ubiquinona ficando esta na sua forma reduzida, o ubiquinol, e a transferência de um próton da matriz para o espaço intermembranar. O complexo II é um complexo enzimático que está ligado à IMM e permite a transferência de elétrons do FADH<sub>2</sub> para a ubiquinona, contudo não contribui para a formação do potencial eletroquímico. A ubiquinona, uma vez reduzida, transfere os elétrons para o complexo III. No complexo III, os elétrons são transferidos para o citocromo *c*, sendo este fluxo de elétrons acompanhado por um fluxo de prótons da matriz para o espaço intermembranar. O complexo IV transfere os elétrons do citocromo *c* para o O<sub>2</sub> reduzindo-o e produzindo H<sub>2</sub>O, contribuindo também com o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranar (Lenaz e Genova, 2009; Dudkina *et al.*, 2010) (Fig. 1.7).

Assim, os complexos I, III e IV bombeiam os prótons através da IMM, à medida que os elétrons passam através do sistema de transporte de elétrons, produzindo uma diferença de potencial eletroquímico através da IMM, conhecida como força protomotriz ( $\Delta p$ ). A força protomotriz, também designada de gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) consiste num gradiente elétrico (potencial de membrana,  $\Delta\psi$ ) e num pequeno gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ):  $\Delta p = \Delta\psi - 59\Delta\text{pH}$ . De uma forma geral, o  $\Delta\psi$  representa cerca -150 a -180 mV, de uma força protomotriz de cerca de -200 a -220 mV (Newmeyer e Ferguson-Miller, 2003; Lenaz e Genova, 2009).

O complexo V é constituído por uma região F<sub>1</sub> na matriz mitocondrial e por uma região F<sub>o</sub>, ligada à IMM. Este complexo sintetiza o ATP, a partir do ADP e do fosfato inorgânico (Pi), que são transportados do citoplasma para a matriz mitocondrial pelo ANT e pelo PiC, respetivamente. Assim, o complexo V sintetiza o ATP na região F<sub>1</sub>, usando a força protomotriz desenvolvida ao longo da IMM, em que o gradiente de prótons atravessa a IMM do espaço intermembranar para a matriz através da fração F<sub>o</sub> (Fig. 1.7). O complexo V tem também a capacidade de hidrolisar o ATP, consoante as condições fisiológicas (Jonckheere *et al.*, 2012).

Recentemente, alguns estudos têm referido a existência de supercomplexos respiratórios altamente ordenados, formados pela associação entre o complexo I e III; ou pela associação entre o complexo I, III e IV, que apresentam uma maior eficiência na transferência de elétrons ao longo do sistema de transporte de elétrons. Foram também descritos outros supercomplexos, com a presença do complexo II e do complexo V (Lenaz e Genova, 2009; Dudkina *et al.*, 2010). O complexo V também pode organizar-se em dímeros ou oligómeros maiores, o que suporta a hipótese de um arranjo oligomérico na

membrana. A formação de dímeros e outros oligómeros permite uma maior estabilidade do complexo V, facilitando a síntese de ATP (Dudkina *et al.*, 2010; Jonckheere *et al.*, 2012). O complexo V pode também formar um complexo com o ANT e com o PiC (Luzikov, 2009). Contudo, os supercomplexos respiratórios poderão coexistir na membrana com os complexos simples do sistema de oxidação fosforilativo (Lenaz e Genova, 2009; Dudkina *et al.*, 2010).

Atualmente, sabe-se que nem toda a energia disponível no gradiente eletroquímico está associada à síntese de ATP. Alguma energia é consumida pela fuga de prótons, uma vez que os prótons bombeados para fora da matriz são capazes de passar através da membrana de volta para a matriz. Este processo de fuga de prótons não produtivo é importante a nível fisiológico, nomeadamente na termogénese, na regulação do metabolismo energético, no controlo da massa corporal e na diminuição da produção de ROS (Echtay, 2007).

Nos mamíferos existem 5 proteínas dissociadoras (UCP 1-5) que são membros da família de proteínas transportadoras mitocondriais presentes na IMM e que dissipam o gradiente de prótons gerado pelo sistema de transporte de eletrões. É aceite que as proteínas UCP 1-3 desempenham funções na termogénese em certos tecidos, no metabolismo dos ácidos gordos, medeiam a secreção de insulina e protegem da produção de ROS. Contudo, pouco se conhece acerca das funções fisiológicas da UCP 4 e 5 (Echtay, 2007).

Nas células, o principal local de produção não enzimática de ROS é o sistema de transporte de eletrões, particularmente os complexos I e III, que contêm vários centros redox capazes de transferir um eletrão para o oxigénio formando o anião radical superóxido. Em condições fisiológicas, cerca de 1 a 2% do oxigénio consumido durante o processo de respiração mitocondrial é convertido no anião radical superóxido (Ott *et al.*, 2007).

A produção de ROS no metabolismo aeróbico encontra-se normalmente em equilíbrio com os antioxidantes fisiológicos. Este sistema de antioxidantes pode ser classificado em dois grupos principais: enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular. As enzimas incluem a manganésio superóxido dismutase, a cobre/zinco superóxido dismutase, a glutatona peroxidase, a glutatona redutase e a catalase. Os antioxidantes de baixo peso molecular incluem o ascorbato (Asc), a glutatona (GSH), os compostos fenólicos e os tocoferóis (Echtay, 2007).

Quando ocorre uma desregulação na produção de ROS e/ou nas defesas antioxidantes, ocorre um processo de stresse oxidativo, com oxidação de proteínas, lípidos e de mtDNA. A peroxidação lipídica pode causar alterações na fluidez e permeabilidade da membrana, inibição de processos metabólicos e alterações no transporte de iões. Por outro lado, a peroxidação lipídica pode levar a um posterior aumento na produção de ROS. O dano oxidativo induzido pelos ROS é provavelmente a principal fonte de instabilidade genómica, que leva à disfunção do sistema de transporte de eletrões (Echtay, 2007; Kowaltowski *et al.*, 2009).

A produção de ROS é altamente dependente do potencial mitocondrial. Altos potenciais de membrana são acompanhados por baixas taxas respiratórias, que estimulam a produção de ROS por aumentarem a tensão de oxigénio nos tecidos e aumentarem o tempo de vida dos intermediários altamente reativos do sistema de transporte de eletrões. Por outro lado, um rápido metabolismo resulta numa maior fuga de eletrões do sistema de transporte e conseqüente aumento na produção de ROS. Contudo, um estado de baixa dissociação constituído por proteínas dissociadoras ou dissociadores químicos diminui a produção de ROS (Brookes *et al.*, 2004).

### **3.3 Mecanismos de transporte através das membranas mitocondriais**

A mitocôndria apresenta uma grande quantidade de canais iónicos que permitem a sua comunicação com o citosol. Existem múltiplos canais iónicos, presentes na membrana interna e externa da mitocôndria, que estão envolvidos num amplo conjunto de processos celulares, nomeadamente na produção de ATP, de esteroides, na síntese do grupo heme e nos mecanismos de apoptose (Peixoto *et al.*, 2010).

Na IMM existem canais seletivos e várias proteínas transportadoras mitocondriais que permitem a comunicação entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranar.

Têm sido identificados vários canais seletivos mitocondriais, tais como os canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , bem como vários trocadores de catiões, tais como  $\text{K}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  (Bernardi, 1999). Outros canais, têm também sido estudados ao longo de vários anos, como é o caso do canal mitocondrial de cloreto e do canal aniónico da membrana interna (IMAC), que é um canal seletivo de aniões, que conduz aniões mono, di e tri-valentes (Peixoto *et al.*, 2010).

De entre as proteínas transportadoras mitocondriais presentes na IMM podem destacar-se o ANT e o PiC, que fazem parte do sistema fosforilativo mitocondrial. O ANT é a proteína mais abundante na IMM, que tem uma função central no metabolismo energético e está envolvido na regulação de mecanismos de morte celular (Dorner e Schultheiss, 2007).

Foram identificadas 4 isoformas humanas altamente homólogas (ANT1-4) codificadas por distintos genes, que têm uma expressão característica em cada tecido. O ANT1 é expresso maioritariamente nos tecidos com altas necessidades energéticas, tais como o músculo cardíaco, esquelético e cérebro. Em contraste, o ANT2 está presente em células com crescimento celular moderado e é a isoforma prevalente na maioria dos outros tecidos. O gene do ANT3 tem características de “housekeeping” e apresenta uma baixa expressão a nível celular. A expressão do ANT4 ocorre principalmente no fígado, testículos e nas células estaminais indiferenciadas do embrião (Dorner e Schultheiss, 2007). É aceite que as isoformas ANT1 e ANT3 têm propriedades pró-apoptóticas, enquanto as isoformas ANT2 e ANT4 têm funções antiapoptóticas nas células tumorais (Gallerne *et al.*, 2010; Brenner e Moulin, 2012).

O ANT catalisa seletivamente a troca eletrogénica e reversível do ADP pelo ATP, com uma estequiometria de 1:1. O antiporte é efetuado pela troca de  $\text{ATP}^{4-}$  por  $\text{ADP}^{3-}$ , em que a direção do transporte de nucleótidos é determinada pelo potencial mitocondrial produzido pela fosforilação oxidativa. Em condições fisiológicas o ATP é transportado para fora da mitocôndria, sendo o ADP transportado para o interior, embora o transporte contrário possa ocorrer, geralmente em condições de anoxia e isquémia (Nury *et al.*, 2006; Dorner e Schultheiss, 2007). Tem sido descrito que as isoformas ANT1 e ANT3 exportam o ATP proveniente da fosforilação oxidativa, e que a isoforma ANT2 está relacionada com o metabolismo glicolítico, e é um indicador importante da carcinogénese (Chevrollier *et al.*, 2011).

A ligação assimétrica de duas classes de inibidores permitiu a caracterização de dois estados conformacionais estáveis do ANT. O atractilosídeo (ATR) e o seu derivado carboxiatractilosídeo (CAT) são inibidores competitivos do transporte de nucleótidos pelo ANT. A ligação destes inibidores ao lado citosólico causa a transição do ANT para a sua conformação *c*, se bem que a ligação de outros inibidores competitivos, tal como o ácido bongkréquico, causa uma transição para a conformação *m* (Pebay-Peyroula e Brandolin, 2004; Nury *et al.*, 2006).

O PiC catalisa o transporte de Pi do citosol para a matriz, de forma dependente do gradiente mitocondrial, por um mecanismo de simporte ( $\text{Pi}/\text{H}^+$ ) ou de antiporte ( $\text{Pi}/\text{OH}^-$ ). Este transportador é constituído por duas isoformas, o PiA e o PiB, sendo o PiA expresso principalmente no músculo e o PiB tem uma expressão ubíqua (Kramer, 1996; Palmieri, 2008).

Na OMM, o VDAC é o principal transportador proteico, que medeia a comunicação entre a mitocôndria e o citosol, constituindo a principal via de entrada de metabolitos e iões através da OMM (Grimm e Brdiczka, 2007). Por outro lado, tem sido sugerido que o VDAC desempenha um papel importante na regulação de mecanismos de morte celular (Shoshan-Barmatz e Ben-Hail, 2012).

Atualmente, são conhecidas três isoformas da VDAC (1-3), que são codificadas por três genes diferentes, sendo a isoforma VDAC1 a mais abundante na maioria das células (Shoshan-Barmatz e Ben-Hail, 2012).

No seu estado aberto, o VDAC é um canal seletivo, que permite a passagem de metabolitos, tais como ATP, ADP e Pi; permite, ainda, a livre difusão de catiões, incluindo  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  e não eletrólitos de diâmetro inferior a 3 nm. Quando o canal está no estado fechado o poro permite apenas a passagem de moléculas com um diâmetro inferior a 1,8 nm, favorecendo a permeabilidade de catiões (O'Rourke, 2007; Peixoto *et al.*, 2010).

### **3.4 Importância da mitocôndria na regulação do cálcio**

A mitocôndria desempenha um importante papel na regulação da concentração de cálcio celular. O cálcio exógeno é acumulado a nível mitocondrial por meio de transportadores que facilitam o seu transporte através da IMM para dentro da matriz mitocondrial (Rasola *et al.*, 2010; Starkov, 2010).

A entrada do cálcio na matriz mitocondrial ocorre através de canais electrogénicos presentes na IMM, sendo o sistema uniporta de cálcio o mais descrito atualmente. Embora ainda se desconheça a estrutura deste canal, sabe-se que o sistema uniporta de cálcio é um canal iónico altamente seletivo ao cálcio, que é inibido pelo vermelho de ruténio, ruténio 360 e lantanídeos. O influxo de cálcio via sistema uniporta de cálcio depende do gradiente electroquímico de cálcio e a sua velocidade de entrada aumenta com o potencial mitocondrial (Crompton, 1999; Gunter *et al.*, 2004). Foram descritos outros dois mecanismos de entrada de cálcio na mitocôndria, um através do canal de aporte rápido de



cálcio e outro através do recetor ryanodina, que permanecem ainda em grande parte por esclarecer (Ryu *et al.*, 2010).

Os processos de efluxo de cálcio ocorrem principalmente por ação dos trocadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  e  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$  presentes na IMM, por reversão do sistema uniporta de cálcio e por indução do poro da permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) (Lemasters *et al.*, 2009; Starkov, 2010).

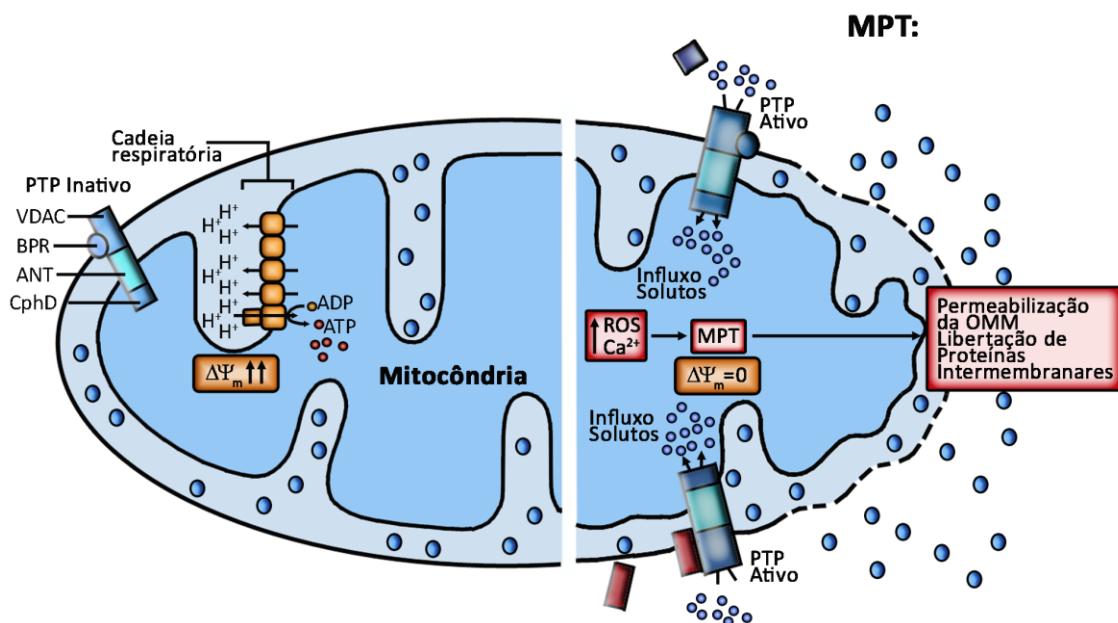
O aumento da concentração intramitocondrial de cálcio desencadeia diferentes efeitos mitocondriais. A captação de cálcio leva à diminuição transiente do potencial mitocondrial e ao aumento do transporte de eletrões, que em algumas condições diminui a formação de ROS. Por outro lado, a acumulação excessiva de cálcio estimula o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, o que pode aumentar a formação de ROS e levar, conseqüentemente, à indução da MPT e à inibição do sistema de transporte de eletrões (Kowaltowski *et al.*, 2009).

### 3.5 Importância da permeabilidade transitória mitocondrial

O mecanismo de regulação da MPT e a estrutura do poro da MPT permanecem ainda por esclarecer. Contudo, é aceite que a indução da MPT é um processo dinâmico, que pode ser reversível ou irreversível. A MPT pode compreender aberturas transientes, que têm sido descritas como conversões rápidas de baixa condutância do canal, que levam à libertação do cálcio da mitocôndria quando se forma um gradiente de concentração entre a matriz e o meio externo. As aberturas transientes da MPT contribuem assim para a homeostase do cálcio a nível mitocondrial, atuando como um rápido mecanismo de libertação do cálcio. Estas aberturas transientes da MPT não estão associadas com alterações mitocondriais irreversíveis, mas sim com papéis fisiológicos da MPT, tais como a regulação do importe de proteínas, do volume e pH da matriz, remodelação da crista, equilíbrio redox e libertação do cálcio (Rasola *et al.*, 2010).

A abertura prolongada do poro da MPT constitui um processo irreversível na indução da morte celular. Nestas situações a MPT assume um estado de alta condutância que permite a entrada desregulada de pequenos solutos da matriz mitocondrial com base no seu gradiente eletroquímico. A extensão celular da indução da MPT determina se a célula vai ativar mecanismos apoptóticos ou necróticos, dependendo da concentração intracelular de ATP (Rasola e Bernardi, 2011; Brenner e Moulin, 2012).

A MPT resulta numa dissipação imediata do potencial de membrana mitocondrial. A mitocôndria despolariza devido ao equilíbrio do gradiente de prótons e à dissipação inicial que é seguida pela perda de nucleótidos de piridina da matriz, resultando da inibição respiratória e da produção de ROS. A fosforilação e síntese de ATP cessa e o complexo V do sistema fosforilativo começa a atuar de forma reversa, hidrolisando o ATP produzido pela glicólise ou por uma função mitocondrial residual, o que desencadeia uma rápida falha na bioenergética mitocondrial. Iões e solutos com peso molecular menor que 1500 kDa passam através da IMM, induzindo a rutura dos gradientes metabólicos e a libertação do cálcio armazenado na matriz. A pressão colóide osmótica exercida pela alta concentração proteica na matriz causa o intumescimento mitocondrial (Fig. 1.8). As cristas da IMM desdobram-se e eventualmente levam à rutura da OMM, dado que a superfície da IMM excede consideravelmente a área da OMM, levando à libertação de proteínas intermembranares, que incluem o citocromo *c*, ativadores de caspases e efetores de morte celular independentes de caspases (Rasola *et al.*, 2010).



**Figura 1.8** - Esquema representativo do processo de permeabilidade transitória mitocondrial (MPT). ANT: transportador de nucleótidos de adenina; BPR: recetor periférico das benzodiazepinas; CphD: ciclofilina D;  $\Delta\psi$ : potencial de membrana; OMM: membrana mitocondrial externa; PTP: poro da permeabilidade transitória mitocondrial; ROS: espécies reativas de oxigénio; VDAC: canais aniônicos dependentes de voltagem. Adaptado de (Fulda *et al.*, 2010).

A permeabilização da IMM surge, por vezes, depois da indução da apoptose, após a libertação do citocromo *c* e da ativação das caspases; assim, tem sido referido que a MPT pode também surgir como uma consequência e não como a causa da indução de mecanismos de apoptose. Outros modelos da permeabilização da OMM sugerem que os mecanismos de apoptose podem ocorrer sem indução da MPT (Smith *et al.*, 2008).

A composição do poro da MPT permanece controversa. Alguns estudos têm sugerido que a ciclofilina D (CphD) presente na matriz mitocondrial, o ANT presente na IMM, o VDAC na OMM e, possivelmente, outras proteínas formem o poro da MPT. Está também descrito que a ciclosporina A (CyA) é um inibidor específico da MPT, por se ligar à CphD, inibindo a formação do poro (Crompton, 1999; Kroemer *et al.*, 2007) (Fig. 1.8). Contudo, alguns estudos em ratinhos “knockout”, mostraram que a MPT pode ocorrer em mitocôndrias que não têm as proteínas ANT, VDAC ou CphD isoladamente, embora algumas propriedades do poro da MPT apresentem alterações nestes casos (Lemasters *et al.*, 2009). Têm sido referidas, ainda, outras proteínas com funções reguladoras importantes, que não são consideradas como parte do próprio poro. Incluem-se algumas proteínas anti e pró-apoptóticas que são membros da família da Bcl-2, a creatina cinase mitocondrial, a hexocinase, o recetor periférico das benzodiazepinas (Zorov *et al.*, 2009) e o transportador de fosfato (Leung *et al.*, 2008).

Existe um modelo alternativo para a formação da MPT, que se baseia na agregação de proteínas membranares “misfolded”. O transporte através destas proteínas é normalmente bloqueado pela CphD ou por outras chaperonas. A acumulação de cálcio ou o stresse oxidativo aumentam a quantidade de proteínas “misfolded”. Quando o número de proteínas agrupadas excede o número de chaperonas necessárias para bloquear o transporte, ocorre a abertura do poro, de forma desregulada, não sensível aos inibidores da MPT, como a CyA. Contudo, este modelo não explica mais de metade das conhecidas características da MPT, nomeadamente a rápida reversibilidade pela quelatação do cálcio, a sensibilidade para a regulação do pH da matriz, a voltagem transmembranar, o tamanho fixo do poro, entre outros (Starkov, 2010).

A abertura do poro da MPT, que é dependente do cálcio, pode ser desencadeada por alguns efeitos diretos e indiretos. Existem vários fatores que regulam a abertura do poro da MPT. O principal modulador da abertura do poro é o  $\text{Ca}^{2+}$ , que pode ser inibido competitivamente por outros iões, como o  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e pelo Pi. A concentração de protões também regula a MPT, sendo o pH ótimo da matriz de 7,4 para a abertura do poro, embora a probabilidade de abertura diminua para valores de pH mais baixos. A MPT é

também dependente do potencial mitocondrial, que estabiliza o poro na sua conformação fechada, e do fluxo de elétrons do complexo I do sistema de transporte de elétrons, dado que um aumento do fluxo aumenta a probabilidade de abertura (Rasola *et al.*, 2010; Bernardi e von Stockum, 2012). Têm também surgido evidências de que o stresse oxidativo desencadeia a abertura do poro da MPT, por oxidação dos grupos tiólicos presentes nas proteínas membranares. De acordo com este modelo, a oxidação dos grupos GSH, NADH e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) durante a produção excessiva de ROS favorece a formação de ligações dissulfureto e a consequente abertura do poro (Crompton, 1999). O stresse oxidativo está suposto poder atuar diretamente no ANT. De facto, existem dois grupos tiólicos da cisteína, que estão implicados nas reações redox que alteram as conformações do ANT (Grimm e Brdiczka, 2007). O ATR e o CAT, que são inibidores do ANT, e o estabilizam na sua conformação *c*, também induzem a MPT (Pebay-Peyroula e Brandolin, 2004; Nury *et al.*, 2006).

Uma grande variedade de compostos endógenos, tais como ferro, ROS, óxido nítrico, ácidos gordos livres (e derivados da acetil-CoA), ceramida e sais biliares estão também descritos como indutores da abertura do poro da MPT. Pelo contrário, a depleção de inibidores endógenos da MPT, tais como a glucose, ATP, creatina fosfato e a GSH podem também desencadear a MPT. Esta pode ainda ser desencadeada por citocinas extracelulares, tais como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  e o ligando Fas, que atuam através dos seus recetores membranares citoplasmáticos. A MPT pode ainda ser induzida por alguns agentes químicos (Labbe *et al.*, 2008).

As células dos mamíferos apresentam dois mecanismos de apoptose, que são conhecidos como processos intrínsecos e extrínsecos. As mitocôndrias são consideradas elementos reguladores dos processos intrínsecos de apoptose. Os mecanismos extrínsecos de apoptose são ativados por recetores de morte celular, e podem também ativar os mecanismos intrínsecos de apoptose (Shoshan-Barmatz e Ben-Hail, 2012).

O processo de morte celular dependente da mitocôndria (ou intrínseco) é ativado por diversos estímulos, incluindo fatores de crescimento, lesões no DNA, radiações ultravioleta (UV), radiações gama e agentes quimioterapêuticos (Pradelli *et al.*, 2010). A mitocôndria controla a ativação de mecanismos efetores de apoptose por regular a translocação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intramembranar para o citosol (Fulda *et al.*, 2010).

Após um estímulo apoptótico, a mitocôndria tem um papel importante nos mecanismos de apoptose por libertar vários fatores apoptogénicos, tais como o

citocromo *c*, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, o fator de indução da apoptose e a endonuclease G do espaço intermembranar para o citosol (Tsujimoto *et al.*, 2006). Existem pelo menos três mecanismos para explicar a perda de fatores intermembranares, como o citocromo *c*: (a) a ruptura física da membrana externa como resultado do intumescimento mitocondrial (usualmente devido à MPT); (b) a modificação da estrutura do VDAC, que é provavelmente induzida por proteínas apoptóticas, tal como o aumento do tamanho do poro, que permite a libertação de citocromo *c*; (c) a formação de um novo poro, como consequência da oligomerização e inserção de proteínas pró-apoptóticas na OMM (O'Rourke, 2007).

No citosol, o citocromo *c* desencadeia a ativação de caspases, seguido pela formação de um complexo ternário, o apoptosoma, que é constituído pela proteína adaptadora “apoptotic protease-activating factor-1”, caspase -9 e citocromo *c*. No apoptosoma, a caspase -9 iniciadora ativa outras caspases efetoras, tais como a caspase -3 e a caspase -7, que clivam vários substratos celulares. Estes processos resultam, eventualmente, na morte celular programada ou apoptose, que é caracterizada por uma condensação nuclear e citoplasmática e fragmentação do DNA, sem ocorrer perda da integridade membranar (Jeong e Seol, 2008; Smith *et al.*, 2008). As mitocôndrias apresentam também um importante papel nos mecanismos de morte celular não programada, associados à depleção dos níveis de ATP, que comprometem a manutenção da viabilidade celular e culminam geralmente com uma resposta inflamatória (Fulda *et al.*, 2010).

### **3.6 A mitocôndria como alvo terapêutico e de toxicidade**

Várias substâncias de baixo peso molecular e macromoléculas são conhecidas por atuarem direta ou indiretamente a nível das mitocôndrias e por influenciarem a sua estrutura e função. Assim, algumas substâncias podem constituir uma estratégia terapêutica específica por exercerem as suas funções a nível mitocondrial, aumentando a sua eficácia, ou reduzindo os efeitos adversos. Por outro lado, as alterações a nível mitocondrial induzidas por alguns fármacos podem desencadear efeitos adversos (Heller *et al.*, 2012).

Têm sido identificados vários alvos mitocondriais, destacando-se o mtDNA, o sistema de transporte de eletrões, o sistema fosforilativo, os processos metabólicos, a síntese de proteínas, os canais mitocondriais e o poro da MPT. Qualquer alteração nestes

alvos mitocondriais pode desencadear mecanismos terapêuticos ou de toxicidade (Scatena *et al.*, 2007).

Assim, é importante o estudo de fármacos com especificidade mitocondrial, e/ou os possíveis efeitos adversos que podem resultar de interações específicas de determinadas moléculas com os alvos mitocondriais referidos (Labbe *et al.*, 2008).

### **3.6.1 A mitocôndria como alvo da ação de fármacos antineoplásicos**

As células tumorais sofrem alterações metabólicas e na composição do mtDNA, que as tornam menos suscetíveis aos mecanismos de morte celular. Assim, a correção das alterações mitocondriais associadas às células neoplásicas e a indução de morte celular programada por agentes farmacológicos que induzem ou inibem a MPT, representam uma estratégia interessante para a terapêutica do cancro (Dias e Bailly, 2005). Por outro lado, alterações na bioenergética mitocondrial da célula tumoral, podem também desencadear mecanismos de morte celular e constituírem uma boa estratégia terapêutica no tratamento do cancro (Jose e Rossignol, 2013).

Além disso, múltiplos estudos têm mostrado que o ANT é um alvo terapêutico promissor no tratamento das doenças neoplásicas, dado que é uma proteína bifuncional que medeia as trocas de ADP por ATP e por ser um componente do poro da MPT (Sharaf el dein *et al.*, 2011). Por outro lado, as isoformas ANT2 e ANT4, que têm funções antiapoptóticas, aumentam nas células tumorais e a sua inibição por agentes quimioterapêuticos pode sensibilizar estas células para a apoptose (Gallerne *et al.*, 2010).

### **3.6.2 Toxicidade mitocondrial**

As mitocôndrias podem ser consideradas os alvos primários ou secundários da toxicidade de diferentes compostos químicos. A mitocôndria tem um papel crucial na suplementação de grande parte do ATP necessário para a célula via fosforilação oxidativa. Assim, qualquer órgão com elevada necessidade de energia aeróbica, como o rim, coração e fígado, é extremamente suscetível à toxicidade mitocondrial. Por estas razões, existem inúmeros síndromes associados à toxicidade mitocondrial, incluindo a acidose láctica,

miopatias cardíacas e esqueléticas, neuropatias, enteropatias, pancreatite, diabetes, fígado gordo e hematotoxicidade (Dykens e Will, 2007; Scatena *et al.*, 2007).

Atualmente, são conhecidos vários mecanismos que estão associados à toxicidade mitocondrial, tais como a dissociação do sistema fosforilativo ou inibição do sistema de transporte de elétrons, com conseqüente depleção de ATP e aumento da concentração de ROS; a indução da MPT, que pode desencadear mecanismos de apoptose e necrose, e lesões no mtDNA (Russmann *et al.*, 2009; Pessayre *et al.*, 2012). Uma alteração no mtDNA pode desencadear alterações no sistema de transporte de elétrons, aumentar a produção de ROS e a oxidação de diversos constituintes mitocondriais, incluindo o mtDNA (Labbe *et al.*, 2008; Pessayre *et al.*, 2012).

O fígado é considerado um importante alvo de toxicidade mitocondrial devido à sua localização, entre o local de absorção e o sistema circulatório, e devido ao facto de ser o principal local de metabolização e eliminação de substâncias estranhas ao organismo (Russmann *et al.*, 2009). Têm sido identificadas diferentes alterações mitocondriais induzidas por diferentes fármacos, que podem desencadear uma lesão hepatocelular direta, fígado gordo, colestase e lesão hepática idiossincrática. Tem sido descrito que alterações no mtDNA, no sistema de transporte de elétrons ou no sistema fosforilativo podem levar à desregulação da oxidação dos ácidos gordos, desencadeando fígado gordo. Por outro lado, a indução da MPT, que pode desencadear mecanismos de morte celular por apoptose ou necrose, tem sido referida como um mecanismo de hepatotoxicidade de diferentes fármacos (Grattagliano *et al.*, 2012; Pessayre *et al.*, 2012).

### **3.7 Efeitos dos retinoides e dos antiestrogénios a nível mitocondrial**

Nos últimos anos têm surgido diferentes trabalhos que indicam que os retinoides atuam através dos RARs (Chambon, 1996). Contudo, vários estudos têm referido que os retinoides podem também atuar por mecanismos independentes dos RARs (Sabichi *et al.*, 2003). De facto, tem-se verificado que a tretinoína induz alterações em diferentes parâmetros mitocondriais independentes dos RARs, tais como a diminuição da expressão da proteína Bcl-2 (Niizuma *et al.*, 2006; Schmidt-Mende *et al.*, 2006), ativação das caspases -3 e -9 (Fujimura *et al.*, 2003; Niizuma *et al.*, 2006) e libertação de citocromo *c* (Gianni *et al.*, 2000; Niizuma *et al.*, 2006) nos mecanismos de morte celular. Schmidt-Mende *et al.* (2006) descreveram também que a tretinoína inibe o sistema de

transporte de elétrons e a capacidade de acumulação do cálcio antes da libertação de citocromo *c*, da diminuição da expressão da proteína Bcl-2 e da fragmentação de cromatina, sugerindo que a mitocôndria está envolvida nos mecanismos de morte celular induzidos por este retinoide. Foi também descrito que a tretinoína e a alitretinoína induzem a MPT em mitocôndrias hepáticas (Rigobello *et al.*, 1999) e cardíacas interagindo com o ANT na sua conformação *c* e promovendo, desta forma, a indução da MPT (Notario *et al.*, 2003). Estudos mais recentes sugerem que são as isoformas ANT1 e 3 que estão envolvidas nos mecanismos de apoptose induzidos pela tretinoína (Zamora *et al.*, 2006).

No que se refere ao efeito da isotretinoína a nível mitocondrial pouco está descrito. Contudo, alguns estudos em culturas celulares mostraram que a isotretinoína induz várias alterações mitocondriais, tais como a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Guruvayoorappan *et al.*, 2008; Vuletic *et al.*, 2010) e a ativação da caspase -3 (Arce *et al.*, 2005; Guruvayoorappan *et al.*, 2008), que estão envolvidas em mecanismos intrínsecos de apoptose. No entanto, sabe-se também que a isotretinoína induz a MPT e a libertação do citocromo *c*, em concentrações muito superiores às concentrações séricas (Rigobello *et al.*, 1999).

Relativamente à acitretina, embora não existam estudos em mitocôndrias isoladas, tem-se verificado que esta diminui a razão da expressão das proteínas Bcl-2/BAX em linhas celulares de melanoma (Ren *et al.*, 2008) e de carcinoma de células escamosas da língua (Ran *et al.*, 2005), sugerindo que a acitretina também induz mecanismos de morte celular programada dependentes da mitocôndria.

Estudos com os antiestrogénios em mitocôndrias de cérebro e de fígado têm também sugerido que o TAM (Custodio *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2005) e o OHTAM (Cardoso *et al.*, 2002a; Moreira *et al.*, 2004) são potentes inibidores da abertura do poro da MPT, devido à sua ação antioxidante. Contudo, é também provável que a inibição da MPT pelo TAM e pelo OHTAM se possa dever à sua ligação com o ANT (Cardoso *et al.*, 2003), que é um dos constituintes do poro da MPT. Por outro lado, tem também sido descrito que o TAM (Cardoso *et al.*, 2001), e em menor extensão o OHTAM (Cardoso *et al.*, 2002b), afetam a bioenergética mitocondrial, por promoverem a despolarização do  $\Delta\psi$  mitocondrial, a inibição do ANT e do PiC e a hidrólise de ATP (Cardoso *et al.*, 2003).



#### 4. Genotoxicidade dos retinoides e antiestrogénios

A genotoxicidade, está em muitos casos associada ao processo de carcinogénese, pelo que tem surgido grande interesse na determinação de biomarcadores de alterações genéticas como fatores preditivos de risco no desenvolvimento do cancro. Contudo, ainda pouco se sabe acerca da relação entre estes biomarcadores e o processo de carcinogénese (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2009; Paules *et al.*, 2011).

Existem vários ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* que permitem a identificação de compostos com potencial genotóxico e o estudo dos seus mecanismos de ação numa grande variedade de células. Os ensaios *in vitro* permitem a deteção direta do potencial genotóxico de um composto, sobre um determinado tipo de célula. Nos ensaios *in vivo* avalia-se o significado biológico/mutagénico da exposição de um indivíduo a um determinado composto que pode sofrer a ação de diferentes fatores. Ou seja, os ensaios *in vivo* avaliam o potencial mutagénico de um composto que sofre diferentes processos fisiológicos, de absorção, distribuição, e excreção (ICH, 2008).

Os ensaios mais utilizados na avaliação genotóxica de um determinado composto são: o ensaio de capacidade de mutação de um gene bacteriano (teste de Ames), análise das células em metáfase para avaliação de alterações cromossómicas, o teste do micronúcleo e o teste do cometa. Contudo, nenhum ensaio genotóxico é capaz de detetar todos os mecanismos de genotoxicidade relevantes para o processo de carcinogénese; por outro lado, um composto pode ser genotóxico *in vitro* mas não ser *in vivo* ou sê-lo apenas *in vivo*.

As diretrizes para os estudos de genotoxicidade propõem a utilização de dois ensaios *in vitro*, isto é, um ensaio positivo *in vitro* deve ser acompanhado por outro tipo de ensaio *in vitro*. Quando os dois testes *in vitro* são positivos devem fazer-se dois testes de genotoxicidade *in vivo* (ICH, 2008).

Os linfócitos humanos de sangue periférico são frequentemente utilizados como modelos celulares para estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. De facto, os linfócitos de sangue periférico são de fácil obtenção, estão quase todos na mesma fase do ciclo celular (G0) e circulam em grande número por todo o organismo, podendo apresentar alterações genéticas que refletem o estado geral do organismo (Collins *et al.*, 2008). Para estes estudos de genotoxicidade podem usar-se outro tipo de células com capacidade

mitótica, nomeadamente células da medula óssea, fibroblastos e queratinócitos (Fenech, 2000).

#### **4.1 Ensaio do micronúcleo**

O ensaio do micronúcleo é um teste de genotoxicidade que permite a deteção de micronúcleos (MN) no citoplasma das células em interfase. Este ensaio é um dos testes mais utilizados na deteção do potencial genotóxico de determinados compostos, pelo facto de requerer uma pequena quantidade de amostra, poder ser realizado em diferentes tipos de células e ser de fácil execução. Além disso, este ensaio parte de um grande número de células (1000-3000) por amostra, em comparação com outros ensaios de genotoxicidade, o que lhe confere um elevado poder estatístico (Suspiro e Prista, 2011). Este ensaio tem evidenciado uma elevada associação entre a frequência de MN e o desenvolvimento do cancro. De facto, tem sido referido um aumento na frequência de MN em doentes com cancro ou com lesões pré-neoplásicas, sugerindo que a frequência de MN pode ser um bom biomarcador de risco de desenvolvimento de cancro (Bonassi *et al.*, 2011; Suspiro e Prista, 2011).

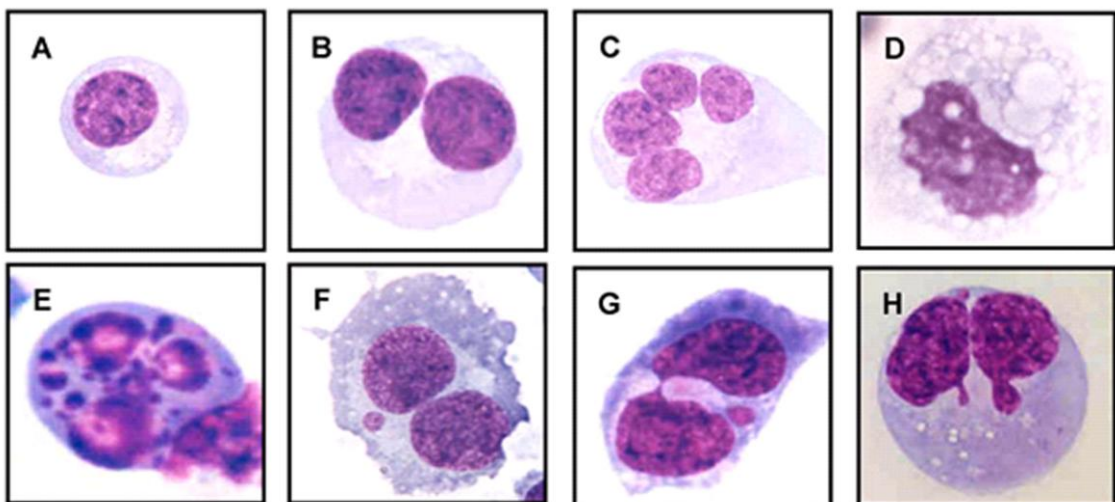
O número de células micronucleadas aumenta com alguns fatores, nomeadamente com a idade (Battershill *et al.*, 2008), com o sexo, sendo superior nas mulheres (Fenech, 1998), com a predisposição genética (Iarmarcovai *et al.*, 2008; Mateuca *et al.*, 2008), bem como com o estilo de vida. Assim, é referido que os fumadores apresentam valores de MN superiores aos não fumadores (Fenech, 1993). O consumo de álcool, doenças crónicas, infeções e exercício físico intenso são também referidos como potenciais fatores de risco mutagénico (Battershill *et al.*, 2008).

O ensaio do micronúcleo é frequentemente utilizado *in vitro* e *in vivo*, com e sem bloqueio de citocinese. Para o ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) é usado geralmente sangue periférico humano ou de ratinhos. Para o ensaio *in vitro* preparam-se culturas de sangue completo ou de linfócitos previamente isolados, que se incubam durante 72 horas, em condições de temperatura de CO<sub>2</sub> adequadas, com o composto a estudar. Contudo, podem também ser utilizadas outras linhas celulares com capacidade mitótica, tais como fibroblastos e queratinócitos (Fenech, 2000). O ensaio do micronúcleo *in vivo* é frequentemente efetuado em ratinhos, quer por punção da medula óssea a nível da cabeça do fémur, quer por colheita de sangue periférico, após exposição

do composto em estudo, seguindo-se a observação dos esfregaços para contagem de eritoblastos com MN ou de eritrócitos com MN. Os ensaios *in vivo* são também efetuados em linfócitos humanos de sangue periférico, para estudar o potencial mutagénico de patologias específicas, de terapêuticas ou associado a exposições ocupacionais de risco.

O ensaio do micronúcleo permite estudar o potencial genotóxico e citotóxico, através da avaliação de células com MN, pontes de cromatina (NPBs), “nuclear buds” (NBUDs) e, ainda, avaliar parâmetros de inibição da divisão celular, de apoptose e necrose (Fenech, 2000; Fenech, 2006).

No ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese estimula-se a divisão celular por adição de fito-hemaglutinina (PHA) ao meio de cultura e, posteriormente, bloqueia-se a citocinese por adição da citocalasina B (Cyt-B). As células que completaram uma divisão nuclear são impedidas de realizar a citocinese, sendo facilmente identificadas por serem binucleadas (Fenech, 2000) (Fig. 1.9).



**Figura 1.9** - Ilustração de linfócitos mononucleados (A), binucleados (B), multinucleados (C), necróticos (D), apoptóticos (E), binucleados com micronúcleo (F), binucleados com micronúcleo e com uma ponte de cromatina (G) e binucleados contendo “nuclear buds” (H). Adaptado de (Fenech, 2006).

Os MN são constituídos por pequenas quantidades de material nuclear, que se separa do núcleo durante a divisão celular e que pode conter cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas. São morfologicamente idênticos ao núcleo, mas de menor tamanho, entre 1/16 e 1/3 do diâmetro do núcleo, e de cor semelhante a este (Fenech, 2000; Fenech *et al.*,

2003). A formação dos MN nas células em mitose pode resultar da quebra de cromossomas (clastogénese) ou da separação anómala de cromossomas devido à má formação do fuso mitótico (aneugénese) (OECD, 2010; Suspiro e Prista, 2011).

No teste do CBMN identificam-se e contam-se as células binucleadas com MN e as células mononucleadas com MN (Fenech, 2007). Quando o ensaio é associado com hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), utilizando sondas centroméricas, pericentroméricas ou pancentroméricas, permite avaliar o mecanismo de formação dos MN, ou seja, se a formação dos MN se deve a eventos clastogénicos e/ou aneugénicos. No caso dos MN serem centrómeros negativos trata-se de clastogenicidade e no caso dos MN serem centrómeros positivos trata-se de aneugenicidade (OECD, 2010; Suspiro e Prista, 2011).

O ensaio do CBMN permite também detetar NPBs em células binucleadas, que indicam a presença de cromossomas dicêntricos, em que os centrómeros do mesmo cromossoma migram para polos opostos da célula em anáfase, dando origem à ponte de cromatina. Estas pontes de cromatina observam-se nas células binucleadas como uma ligação contínua entre os núcleos, com uma largura que pode variar consideravelmente, mas geralmente não excede 1/4 do diâmetro dos núcleos (Fenech, 2000; Fenech, 2006). Este ensaio permite também a deteção de NBUDs, que se formam devido à excessiva amplificação de DNA. O núcleo elimina o excesso de DNA amplificado por um processo ativo num ponto periférico e externo ao núcleo. Este processo ocorre durante a fase S; os NBUDs apresentam a mesma morfologia do MN, mantendo-se ligados ao núcleo por um pedúnculo estreito ou largo de material nucleoplásmico (Fenech, 2006). O CBMN permite também a contagem de células mono-, bi-, tri- e tetra-nucleadas (Fig. 1.9), podendo avaliar-se o índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) e a percentagem de citostase (OECD, 2010).

A citotoxicidade pode ainda ser quantificada por contagem das células apoptóticas e necróticas (Fig. 1.9). As células apoptóticas são células que apresentam uma condensação irregular da cromatina, com fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos, mantendo a membrana citoplasmática intacta. As células necróticas são células que exibem uma estrutura nuclear parcialmente intacta, citoplasma pálido e vacuolizado, que pode estar parcialmente destruído e com a membrana nuclear e citoplasmática irregulares ou danificadas (Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000).

## 4.2 Ensaio do cometa

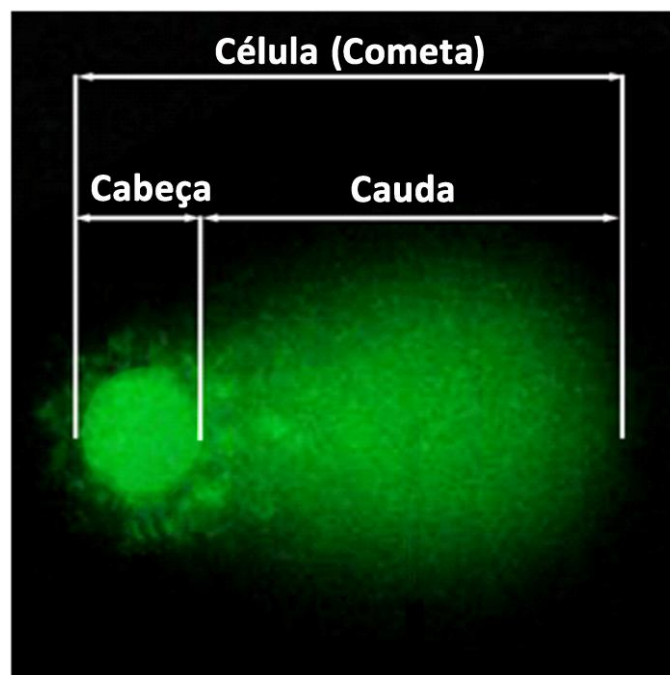
O ensaio do cometa é um teste de genotoxicidade que permite a detecção de lesões no DNA. Este ensaio tem sido largamente utilizado devido à sua elevada sensibilidade para a detecção de baixos níveis de lesões no DNA, à exigência de um pequeno número de células por amostra, à simplicidade, ao curto tempo de realização e por ter um custo relativamente baixo. Pode ser realizado com vários tipos de células, sendo facilmente modificado e adaptado para uma grande variedade de requisitos experimentais (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Suspiro e Prista, 2011).

As lesões no DNA detetadas pelo ensaio do cometa aumentam também com a idade, sexo e com a exposição clínica e toxicológica específica (Moller, 2006; McKenna *et al.*, 2008).

O ensaio do cometa pode ser realizado *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro* utilizam-se culturas de células com capacidade mitótica que são expostas ao composto em estudo, sendo a cultura de linfócitos de sangue periférico muito utilizada. Nos ensaios *in vivo*, pode também utilizar-se sangue periférico, determinando o valor das lesões no DNA das células nucleadas. Nos ensaios *in vivo* podem também utilizar-se células retiradas do tecido que se pretende estudar.

O ensaio do cometa consiste numa técnica clássica, descrita por Tice *et al.* (1991), em que as suspensões celulares são incorporadas em agarose e lisadas de forma a libertar o conteúdo de DNA. Após a lise faz-se um pré-tratamento alcalino seguido de eletroforese, também em condições alcalinas (pH > 13), em que o DNA migra para o ânodo. Posteriormente, em condições de neutralização, as cadeias de DNA localizadas na cabeça do cometa renaturam, enquanto que o DNA presente na cauda permanece em cadeias simples. Para avaliar a extensão da migração, o DNA é corado com um corante fluorescente, passando-se posteriormente à observação num microscópio de fluorescência. Um "cometa" é constituído por uma cabeça com DNA intacto e uma cauda que contém fragmentos de DNA (Fig. 1.10). O ensaio do cometa deteta lesões nas cadeias simples e nas cadeias duplas e "alkali-labile sites" (ALS) do DNA. Quanto maior a cauda do cometa, tanto maior a degradação de DNA e, portanto, a genotoxicidade do composto em estudo (Collins *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2009). O ensaio do cometa permite também avaliar ligações cruzadas entre DNA-DNA, proteínas-DNA, identificar lesões no DNA em genes específicos e localizar lesões a nível das bases constituintes do DNA, utilizando para tal diferentes modificações deste ensaio (Moller, 2006).

A avaliação é feita habitualmente recorrendo a softwares apropriados que permitem avaliar diferentes parâmetros, tais como o comprimento da cauda (TL), percentagem de DNA na cabeça, a percentagem de DNA na cauda e o “tail moment” (TM), que é o produto entre a percentagem de DNA na cauda e o comprimento da cauda, em 100 células, por amostra (Battershill *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2008).



**Figura 1.10** - Representação de um “cometa”. O DNA foi corado com SyberGreen e visualizado numa microscópio de epifluorescência. (Adaptado de <http://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-and-slides>).

### **4.3 Efeito genotóxico dos retinoides e antiestrogénios**

Os estudos acerca da genotoxicidade dos retinoides são restritos e em alguns casos contraditórios. Tem sido referido que a tretinoína *in vitro* (10-100  $\mu\text{M}$ ) aumenta a frequência de MN em linfócitos humanos e em células de rato (Alakhras *et al.*, 2011), enquanto que outros estudos *in vitro* referem a tretinoína como não apresentando efeitos genotóxicos significativos (Watanabe e Pratt, 1991). A isotretinoína administrada (30-40 mg/dia) em doentes com acne pode induzir lesões no DNA (Georgala *et al.*, 2005). Contudo, em ensaios *in vitro*, a isotretinoína (0,01 - 10  $\mu\text{M}$ ) incubada com linfócitos humanos ou com uma linha celular de linfoblastos diminuiu a quebra de cromátides induzida por um agente genotóxico (Trizna *et al.*, 1992). Foi referido que doentes com

xeroderma pigmentoso, uma doença caracterizada por sensibilidade à luz solar, devido a uma deficiência nos mecanismos de reparação das lesões de DNA induzidas pelas radiações UV, quando tratados com isotretinoína (30-40 mg/dia), apresentavam uma redução nas lesões do DNA. Igualmente, foi observado uma diminuição de lesões no DNA em linfócitos de voluntários saudáveis, quando incubados em culturas celulares com isotretinoína (0.001 e 10  $\mu$ M) e expostos a raio-x (Sanford *et al.*, 1992).

A acitretina tem sido descrita como não apresentando genotoxicidade, mesmo em altas concentrações (50-100  $\mu$ M), observando-se um efeito antígenotóxico, quando adicionada a culturas celulares, na presença de um composto genotóxico (Stephanou *et al.*, 2004).

O TAM foi classificado como um agente carcinogénico do grupo 1 pelo “International Agency for Research on Cancer”, por apresentar capacidade de formar adutos de DNA em vários tecidos (Poirier e Schild, 2003; Brown, 2009), que não são removidos por mecanismos de reparação e que podem, subsequentemente, produzir mutações pontuais e aberrações cromossómicas. De facto, tem-se verificado que o TAM aumenta a incidência de aberrações cromossómicas em hepatócitos de rato (Styles *et al.*, 1997), aumenta o número de MN e de aberrações cromossómicas em células de medula óssea de ratinho (Vijayalaxmi e Rai, 1996), bem como o número de lesões no DNA de linfócitos e de células do cancro da mama (Wozniak *et al.*, 2007). Contudo, continuam por esclarecer os seus mecanismos genotóxicos. No que se refere à genotoxicidade do OHTAM, existem alguns estudos na literatura, que são controversos. Tem sido referido que o OHTAM não induz a formação de adutos de DNA (Beland *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006), em contradição com o facto de ter sido observado a formação de adutos de DNA (Marques e Beland, 1997) e o aumento da frequência de MN numa linha celular humana linfoblastóide (Styles *et al.*, 1997), permanecendo assim por esclarecer o potencial efeito genotóxico do OHTAM.

## **5. Retinoides e antiestrogénios na terapêutica do melanoma e do cancro da mama**

### **5.1 Melanoma**

O melanoma é a forma mais agressiva de cancro de pele, superando a maioria dos tumores em termos de evolução metastática. A sua natureza altamente agressiva e a crescente incidência que se tem observado em todo o mundo, constitui um problema de saúde a nível mundial (Ghosh e Chin, 2009; Sarasin e Dessen, 2010).

No melanoma, tal como noutras doenças malignas, tanto a exposição a agentes ambientais como a predisposição genética constituem importantes fatores de risco. Estudos epidemiológicos sugerem que a predisposição familiar, representa cerca de 10% a 13% dos casos desta doença (Ko *et al.*, 2010). A exposição solar é a principal causa do desenvolvimento do melanoma. De facto, a radiação UV é um fator de risco estabelecido para esta patologia, estando o risco dependente dos padrões de exposição solar (exposição intermitente ou cumulativa), da frequência de exposição e da suscetibilidade hereditária (Erdei e Torres, 2010; Godden *et al.*, 2010). É aceite que a radiação ultravioleta A (UVA) e ultravioleta B (UVB) podem causar lesões no DNA, desencadear mecanismos de imunossupressão, de stresse oxidativo e de resposta inflamatória, que podem contribuir para o desenvolvimento do cancro de pele (Narayanan *et al.*, 2010). Pouco se sabe sobre a relação entre a exposição à radiação UV e os fatores genéticos (Erdei e Torres, 2010; Godden *et al.*, 2010).

No melanoma há uma desregulação de mecanismos homeostáticos da pele, observando-se uma proliferação descontrolada de melanócitos. É aceite que o melanoma pode começar com o desenvolvimento displástico de nevos benignos, que progridem para a fase de crescimento radial, com expansão lateral. A progressão para a fase de crescimento vertical é marcada pela invasão até à derme, tecido subcutâneo e epiderme superior (Soengas e Lowe, 2003; Ghosh e Chin, 2009). Na etapa final, o melanoma metastiza-se para órgãos distantes. Existe outra via de desenvolvimento, em que as lesões agressivas se desenvolvem mais rapidamente, sem desenvolvimento de nevos (Erdei e Torres, 2010).

A maioria dos doentes com melanoma avançado não responde às terapêuticas atualmente disponíveis (Ko *et al.*, 2010), sendo a remoção cirúrgica do tumor o único tratamento eficaz. De facto, a terapêutica sistémica para o tratamento da doença disseminada continua a ser ineficaz, sendo o melanoma metastizado altamente resistente a



quase todos os agentes citotóxicos (Soengas e Lowe, 2003; Sarasin e Dessen, 2010). É, portanto, de fundamental importância o desenvolvimento de terapêuticas eficazes no tratamento desta doença.

### **5.1.1 Expressão dos recetores dos ácidos retinoicos e dos estrogénios e sua função no melanoma**

Embora permaneçam por esclarecer os mecanismos de ação dos retinoides na pele, sabe-se que os RARs e RXRs desempenham um importante papel nos seus mecanismos de homeostase. A epiderme humana (Elder *et al.*, 1991), bem como culturas de queratinócitos e de fibroblastos dérmicos humanos (Elder *et al.*, 1992) expressam os recetores RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ ; o subtipo RAR $\beta$  tem uma expressão mais baixa na pele (Boehm *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, o heterodímero RAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  está envolvido na manutenção e diferenciação da epiderme (Boehm *et al.*, 2004), na manutenção dos melanócitos no seu estado diferenciado, impedindo a formação do melanoma, embora o mecanismo de ação não seja ainda totalmente conhecido (Spanjaard *et al.*, 1997).

O desenvolvimento do melanoma é geralmente acompanhado pela redução da expressão de RAR $\beta$ , que pode ser, pelo menos em parte, responsável pela resistência aos retinoides (Boehm *et al.*, 2004). Estudos mais recentes têm sugerido que a diminuição da expressão do RAR $\beta$ 2 se deve a modificações epigenéticas, quer por hipermetilação do promotor, observada em linhas celulares de melanoma humano e em amostras clínicas de melanomas (Liu *et al.*, 2008), quer por acetilação de histonas, observada em linhas de melanoma metastáticas (Fan *et al.*, 2010). Vários estudos têm sugerido que a expressão anormal dos RARs pode estar envolvida na melanogénese, na progressão do melanoma, bem como na resistência aos retinoides (Chakravarti *et al.*, 2007).

Tem-se verificado que a administração de tretinoína ou de alitretinoína resulta num rápido aumento da expressão de RAR $\beta$ , seguida do bloqueio da divisão celular (Clifford *et al.*, 1990). De facto, tem-se verificado que os retinoides têm um efeito antiproliferativo no melanoma. A tretinoína induz a paragem do ciclo celular na fase G0/G1 e induz mecanismos de apoptose em diferentes linhas celulares de melanoma (Zhang e Rosdahl, 2004; Niu *et al.*, 2005). De forma semelhante, a isotretinoína também tem um efeito antiproliferativo nas linhas celulares de melanoma, quer por induzir mecanismos de morte

celular por apoptose, dependentes da mitocôndria (Guruvayoorappan *et al.*, 2008), quer por inibir o ciclo celular na fase G0/G1 (Niu *et al.*, 2005). A isotretinoína tem sido utilizada como terapêutica adjuvante no tratamento do cancro da pele não melanoma (Danopoulou *et al.*, 2009) e no carcinoma de células escamosas da pele, com bastante sucesso (Brewster *et al.*, 2007).

A acitretina tem também sido utilizada na quimioprevenção de doentes com carcinoma de células escamosas da pele (Kadakia *et al.*, 2012) e no cancro da pele não melanoma (Anforth *et al.*, 2012).

A acitretina apresentou um efeito antiproliferativo numa linha celular de melanoma, por induzir mecanismos de apoptose dependentes da mitocôndria (Ren *et al.*, 2008). Contudo, permanece por esclarecer se estes mecanismos se devem a processos dependentes ou independentes dos receptores dos ácidos retinoicos.

Os estrogénios desempenham vários papéis específicos a nível da pele, intervindo na regulação do teor de colagénio e da espessura da pele, e na regulação da função dos fibroblastos, queratinócitos e melanócitos, sendo desconhecidos os seus mecanismos de ação. Como os ERs, principalmente a isoforma ER $\beta$ , estão expressos nos fibroblastos da derme, nos queratinócitos e nos melanócitos, tem sido sugerido que os estrogénios exercem os seus efeitos na pele através dos receptores de estrogénio (Verdier-Sevrain *et al.*, 2006).

O melanoma tem sido tradicionalmente considerado como um tumor ER(+), devido à presença dos ERs em diferentes linhas celulares de melanoma. No entanto, a análise de melanomas humanos tem mostrado uma expressão variável dos ERs (Mori *et al.*, 2006). Foi demonstrado recentemente que os melanomas mais invasivos expressam níveis mais baixos de ER $\beta$  (de Giorgi *et al.*, 2009; de Giorgi *et al.*, 2011) e ER $\alpha$  (de Giorgi *et al.*, 2009), o que sugere que tenham um papel importante no desenvolvimento do melanoma.

O TAM e o OHTAM têm mostrado ter um efeito antiproliferativo em diferentes linhas celulares de melanoma ER(+). O TAM tem sido usado no tratamento de doentes com melanoma maligno metastizado, em monoterapia ou em associação com outros agentes quimioterapêuticos. Contudo, tem-se verificado que o TAM, em diferentes regimes terapêuticos, produz resultados inconclusivos (Lens *et al.*, 2003; Beguerie *et al.*, 2010). No entanto, alguns ensaios *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que o TAM melhora as taxas de resposta de diferentes agentes quimioterapêuticos no melanoma (Chatterjee *et al.*, 2011; Misir Krpan *et al.*, 2012). O TAM e o OHTAM podem, portanto, constituir uma boa estratégia no tratamento do melanoma quando associados com outros agentes antiproliferativos.

## 5.2 Cancro da mama

O cancro da mama é o cancro com maior incidência nas mulheres, a nível mundial. Em Portugal é também o tipo de cancro mais frequente nas mulheres (Bastos *et al.*, 2007).

O cancro da mama é uma doença heterogénea, com uma apresentação morfológica variada e de características moleculares específicas. A etiologia do cancro da mama é complexa, sendo múltiplos os fatores que contribuem para o seu desenvolvimento e progressão. Como fatores de risco associados ao desenvolvimento do cancro da mama destacam-se a idade, género, índice de massa corporal (IMC) elevado, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo, história familiar da doença, bem como a exposição a estrogénios exógenos (Nelson *et al.*, 2012).

### 5.2.1 Expressão dos recetores de estrogénios e dos ácidos retinoicos e sua ação no cancro da mama

Os estrogénios, por meio de uma variedade de mecanismos, constituem um fator de risco muito importante no desenvolvimento do cancro da mama (Keen e Davidson, 2003). Como o principal efeito dos estrogénios é mediado pelos ERs, é aceite que as vias de transdução de sinal dos ERs são suscetíveis de contribuir para a progressão deste tipo de cancro. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes ao efeito dos estrógenos na carcinogénese mamária não estão completamente esclarecidos (Chang, 2011).

O cancro da mama pode ser ER(+) ou ER(-), estimando-se que aproximadamente 70-80% dos cancros da mama sejam ER(+) (Conzen, 2008). A perda da expressão dos ERs está associada com o aumento da agressividade do cancro da mama e deve-se, geralmente, a modificações epigenéticas reversíveis, incluindo desacetilação das histonas e metilação do DNA (Yang *et al.*, 2001; Keen e Davidson, 2003).

O TAM é o fármaco mais frequentemente prescrito para o tratamento de todos os estadios do cancro da mama (Clarke *et al.*, 2004; Shao e Brown, 2004). O uso de TAM reduz o risco de desenvolvimento de cancro da mama em mulheres com alto risco (Lester, 2007), podendo também ser utilizado no tratamento do cancro da mama em estadios avançados (Mao *et al.*, 2012). No entanto, como já foi referido, o OHTAM poderá constituir uma alternativa terapêutica em substituição do TAM, por apresentar uma menor toxicidade (Cruz Silva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002a), maior tolerabilidade (Sauvez *et*

*al.*, 1999) e uma maior afinidade de ligação com os ERs e maior potencial antiproliferativo, neste tipo de cancro (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012).

Embora pouco se conheça acerca dos mecanismos moleculares de ação dos retinoides no desenvolvimento do cancro da mama, sabe-se que as vias de sinalização desempenham importantes funções. Nas linhas celulares do cancro da mama ER(+) ou ER (-), a expressão dos RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ , é semelhante à das células normais (Brtko, 2007). Contudo, durante a progressão do cancro a expressão do RAR $\beta$  é reduzida ou mesmo perdida, constituindo uma característica típica do cancro da mama, que é considerada como um dos principais fatores responsáveis pela resistência aos retinoides nestas neoplasias. Estudos recentes têm mostrado que a diminuição da expressão de RAR $\beta$ 2 é devida a alterações epigenéticas, por metilação e desacetilação das histonas da região do promotor, resultando no silenciamento de genes (Keen e Davidson, 2003; Brtko, 2007), semelhante ao que acontece no melanoma (Liu *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2010). Num estudo mais recente, foi também descrito uma diminuição da expressão da isoforma RAR $\beta$ 5 nas células do cancro da mama, sugerindo que esta isoforma poderá ser um potencial biomarcador da resistência dos retinoides neste tipo de cancro (Christov, 2009).

A expressão de RAR $\beta$  desempenha aparentemente um papel importante na sensibilidade aos retinoides, dado que estes atuam predominantemente através dos RAR $\beta$ , podendo promover mecanismos de apoptose em células de cancro da mama, assim como noutros tipos de neoplasias. Tem sido evidenciado que os retinoides são capazes de inibir o cancro da mama nas fases iniciais de progressão do tumor e que a sua eficácia diminui à medida que os tumores se tornam mais agressivos (Brtko, 2007).

A tretinoína e a isotretinoína têm um efeito antiproliferativo em linhas celulares do cancro da mama ER(+) e ER(-), por induzirem paragem do ciclo celular na fase G0/G1 e mecanismos de apoptose (Toma *et al.*, 1997; Czezug-Semeniuk *et al.*, 2001). Por outro lado, tem sido referido que a alitretinoína pode prevenir o cancro da mama em modelos animais (Wu *et al.*, 2006) e inibir o crescimento de linhas celulares do cancro da mama ER(+) (Conzen, 2008). Os retinoides impedem o desenvolvimento do tumor em modelos animais de cancro (Howe, 2007; Liby *et al.*, 2007) e parecem ser tão eficazes como a alitretinoína na supressão do crescimento das células epiteliais mamárias ER(+) e ER(-) (Conzen, 2008). Estes retinoides levam à paragem do crescimento, predominantemente, por bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 (Wu *et al.*, 2006).

### 5.2.2 Efeitos dos retinoides em associação com os antiestrogénios

Vários trabalhos têm sugerido existir uma interligação nas vias de sinalização dos estrogénios e dos retinoides no cancro da mama (Simeone e Tari, 2004; Hua *et al.*, 2009). Tem-se verificado que a inibição do crescimento das células do cancro da mama por tratamento com retinoides é mais acentuada nas células ER(+) do que nas ER(-) (Simeone e Tari, 2004). Contudo, a possibilidade de interação dos retinoides com os ERs é contraditória, uma vez que alguns estudos revelaram que os retinoides podem aumentar a expressão de ERs numa linha celular de cancro da mama (Butler e Fontana, 1992), enquanto que outros referem que os retinoides podem diminuir a expressão dos ERs (Rubin *et al.*, 1994). Foi também demonstrado que a adição de estradiol a linhas celulares de cancro da mama levou a um aumento significativo dos níveis de RAR $\alpha$  tendo desencadeado uma maior inibição do crescimento celular pelos retinoides (van der Leede *et al.*, 1995). Assim, apesar destas contradições, os RARs, uma vez ativados, poderão exercer efeitos antiestrogénicos, quer por ligação direta, quer por ligação indireta dos ERs com os elementos de resposta dos ERs (EREs) (Demirpence *et al.*, 1994). Por outro lado, a região N-terminal do ER $\alpha$  pode modular a atividade de transcrição dos RARs (Rousseau *et al.*, 2003). De facto, estudos mais recentes têm mostrado que o RAR $\alpha$  é um componente essencial dos ERs (Ross-Innes *et al.*, 2010) e que estes dois recetores podem cooperar numa atividade transcricional efetiva nas células de cancro da mama (Hua *et al.*, 2009; Ross-Innes *et al.*, 2010). Adicionalmente, tem-se verificado um efeito sinérgico quando os retinoides são administrados em associação com os antiestrogénios (Brtko, 2007). De facto, a associação da tretinoína com o TAM inibe sinérgicamente o crescimento de células do cancro da mama (Searovic *et al.*, 2009; Koay *et al.*, 2010) devido, provavelmente, à similaridade entre os RARs e os ERs. Contudo, os mecanismos de ação destas combinações continuam por esclarecer.

## **6. Os retinoides na terapêutica da psoríase e da acne**

### **6.1 Etiologia e apresentação clínica da psoríase**

A psoríase é uma doença inflamatória crónica da pele, que afeta entre 2 a 3% da população mundial. É uma dermatite crónica eritematosa, recorrente, que se caracteriza pela alternância de períodos sintomáticos, com períodos de remissão. Nos períodos sintomáticos desenvolvem-se lesões dermatológicas que se caracterizam histologicamente pela presença de infiltrado inflamatório, aumento da proliferação epidérmica, queratinização anormal e angiogénese (Murphy *et al.*, 2007; Rashmi *et al.*, 2009).

A etiologia da psoríase permanece por esclarecer, sabe-se no entanto que é multifatorial, dependendo a manifestação da doença e a sua severidade de fatores genéticos e ambientais (Mak *et al.*, 2009).

A história familiar de psoríase é observada em cerca de 30% a 50% dos doentes, e estima-se que os irmãos e parentes em primeiro grau dos doentes com psoríase apresentam um risco quatro vezes ao da população em geral de desenvolver a doença. São vários os genes descritos que favorecem a manifestação da psoríase, nomeadamente os genes do locus *PSORS1* a *PSORS10* (Mak *et al.*, 2009; Goldenstein-Schainberg *et al.*, 2012).

Vários fatores ambientais favorecem o desenvolvimento da psoríase, dos quais se destacam as doenças infecciosas e inflamatórias, o traumatismo físico e o stress emocional, bem como o abuso de álcool, a obesidade e algumas terapêuticas (Kurian e Barankin, 2011).

A psoríase é classificada de acordo com a idade de aparecimento da doença, com o tipo de lesão dermatológica e de acordo com a localização das lesões. A psoríase pode apresentar-se sob a forma de psoríase *vulgaris* ou psoríase crónica em placas, psoríase *guttata*, psoríase *pustular* e psoríase eritrodérmica, de acordo com o tipo de lesão. A apresentação clínica mais comum da psoríase é a psoríase *vulgaris*, que afeta cerca de 80% dos doentes. Na psoríase *vulgaris*, a doença apresenta pápulas avermelhadas bem circunscritas e descamativas, localizadas frequentemente nos cotovelos, joelhos, na parte inferior das costas e no couro cabeludo (Murphy *et al.*, 2007; Mrowietz e Reich, 2009).

A severidade da psoríase é habitualmente avaliada pelo índice de severidade e área psoriática (PASI). Este índice avalia a gravidade da doença através dos valores de eritema,

induração, descamação e área de envolvimento das quatro zonas do corpo (cabeça, tronco, braços e pernas) (Fredriksson e Pettersson, 1978). A psoríase é classificada como ligeira, se o PASI for inferior a 10, moderada para valores de PASI entre 10 e 20, e grave se o PASI for superior a 20 (Naldi e Gambini, 2007; Mrowietz e Reich, 2009).

## 6.2 Fisiopatologia da psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crónica sistémica caracterizada por hiperproliferação e diferenciação anormal de queratinócitos, infiltração de células inflamatórias e angiogénese. A infiltração dérmica de células do sistema imunitário inato, macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, mastócitos e células “natural killer”, e do sistema imunitário adaptativo, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, tem um papel importante na mediação da resposta inflamatória e no desenvolvimento das lesões da psoríase (Sweeney *et al.*, 2011; Coimbra *et al.*, 2012a).

O desenvolvimento da psoríase tem sido associado com o reconhecimento de um autoantígeno ou de um antígeno exógeno, que desencadeia uma resposta inflamatória e imunológica. No entanto, este processo de ativação inicial permanece por identificar (Ghoreschi *et al.*, 2007).

As células Th1 e Th17 contribuem para a patogénese da psoríase através da libertação de citocinas inflamatórias que promovem o recrutamento de outras células inflamatórias para o local da lesão, a proliferação de queratinócitos e alterações vasculares (Lima Ede e Lima Mde, 2011; Coimbra *et al.*, 2012a). A este processo inflamatório associa-se uma hiperproliferação dos queratinócitos, com redução do seu ciclo de maturação de 28 para 5 dias, que se manifesta clinicamente pela formação de placas psoriáticas (Mak *et al.*, 2009).

Os queratinócitos promovem a acumulação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, que produzem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que recrutam outras células inflamatórias para o local da lesão, e ativam outras células presentes na lesão, incluindo os neutrófilos e as células T (Lima Ede e Lima Mde, 2011; Sweeney *et al.*, 2011). Os queratinócitos ativados libertam também fatores que ativam as células dendríticas na derme, que por sua vez estimulam as células T (Coimbra *et al.*, 2012a).

Os neutrófilos são também células do infiltrado inflamatório das lesões, capazes de recrutar e ativar os linfócitos T, e influenciar a proliferação e diferenciação dos

queratinócitos. A ativação dos neutrófilos é acompanhada de desgranulação, com libertação dos seus constituintes para o espaço extracelular, e produção de ROS. A desgranulação dos neutrófilos ativados e a libertação de proteases (por exemplo, elastase) e proteínas catiónicas (por exemplo, a lactoferrina) parecem ter um papel importante nas lesões psoriáticas e estar também relacionada com a própria gravidade da doença (Rocha-Pereira *et al.*, 2004b; Coimbra *et al.*, 2009). No entanto, permanece por esclarecer se a ativação dos neutrófilos é uma causa ou uma consequência da psoríase (Coimbra *et al.*, 2012a).

### **6.3 Comorbilidades associadas à psoríase**

A psoríase associa-se frequentemente a diferentes comorbilidades, nomeadamente à obesidade, dislipidemia, diabetes e doenças cardiovasculares (DCV). Tem sido proposto que a inflamação, característica da psoríase, pode contribuir para o desenvolvimento destas comorbilidades ou que estas patologias podem contribuir para a manifestação da psoríase e/ou para o seu agravamento (Singh e Aneja, 2011; Reich, 2012).

A associação entre a psoríase e estas patologias permanece por esclarecer. A obesidade é um estado pró-inflamatório que pode, por si só, potenciar o estado inflamatório do doente e, portanto, agravar a apresentação da psoríase; pode, ainda, predispor os doentes para o desenvolvimento de outras comorbilidades associadas à psoríase, como as doenças cardiovasculares (Singh e Aneja, 2011).

O perfil lipídico nestes doentes está frequentemente associado a modificações aterogénicas, nomeadamente a valores mais elevados de colesterol total, triglicéridos (TG) e colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDLc), e a valores mais baixos de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDLc) (Rocha-Pereira *et al.*, 2001; Coimbra *et al.*, 2010d), o que poderá contribuir para a elevada prevalência de eventos cardiovasculares (Pietrzak *et al.*, 2010). De facto, a prevalência de DCV é bastante elevada nestes doentes, o que pode estar relacionado com a elevada incidência de fatores de risco, tais como o stresse oxidativo, a ativação leucocitária, obesidade e dislipidemia. No entanto, tem sido proposto que o próprio estado inflamatório associado à psoríase pode contribuir para o processo aterogénico (Coimbra *et al.*, 2009).

Tem também sido referido que a incidência de cancro é superior em doentes com psoríase (Ji *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011). No entanto, permanece por esclarecer se este



risco está relacionado com as terapêuticas utilizadas no tratamento da psoríase ou com a psoríase *per se*, nomeadamente com o processo inflamatório e imunológico e com a ativação endotelial associados à doença (Mak *et al.*, 2009; Alexandrescu *et al.*, 2011).

Os doentes com psoríase apresentam uma taxa mais elevada de estados depressivos e de suicídio, o que tem sido associado à exposição das lesões psoriáticas, sobretudo quando localizadas em zonas como a cara, braços e pernas; as alterações no quotidiano pessoal e profissional do doente, sendo determinantes de uma redução na qualidade de vida, podem também contribuir para o desenvolvimento de estados depressivos. O índice de qualidade de vida para doenças dermatológicas (DLQI) é um inquérito frequentemente utilizado para avaliar a qualidade de vida dos doentes com psoríase, monitorizando desta forma o impacto da doença na vida do doente (Mrowietz e Reich, 2009; Coimbra *et al.*, 2010a).

#### 6.4 Terapêutica da psoríase

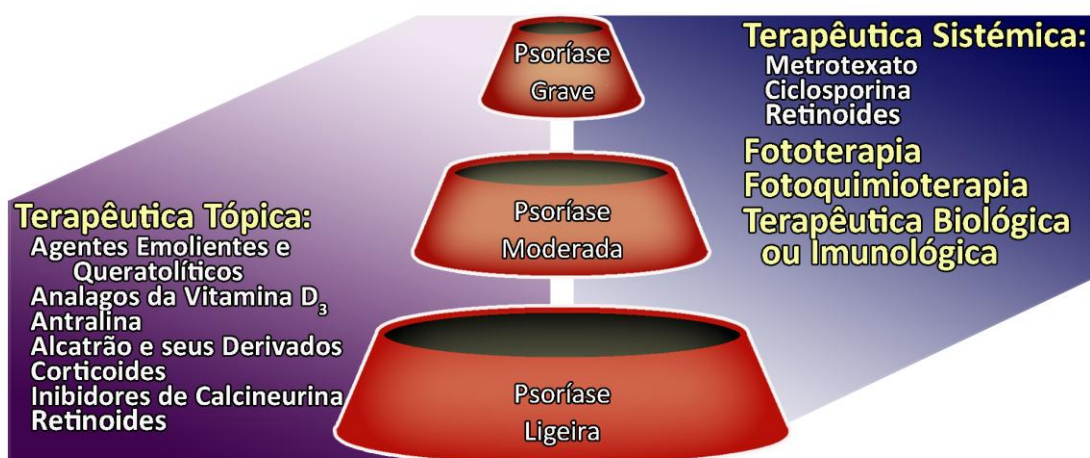
As terapêuticas disponíveis para o tratamento da psoríase, embora não permitam a cura da doença, têm como objetivo o controlo das manifestações clínicas, isto é, eliminar as lesões psoriáticas e diminuir o número e a gravidade das recidivas (Mrowietz, 2012). O tratamento destes doentes deve também ter como objetivo impedir o desenvolvimento ou a progressão das comorbilidades que frequentemente se associam à psoríase (Mrowietz e Reich, 2009; Mrowietz, 2012).

As terapêuticas utilizadas no tratamento da psoríase podem dividir-se, em tópicas, geralmente utilizadas no tratamento da psoríase ligeira e de localização bem definida, a fototerapia e a fotoquimioterapia utilizadas no tratamento da psoríase moderada a grave, a terapêutica sistémica e a terapêutica imunológica ou biológica para o tratamento da psoríase grave (Fig. 1.11) (Murphy e Reich, 2011).

A terapêutica tópica é geralmente utilizada em monoterapia no tratamento da psoríase ligeira, localizada, e como terapêutica adjuvante em formas moderadas a graves desta patologia. Dos fármacos utilizados neste tipo de terapêutica destacam-se os agentes emolientes e queratolíticos, a antralina, o alcatrão e os seus derivados, os corticoides, os análogos da vitamina D3, os inibidores da calcineurina e os retinoides (Fig. 1.11) (Kurian e Barankin, 2011).

Os retinoides são frequentemente utilizados no tratamento tópico da psoríase, em monoterapia ou em associação com outras terapêuticas. Os seus mecanismos de ação na

psoríase incluem a supressão da inflamação, a inibição da proliferação e da diferenciação das células epiteliais. O retinoide tópico aprovado para a psoríase é o tazaroteno, que é muito utilizado no tratamento da psoríase *vulgaris*, embora não seja comercializado em Portugal. O tazaroteno, tal como os outros retinoides de 3ª geração, atua ligando-se seletivamente com os RARs, RAR $\beta$  e RAR $\gamma$ . A ligação do tazaroteno com estes recetores induz a normalização do processo de diferenciação e de hiperproliferação dos queratinócitos e da inflamação. Os principais efeitos adversos do tazaroteno são o desenvolvimento de prurido, ardor, eritema, descamação e o seu elevado potencial teratogénico (Kurian e Barankin, 2011).



**Figura 1.11** - Terapêuticas utilizadas para o tratamento da psoríase ligeira, moderada e grave.

A terapêutica sistémica é utilizada no tratamento da psoríase grave, em monoterapia, em regime sequencial ou rotacional ou em associação com outras terapêuticas; é também usada em casos que apresentam uma grande área de superfície corporal com lesões ou, ainda, em casos menos graves, mas refratários a outros tipos de tratamento, menos agressivos. Os fármacos utilizados na terapêutica sistémica da psoríase incluem o metrotexato, a ciclosporina, e os retinoides (Fig. 1.11). A grande maioria dos doentes tolera bem a terapêutica sistémica, no entanto, muitos destes fármacos podem causar efeitos adversos graves (Warren e Griffiths, 2008).

### 6.4.1 Efeitos dos retinoides sistêmicos

A acitretina é o retinoide de escolha no tratamento sistêmico da psoríase grave. É eficaz no tratamento de vários tipos de psoríase, sendo a psoríase eritrodérmica e a psoríase *pustular* as que apresentam uma melhor resposta à monoterapia com acitretina (Warren e Griffiths, 2008). A isotretinoína é também utilizada no tratamento da psoríase *pustular* e em placas, tendo um tempo de semi-vida menor que a acitretina e o etretinato. Contudo, parece ter uma eficácia terapêutica menor que a acitretina e o etretinato (Ellis e Krach, 2001; Mortazavi *et al.*, 2011).

O tratamento da psoríase com acitretina em monoterapia é feito com uma dose inicial que pode variar entre 25 e 50 mg por dia, sendo as doses mais altas reservadas para os casos graves ou resistentes de psoríase (Warren e Griffiths, 2008).

O mecanismo de ação da acitretina no tratamento da psoríase, ainda permanece em grande parte por esclarecer. Contudo, tem sido descrito que a acitretina compete com a tretinoína para a ligação às CRABP (Pastuszka e Kaszuba, 2011) e que tem capacidade para ativar todos os subtipos dos RARs, alterando a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na patogênese da psoríase e normalizando a proliferação e a diferenciação dos queratinócitos. A acitretina tem, ainda, uma ação imunomoduladora, particularmente dos linfócitos T, e uma atividade anti-inflamatória, por inibir a ativação dos leucócitos polimorfonucleares e a sua migração para as lesões psoriáticas (Warren e Griffiths, 2008).

Dos efeitos adversos da terapêutica com acitretina, a teratogenicidade é o mais grave. Os efeitos adversos mais comuns são efeitos mucocutâneos, tais como, queilite, secura das mucosas da boca, nariz e olhos, prurido, fotossensibilidade, descamação cutânea, fragilidade cutânea e alopecia. Tem também sido associada hepatotoxicidade, hiperlipidemia, dores musculares, calcificação de ligamentos e osteoporose. Aproximadamente 33% dos doentes tratados com acitretina apresentam uma atividade elevada das enzimas hepáticas; cerca de 10-30 % desenvolvem hipercolesterolemia e cerca de 25% a 50% dos doentes desenvolvem hipertrigliceridemia. As alterações hepáticas e lipídicas são geralmente reversíveis após 4 a 8 semanas do término da terapêutica. Foram referidos casos raros de pancreatites, associadas a hipertrigliceridemia (Warren e Griffiths, 2008; Pastuszka e Kaszuba, 2011).

A acitretina não deve, portanto, ser administrada a indivíduos com patologia hepática, história de dislipidemias familiares, em caso de alcoolismo, uma vez que o álcool

converte a acitretina em etretinato, que tem um tempo de semi-vida muito longo no organismo, e está contraindicado nas grávidas. Nas mulheres em idade fértil deve ser utilizado um contraceptivo antes de iniciar o tratamento, e permanecerem sem engravidar, por um período de cerca de 3 anos, após o tratamento com acitretina (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011).

Outros efeitos adversos incluem artralgias, mialgias, hipertensão intracraniana benigna, pseudotumor cerebral (um risco que aumenta se os retinoides são tomados em associação com tetraciclina), diminuição da visão noturna, e alterações gastrointestinais (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011).

### **6.4.2 A fototerapia e a fotoquimioterapia**

A fototerapia com radiação UVB de banda larga (BBUVB) foi usada durante bastante tempo no tratamento da psoríase, em monoterapia ou em associações terapêuticas (Nolan *et al.*, 2010). No entanto, não foi bem tolerada pelos doentes devido ao seu potencial eritemogénico. A fototerapia com UVB de banda estreita (NBUVB), com um comprimento de onda de 311 ( $\pm 2$ ) nm, começou a ser utilizada há cerca de 24 anos no tratamento da psoríase, sem produzir eritema significativo. Assim, a fototerapia BBUVB foi gradualmente substituída pela fototerapia NBUVB ao longo dos últimos anos, apresentando melhores resultados no tratamento e menos efeitos secundários (Dogra e De, 2010; Rajpara *et al.*, 2010).

O objetivo da fototerapia é eliminar as lesões da psoríase com um número mínimo de sessões, uma dose cumulativa baixa de UV e o mínimo possível de efeitos secundários. A dose inicial de UV é calculada com base na dose eritematosa mínima, aumentando-se a dose ao longo das sessões, sem exceder um determinado valor cumulativo. A frequência da exposição à NBUVB pode variar entre 3 a 5 sessões por semana (Dogra e De, 2010; Rajpara *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação da NBUVB não é totalmente conhecido, embora se reconheça uma ação antiproliferativa e imunossupressora, induzindo apoptose dos linfócitos T e dos queratinócitos, diminuição da inflamação e da hiperplasia da epiderme; induz também a formação de fotoprodutos de DNA, principalmente dímeros de pirimidina, que interferem com a progressão do ciclo celular, inibindo o crescimento celular das camadas basais e suprabasais da epiderme. A radiação UVB induz, ainda, a libertação de prostaglandinas e

altera a expressão das citocinas de resposta imunitária Th1 e Th17 para uma resposta Th2. A NBUVB inibe também as funções das células apresentadoras de antígeno, modificando os mecanismos de sinalização celular (Dogra e De, 2010; Rajpara *et al.*, 2010).

Em geral, a terapêutica de irradiação NBUVB é bem tolerada, contudo existem alguns efeitos secundários. Para além do risco de eritema, há uma acentuada secura da pele, o que pode provocar prurido. Além disso, a imunossupressão induzida pela NBUVB pode conduzir a surtos de doenças infecciosas na pele. Por outro lado, a longo prazo, a fotocarcinogénese e o fotoenvelhecimento podem também tornar-se um importante problema de saúde (Schneider *et al.*, 2008).

Não existe qualquer evidência que indique que a NBUVB está associada com um aumento do risco de cancro de pele. Contudo, dado que o período de latência para o desenvolvimento de cancro de pele pode estender-se por mais de 20 anos, vários autores apontam a importância da realização de estudos que permitam clarificar este potencial efeito (Schneider *et al.*, 2008; Rajpara *et al.*, 2010).

A NBUVB tem algumas vantagens relativamente à maioria dos agentes sistémicos, dado que pode ser usada em quase todos os doentes, independentemente de apresentarem comorbilidades. Além disso, pode ser utilizada durante a gravidez e em crianças. Contudo, é contraindicada em doentes fotossensíveis e naqueles em que há predisposição ou história de neoplasias cutâneas (Dogra e De, 2010; Rajpara *et al.*, 2010).

A fotoquimioterapia com radiação UVA e psoraleno (PUVA) consiste na exposição do doente à irradiação UVA (320-400 nm) após a administração de um fotossensibilizador oral, o psoraleno, que absorve a luz entre 315 nm e 350 nm e é fotoativado pela irradiação UVA. Atualmente, existem vários psoralenos utilizados na PUVA, sendo o 8-metoxipsoraleno o mais comum (Schneider *et al.*, 2008; Rajpara *et al.*, 2010). A dose de UVA a aplicar é determinada pela dose eritemogénica mínima de cada doente, sendo as sessões de fotoquimioterapia de duas a quatro vezes por semana (Schneider *et al.*, 2008; Rajpara *et al.*, 2010).

A fotoquimioterapia PUVA tem uma ação anti-inflamatória, antiproliferativa e imunossupressora. O comprimento de onda da radiação UVA permite a sua penetração até à derme, afetando, portanto, as células dendríticas dérmicas, fibroblastos dérmicos, células endoteliais, mastócitos e granulócitos (Rajpara *et al.*, 2010); provoca danos no DNA, indiretamente, através da formação de ROS, os quais desencadeiam danos oxidativos no DNA e a formação de fotoprodutos (Narayanan *et al.*, 2010; von Thaler *et al.*, 2010). O psoraleno, após a exposição de UVA, intercala-se entre pares de bases de DNA e forma

ligações cruzadas de DNA, inibindo a síntese de DNA e, portanto, a proliferação celular (Rajpara *et al.*, 2010).

Esta terapêutica é geralmente bem tolerada, no entanto existem alguns efeitos secundários potencialmente graves, como as reações fototóxicas. Após 24 horas, é frequente o aparecimento de um eritema disperso. Estão também descritos alguns sintomas gastrointestinais, tais como náuseas e vômitos. Por outro lado, como os psoralenos orais são metabolizados no fígado, podem induzir aumento dos níveis das transaminases. O psoraleno pode também ligar-se às proteínas do cristalino, com consequente desenvolvimento de cataratas, pelo que é sempre aconselhável o uso de óculos de sol durante pelo menos 12 horas após a fotoquimioterapia com PUVA. A longo prazo, a terapêutica com PUVA provoca fotoenvelhecimento e eventualmente fotocarcinogénese. Esta terapêutica induz cancro de pele não melanoma em mais de 25 % dos doentes tratados. Contudo, o risco de desenvolvimento de melanoma associado a este tratamento permanece ainda por esclarecer (Schneider *et al.*, 2008; Rajpara *et al.*, 2010).

A eficácia do tratamento da psoríase com fototerapia e fotoquimioterapia, a duração da remissão e a tolerância a estas terapêuticas têm sido comparadas em vários estudos. Relativamente à eficácia terapêutica, tem-se verificado que o tratamento com PUVA é mais eficaz, principalmente em doentes com valores de PASI mais elevados (Coimbra *et al.*, 2010b). A duração da remissão parece ser mais longa na terapêutica com NBUVB (Dogra e De, 2010; Nolan *et al.*, 2010). Os efeitos secundários a curto e a longo prazo associados com PUVA ocorrem em maior número. A NBUVB, pela sua maior segurança, é a terapêutica de primeira escolha. No entanto, em casos de psoríase resistente à NBUVB, a PUVA é considerada como a opção de tratamento (Schneider *et al.*, 2008; Rajpara *et al.*, 2010).

### **6.4.3 Associações terapêuticas**

As associações terapêuticas desempenham um papel importante na prática diária do tratamento da psoríase, já que permitem a utilização de menores doses de cada um dos agentes terapêuticos, com maior eficácia e menores efeitos adversos, que a monoterapia (Domm e Mrowietz, 2011).

Existem várias associações terapêuticas que são utilizadas no tratamento da psoríase, desde associações tópicas, tópicas e sistémicas, associação da fototerapia ou da

fotoquimioterapia com terapêuticas tópicas ou sistêmicas (Lebwohl *et al.*, 2004). Contudo, nem todas as associações têm um aumento da eficácia terapêutica. Algumas associações podem mesmo ser contraindicadas por potenciarem os efeitos adversos de cada uma (Domm e Mrowietz, 2011).

A associação terapêutica de agentes sistêmicos com fototerapia ou fotoquimioterapia é utilizada no tratamento da psoríase moderada a grave. A acitretina tem sido bastante utilizada em associação com outras terapêuticas, incluindo a fototerapia e a fotoquimioterapia, principalmente em formas resistentes de psoríase (Lebwohl *et al.*, 2004). A isotretinoína também tem sido utilizada em associação com a fototerapia e a fotoquimioterapia no tratamento desta doença (Anstey e Hawk, 1997; Mortazavi *et al.*, 2011).

A associação terapêutica da acitretina (Ozdemir *et al.*, 2008; Monfrecola e Baldo, 2009) ou da isotretinoína (Anstey e Hawk, 1997; Mortazavi *et al.*, 2011) com a fototerapia ou a fotoquimioterapia, permite reduzir a dose dos retinoides e a dose cumulativa da radiação UV, conseguindo-se assim reduzir os efeitos adversos de cada um dos agentes terapêuticos, obtendo, no entanto, uma boa eficácia no tratamento.

### **6.5 Etiologia e fisiopatologia da acne**

A acne é uma doença inflamatória crônica da pele, que afeta entre 85 a 100 % da população em qualquer momento da sua vida. Contudo, a maior incidência é na adolescência, devido às alterações hormonais que ocorrem na puberdade (Figueiredo *et al.*, 2011a).

A acne está associada a uma elevada morbidade psicológica, devido à localização das lesões, sobretudo a nível facial, dor, perda do bem-estar emocional, diminuição de autoestima e rejeição social (Purdy e de Berker, 2006; Rigopoulos *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos a acne é uma patologia de fácil diagnóstico, que se caracteriza pelo aparecimento de lesões não inflamatórias, constituídas por comedões e por pápulas foliculares não inflamatórias; observam-se também lesões inflamatórias constituídas por pápulas inflamatórias, pústulas e nódulos. Estas lesões tendem a aparecer nas áreas da pele que têm uma maior densidade de folículos sebáceos, tais como a face, a parte superior do tórax e o dorso (Figueiredo *et al.*, 2011a; Williams *et al.*, 2012).

## Introdução Geral

A acne é uma doença inflamatória de unidades pilosebáceas, que tem origem em alterações hormonais androgênicas que ocorrem na puberdade. Existem outros fatores, que podem contribuir para o aparecimento e/ou agravamento da acne, tais como a dieta, stresse, falta de hábitos de higiene e a exposição solar (Figueiredo *et al.*, 2011a; Williams *et al.*, 2012).

Foram identificados 4 fatores fisiopatológicos que estão envolvidos no desenvolvimento da acne: 1) hiperplasia das glândulas sebáceas, 2) anomalias na diferenciação e adesão dos queratinócitos, com consequente queratinização folicular anormal, 3) proliferação de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) e 4) reações inflamatórias e imunológicas (Figueiredo *et al.*, 2011a; Decker e Graber, 2012).

A hiperqueratinização e o aumento da produção sebácea cria um ambiente ideal para a proliferação de *P. acnes*, uma bactéria anaeróbia, que é um agente normal da flora microbiana da pele e tem propriedades inflamatórias e imunomoduladoras (Rigopoulos *et al.*, 2010; Decker e Graber, 2012).

A hiperplasia das glândulas sebáceas, os distúrbios do crescimento e a diferenciação da unidade folicular são os principais responsáveis pela formação dos comedões. Os comedões inicialmente fechados (cabeças brancas) podem abrir e ficar com um aspeto de “pontos negros” e evoluir para lesões inflamatórias visíveis, com subsequente formação de pápulas eritematosas, pústulas, nódulos e quistos (Rigopoulos *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2011a).

As pápulas têm geralmente pequenas dimensões (até 3 mm) e surgem como uma área de eritema e edema em redor do comedão. As pústulas, ocorrem geralmente, por inflamação da pápula, e sobrepõem-se a esta possuindo um conteúdo purulento. Os nódulos, por sua vez, têm estruturas semelhantes às pápulas, embora sejam de maiores dimensões (podendo atingir 2 cm). Os quistos são comedões de grandes dimensões que sofreram várias ruturas e recapsulações e apresentam geralmente um conteúdo pastoso e caseoso (Figueiredo *et al.*, 2011a).

O predomínio dos diferentes tipos de lesões permite definir a acne em três tipos: acne comedónica, acne pápulo-pustulosa e acne nódulo-quística. O número de lesões e o tipo de manifestações clínicas, define a severidade da acne, classificando-a como ligeira, moderada ou grave (Figueiredo *et al.*, 2011a; Figueiredo *et al.*, 2011b).



## 6.6 Terapêutica da acne

As diferentes terapêuticas tópicas e sistêmicas disponíveis para o tratamento da acne têm como objetivo controlar os diferentes fatores envolvidos na patogênese da doença, nomeadamente, controlar a hiperqueratose, reduzir a produção de sebo, a população bacteriana e eliminar a inflamação (Figueiredo *et al.*, 2011b; Kraft e Freiman, 2011).

Os tratamentos tópicos são úteis no tratamento da acne ligeira e moderada ou como adjuvantes de terapêuticas sistêmicas nas formas mais graves. Das terapêuticas tópicas mais comuns destacam-se os antibióticos, outros agentes antimicrobianos e os retinoides tópicos (Figueiredo *et al.*, 2011b; Williams *et al.*, 2012).

Os retinoides mais utilizados na terapêutica tópica são a tretinoína, a isotretinoína e o adapaleno. Esta terapêutica é útil no tratamento de lesões inflamatórias e não inflamatórias da acne ligeira e moderada. Os retinoides tópicos reduzem a formação de novos comedões, e têm uma ação anti-inflamatória (Figueiredo *et al.*, 2011b; Kraft e Freiman, 2011).

A isotretinoína é também usada na terapêutica sistémica da acne, sendo indicada no tratamento da acne nódulo-quística e em casos de acne moderada ou grave que não respondem a outros tipos de tratamento, ou em casos de recidivas (Figueiredo *et al.*, 2011b). Nos últimos anos, no entanto, alguns dermatologistas têm usado a isotretinoína sistémica no tratamento de doentes com formas menos graves de acne que produzem cicatrizes ou sofrimento psicológico excessivo (Rigopoulos *et al.*, 2010).

A isotretinoína é administrada em doses de 30-80 mg/dia, não devendo exceder-se a dose cumulativa total de 120 -150 mg/kg. A duração do tratamento varia de acordo com a dose administrada tendo, geralmente, uma duração de 16-30 semanas (Layton, 2009; Rademaker, 2012). A isotretinoína tem também sido utilizada em doses mais baixas (10-20 mg/dia) em tratamentos longos, tendo mostrado uma eficácia semelhante ao observado no tratamento da acne ligeira e moderada, e apresentando um melhor perfil de tolerabilidade (Amichai *et al.*, 2006; Sardana e Garg, 2011).

A isotretinoína diminui a proliferação, a diferenciação e atividade de sebócitos basais, diminuindo o tamanho das glândulas sebáceas e a sua capacidade de produzir sebo. A isotretinoína induz a apoptose dos sebócitos através de mecanismos independentes dos RARs; modula também a maturação dos queratinócitos, normaliza a queratinização folicular e inibe a comedogênese. Embora a isotretinoína não seja um agente antimicrobiano, reduz eficazmente o número total de P. acnes, por modificação do microambiente folicular, tornando-o muito menos favorável à colonização com P. acnes. A

## Introdução Geral

isotretinoína tem também propriedades anti-inflamatórias, por inibir a motilidade e a migração de neutrófilos para a pele e induzir outros mecanismos, incluindo a redução de metaloproteínases da matriz e a diminuição da população de *P. acnes* (Layton, 2009; Rigopoulos *et al.*, 2010).

A isotretinoína, como todos os outros retinoides, é teratogénica, podendo ocasionar abortos espontâneos ou má formação do feto. Além da teratogenicidade, o tratamento com isotretinoína está associado a outros efeitos adversos, dependentes da dose terapêutica administrada, que incluem efeitos mucocutâneos, nomeadamente da pele e mucosas, podendo desencadear queilite. Pode ocorrer ocasionalmente descamação das palmas das mãos e plantas dos pés, no entanto, este efeito é mais comum na terapêutica com acitretina. Têm sido também descritas alterações da função hepática, em cerca de 15% dos doentes, aumento dos TG e dos níveis de colesterol (Goodfield *et al.*, 2010).

Outros efeitos adversos descritos em doentes tratados com isotretinoína são eritema facial, eczema, alopecia, fotossensibilidade, mialgias e artrites. Alterações no sistema nervoso central, como hipertensão craniana e pseudotumor cerebral têm também sido descritos nalguns doentes (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011). Há também referência a alguns casos de perturbação de humor, que raramente podem levar a comportamentos suicidas. No entanto, permanece ainda por esclarecer se estes comportamentos se devem à terapêutica ou à própria patologia (Purdy e de Berker, 2006; Goodfield *et al.*, 2010).

## 7. Objetivos e plano de trabalho

Vários estudos têm referido a importância terapêutica da acitretina e da isotretinoína no tratamento de algumas doenças inflamatórias da pele, e na quimioprevenção do cancro. No entanto a sua utilização clínica é limitada pelos inúmeros efeitos adversos, que ocorrem geralmente a longo prazo. Assim, o estudo de novas associações de moléculas que permitam uma maior eficácia terapêutica com menos efeitos secundários é fundamental para o tratamento das doenças inflamatórias da pele e na quimioprevenção do cancro.

De uma forma geral, as associações terapêuticas permitem aumentar a eficácia terapêutica, por utilizarem agentes farmacológicos com mecanismos de ação complementares, e ao mesmo tempo por minimizarem os efeitos adversos de cada composto individualmente. A associação terapêutica dos retinoides com os antiestrogénios parece ser uma estratégia promissora a nível da quimioprevenção (Searovic *et al.*, 2009; Koay *et al.*, 2010), embora pouco se conheça acerca dos seus mecanismos de ação quando administrados em conjunto.

De facto, os mecanismos de ação farmacológica e toxicológica da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios; bem como o efeito destes dois retinoides em associação com a NBUVB ou com a PUVA no tratamento das doenças inflamatórias da pele estão por esclarecer. Assim, neste trabalho estudámos os efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou com os antiestrogénios TAM e OHTAM em mitocôndrias e linhas celulares de melanoma e de cancro da mama. Adicionalmente, estudámos os efeitos genotóxicos da acitretina e da isotretinoína em associação com o TAM ou com o OHTAM, bem como em monoterapia ou em associação com a NBUVB ou com a PUVA no tratamento de doentes com psoríase *vulgaris* e com acne *vulgaris*. Por outro lado, procedeu-se à avaliação clínica de doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris* sob terapêutica com a acitretina e a isotretinoína em monoterapia ou em associação com a NBUVB ou a PUVA, tendo sido determinados alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos ao longo do tratamento, para avaliar possíveis efeitos tóxicos.

Vários trabalhos têm referido o aparecimento de lesões hepáticas associadas ao tratamento com acitretina (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011) e com isotretinoína (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011). Contudo, os mecanismos de hepatotoxicidade e de apoptose, não estão esclarecidos. Considerando que as mitocôndrias

## Introdução Geral

são reconhecidas como importantes alvos nos mecanismos de hepatotoxicidade e de apoptose induzidas por diferentes fármacos (Russmann *et al.*, 2009; Pessayre *et al.*, 2012), é possível que os mecanismos associados à acitretina e à isotretinoína possam ocorrer através de processos mitocondriais. Por outro lado, considerando que o TAM (Custodio *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2005), e o seu metabolito ativo o OHTAM (Cardoso *et al.*, 2002a; Moreira *et al.*, 2004) inibem a MPT e têm a capacidade de se ligarem ao ANT (Cardoso *et al.*, 2003), também é possível que o TAM e o OHTAM possam impedir a hepatotoxicidade induzida por estes dois retinoides. No sentido de esclarecer estes mecanismos, avaliaram-se os efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou com o OHTAM nas funções bioenergéticas e no conteúdo do transportador de nucleótidos de adenina. Os resultados deste trabalho estão apresentados no Capítulo II e constituem a base de dois artigos científicos:

“Acitretin affects bioenergetics of liver mitochondria and promotes mitochondrial permeability transition: Potential mechanisms of hepatotoxicity.” publicado na revista *Toxicology*.

“The antiestrogen 4-hydroxytamoxifen protects against isotretinoin-induced permeability transition and bioenergetic dysfunction of liver mitochondria: comparison with tamoxifen.” publicado na revista *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*.

Além do efeito sinérgico dos retinoides em associação com os antiestrogénios, os RARs e os ERs parecem ter também um mecanismo de ação complementar, por cooperarem numa atividade de transcrição eficaz nas células do cancro da mama (Hua *et al.*, 2009; Ross-Innes *et al.*, 2010); sendo também possível que a acitretina ou a isotretinoína em associação com o TAM ou com o OHTAM possam ter um efeito antiproliferativo aditivo/sinérgico em linhas celulares de cancro da mama ER(+) e de melanoma. Assim, foram determinados os efeitos antiproliferativos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios, numa linha celular de melanoma K1735-M2, e numa linha celular de cancro da mama MCF-7 ER(+). Além disso, estudaram-se também os efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM na progressão do ciclo celular e na morte celular das células de melanoma K1735-M2.

Os resultados deste trabalho estão apresentados no Capítulo III.

Atualmente, a acitretina é utilizada a nível clínico em monoterapia ou em associação com a NBUVB ou com a PUVA no tratamento da psoríase *vulgaris* moderada e grave; enquanto a isotretinoína é frequentemente utilizada em monoterapia ou em associação com

a NBUVB, no tratamento de doentes com psoríase *vulgaris* e com acne *vulgaris*. Contudo, como ambas as doenças necessitam de intervenções terapêuticas frequentes e/ou prolongadas, o estudo da genotoxicidade da acitretina e da isotretinoína torna-se uma questão de extrema importância para estes doentes. Os estudos que existem na literatura sobre a genotoxicidade dos retinoides são controversos. Para esclarecer estes efeitos, foi estudada a atividade citotóxica e genotóxica da acitretina e da isotretinoína em doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris*, tratados com acitretina ou isotretinoína em monoterapia ou em associações terapêuticas com NBUVB ou com PUVA. Foram realizados também estudos *in vitro* em culturas celulares sanguíneas, para avaliar a actividade citogenotóxica da acitretina ou da isotretinoína individualmente ou da acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM.

Os resultados deste estudo estão apresentados no Capítulo IV, e constituem a base de dois artigos já publicados:

“Cytotoxic and genotoxic effects of acitretin, alone or in combination with psoralen-ultraviolet A or narrow-band ultraviolet B-therapy in psoriatic patients.” publicado na revista Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.

“The *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of isotretinoin assessed by cytokinesis blocked micronucleus assay and comet assay.” publicado na revista Toxicology in Vitro.

A maioria dos trabalhos que estudam as várias abordagens terapêuticas no tratamento da psoríase e da acne abordam principalmente o sucesso terapêutico, e não os seus efeitos secundários. Assim, neste estudo propusemo-nos avaliar os efeitos adversos das diferentes terapêuticas aplicadas no tratamento da psoríase *vulgaris* e da acne *vulgaris* que usam retinoides, fazendo a determinação de vários parâmetros bioquímicos e hematológicos em doentes com psoríase *vulgaris*, antes e após o tratamento com a acitretina em monoterapia ou associada com a NBUVB ou com a PUVA, e em doentes com psoríase ou com acne sob terapêutica com isotretinoína em monoterapia ou em associação com a NBUVB. Foram estudados parâmetros para avaliação da função hepática, renal e da função muscular, assim como do metabolismo da glucose e do perfil lipídico. Foi também feito o estudo hematológico que incluiu o hemograma e a avaliação da HbLM e do perfil da proteína banda 3. Finalmente, foram também analisadas algumas reações adversas descritas pelos doentes, que poderão estar relacionadas com a terapêutica administrada.

Os resultados deste trabalho estão apresentados no Capítulo V.

## Introdução Geral

Em suma, pretendemos com este trabalho avaliar se as associações terapêuticas da acitretina e da isotretinoína com o TAM ou com o OHTAM, bem como a utilização clínica da acitretina e da isotretinoína em monoterapia ou em associação com a NBUVB ou com a PUVA poderão no futuro apresentar uma maior eficácia e menor toxicidade relativamente aos regimes terapêuticos utilizados atualmente nas doenças neoplásicas e nas doenças inflamatórias da pele, respetivamente.

## **Capítulo II**

**Efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente  
ou em associação com os antiestrogénios TAM e OHTAM  
em mitocôndrias de fígado**





## 1. Introdução

A acitretina e a isotretinoína são retinoides sintéticos, frequentemente utilizados no tratamento de várias doenças inflamatórias da pele, estando atualmente a ser estudada a sua utilização no tratamento de alguns tipos de cancro.

Alguns estudos têm sugerido que os retinoides inibem o crescimento das células tumorais através dos recetores nucleares dos retinoides, isto é, através dos recetores RARs e RXRs (Chambon, 1996). Também tem sido descrito que os retinoides podem atuar de forma independente dos RARs (Sabichi *et al.*, 2003), como sugerem os efeitos secundários da terapêutica com acitretina (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011), ou com isotretinoína (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011), nomeadamente a hepatotoxicidade observada em alguns doentes tratados com estes fármacos. Foi também descrito um caso de insuficiência hepática fulminante após sobredosagem de acitretina (Leithead *et al.*, 2009). Contudo, os mecanismos de hepatotoxicidade e apoptose associados à terapêutica com acitretina e com isotretinoína permanecem por esclarecer e é possível que alguns destes mecanismos possam ocorrer através de processos mitocondriais. De facto, alguns estudos em culturas celulares têm mostrado que a isotretinoína induz diversas alterações mitocondriais, tais como a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Guruvayoorappan *et al.*, 2008; Vuletic *et al.*, 2010) e a ativação da caspase-3 (Arce *et al.*, 2005; Guruvayoorappan *et al.*, 2008), desencadeando mecanismos de morte celular por apoptose. Além disso, a isotretinoína (em concentrações de 16-132 nmoles/mg proteína ou 4-33  $\mu$ M) induz a MPT e a libertação de citocromo *c* (Rigobello *et al.*, 1999), também sugerindo que as mitocôndrias podem estar envolvidas nos mecanismos de ação e/ou nos efeitos toxicológicos induzidos por este retinoide. Relativamente à acitretina, embora não existam estudos em mitocôndrias isoladas, tem-se verificado que esta diminui a razão da expressão das proteínas Bcl-2/BAX em linhas celulares de melanoma (Ren *et al.*, 2008) e de carcinoma de células escamosas da língua (Ran *et al.*, 2005), o que sugere que a acitretina também induz mecanismos de morte celular programada dependentes das mitocôndrias.

Diferentes estudos, que têm avaliado os mecanismos de lesões hepáticas e apoptose induzidas por fármacos, sugerem que as mitocôndrias são alvos críticos, que direta ou indiretamente podem estar envolvidas em diferentes mecanismos de hepatotoxicidade (Russmann *et al.*, 2009; Pessayre *et al.*, 2012). Assim, as mitocôndrias têm sido

reconhecidas como importantes alvos nos mecanismos de hepatotoxicidade devido às suas funções essenciais na célula, fornecendo energia, produzindo ROS, regulando os mecanismos intracelulares de cálcio e de morte celular através da MPT (Lemasters *et al.*, 2009; Starkov, 2010).

O ANT está envolvido na produção de ATP e na regulação de mecanismos de morte celular, sendo considerado um alvo importante nos mecanismos de lesões hepáticas induzidas por diferentes compostos. Assim, o ANT catalisa a exportação do ATP para o citosol com a importação concomitante de ADP para a matriz; no entanto, pode também funcionar como um elemento importante na regulação da MPT (Lemasters *et al.*, 2009; Zorov *et al.*, 2009).

A abertura do poro da MPT é caracterizada por despolarização do  $\Delta\psi$ , libertação do  $\text{Ca}^{2+}$ , intumescimento mitocondrial e ruptura da membrana mitocondrial. Estes processos levam à libertação de citocromo *c* e de outras proteínas pró-apoptóticas, que podem ativar a cascata de caspases, amplamente envolvidas em mecanismos de morte celular por apoptose (Jeong e Seol, 2008; Smith *et al.*, 2008). Portanto, os compostos que interferem com os processos metabólicos do fígado, diminuindo a produção de ATP, ou induzindo mecanismos de morte celular, podem ser considerados hepatotóxicos. Além disso, a indução da MPT, a diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial ou as alterações no sistema de transporte de elétrões, desregulam a oxidação dos ácidos gordos, que tem sido implicada numa variedade de patologias relacionadas com alterações no metabolismo lipídico e hepatotoxicidade (Grattagliano *et al.*, 2012; Pessayre *et al.*, 2012).

Considerando que os RARs e os ERs, dois recetores nucleares com uma estrutura básica comum (Chambon, 1996), têm um mecanismo de interação na inibição da proliferação de células de cancro da mama (Hua *et al.*, 2009; Ross-Innes *et al.*, 2010), é possível que a associação da acitretina ou da isotretinoína com antiestrogénios possa ser uma terapêutica promissora no tratamento deste tipo de cancro. Como o TAM (Custodio *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2005) e o seu metabolito ativo, o OHTAM (Cardoso *et al.*, 2002a; Moreira *et al.*, 2004) inibem a MPT e têm a capacidade de se ligarem ao ANT (Cardoso *et al.*, 2003), também é possível que possam impedir a hepatotoxicidade induzida por estes dois retinoides. No entanto, os efeitos da acitretina e da isotretinoína nas mitocôndrias estão pouco esclarecidos e os seus efeitos, em associação com o TAM e o OHTAM ainda não foram estudados.

Por outro lado, tendo em conta que o TAM desencadeia efeitos adversos graves (Wong e Ellis, 2004), que apresenta geralmente uma grande variação na eficácia

terapêutica bem, como nos efeitos secundários, devido aos diferentes polimorfismos que existem nos genes *CYP3A4* e *CYP2D6* (Damodaran *et al.*, 2012; Kiyotani *et al.*, 2012), é possível que o OHTAM possa constituir uma alternativa de substituição ao TAM. De facto, o OHTAM apresenta uma afinidade de ligação com os ERs 30 a 100 vezes superior ao TAM (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012), uma maior tolerabilidade (Sauvez *et al.*, 1999) e uma menor toxicidade que o TAM (Cruz Silva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002b).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou com o OHTAM em mitocôndrias de fígado de rato, nomeadamente na MPT, nas funções bioenergéticas e no conteúdo de ANT.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Reagentes

A acitretina, a isotretinoína, o OHTAM, o TAM, a albumina bovina sérica (BSA), o ADP, o ATP, o Asc, o CAT, a CyA, a cisteína (Cys), o ditioneitol (DTT), a GSH, a N-acetilcisteína (NAC), a N-etilmaleimida (NEM), o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o ácido etilenoglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter) N,N,N',N'-tetracético (EGTA), a oligomicina, a rotenona, o ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico (Mops), o ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N-2-etanossulfónico (HEPES) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). O tetrafenilfosfónio (TPP<sup>+</sup>), o carbonildiciano-*p*-trifluoro-metoxifenilhidrazona (FCCP), o dodecilsulfato de sódio (SDS), a sacarose e o tris-hidroximetil-aminometano (Tris) foram obtidos da Merck (Dramstadt, Germany).

### 2.2 Isolamento de mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos da espécie Wistar (fêmeas ou machos), com 200 a 300 g de peso. Antes de serem sacrificados, os ratos foram mantidos cerca de 12 horas em jejum com água *ad libitum*, de forma a permitir que esgotassem as reservas de glicogénio e reduzissem as reservas de gordura acumuladas no fígado. Este

procedimento tem como intuito preservar a integridade das mitocôndrias durante o seu isolamento. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial de acordo com o método descrito por Gazzoti et al. (1979), com pequenas modificações (Moreira *et al.*, 2006).

O animal foi sacrificado por deslocamento cervical e o fígado foi imediatamente removido e colocado no meio de homogeneização, constituído por sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4 e BSA deslipidificada a 0,1 % (w/v), a 4 °C. Todo este procedimento foi realizado colocando o material de laboratório em gelo, de modo a permitir manter a temperatura entre 0 e 4 °C. O fígado foi triturado com uma tesoura e lavado várias vezes com meio de homogeneização, para eliminar o excesso de sangue. Posteriormente, o fígado triturado foi homogeneizado em 60 mL de meio de homogeneização, utilizando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com um pistão de teflon. Esta etapa de homogeneização teve como objetivo a desintegração tecidular e a lise celular, obtendo-se uma suspensão constituída por células fragmentadas, células intactas, organelos intracelulares (núcleos, mitocôndrias, lisossomas, peroxissomas, fragmentos de endoplasma) e eritrócitos. O homogeneizado foi centrifugado a 800 g, durante 10 minutos a 4 °C, numa centrífuga refrigerada, com o objetivo de remover os componentes mais densos da suspensão, tais como células fragmentadas e intactas, incluindo eritrócitos, núcleos e outros componentes celulares. O sobrenadante foi cuidadosamente decantado para novos tubos e o volume foi ajustado para 40 mL com meio de homogeneização. Procedeu-se a uma centrifugação a 10 000 g durante 10 minutos e o sedimento resultante contendo as mitocôndrias, foi ressuspensão em cerca de 2 mL de meio de lavagem, constituído por sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2, a 4 °C. A suspensão mitocondrial foi diluída em 40 mL de meio de lavagem e centrifugada novamente a 10 000 g durante 10 minutos, tendo-se repetido este procedimento mais uma vez. No final, a fração mitocondrial purificada foi ressuspensa em 2 - 3 mL de meio de lavagem, de modo a obter uma concentração proteica de cerca de 25 a 30 mg/mL em meio de lavagem. Por último, foi avaliada a concentração proteica da suspensão mitocondrial, utilizando o método colorimétrico do biureto (Gornall *et al.*, 1949).

## 2.3 Avaliação da permeabilidade transitória mitocondrial

### 2.3.1 Determinação do potencial de membrana

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) foi efetuada para estudar os efeitos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM na MPT.

O  $\Delta\psi$  foi determinado indiretamente com um eletrodo de  $\text{TPP}^+$  seletivo ao cátion lipofílico  $\text{TPP}^+$ , e como eletrodo de referência foi utilizado o eletrodo de calomelanos ( $\text{Ag}/\text{AgCl}_2$ ) (modelo MI 402; Microeletrodes, Inc., Bedford, NH). Os eletrodos foram ligados a um aparelho de pH (Crison micro pH 2001) e o sinal correspondente à diferença de potencial gerada entre os eletrodos foi debitado num registador Kipp & Zonen, após ter passado por um circuito de compensação de voltagem basal (Madeira, 1975).

O  $\Delta\psi$  foi calculado como descrito por Kamo et al. (1979), assumindo que a distribuição do  $\text{TPP}^+$  entre a mitocôndria e o meio respeita a equação de Nernst:

$$\Delta\psi \text{ (mV)} = 59 \log (v/V) - 59 \log (10^{\Delta E/59} - 1),$$

em que  $v$  representa o volume mitocondrial,  $V$  o volume do meio de incubação e  $\Delta E$  a deflexão do potencial do eletrodo desde a linha basal. Para o volume da matriz mitocondrial assumiu-se o valor de 1,1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  proteína (Masini *et al.*, 1984).

A determinação do  $\Delta\psi$  foi realizada numa câmara de reação aberta termostatizada a 30 °C, sob agitação magnética contínua. A suspensão mitocondrial (1 mg) foi adicionada a 2 mL de meio de reação de MPT contendo sacarose 200 mM, Tris-Mops 10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1mM, EGTA 10  $\mu\text{M}$  (pH 7,4), suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$ , e  $\text{TPP}^+$  4  $\mu\text{M}$ . As mitocôndrias foram energizadas pela adição de succinato 5 mM. Após o  $\Delta\psi$  ter atingido o estado de equilíbrio, foram adicionadas 120 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$  proteína. A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial através do uniporta de cálcio induz uma despolarização transitória do  $\Delta\psi$ , à qual se segue uma fase de recuperação do potencial mitocondrial, para valores semelhantes ao inicial (Custodio *et al.*, 2002).

Posteriormente, a suspensão mitocondrial foi pré-incubada com acitretina (5 nmoles/mg proteína ou 2,5  $\mu\text{M}$ ) ou com isotretinoína (5 nmoles/mg proteína ou 2,5  $\mu\text{M}$ ) durante 4 e 2 minutos, respetivamente, antes da adição do succinato. Os antiestrogénios, TAM e OHTAM (10 nmoles/mg proteína ou 5  $\mu\text{M}$ ), e a CyA (1  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados à suspensão mitocondrial 3 minutos antes da incubação com a acitretina ou com a

isotretinoína, ou adicionados após a energização das mitocôndrias e do  $\text{Ca}^{2+}$  (120 nmoles/mg proteína), isto é, durante a despolarização do  $\Delta\psi$  devido à indução da MPT.

No sentido de esclarecer os mecanismos subjacentes aos efeitos inibidores do TAM e do OHTAM na indução da MPT pela acitretina e pela isotretinoína foram estudados os efeitos de agentes protetores dos grupos SH e de antioxidantes (DTT 1 mM, NEM 50 mM, Cys 200  $\mu\text{M}$ , NAC 200  $\mu\text{M}$ , Asc 1 mM, GSH 1 mM), e de ligandos do ANT (ADP 75  $\mu\text{M}$  e ATP 150  $\mu\text{M}$ ), tendo sido incubados com a suspensão mitocondrial durante 3 minutos, antes da adição da acitretina ou da isotretinoína.

### **2.3.2 Determinação dos fluxos de $\text{Ca}^{2+}$**

Os fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial associados com a indução da MPT foram avaliados em função das alterações da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de reação, utilizando um eletrodo seletivo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Madeira, 1975; Cardoso *et al.*, 2004). Os ensaios foram realizados a 30 °C e a suspensão mitocondrial (1 mg) foi incubada em 2 mL de meio de reação de MPT, descrito anteriormente, e suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$ . As experiências foram iniciadas pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (120 nmoles/mg proteína) e de succinato 5 mM. Em seguida, a suspensão mitocondrial foi incubada com acitretina (5 nmoles/mg proteína ou 2,5  $\mu\text{M}$ ) ou isotretinoína (5 nmoles/mg proteína ou 2,5  $\mu\text{M}$ ) durante 4 e 2 minutos, respectivamente, antes da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e de succinato. O TAM, o OHTAM (10 nmoles/mg proteína ou 5  $\mu\text{M}$ ) e a CyA (1  $\mu\text{M}$ ) foram incubados com as mitocôndrias durante 3 minutos, antes da adição de acitretina ou de isotretinoína ou no decorrer do processo de libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  devida à indução da MPT.

Paralelamente, foram realizadas experiências em que agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes (DTT 1 mM, NEM 50  $\mu\text{M}$ , Cys 200  $\mu\text{M}$ , NAC 200  $\mu\text{M}$ , Asc 1 mM e GSH 1 mM) e ligandos do ANT (ADP 75  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados à suspensão mitocondrial 3 minutos, antes da incubação com a acitretina ou com a isotretinoína.

## 2.4 Avaliação da bioenergética mitocondrial

### 2.4.1 Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi avaliado por determinação polarográfica utilizando um eletrodo de O<sub>2</sub> do tipo Clark (YSI modelo 5331, Yellow Springs Instruments, Co.) ligado a um registrador Kipp & Zonen. A calibração do eletrodo de O<sub>2</sub> foi feita de acordo com Rickwood et al. (1987).

Os ensaios foram realizados em câmara fechada termostatizada a 30 °C, sob agitação magnética contínua (Cardoso *et al.*, 2003). A suspensão mitocondrial (1 mg) foi adicionada a 1 mL de meio de respiração, constituído por sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, HEPES 5 mM e EGTA 0,1 mM (pH 7,4). As reações foram iniciadas pela adição do substrato glutamato/malato 5 mM/2,5 mM ou succinato 5 mM. Quando foi usado o succinato como substrato o meio de reação foi suplementado com rotenona 2 µM. A adição de 200 nmoles de ADP/mg proteína origina um aumento do consumo de oxigênio, denominado por estado 3 da respiração. Após ter sido consumido todo o ADP, a velocidade de consumo de O<sub>2</sub> diminui e atinge-se o estado 4 da respiração. A posterior adição de 200 nmoles de ADP/mg proteína seguida de 1 µg/mL de oligomicina, um inibidor da fração Fo do complexo V do sistema fosforilativo, induz uma redução na velocidade de consumo de O<sub>2</sub> para valores próximos dos observados no estado 4 da respiração, sendo designado por estado 4 de oligomicina. O consumo de O<sub>2</sub> nestas condições permite estudar a indução da permeabilidade membranar por fuga de prótons através da fração Fo do complexo V do sistema fosforilativo. A adição de FCCP (1 µM), permite o transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna e induz a dissipação do  $\Delta\psi$  mitocondrial, o que origina um drástico aumento no consumo de O<sub>2</sub> pelo sistema de transporte de eletrões, designado por estado 4-FCCP. Assim, como não ocorre interferência do sistema fosforilativo na resposta do sistema de transporte de prótons, este ensaio permite estudar possíveis efeitos dos compostos com os componentes do sistema de transporte de eletrões.

Para estudar os efeitos da acitretina e da isotretinoína, as mitocôndrias foram incubadas durante 4 e 2 minutos, respetivamente, com diferentes concentrações destes compostos (5, 10 e 20 nmoles/mg proteína ou 5, 10 e 20 µM), antes da energização com glutamato/malato ou succinato. Foram ainda estudados os efeitos da acitretina e da isotretinoína em associação com os antiestrogénios, tendo as mitocôndrias sido incubadas

com o OHTAM e o TAM (10 nmoles/mg proteína ou 10  $\mu$ M) durante 3 minutos, antes da adição da acitretina ou da isotretinoína.

As velocidades de consumo de  $O_2$  foram calculadas a partir da calibração do elétrodo, fazendo corresponder a concentração de oxigénio de 240 nmoles  $O_2$ /ml de meio de respiração, a 30 °C, a 300 mm de papel do registador. As velocidades de consumo de  $O_2$  e os índices respiratórios, descritos em baixo, foram determinados de acordo com Chance e Williams (1956). O índice de controlo respiratório (ICR) foi calculado pelo quociente entre a velocidade de consumo de  $O_2$  (expressa em nmoles/min/mg proteína) na presença de ADP (estado 3 da respiração) e a velocidade após a fosforilação de todo o ADP adicionado (estado 4 da respiração). A eficiência fosforilativa (ADP/O) foi determinada pelo quociente entre a quantidade de ADP fosforilada (expresso em nmoles) e a quantidade de oxigénio consumida (expresso em nAtg) durante o estado 3 da respiração, isto é, necessário para fosforilar todo o ADP.

#### **2.4.2 Determinação do potencial de membrana**

O  $\Delta\psi$  foi determinado indiretamente, utilizando um elétrodo de  $TPP^+$ , como descrito anteriormente.

As reações foram realizadas numa câmara aberta termostatizada a 30 °C, sob agitação magnética contínua. A suspensão mitocondrial (1 mg) foi adicionada a 2 mL de meio de respiração como descrito anteriormente e suplementado com  $TPP^+$  4  $\mu$ M. As reações foram iniciadas pela adição de glutamato/malato 5 mM/2,5 mM ou succinato 5 mM, sendo no segundo caso o meio de reação suplementado com rotenona 2  $\mu$ M. Após a adição dos substratos, as mitocôndrias desenvolvem um potencial máximo de polarização. Posteriormente, a despolarização foi induzida pela adição de 150 nmoles de ADP/mg proteína, correspondente ao gasto de  $\Delta\psi$  necessário para transportar e fosforilar todo o ADP adicionado. Após ocorrer a fosforilação de todo o ADP adicionado segue-se a repolarização do potencial de membrana mitocondrial.

Para avaliar os efeitos da acitretina e da isotretinoína nas variações do  $\Delta\psi$ , as mitocôndrias foram incubadas durante 4 e 2 minutos, respetivamente, com diferentes concentrações dos retinoides (5, 10 e 20 nmol/mg proteína ou 2,5; 5 e 10  $\mu$ M) antes da adição de glutamato/malato ou de succinato.



### 2.4.3 Determinação da concentração dos nucleótidos de adenina por HPLC

As alterações na eficiência fosforilativa mitocondrial foram também avaliadas pela determinação das concentrações dos nucleótidos de adenina (ATP e ADP), recorrendo a um processo de extração ácida, seguido de separação por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), de fase reversa (Stocchi *et al.*, 1985). Os ensaios foram realizados em câmara fechada, termostaticada a 30 °C, sob agitação magnética contínua e o consumo de O<sub>2</sub> foi determinado com um eléctrodo de O<sub>2</sub> do tipo Clark, como descrito anteriormente. A suspensão mitocondrial (1 mg) foi adicionada a 1 mL de meio de respiração e as reações foram iniciadas pela adição de glutamato/malato 5 mM/2,5 mM, de modo a induzir o estado 4 da respiração e, decorridos 2 minutos, foram adicionadas 150 nmoles de ADP/mg proteína para induzir o estado 3 da respiração. Para avaliar os efeitos da acitretina e da isotretinoína nas alterações da eficiência fosforilativa mitocondrial, as mitocôndrias foram incubadas durante 4 e 2 minutos, respetivamente, com diferentes concentrações dos retinoides (5, 10 e 20 nmoles/mg proteína ou 5, 10 e 20 µM) antes da adição de glutamato/malato. As mitocôndrias foram também incubadas com TAM ou com OHTAM (10 nmoles/mg proteína ou 10 µM) durante 3 minutos, antes da adição da isotretinoína. Foi determinado o tempo necessário para ocorrer a fosforilação do ADP no ensaio controlo, e posteriormente foi recolhido em cada ensaio um volume de 250 µL, para avaliar o conteúdo em nucleótidos de adenina. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de uma solução de HClO<sub>4</sub> 0,6 M (EDTA-Na 25 mM), a 4 °C; e a mistura foi vigorosamente agitada sob vórtice e centrifugada a 10 000 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi neutralizado com KOH 3 M e centrifugado de novo a 10 000 g durante 2 minutos de modo a precipitar os cristais de KClO<sub>4</sub> formados. Todo o procedimento foi realizado a uma temperatura entre 0 e 4 °C, de modo a minimizar a degradação dos nucleótidos. As amostras foram conservadas a - 80 °C, para posterior análise cromatográfica. A separação foi feita num cromatógrafo Beckman-Gold, composto por uma bomba peristáltica (modelo 126) e um detetor de UV variável (modelo 166) controlados por um computador, tendo sido usada uma coluna Licrospher 100 RP-18 (5 mm) da Merck (Darmstad, Germany).

A deteção dos nucleótidos de adenina foi determinada a um comprimento de onda de 254 nm.

O protocolo utilizado consistiu na injeção de cerca de 20 µL da amostra e de uma eluição isocrática com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 100 mM (pH 6,5) contendo 1,2 % (v/v) de metanol. A

velocidade de fluxo foi de 1,0 ml/minuto e o tempo necessário para a separação dos nucleótidos de adenina foi de cerca de 10 minutos (Cardoso *et al.*, 2003).

#### **2.4.4 Determinação do conteúdo do transportador de nucleótidos de adenina**

Os efeitos da acitretina e da isotretinoína a nível do ANT foram avaliados por titulação com CAT, um inibidor do ANT (Vignais, 1976). Este ensaio baseia-se no facto de que o CAT reage com o ANT na estequiometria de 1:1 (Vignais, 1976; Zhou *et al.*, 2001). O conteúdo mitocondrial de ANT pode ser determinado através de titulação das mitocôndrias em respiração ativa (estado 3 da respiração) com CAT. Assim, quando as mitocôndrias são incubadas com concentrações crescentes de CAT, os locais ativos do ANT são bloqueados, de forma gradual em função da concentração de CAT, o que é indicativo de uma diminuição da eficiência fosforilativa devido à interferência com o ANT.

Os ensaios foram realizados em câmara fechada termostatzada a 30 °C, sob agitação magnética contínua. As velocidades de respiração mitocondrial foram determinadas pela avaliação do consumo de O<sub>2</sub> com um eléctrodo do tipo Clark (como descrito anteriormente). A suspensão mitocondrial (0,5 mg) foi adicionada a 1 mL de meio de respiração, constituído por sacarose 200 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), succinato 5 mM e rotenona 5 µM, e pré-incubada, durante 2 minutos, com diferentes concentrações de CAT. As mitocôndrias foram incubadas com acitretina e isotretinoína (5, 10 e 20 nmoles/mg proteína) durante 4 e 2 minutos, respetivamente, antes da adição de CAT. As reações foram iniciadas com a adição de ADP (0,1 mM), que desencadeia o estado 3 da respiração.

O conteúdo mitocondrial de ANT ativo foi determinado pela quantidade de CAT requerida para reduzir o estado 3 ao estado 4 da respiração, isto é, para atingir um estado em que não se observa estimulação da respiração após adição de ADP, tendo o CAT saturado os locais ativos do ANT (Vignais, 1976).

O perfil do gráfico do consumo de O<sub>2</sub> relativamente à concentração de CAT é bifásico, apresentando uma diminuição gradual da velocidade de respiração, seguida de um patamar de equilíbrio no consumo de O<sub>2</sub>, indicativo de que o estado 3 da respiração foi completamente inibido, ficando as mitocôndrias no estado 4 da respiração.

O conteúdo de ANT foi expresso pela quantidade de CAT por mg proteína

mitocondrial (Cardoso *et al.*, 2003; Oliveira e Wallace, 2006).

## 2.5 Análise estatística

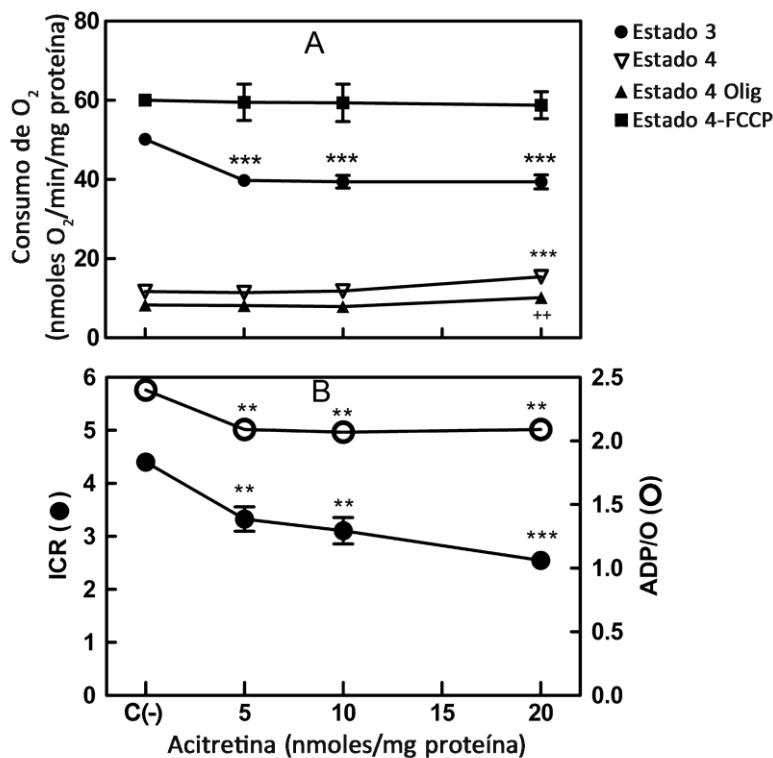
Foi utilizado o “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS, versão 17 para o Windows, SPSS, Chicago, IL, USA). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de quatro experiências independentes e os resultados foram analisados utilizando o teste OneWay Anova associado ao teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prim 5 (San Diego, California).

## 3. Resultados

### 3.1 Efeitos da acitretina na bioenergética e na permeabilidade transitória mitocondrial: associação com o TAM e o OHTAM

#### 3.1.1 Resultados

Os efeitos da acitretina na bioenergética mitocondrial foram avaliados pelo consumo de oxigénio (Fig. 2.1), potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) (Fig. 2.2) e por determinação dos níveis de ADP e ATP (Tabela 2.1). Nas condições de controlo, isto é, na ausência de acitretina, a adição de ADP às mitocôndrias energizadas com glutamato/malato induziu um forte consumo de oxigénio (50,2 nmoles de  $O_2$ /min/mg proteína) para suportar a taxa de fosforilação de ADP (estado 3 da respiração) (Fig. 2.1A). Após ter sido fosforilado todo o ADP, as mitocôndrias voltaram ao estado 4 da respiração, em que o consumo de oxigénio é inferior ao do estado 3 da respiração (11,7 nmoles de  $O_2$ /min/mg proteína) (Fig. 2.1A). A acitretina, em concentrações de cerca de 5 nmoles/mg proteína induziu uma redução significativa no estado 3 da respiração, em comparação com o controlo. Em concentrações acima de 10 nmoles de acitretina/mg proteína, a diminuição do estado 3 da respiração foi semelhante ao observado em presença de 5 nmoles/mg proteína, o que sugere que esta diminuição não é estatisticamente dependente da concentração utilizada (Fig. 2.1A).

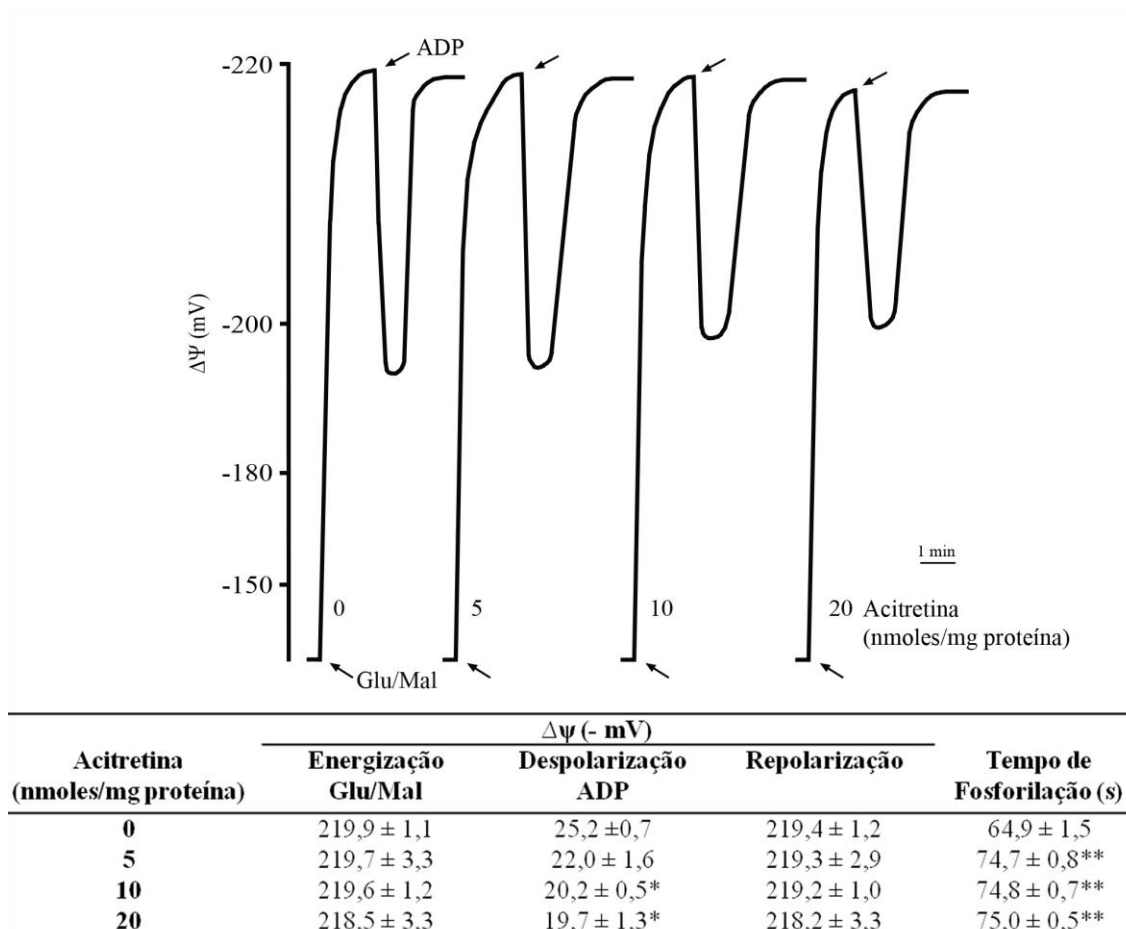


**Figura 2.1** - Efeitos da acitretina no consumo de O<sub>2</sub> e índices de ICR e ADP/O em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato. A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias foi avaliada no estado 3 (círculos fechados), no estado 4 (triângulos abertos), no estado 4 oligomícina (estado 4 olig) (triângulos fechados) e no estado 4-FCCP (quadrados fechados) (A). Os índices respiratórios ICR (círculos fechados) e ADP/O (círculos abertos) (B) foram determinados como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais (quando as barras de erro não estão visíveis, o SEM está contido no tamanho dos símbolos). \*\*\*p <0,001 e \*\*p <0,01 quando comparado com o controle (na ausência de acitretina); ++p <0,01 quando o estado 4 de oligomícina foi comparado com o estado 4 da respiração.

A pré-incubação das mitocôndrias com 5 e 10 nmoles de acitretina/mg proteína não induziu alterações estatisticamente significativas no estado 4 da respiração, no entanto ocorreu uma estimulação do estado 4 em presença de 20 nmoles de acitretina/mg proteína (Fig. 2.1A). O estado 4 de oligomícina, obtido pela adição de ADP e oligomícina (um inibidor da fração Fo do complexo V do sistema fosforilativo), foi apenas alterado em presença de concentrações elevadas de acitretina (≥ 20 nmoles/mg proteína) (Fig. 2.1A);

esta diminuição, estatisticamente significativa relativamente ao estado 4 da respiração, sugere que a acitretina em concentrações elevadas induz fuga de prótons através da fração  $F_0$  do complexo V do sistema fosforilativo. A adição de FCCP, um dissociador do sistema de transporte de eletrões, na ausência de acitretina, induziu um forte consumo de oxigénio (60,0 nmoles de  $O_2$ /min/mg proteína) (estado 4-FCCP) (Fig. 2.1A), devido à dissipação do potencial da membrana mitocondrial. O estado 4-FCCP não apresentou alterações significativas na presença de acitretina, o que significa que este retinoide não inibiu o sistema de transporte de eletrões da mitocôndria. Como se pode verificar na figura 2.1B, a adição de 5 e 10 nmoles de acitretina/mg proteína às mitocôndrias energizadas com glutamato/malato induziu um decréscimo significativo do ICR essencialmente como consequência da redução do estado 3 da respiração. Para concentrações mais elevadas de acitretina ( $\geq 20$  nmoles/mg proteína), este decréscimo foi mais acentuado, dado que a acitretina estimulou o estado 4 e diminuiu o estado 3 da respiração. O quociente ADP/O confirmou a redução no estado 3 da respiração, que também não foi significativamente dependente da concentração utilizada (Fig. 2.1B).

Os efeitos da acitretina na capacidade fosforilativa das mitocôndrias foram também avaliados pelas flutuações do  $\Delta\psi$  associadas ao ciclo fosforilativo induzido pelo ADP (Fig. 2.2). Na ausência de acitretina, as mitocôndrias energizadas com glutamato/malato desenvolveram um  $\Delta\psi$  de cerca de  $219,9 \pm 1,1$  mV (interior negativo). A despolarização do  $\Delta\psi$  induzida pela adição de ADP (despolarização de ADP) e o tempo necessário para a fosforilação do ADP adicionado (tempo de fosforilação), foi de cerca de  $25,2 \pm 0,7$  mV e  $64,9 \pm 1,5$  s, respetivamente. A repolarização ocorreu após a fosforilação do ADP e o potencial de repolarização aproximou-se do valor inicial ( $-219,4 \pm 1,2$  mV). A adição de acitretina, em concentrações de 5, 10 e 20 nmoles/mg proteína, não afetou de forma significativa o potencial da membrana mitocondrial desenvolvido, nem o potencial de repolarização. A despolarização do ADP diminuiu para concentrações de 10 nmoles/mg proteína, enquanto que o tempo de fosforilação foi reduzido para todas as concentrações de acitretina (Fig. 2.2), de acordo com o estado 3 da respiração (Fig. 2.1A) e o ADP/O (Fig. 2.1B).



**Figura 2.2** – Efeitos da acitretina no potencial de membrana ( $\Delta\psi$ )- dependente de glutamato/malato em mitocôndrias de fígado de rato. Os traços representam registros típicos de experiências realizadas nas condições descritas nos Materiais e métodos. As setas indicam as adições de glutamato/malato (Glu/Mal) 5 mM/2,5 mM, 150 nmoles de ADP/mg proteína (ADP), e os números à direita dos traços representam as concentrações de acitretina. Os resultados da tabela abaixo são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais. \*\*p < 0,01 e \*p < 0,5 versus controlo (na ausência de acitretina).

As alterações na eficiência fosforilativa mitocondrial induzidas pela acitretina foram confirmadas através da determinação dos níveis de ATP e ADP nas mitocôndrias energizadas com glutamato/malato (Tabela 2.1).

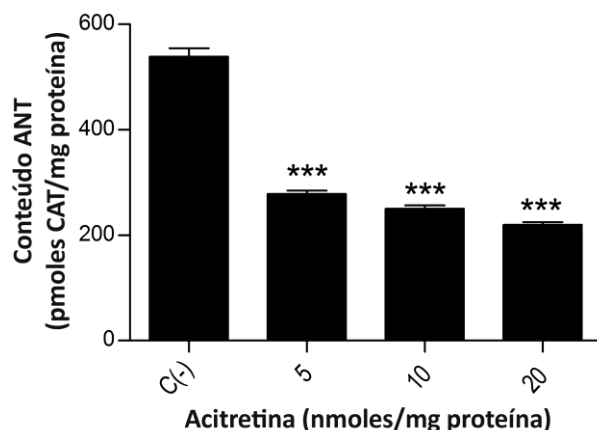
**Tabela 2.1** - Efeito da acitretina nos níveis de ATP e ADP em mitocôndrias energizadas com glutamato/malato.

Acitretina (nmoles/mg proteína)	ADP (nmoles/mg proteína)	ATP (nmoles/mg proteína)
0	8,6 ± 0,6	129,8 ± 3,4
5	15,5 ± 0,5**	105,5 ± 3,1**
10	16,3 ± 0,8**	104,5 ± 3,8**
20	16,7 ± 1,6**	103,3 ± 3,5**

Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências independentes, com diferentes preparações mitocondriais. \*\*p <0.01 quando comparado com o controlo (na ausência de acitretina).

Em concentrações de 5-20 nmoles/mg proteína, a acitretina reduziu a capacidade fosforilativa das mitocôndrias em cerca de 20%, e este efeito foi ligeiramente dependente da concentração. Os efeitos foram altamente significativos quando as mitocôndrias foram incubadas com concentrações superiores a 40 nmoles/mg proteína (resultados não apresentados).

Para clarificar os efeitos da acitretina na capacidade de fosforilação oxidativa, foi também avaliado o efeito da acitretina no conteúdo de ANT (Fig. 2.3). O CAT reage com o ANT numa estequiometria de 1:1 (Vignais, 1976; Zhou *et al.*, 2001). Assim, o conteúdo de ANT pode ser determinado por titulação do estado 3 da respiração com o CAT, sendo o conteúdo ativo de ANT mitocondrial determinado pela quantidade de CAT necessária para reduzir o estado 3 ao estado 4 da respiração, quando o CAT presumivelmente satura os locais do transportador (Vignais, 1976), como já foi referido.



**Figura 2.3** - Efeito da acitretina no conteúdo do transportador de nucleótidos de adenina (ANT). As experiências foram realizadas como descrito nos Materiais e métodos e os resultados são expressos em pmol de carboxiatractilosídeo (CAT) por mg de proteína mitocondrial. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências independentes, utilizando diferentes preparações mitocondriais. \*\*\* $p < 0,001$  versus controlo (na ausência de acitretina).

Na ausência de acitretina [C(-)], a quantidade de CAT necessária para reduzir o estado 3 ao estado 4 da respiração foi de 539 pmoles de CAT/mg proteína. No entanto, na presença de 5 nmoles de acitretina/mg proteína, os locais do ANT foram inibidos pela adição de 278 pmoles de CAT/mg proteína e o conteúdo de ANT foi diminuído para cerca de 52% relativamente ao controlo. Quando as mitocôndrias foram incubadas com concentrações de 10 e 20 nmoles de acitretina/mg proteína, os locais do ANT foram inibidos pela adição de 250 e 219 pmoles de CAT/mg proteína, o que corresponde a uma diminuição do conteúdo de ANT para cerca de 46% e 41% relativamente ao controlo, respetivamente (Fig. 2.3). Este decréscimo no conteúdo ANT correlaciona-se com a diminuição da velocidade de consumo de  $O_2$  no estado 3 (Fig. 2.1A), com o tempo de fosforilação do ADP (Fig. 2.2), bem como com as mudanças nos níveis de ATP induzidas pela acitretina (Tabela 2.1).

A modulação da abertura do poro da MPT tem sido associada com os efeitos dos compostos na orientação do ANT através da membrana interna (Pebay-Peyroula e Brandolin, 2004). Os nossos resultados demonstraram que a acitretina interagiu com o ANT (Fig. 2.3), o que pode contribuir para alterar os processos de regulação da MPT. Os

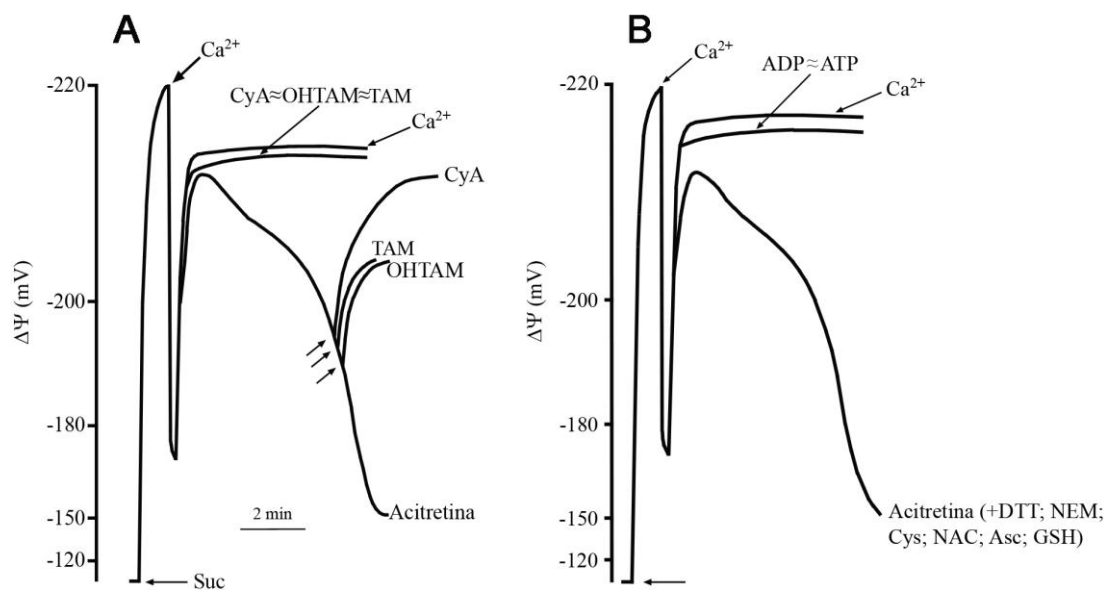


efeitos da acitretina na MPT foram avaliados através da monitorização da dissipação do  $\Delta\psi$  (Fig. 2.4) e pelos fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.5) associados à indução da MPT.

Como se pode verificar na figura 2.4A, na ausência de acitretina, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (120 nmoles/mg proteína) às mitocôndrias energizadas com succinato provocou uma despolarização transitória do  $\Delta\psi$ , seguida por uma rápida repolarização, após a acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando que as mitocôndrias são capazes de manter o  $\Delta\psi$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

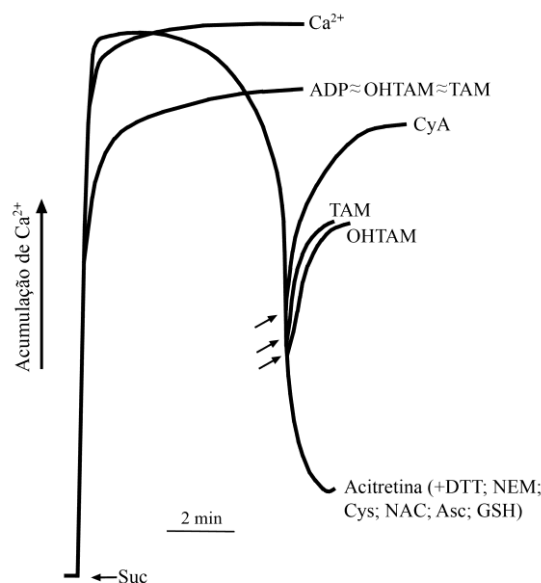
Pelo contrário, a adição de 200 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína causou uma despolarização irreversível do  $\Delta\psi$  (resultados não apresentados). A pré-incubação das mitocôndrias com acitretina (5 nmoles/mg proteína) durante 4 minutos, seguida da adição de 120 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína causou uma dissipação do  $\Delta\psi$ , induzida por uma despolarização irreversível do  $\Delta\psi$  (acitretina). Este efeito foi prevenido e revertido pela adição de CyA 1  $\mu\text{M}$  antes da incubação com acitretina ou durante a despolarização do  $\Delta\psi$  (CyA), respetivamente. Como a CyA é um inibidor específico da MPT (Crompton, 1999; Kroemer *et al.*, 2007), estes resultados indicam que a acitretina aumenta a sensibilidade da mitocôndria à MPT. A pré-incubação das mitocôndrias com TAM e OHTAM (10 nmoles/mg proteína) induziu uma completa proteção contra a despolarização irreversível induzida pela acitretina (Fig. 2.4A - TAM e OHTAM). Além disso, o TAM ou o OHTAM adicionados durante a despolarização do  $\Delta\psi$  promovida pela acitretina induziram a repolarização do  $\Delta\psi$  de forma semelhante à CyA. Os ligandos do ANT, ADP ou ATP, adicionados às mitocôndrias, antes da pré-incubação com acitretina, inibiram a despolarização irreversível do  $\Delta\psi$  (Fig. 2.4B - ADP e ATP), o que sugere que os nucleótidos de adenina regulam a abertura do poro da MPT, provavelmente através da interação com o ANT.

Para clarificar o mecanismo bioquímico pelo qual a acitretina potencia a MPT, estudou-se a capacidade dos agentes protetores dos grupos SH e de antioxidantes na proteção da MPT induzida pela acitretina (Fig. 2.4B). A pré-incubação das mitocôndrias com DTT 1 mM, NEM 50 mM, Cys 200  $\mu\text{M}$ , NAC 200  $\mu\text{M}$ , Asc 1 mM, GSH 1 mM, antes da adição de acitretina (5 nmoles/mg proteína), não impediu a dissipação do  $\Delta\psi$  induzida pela acitretina (Fig. 2.4B), sugerindo que este retinoide não potencia a MPT através da interação com os grupos SH das proteínas constituintes da MPT, nem por mecanismos de stresse oxidativo.



**Figura 2.4** - Efeitos da acitretina individualmente e em associação com os antiestrogénios, TAM ou OHTAM (A), ligandos do transportador de nucleótidos de adenina (ANT), ADP ou ATP, agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes (B) na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT), avaliados pela dissipação do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ). As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200  $\mu\text{M}$ , N-acetilcisteína (NAC) 200  $\mu\text{M}$ , ascorbato (Asc) 1 mM, glutationa (GSH) 1 mM, ADP 75  $\mu\text{M}$ , ATP 150  $\mu\text{M}$ , ciclosporina A (CyA) 1  $\mu\text{M}$ , 10 nmoles de TAM/mg proteína, 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro preparações mitocondriais diferentes.

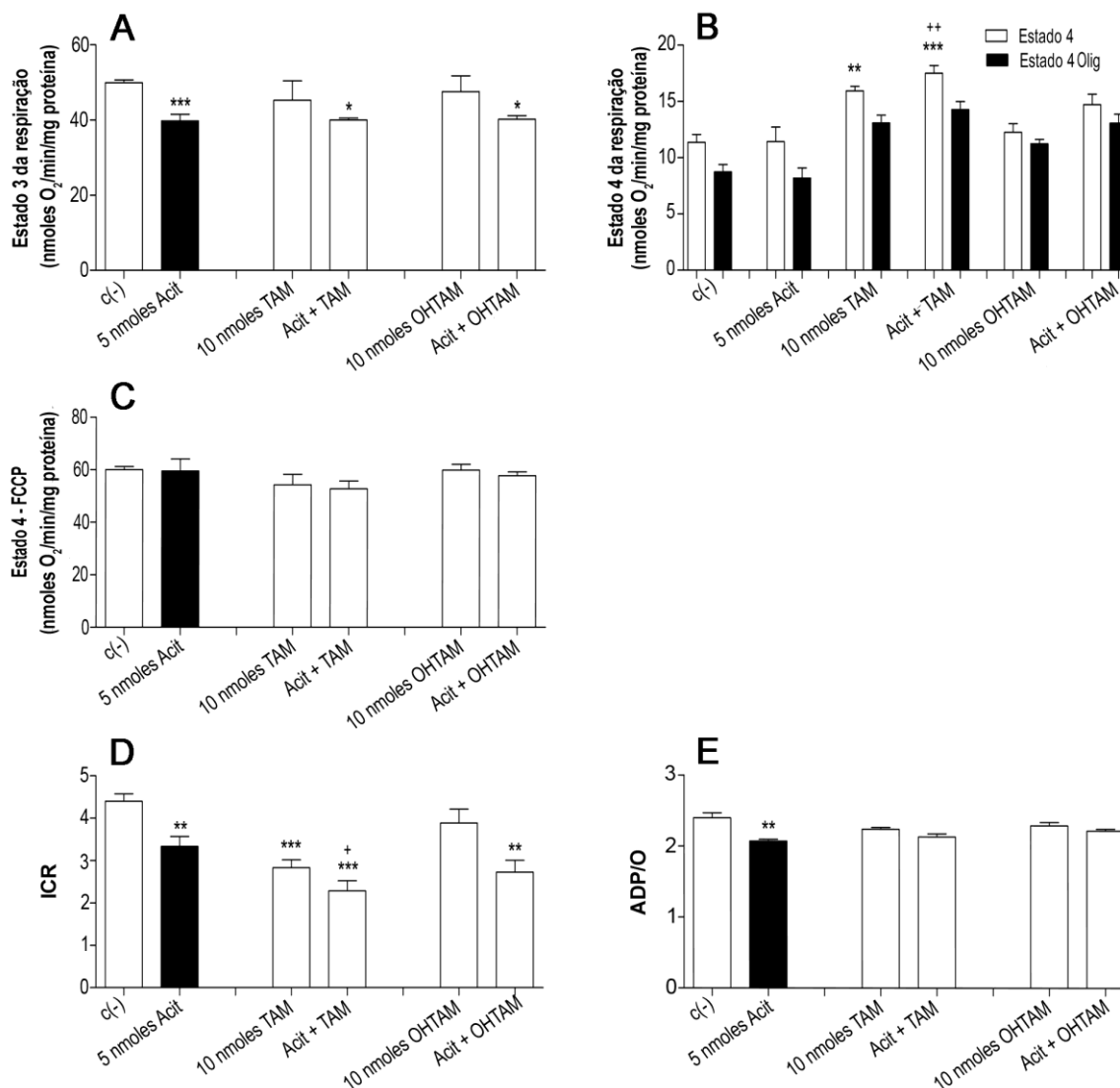
Os fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$ , avaliados com um eletrodo seletivo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.5) confirmaram os resultados da indução da MPT pela acitretina, avaliados pela dissipação do  $\Delta\psi$ . Na ausência de acitretina, a energização das mitocôndrias com succinato induziu uma acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado (120 nmoles/mg proteína). A pré-incubação das mitocôndrias com acitretina (5 nmoles/mg proteína) na presença de 120 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína conduziu à libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado (Fig. 2.5 - acitretina).



**Figura 2.5** - Efeitos dos antiestrogênicos (TAM ou OHTAM) e ADP na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) induzida pela acitretina foram avaliados pelos fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$ . As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200  $\mu\text{M}$ , N-acetilcisteína (NAC) 200  $\mu\text{M}$ , ascorbato (Asc) 1 mM, glutationa (GSH) 1 mM, ADP 75  $\mu\text{M}$ , ciclosporina A (CyA) 1  $\mu\text{M}$ , 10 nmoles de TAM/mg proteína e de 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro ensaios mitocondriais independentes.

A adição da CyA antes da acitretina impediu completamente a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (resultados não apresentados). Quando a CyA foi adicionada depois da acitretina induzir a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$ , a CyA reverteu este efeito, resultando na re-acumulação e retenção do  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado (Fig. 2.5 – CyA). Estes resultados demonstraram que a acitretina aumentou a sensibilidade à liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado pelas mitocôndrias, como consequência da indução da MPT. Tal como observado com o eletrodo seletivo de  $\text{TPP}^+$  (Fig. 2.4), o TAM e o OHTAM adicionados antes ou após a indução da MPT pela acitretina induziram uma proteção completa contra a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado (Fig. 2.5 - TAM e OHTAM). A adição de ADP antes da acitretina também protegeu da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$ , ao passo que a adição de agentes protetores dos grupos SH e de antioxidantes não impediram a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado pelas mitocôndrias (Fig. 2.5).

Os efeitos da acitretina em associação com o TAM ou o OHTAM foram também avaliados no consumo de O<sub>2</sub> (Fig. 2.6).



**Figura 2.6** - Efeitos da acitretina individualmente e em associação com os antiestrogénios no consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato. A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> no estado 3 (A), no estado 4 e no estado 4 oligomícina (estado 4 olig) (B), no estado 4-FCCP (C), no índice de controle respiratório (ICR) (D) e no quociente ADP/O (E) de mitocôndrias foi determinada como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências, com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,5, quando comparado com o controlo (na ausência de acitretina); ++p <0,01 e +p <0,05 quando comparado com a acitretina.

A associação de 5 nmoles de acitretina/mg proteína com 10 nmoles/mg proteína de TAM ou OHTAM (Fig. 2.6A) não acentuou a diminuição do estado 3 da respiração induzido pelos compostos individualmente. O estado 4 da respiração só foi afetado na presença de TAM individualmente ou em associação com a acitretina (Fig. 2.6B) e a adição de oligomicina não diminuiu o consumo de oxigénio, o que sugere que o aumento da taxa do estado 4 da respiração não se deve a uma fuga de prótons através da fração  $F_o$  da ATP sintase. O estado 4-FCCP (Fig. 2.6C) não foi afetado pelas concentrações estudadas, o que sugere que a acitretina em associação com estes antiestrogénios não inibe os complexos do sistema de transporte de eletrões (complexos I-IV). Além disso, as associações com o TAM ou o OHTAM diminuíram o ICR, em comparação com o controlo, no entanto só a associação com o TAM diminuiu o ICR comparativamente à acitretina individualmente (Fig. 2.6D). O quociente ADP/O não foi afetado pela associação da acitretina com o TAM ou o OHTAM em comparação com a acitretina individualmente e com as condições controlo (Fig. 2.6E).

### 3.1.2 Discussão

Os resultados obtidos com mitocôndrias energizadas com glutamato/malato demonstraram que a acitretina, em concentrações de 5-20 nmoles/mg proteína, diminuiu a capacidade fosforilativa das mitocôndrias hepáticas, conforme evidenciado pela redução do estado 3 da respiração (Fig. 2.1A), ICR, ADP/O (Fig. 2.1B) e pelo aumento do tempo de fosforilação (Fig. 2.2). Estes resultados foram acompanhados pela diminuição dos níveis de ATP e pelo aumento dos níveis de ADP (Tabela 2.1).

A acitretina não dissipou o potencial de membrana ou as flutuações do  $\Delta\psi$  associadas ao ciclo fosforilativo induzido pelo ADP (Fig. 2.2) e o consumo de oxigénio mitocondrial estimulado pelo FCCP (Fig. 2.1A) não foi inibido pela acitretina, demonstrando que o sistema de transporte de eletrões não foi inibido. Conclui-se que a diminuição da capacidade fosforilativa das mitocôndrias hepáticas é uma consequência da interação da acitretina com os componentes do sistema fosforilativo. De acordo com as experiências da atividade do ANT (Fig. 2.3), a inibição da capacidade fosforilativa mitocondrial pode resultar de um efeito inibidor no ANT. No entanto, a acitretina, em concentrações mais elevadas ( $\geq 20$  nmoles/mg proteína), também aumentou a permeabilidade da membrana mitocondrial, avaliada pela estimulação do estado 4 da respiração (Fig. 2.1A). Este efeito

foi, provavelmente, devido à sua capacidade para afetar a estrutura conformacional do complexo V, nomeadamente a fração Fo da ATP sintase, tal como evidenciado pela adição de oligomicina (Fig. 2.1A), um inibidor desta fração.

Este estudo demonstrou também que a acitretina (5 nmoles/mg proteína) aumentou a sensibilidade das mitocôndrias hepáticas aos efeitos do  $\text{Ca}^{2+}$  na estimulação da MPT, como evidenciado pela despolarização do  $\Delta\psi$  na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.4) e pela libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.5). Além disso, este efeito foi prevenido pela CyA, um inibidor específico da MPT (Crompton, 1999; Kroemer *et al.*, 2007). No entanto, a capacidade das mitocôndrias para acumularem  $\text{Ca}^{2+}$  não foi afetada, conforme demonstrado pela repolarização e re-acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial induzida pela CyA após o início da MPT (Figs. 2.4 e 2.5). Estas observações sugerem que a acitretina induz a MPT sem interferir nos mecanismos de recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$ . Um fator crítico para a indução da MPT é a oxidação dos grupos tiólicos das proteínas da MPT, criando ligações cruzadas dissulfureto (Costantini *et al.*, 1996; Halestrap *et al.*, 1997; Costantini *et al.*, 1998; McStay *et al.*, 2002). Como alguns agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes (DTT, NEM, Cys, NAC, Asc e GSH) não inibiram a abertura do poro da MPT induzida pela acitretina (Figs. 2.4B e 2.5), não é provável que a indução da MPT por este retinoide esteja relacionada com os mecanismos de stresse oxidativo. A hipótese mais plausível para explicar a indução da MPT pela acitretina está relacionada com a ligação da acitretina com as proteínas do ANT, um componente regulador do megacomplexo da MPT. De facto, os nossos resultados mostraram que os ligandos do ANT, ATP e ADP, foram potentes inibidores da MPT por se ligarem ao ANT, impedindo a abertura do poro da MPT induzida pela acitretina (Figs. 2.4B e 2.5). Além disso, o TAM, e o OHTAM, antiestrogénios com capacidade de ligação com o ANT (Cardoso *et al.*, 2003), também preveniram e reverteram a MPT induzida pela acitretina (Figs. 2.4A e 2.5). Estes dados corroboram a hipótese de que a acitretina induz a abertura do poro da MPT, por interação com o ANT (Pebay-Peyroula e Brandolin, 2004; Nury *et al.*, 2006).

A formação do poro da MPT resulta num colapso do potencial de membrana mitocondrial e na paragem da síntese de ATP. Além disso, a libertação de proteínas, tais como os fatores de indução de apoptose e a endonuclease G, e a sua translocação para o núcleo, leva a fragmentação do DNA nuclear. Todos, estes eventos desencadeiam mecanismos de morte celular por necrose. Em alternativa, a libertação de citocromo *c* e de outros fatores pró-apoptóticos a partir da mitocôndria podem promover a ativação da cascata de caspases desencadeando mecanismos de morte celular por apoptose (Jeong e

Seol, 2008; Smith *et al.*, 2008). Portanto, é possível que estes eventos possam ser responsáveis pela hepatotoxicidade e apoptose descritos em doentes tratados com acitretina (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011). Além disso, a interação com o ANT pode também explicar o estado de resistência à insulina, descrito em doentes tratados com este fármaco (Corbetta *et al.*, 2006). De facto, foi descrito que a redução da capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial, por inibição do ANT, está associada com o desenvolvimento de resistência à insulina (Kim *et al.*, 2010a).

Os nossos estudos evidenciaram também que o TAM e o OHTAM em associação com a acitretina (5 nmoles/mg proteína) não potenciaram a fosforilação oxidativa e as alterações induzidas pela acitretina no sistema transportador de eletrões (Fig. 2.6). A associação com o TAM induziu a permeabilização da membrana mitocondrial interna a protões (estimulação do estado 4 da respiração) (Fig. 2.6B), tal como descrito previamente por Cardoso *et al.* (2001). Considerando que os RARs e os ERs parecem ter um mecanismo de interação, é possível que a associação da acitretina com os antiestrogénios, particularmente com o OHTAM, tenha vantagens como estratégia terapêutica na inibição da proliferação de células tumorais.

Em conclusão, o presente estudo demonstra que a acitretina perturba a síntese de ATP e induz MPT através das interações com o ANT. Estes efeitos podem constituir um potencial mecanismo de morte celular por apoptose e necrose, e toxicidade em células do fígado induzidas pela acitretina, o que pode contribuir para os efeitos toxicológicos descritos em doentes tratados com acitretina. Além disso, uma vez que alguns dos efeitos deletérios induzidos pela acitretina, nomeadamente a indução da MPT, são inibidos por antiestrogénios, é possível que esta associação possa constituir uma potencial estratégia para minimizar a toxicidade da acitretina.

### **3.2 Efeitos da isotretinoína na permeabilidade transitória e na bioenergética mitocondrial: associação com o TAM e o OHTAM**

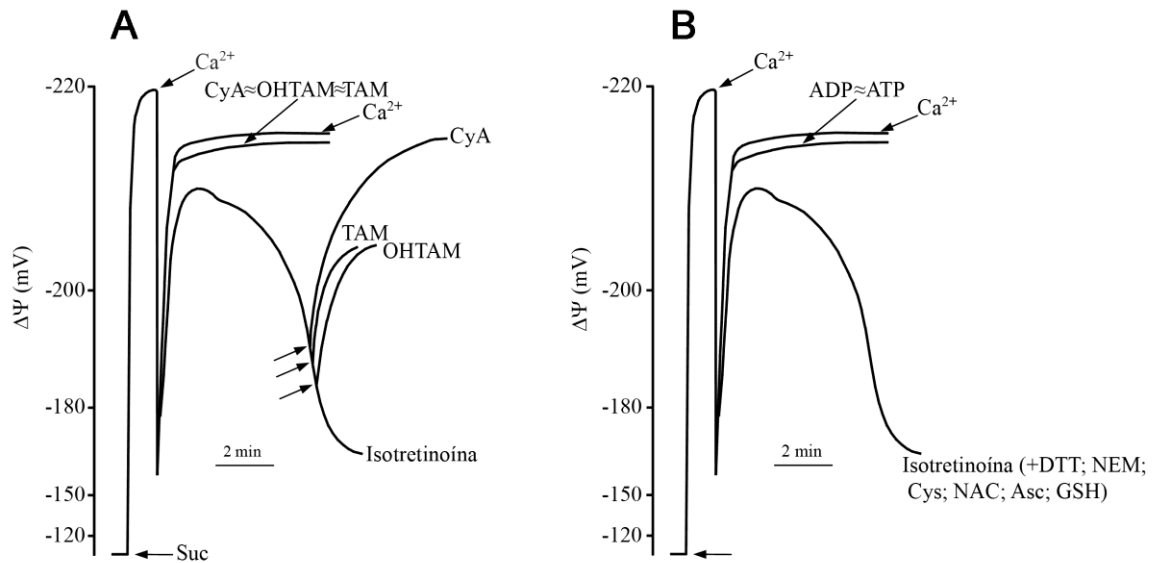
#### **3.2.1 Resultados**

Os efeitos da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM na MPT foram avaliados pela dissipação do  $\Delta\psi$  (Fig. 2.7) e pela determinação dos fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Fig. 2.8).

Como se pode observar na figura 2.7, na ausência de isotretinoína, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (120 nmoles/mg proteína) às mitocôndrias energizadas com succinato causou uma despolarização transitória do  $\Delta\psi$  seguida de uma rápida repolarização, que surge após a acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando que as mitocôndrias têm a capacidade para manter o  $\Delta\psi$  (Fig. 2.7A- $\text{Ca}^{2+}$ ). Em contrapartida, a adição de 200 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína causou uma despolarização irreversível do  $\Delta\psi$ , após a adição do  $\text{Ca}^{2+}$  (resultados não apresentados). A pré-incubação das mitocôndrias com isotretinoína (5 nmoles/mg proteína ou 2,5  $\mu\text{M}$ ) causou uma despolarização irreversível do  $\Delta\psi$  depois da adição de 120 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína (Fig. 2.7A-isotretinoína). A dissipação do  $\Delta\psi$  induzido pela isotretinoína foi completamente inibida pela adição de CyA (Fig. 2.7A-CyA), um inibidor específico da MPT (Crompton, 1999; Kroemer *et al.*, 2007). A pré-incubação das mitocôndrias com 5  $\mu\text{M}$  de TAM ou 5  $\mu\text{M}$  de OHTAM (10 nmoles/mg proteína) proporcionou uma completa proteção contra a despolarização irreversível induzida pela isotretinoína (Fig. 2.7A-TAM e OHTAM). Além disso, o TAM ou o OHTAM adicionados durante a despolarização do  $\Delta\psi$ , promovida pela isotretinoína, induziram a repolarização do  $\Delta\psi$  de um modo semelhante à CyA (Fig. 2.7A), o que indica que estes compostos têm a capacidade para prevenir e reverter a MPT induzida pela isotretinoína. O TAM e o OHTAM são potentes inibidores da abertura do poro da MPT, provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes (Custodio *et al.*, 1998; Cardoso *et al.*, 2002a). Assim, para elucidar os mecanismos bioquímicos pelos quais a isotretinoína potencia a MPT, foram avaliados os efeitos de agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes, que impedem a abertura do poro da MPT induzida por mecanismos de stresse oxidativo. Como se verifica na figura 2.7B, a pré-incubação das mitocôndrias com agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes, ou seja, DTT, NEM, Cys, NAC, Asc e GSH, não impediram a despolarização do  $\Delta\psi$  induzida pela isotretinoína, em contraste com o observado com o TAM e o OHTAM (Fig. 2.7A). No entanto, os ligandos do ANT, ADP ou ATP,



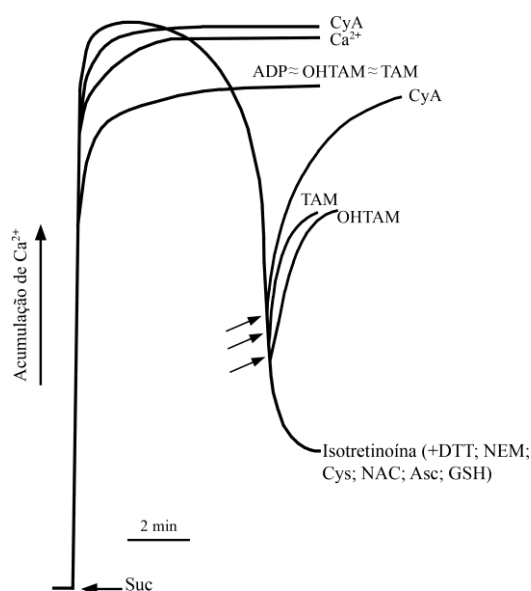
adicionados às mitocôndrias, antes da pré-incubação com isotretinoína, inibiram a despolarização do potencial de membrana (Fig. 2.7B-ADP e ATP).



**Figura 2.7** – Efeitos da isotretinoína individualmente e em associação com os antiestrogênicos, TAM ou OHTAM (A), ligandos do transportador de nucleótidos de adenina (ANT), ADP ou ATP, agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes (B) na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT), avaliados pela dissipação do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ). As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200  $\mu\text{M}$ , N-acetilcisteína (NAC) 200  $\mu\text{M}$ , ascorbato (Asc) 1 mM, glutationa (GSH) 1 mM, ADP (ADP) 75  $\mu\text{M}$ , ATP (ATP) 150  $\mu\text{M}$ , ciclosporina A (CyA) 1  $\mu\text{M}$ , 10 nmoles de TAM/mg proteína, 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro preparações mitocondriais diferentes.

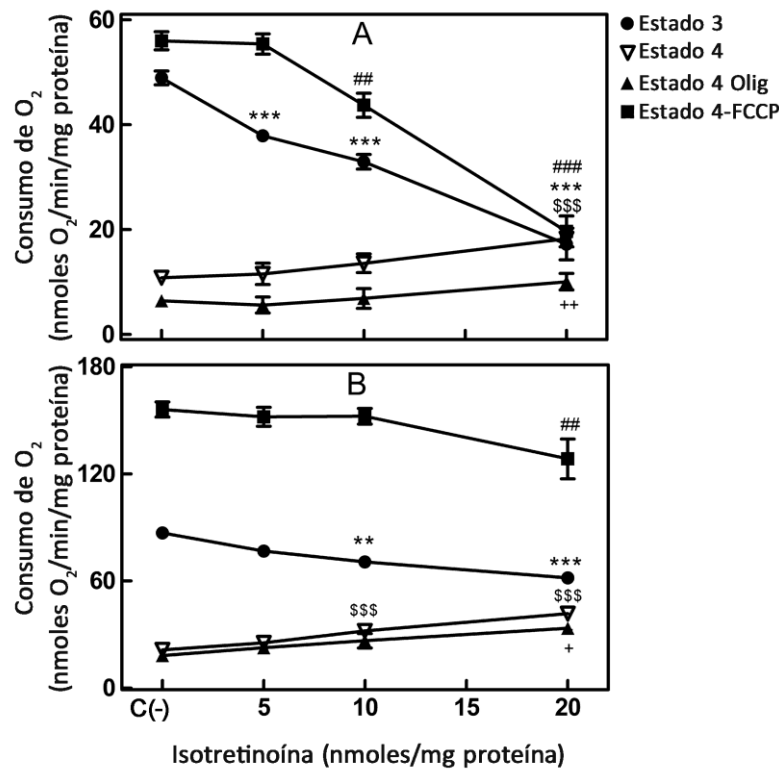
Os efeitos da isotretinoína (5 nmoles/mg proteína) individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM na MPT foram também avaliados por determinação do fluxo de cálcio mitocondrial utilizando um eletrodo seletivo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.8). A energização das mitocôndrias com succinato induziu uma acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$  (120 nmoles/mg proteína), e a mitocôndria manteve o cálcio acumulado (Fig. 2.8 -  $\text{Ca}^{2+}$ ). A incubação das mitocôndrias com isotretinoína (5 nmoles/mg proteína) na presença de 120 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína

induziu a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado (Fig. 2.8 - isotretinoína). De forma semelhante ao que observamos com o eletrodo de  $\text{TPP}^+$  (Fig. 2.7), a CyA impediu os efeitos da isotretinoína na liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.8 - CyA). A adição de TAM ou de OHTAM antes ou após a indução da MPT pela isotretinoína promoveu uma completa proteção contra a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado (Fig. 2.8 – TAM e OHTAM). No entanto, e de forma semelhante ao observado com o eletrodo seletivo de  $\text{TPP}^+$  (Fig. 2.7B), a adição dos agentes protetores dos grupos SH e de antioxidantes não impediram a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado pelas mitocôndrias. Como observado para a CyA, o ADP (ligando do ANT) adicionado antes da isotretinoína e do  $\text{Ca}^{2+}$  também inibiu a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.8 - ADP).



**Figura 2.8** – Efeitos dos antiestrogénios (TAM ou OHTAM) e ADP na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) induzida pela isotretinoína foram avaliados pelos fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$ . As adições de succinato (Suc) 5 mM, 120 nmoles  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ADP (ADP) 75  $\mu\text{M}$ , ditioneitol (DTT) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cisteína (Cys) 200  $\mu\text{M}$ , N-acetilcisteína (NAC) 200  $\mu\text{M}$ , ascorbato (Asc) 1 mM, glutatona (GSH) 1 mM, ciclosporina A (CyA) 1  $\mu\text{M}$ , 10 nmoles de TAM/mg proteína e de 10 nmoles de OHTAM/mg proteína, antes ou depois da energização das mitocôndrias foram realizadas conforme indicado nos Materiais e métodos. Os traços são representativos de quatro ensaios mitocondriais independentes.

Foram também avaliados os efeitos da isotretinoína no consumo de oxigênio e no  $\Delta\psi$  de mitocôndrias hepáticas de rato associados à fosforilação do ADP (Figs. 2.9-2.12).



**Figura 2.9** – Efeitos da isotretinoína no consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato (A) e succinato (B). A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias foi avaliada no estado 3 (círculos fechados), no estado 4 (triângulos abertos), no estado 4 oligomycin (estado 4 olig) (triângulos fechados) e no estado 4-FCCP (quadrados fechados). Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais (quando as barras de erro não estão visíveis, o SEM está contido no tamanho dos símbolos). \*\*\*p < 0,001 e \*\*p < 0,01 quando comparado com o controle (na ausência de isotretinoína) no estado 3 da respiração. \$\$\$p < 0.01 *versus* respectivo controle no estado 4 da respiração; ###p < 0.001 e ##p < 0.01 *versus* controle no estado 4-FCCP; ++p < 0.01 e +p < 0.05 quando o estado 4 de oligomycin foi comparado com o estado 4 da respiração.

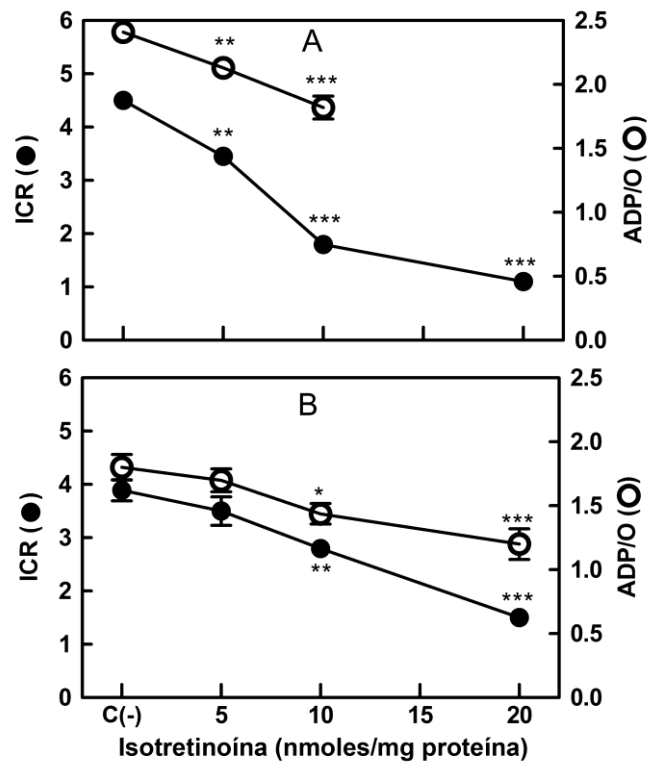
A isotretinoína pré-incubada com as mitocôndrias diminuiu significativamente o estado 3 da respiração de uma forma dependente da concentração (Fig. 2.9A). As concentrações de 5 e 10 nmoles/mg proteína (5-10 μM) de isotretinoína não induziram

alterações estatisticamente significativas no estado 4 da respiração. Contudo, 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína estimulou significativamente o estado 4 da respiração (Fig. 2.9A). A adição de ADP e oligomicina (estado 4 olig) em mitocôndrias pré-incubadas com 5 e 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína induziu uma diminuição no estado 4 de oligomicina, embora sem significado estatístico. Para concentrações mais elevadas ( $\geq 20$  nmoles de isotretinoína/mg proteína), a adição de oligomicina diminuiu o consumo de oxigénio estimulado pela isotretinoína (Fig. 2.9A). O estado 4-FCCP foi reduzido significativamente para concentrações de 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.9A).

Os efeitos da isotretinoína em mitocôndrias energizadas com succinato (Fig. 2.9B) foram ligeiramente diferentes dos observados com o glutamato/malato (Fig. 2.9A). Conforme se verifica na figura 2.9B, o estado 4 da respiração foi significativamente estimulado para concentrações de 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína, ao contrário das mitocôndrias energizadas com glutamato/malato (Fig. 2.9A). O estado 3 da respiração não foi significativamente afetado por 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína e teve um menor efeito para concentrações de 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.9B). Relativamente ao estado 4-FCCP verificou-se que em mitocôndrias energizadas com succinato a isotretinoína não afetou significativamente este parâmetro para concentrações inferiores a 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.9B). Além disso, a presença de 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína afetou de forma menos significativa o estado 4-FCCP (Fig. 2.9B), comparativamente com as mitocôndrias energizadas com glutamato/malato (Fig. 2.9A).

Em mitocôndrias energizadas com glutamato/malato (Fig. 2.10A) os índices ICR e ADP/O foram também ligeiramente diferentes dos observados com succinato (Fig. 2.10B). A adição de 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína às mitocôndrias energizadas com glutamato/malato induziu uma diminuição significativa no ICR; na presença de concentrações mais elevadas de isotretinoína ( $\geq 10$  nmoles/mg proteína), este decréscimo foi mais pronunciado, comparativamente com as condições controlo (Fig. 2.10A). A diminuição do ICR foi devida principalmente ao decréscimo no estado 3 da respiração.

Para concentrações de isotretinoína de 20 nmoles/mg proteína, o ICR aproximou-se de 1,0 (Fig. 2.10A), sugerindo que não ocorre fosforilação de ADP, devido a um efeito dissociador da respiração mitocondrial induzido pelo retinoide.



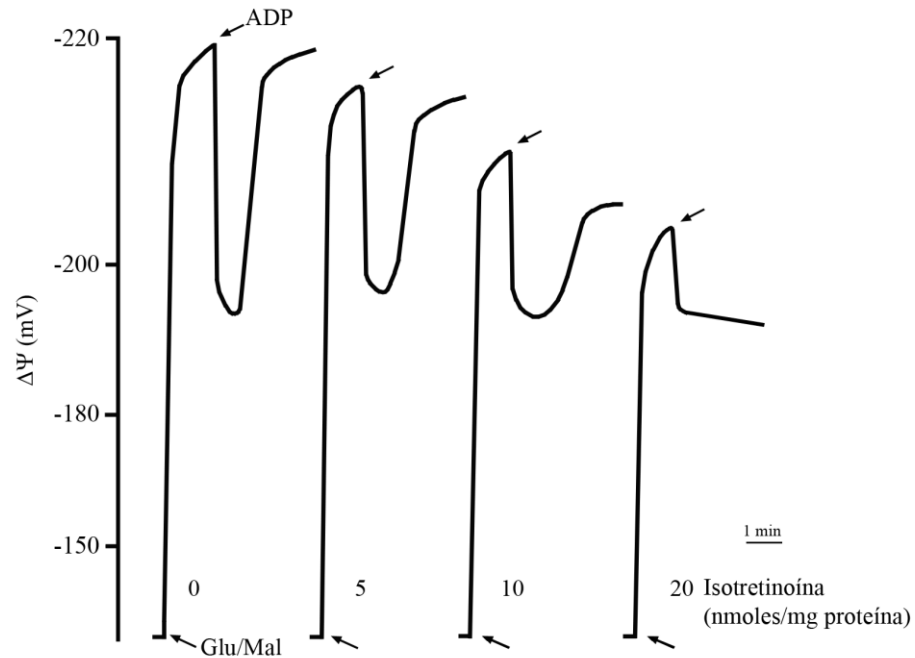
**Figura 2.10** – Efeitos da isotretinoína nos índices respiratórios em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato (A) e succinato (B): índice de controlo respiratório (ICR) (círculos fechados) e ADP/O (círculos abertos) foram determinados como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais (quando as barras de erro não estão visíveis, o SEM está contido no tamanho dos símbolos). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,5$  *versus* controlo (na ausência de isotretinoína).

O quociente ADP/O foi também diminuído pela isotretinoína, não sendo possível a sua determinação para concentrações de 20 nmoles/mg proteína, de acordo com o ICR (Fig. 2.10A), devido ao efeito dissociador. Em mitocôndrias energizadas com succinato (Fig. 2.10B), o ICR não foi significativamente afetado na presença de concentrações de 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína e foi menos diminuído para concentrações de 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.10B), comparativamente com as mitocôndrias energizadas com glutamato/malato (Fig. 2.10A). Esta redução no ICR foi devida principalmente à estimulação do estado 4 (Fig. 2.9B), dado que o estado 3 da respiração foi menos afetado, em comparação com as mitocôndrias energizadas com

glutamato/malato (Fig. 2.9A). Além disso, o ICR atingiu um valor de cerca de 2 em presença de 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.10B), o que significa que as mitocôndrias não estão dissociadas, tal como observado com o glutamato/malato (Fig. 2.10A). Relativamente ao quociente ADP/O, verificou-se também uma diminuição para concentrações iguais ou superiores a 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.10B). No entanto, a capacidade fosforilativa das mitocôndrias hepáticas energizadas com succinato foi menos afetada do que nas mitocôndrias energizadas com glutamato/malato (Fig. 2.10A).

A diminuição da capacidade fosforilativa das mitocôndrias, observada em presença de isotretinoína, foi confirmada através das flutuações do  $\Delta\psi$  associadas ao ciclo fosforilativo induzido por ADP (Figs. 2.11 e 2.12). Após a adição de glutamato/malato (Fig. 2.11), na ausência de isotretinoína, as mitocôndrias desenvolveram um  $\Delta\psi$  de cerca de  $219,9 \pm 1,3$  mV (interior negativo).

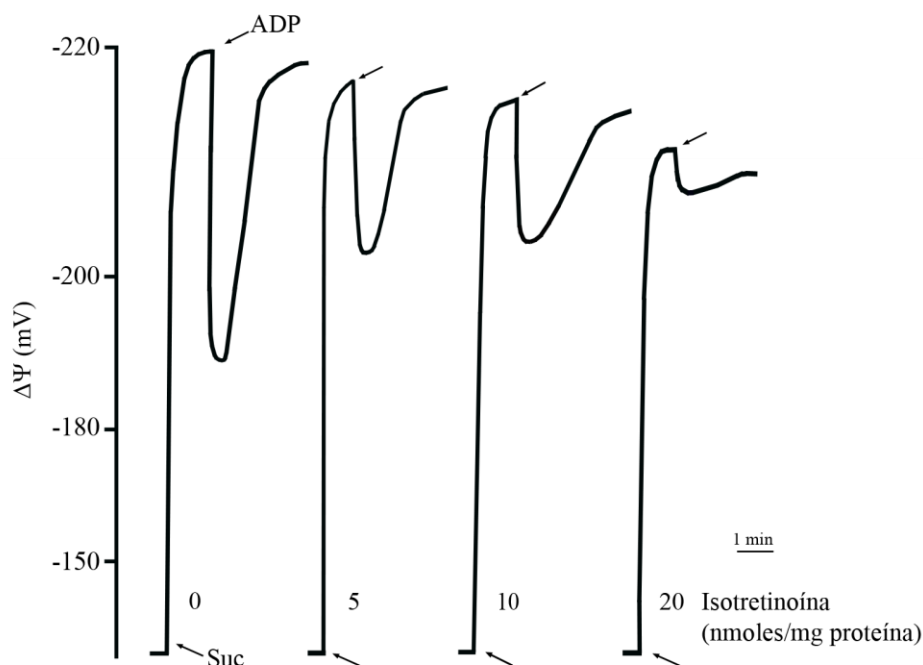
A adição de isotretinoína em concentrações de 5 e 10 nmoles/mg proteína não afetou significativamente o  $\Delta\psi$  mitocondrial desenvolvido. No entanto, a presença de 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína, induziu um decréscimo significativo no  $\Delta\psi$  (Fig. 2.11). A adição de ADP na ausência de isotretinoína promoveu um decréscimo no  $\Delta\psi$  de cerca de  $25,1 \pm 1,6$  mV (despolarização do ADP). A pré-incubação com isotretinoína para concentrações iguais ou superiores a 10 nmoles/mg proteína reduziu a despolarização do ADP (Fig. 2.11). O tempo necessário para ocorrer a fosforilação de ADP (tempo de fosforilação), na ausência de isotretinoína, foi de cerca de  $63,4 \pm 1,7$  s, enquanto que a adição de 5 e 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína induziu um aumento significativo no tempo de fosforilação (Fig. 2.11). Na presença de 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína não se determinou o tempo de fosforilação, dado que não ocorreu fosforilação de ADP, de acordo com o ICR (Fig. 2.10A). Após fosforilação de ADP, seguiu-se a repolarização do potencial, que volta para valores próximos do inicial ( $-219,6 \pm 1,0$  mV). Na presença de 5 e 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína não se observaram alterações significativas no potencial de repolarização. Contudo, para concentrações de cerca de 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína não se verificou o processo de repolarização e as mitocôndrias não tiveram capacidade para manter o  $\Delta\psi$  (Fig. 2.11).



Isotretinoína (nmoles/mg proteína)	$\Delta\psi$ (- mV)			Tempo de Fosforilação (s)
	Energização Glu/Mal	Despolarização ADP	Repolarização	
0	219,9 ± 1,3	25,1 ± 1,6	219,6 ± 1,0	63,4 ± 1,7
5	217,8 ± 2,0	23,1 ± 1,1	216,1 ± 1,8	80,0 ± 2,6**
10	212,4 ± 3,6	20,6 ± 1,6*	206,6 ± 3,4	98,0 ± 3,6***
20	202,4 ± 4,1***	12,8 ± 0,7***	nd	nd

**Figura 2.11** – Efeitos da isotretinoína no potencial de membrana ( $\Delta\psi$ )- dependente de glutamato/malato em mitocôndrias de fígado de rato. Os traços representam registros típicos de experiências realizadas nas condições descritas nos Materiais e métodos. As setas indicam as adições de glutamato/malato (Glu/Mal) 5 mM/2,5 mM, 150 nmoles de ADP/mg proteína (ADP), e os números à direita dos traços representam as concentrações de isotretinoína. Os resultados da tabela abaixo são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,5 versus controlo (na ausência de isotretinoína).

Em mitocôndrias energizadas com succinato (Fig. 2.12), os resultados foram ligeiramente diferentes, dos observados com o glutamato/malato (Fig. 2.11).



Isotretinoína (nmoles/mg proteína)	$\Delta\Psi$ (- mV)			Tempo de Fosforilação (s)
	Energização Suc	Despolarização ADP	Repolarização	
0	219,8 ± 1,2	30,8 ± 4,6	219,4 ± 4,3	65,0 ± 2,9
5	218,2 ± 1,4	16,4 ± 0,5	217,2 ± 1,8	76,0 ± 4,8
10	216,8 ± 2,1	12,0 ± 0,4*	214,5 ± 3,1	95,3 ± 2,9*
20	212,3 ± 3,1	4,4 ± 0,7***	208,5 ± 6,5	101,2 ± 4,2***

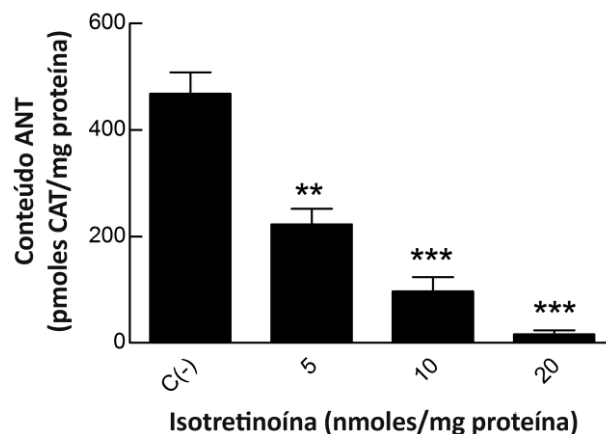
**Figura 2.12** – Efeitos da isotretinoína no potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ )- dependente de succinato em mitocôndrias de fígado de rato. Os traços representam registos típicos de experiências realizadas nas condições descritas nos Materiais e métodos. As setas indicam as adições de succinato (Suc) 5 mM, 150 nmoles de ADP/mg proteína (ADP), e os números à direita dos traços representam as concentrações de isotretinoína. Os resultados da tabela abaixo são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências realizadas com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001 e \*p <0,5 *versus* controlo (na ausência de isotretinoína).

De facto, o tempo de fosforilação só aumentou significativamente para concentrações de cerca de 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína em mitocôndrias energizadas com succinato (Fig. 2.12), ao passo que o tempo de fosforilação aumentou em mitocôndrias



energizadas com glutamato/malato, na presença de 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.11). Pelo contrário, nas mitocôndrias energizadas com succinato, o potencial de membrana mitocondrial não foi afetado em presença de 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.12). Além disso, as mitocôndrias energizadas com succinato, em presença de 30 nmoles de isotretinoína/mg proteína, continuaram a ter a capacidade de manter o  $\Delta\psi$  após adição de ADP (resultados não apresentados), em contraste com o que se observou em mitocôndrias pré-incubadas com 20 nmoles isotretinoína/mg proteína e energizadas com glutamato/malato (Fig. 2.11).

O conteúdo de ANT foi também determinado para clarificar os mecanismos envolvidos na abertura do poro da MPT e as alterações na fosforilação mitocondrial induzidas pela isotretinoína (Fig. 2.13). O conteúdo mitocondrial de ANT ativo foi determinado pela quantidade de CAT necessária para reduzir o estado 3 ao estado 4 da respiração, quando este inibidor satura os locais do transportador (Vignais, 1976).



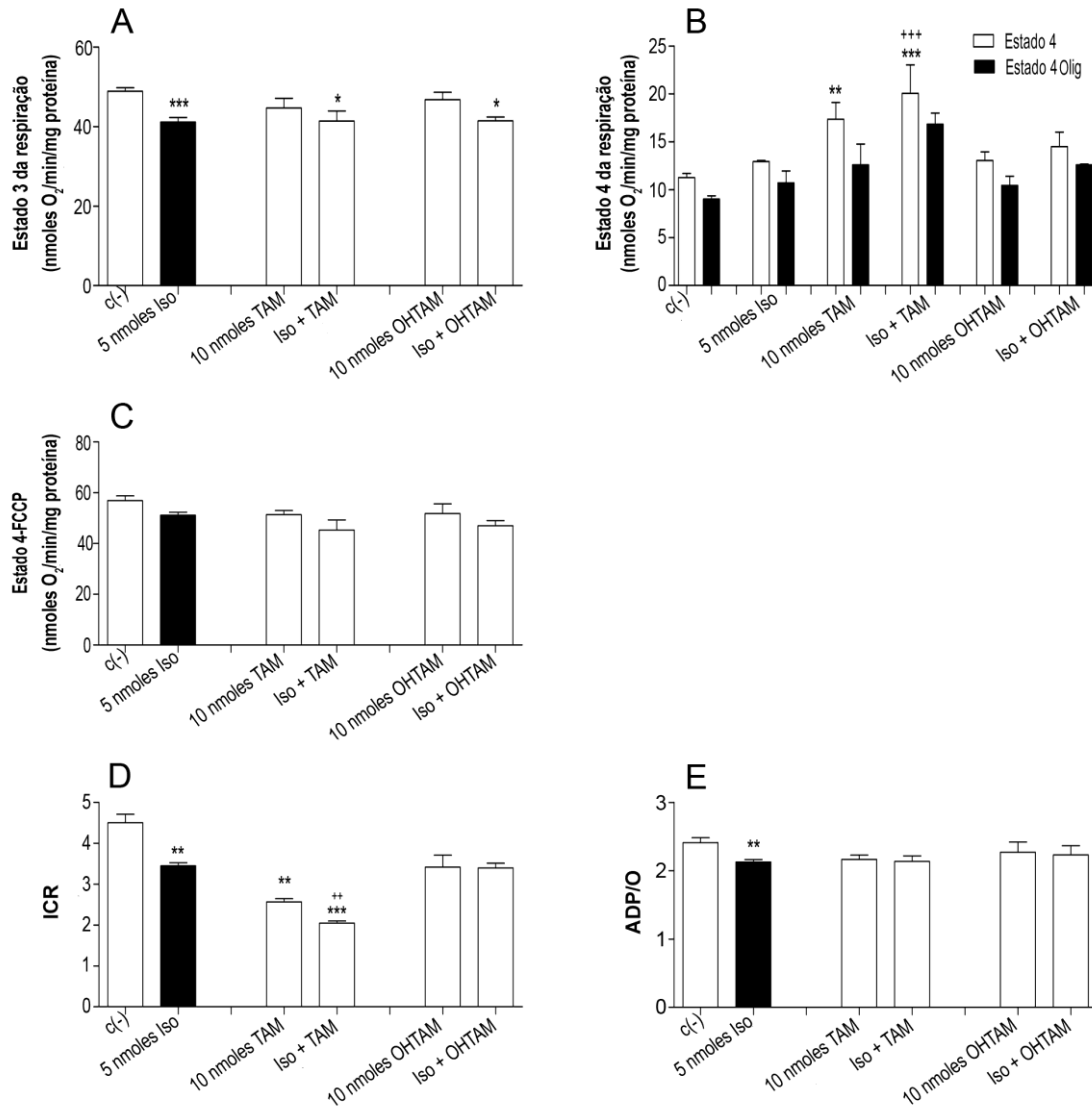
**Figura 2.13** – Efeito da isotretinoína no conteúdo do transportador de nucleótidos de adenina (ANT). As experiências foram realizadas como descrito nos Materiais e métodos e os resultados são expressos em pmoles de carboxiatractilosídeo (CAT) por mg de proteína mitocondrial. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro experiências utilizando diferentes preparações mitocondriais. \*\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  *versus* controlo (na ausência de isotretinoína).

Na ausência de isotretinoína, o ANT foi inibido pela adição de 468 pmoles de CAT/mg proteína. No entanto, na presença de 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína o ANT foi inibido pela adição de 222 pmoles de CAT/mg proteína, e pela adição de cerca de

97 pmoles de CAT/mg proteína na presença de 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína (Fig. 2.13). Assim, as concentrações de 5 e 10 nmoles de isotretinoína/mg proteína induziram um decréscimo no conteúdo de ANT para cerca de 47% e 21% comparativamente ao controlo, respetivamente. A presença de 20 nmoles de isotretinoína/mg proteína inibiu praticamente todo o conteúdo do ANT, o que sugere que a isotretinoína interfere com o ANT de uma forma dependente da concentração.

Para além dos efeitos inibidores do TAM e do OHTAM na MPT induzida pela isotretinoína (Figs. 2.7 e 2.8), foram também estudados os efeitos da isotretinoína em associação com o TAM e o OHTAM no consumo de O<sub>2</sub> (Fig. 2.14) e nos níveis energéticos (Tabela 2.2) de mitocôndrias hepáticas.

A associação de 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína (5 µM) com o TAM ou o OHTAM (10 nmoles/mg proteína ou 10 µM) induziu uma redução significativa no estado 3 da respiração (Fig. 2.14A). No entanto, esta diminuição não foi estatisticamente significativa quando comparada com a isotretinoína individualmente (5 nmoles/mg proteína), a qual induziu uma diminuição significativa no estado 3 da respiração (Fig. 2.9A). A isotretinoína associada com o OHTAM não estimulou de forma significativa o estado 4 da respiração (Fig. 2.14B). No entanto, a isotretinoína, em associação com o TAM induziu um aumento significativo no estado 4 da respiração, comparativamente com o controlo e com a isotretinoína individualmente. O facto da adição de oligomicina não ter diminuído o consumo de oxigénio estimulado pela associação de TAM e isotretinoína (Fig. 2.14B), sugere que esta estimulação do estado 4 não se deve à fuga de prótons através da fração Fo no complexo V do sistema fosforilativo. A avaliação do estado 4-FCCP (Fig. 2.14C) demonstrou que as associações estudadas não afetaram os complexos do sistema de transporte de eletrões. A associação de isotretinoína com o OHTAM não diminuiu significativamente o ICR, comparativamente ao controlo (Fig. 2.14D), de acordo com os resultados obtidos para o estado 3 e para o estado 4 da respiração. No entanto, a associação de isotretinoína com o TAM induziu uma diminuição significativa no valor de ICR (Fig. 2.14D), em consequência da estimulação do estado 4 da respiração (Fig. 2.14B). Em contrapartida, o valor do quociente ADP/O não foi alterado em nenhuma destas associações (Fig. 2.14E).



**Figura 2.14** – Efeitos da isotretinoína individualmente e em associação com os antiestrogênicos no consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato. A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> no estado 3 (A), no estado 4 e no estado 4 oligomicina (estado 4 olig) (B), no estado 4-FCCP (C), no índice de controle respiratório (ICR) (D) e no quociente ADP/O (E) de mitocôndrias foi avaliada como descrito nos Materiais e métodos. Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências, usando diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,5, quando comparado com o controle (na ausência de isotretinoína); +++p <0,001 e ++p <0,01 quando comparado com a isotretinoína.

Os efeitos da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM foram também avaliados por determinação do conteúdo de ATP e ADP, por HPLC (Tabela 2.2).

**Tabela 2.2** – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nos níveis de ATP e ADP em mitocôndrias energizadas com glutamato/malato.

<b>Isotretinoína (nmoles/mg proteína)</b>	<b>TAM/OHTAM (nmoles/mg proteína)</b>	<b>ADP (nmoles/mg proteína)</b>	<b>ATP (nmoles/mg proteína)</b>
<b>0</b>	---	9,3 ± 2,2	126,3 ± 8,3
<b>5</b>	---	16,6 ± 1,4**	102,2 ± 1,7**
<b>10</b>	---	33,4 ± 3,6***	72,7 ± 4,8***
<b>20</b>	---	51,6 ± 3,2***	40,3 ± 10,9***
	---		
<b>5</b>	<b>10 TAM</b>	12,8 ± 3,4	116,3 ± 6,2
<b>5</b>	<b>10 OHTAM</b>	12,8 ± 3,4	119,6 ± 8,1

Os resultados são apresentados como a média ± SEM de quatro experiências independentes, com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*p <0,001 e \*\*p <0,01 quando comparado com o respetivo controlo (na ausência de isotretinoína).

A adição de 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína (5 µM) induziu uma redução significativa dos níveis de ATP, com concomitante aumento dos níveis de ADP. Estes efeitos foram mais pronunciados para concentrações mais elevadas de isotretinoína (≥ 10 nmoles/mg proteína) (Tabela 2.2), sugerindo que a fosforilação está comprometida, de acordo com o ICR (Fig. 2.10A) e com o tempo de fosforilação (Figs. 2.9A e 2.11). No entanto, a incubação de mitocôndrias com isotretinoína (5 nmoles/mg proteína) e TAM ou OHTAM (10 nmoles/mg proteína ou 10 µM) não induziu alterações significativas nos níveis de ATP e ADP (Tabela 2.2) e os valores foram semelhantes aos observados na presença de ambos os antiestrogénios individualmente (resultados não apresentados), tal como descrito anteriormente (Cardoso *et al.*, 2003).

### 3.2.2 Discussão

Nas condições experimentais estudadas a isotretinoína promoveu a abertura do poro da MPT para concentrações de 5 nmoles/mg proteína (2,5  $\mu\text{M}$ ), concentrações estas que são significativamente mais baixas do que as utilizadas por Rigobello et al. (1999) (4-33  $\mu\text{M}$  ou 16-132 nmoles/mg proteína). A isotretinoína, em concentrações de 5 nmoles/mg proteína, não afetou o sistema de transporte de elétrons (Figs. 2.9A e 2.9B) e não alterou o  $\Delta\psi$  desenvolvido pelas mitocôndrias (Figs. 2.11 e 2.12). Além disso, a despolarização do  $\Delta\psi$  e a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  associadas à indução da MPT pela adição de 5 nmoles de isotretinoína/mg proteína foram revertidas pela adição de CyA após a abertura do poro (Figs. 2.7 e 2.8), sugerindo que a isotretinoína afeta diretamente a estrutura conformacional da MPT.

Este trabalho demonstrou que a isotretinoína induziu a despolarização do potencial mitocondrial na presença do  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.7) e a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2.8), devido à indução da MPT; e mostrou ainda, que estes efeitos foram inibidos e revertidos pelo TAM e OHTAM, sugerindo que ambos os antiestrogénios são inibidores da abertura do poro da MPT induzida pela isotretinoína.

Tem sido descrito que a indução da MPT pode ocorrer após um evento de stresse oxidativo (Halestrap *et al.*, 1997). Ao contrário do que se observou com o TAM e o OHTAM, que são conhecidos como antioxidantes intramembranares (Custodio *et al.*, 1994), a adição de agentes protetores dos grupos SH e antioxidantes (DTT, NEM, Cys, NAC, Asc e GSH) não inibiram a abertura do poro da MPT induzida pela isotretinoína (Figs. 2.7B e 2.8). Os resultados obtidos com estes compostos, que são inibidores eficazes da permeabilidade transitória, demonstraram que a MPT induzida pela isotretinoína não deverá estar relacionada com alterações oxidativas de proteínas mitocondriais do poro da MPT. Os ligandos do ANT, o ATP e o ADP, inibiram a abertura do poro da MPT induzida pela isotretinoína (Figs. 2.7B e 2.8). O facto de ambos os nucleótidos de adenina inibirem a abertura do poro pela ligação ao ANT, está de acordo com a hipótese de que a isotretinoína pode induzir a MPT através da interação com o ANT, e com os efeitos obtidos por titulação das mitocôndrias com CAT (Fig. 2.13). Assim, pode sugerir-se que, tal como o CAT, a isotretinoína pode promover a abertura do poro, por estabilizar o ANT no lado citosólico da membrana interna. Esta hipótese parece estar de acordo com a inibição da MPT pelo TAM e OHTAM, o que por sua vez pode ser devido a uma forte capacidade de partição de ambos os antiestrogénios nas biomembranas, interagindo assim com as

proteínas da membrana (Custodio *et al.*, 1991). Através desta interação, os antiestrogénios podem diminuir a fluidez da membrana (Custodio *et al.*, 1993b; Kazanci e Severcan, 2007) e influenciar a conformação do ANT (Cardoso *et al.*, 2003). Estes múltiplos mecanismos dos antiestrogénios podem impedir as mudanças conformacionais promovidas pela isotretinoína, que estão envolvidas na indução da MPT.

Além disso, a interação da isotretinoína com o ANT, um componente regulador do poro da MPT (Lemasters *et al.*, 2009; Zorov *et al.*, 2009), sugere um possível mecanismo para a indução da MPT e pode também explicar a diminuição do estado 3 da respiração (Fig. 2.9A), pois, e tal como descrito acima, a isotretinoína, em concentrações de 5 nmoles/mg proteína, não induziu qualquer outra alteração responsável por este efeito (Figs. 2.9-2.12).

Neste estudo verificámos que a isotretinoína induziu alterações significativas em diferentes funções mitocondriais, mais acentuadas para concentrações iguais ou superiores a 10 nmoles/mg proteína. De facto, a isotretinoína, para concentrações de 5 nmoles/mg proteína, diminuiu a capacidade fosforilativa de mitocôndrias hepáticas, como evidencia a diminuição do estado 3 da respiração (Fig. 2.9A), ICR, ADP/O (Fig. 2.10A), dos níveis de ATP (Tabela 2.2), e o aumento do tempo de fosforilação do ADP (Fig. 2.11). No entanto, a isotretinoína, para concentrações de 10 nmoles/mg proteína, só afetou ligeiramente o sistema de transporte de eletrões, tal como sugere o efeito no estado 4-FCCP (Fig. 2.9A). Além disso, verificámos que a isotretinoína diminuiu significativamente o conteúdo de ANT (Fig. 2.13), indicando que a interação com este componente do sistema fosforilativo pode ser o principal fator envolvido na diminuição da eficiência fosforilativa mitocondrial, induzida pela isotretinoína.

Para concentrações mais elevadas ( $\geq 10$  nmoles/mg proteína) a isotretinoína potenciou significativamente as disfunções mitocondriais descritas acima e o efeito dissociador, como se pode observar pela diminuição do ICR (Fig. 2.10A), do quociente ADP/O (Fig. 2.10A) e pelos efeitos no ciclo fosforilativo do ADP (Fig. 2.11). Estes efeitos devem-se provavelmente às fortes alterações induzidas no conteúdo de ANT (Fig. 2.13), e à sua capacidade para afetar a estrutura conformacional das proteínas do complexo V, ou seja, a fração de Fo da ATP sintase, induzindo a fuga de protões, como evidenciam os efeitos no estado 4 de oligomicina (Fig. 2.9A) e a diminuição do  $\Delta\psi$  (Fig. 2.11). O efeito inibidor no complexo I do sistema de transporte de eletrões é sugerido pela diminuição significativa do estado 4-FCCP (Fig. 2.9A) e do  $\Delta\psi$  observados em mitocôndrias energizadas com glutamato/malato (Fig. 2.11), em comparação com as ligeiras alterações

observadas nas mitocôndrias energizadas com succinato (Figs. 2.9B e 2.12). Este efeito inibidor no complexo I da respiração pode também contribuir para as disfunções mitocondriais observadas com altas concentrações de isotretinoína. É possível que estas disfunções mitocondriais possam estar subjacentes ou contribuir para os numerosos efeitos secundários observados nos doentes tratados com altas concentrações de isotretinoína (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011). Assim, a associação da isotretinoína com outros compostos que promovam uma ação terapêutica aditiva/sinérgica, permite o uso de concentrações mais baixas com menos efeitos secundários, o que pode ser uma importante abordagem terapêutica e representar uma importante melhoria na qualidade de vida dos doentes.

Quando a isotretinoína, em baixas concentrações (5 nmoles/mg proteína), foi associada com o TAM ou o OHTAM, observou-se um efeito protetor na abertura do poro da MPT, sem serem observadas alterações significativas no sistema fosforilativo e no sistema de transporte de eletrões (Fig. 2.14), em comparação com a isotretinoína individualmente. No entanto, na associação da isotretinoína com o TAM observou-se uma exceção para o estado 4 da respiração e para o ICR, tendo-se verificado uma estimulação do estado 4, que se pode dever, possivelmente à permeabilização da membrana mitocondrial interna a prótons induzida pelo TAM, como proposto por Cardoso *et al.* (2001). O TAM e o OHTAM, em concentrações que não alteraram a eficiência fosforilativa mitocondrial (Cardoso *et al.*, 2003), diminuíram a depleção de ATP induzida pela isotretinoína (Tabela 2.2). A prevenção do TAM e do OHTAM na MPT induzida pela isotretinoína (Figs. 2.7 e 2.8), poderá dever-se ao facto de ambos bloquearem o ANT na membrana mitocondrial, diminuindo a interação da isotretinoína com o ANT ou concorrendo para os locais de ligação da isotretinoína com o ANT.

Em conclusão, este estudo demonstra que a isotretinoína induz diferentes alterações mitocondriais, que incluem um aumento da sensibilidade das mitocôndrias à MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ , mecanismo que é inibido pelo TAM e pelo OHTAM. Por outro lado, a disfunção mitocondrial é um evento que desencadeia mecanismos de toxicidade e de morte celular, devido à importante função das mitocôndrias na homeostase celular. Assim, o uso de isotretinoína associada com o OHTAM pode ser uma estratégia terapêutica eficaz, com efeitos secundários reduzidos nas proteínas responsáveis pela produção de energia na célula.





## **Capítulo III**

**Efeitos antiproliferativos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios TAM e OHTAM em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama**



## 1. Introdução

A acitretina (Anforth *et al.*, 2012; Kadakia *et al.*, 2012) e a isotretinoína (Norris *et al.*, 2011; Pili *et al.*, 2012) estão atualmente a ser investigadas no tratamento de alguns tipos de cancro, como referido anteriormente. De facto, estudos feitos em linhas celulares de cancro da mama (Toma *et al.*, 1997; Czczuga-Semieniuk *et al.*, 2001), melanoma (Niu *et al.*, 2005; Guruvayoorappan *et al.*, 2008), e hepatoma (Arce *et al.*, 2005) têm demonstrado que a isotretinoína interfere com a progressão, diferenciação e sobrevivência celular e induz mecanismos de apoptose. Tem também sido atribuído à acitretina um efeito anticarcinogénico em linhas celulares de cancro da mama, de leucemia promielocítica aguda (Frey *et al.*, 1991), de carcinoma de células escamosas cutâneas (Lin *et al.*, 2009), de carcinoma de células escamosas da língua (Ran *et al.*, 2005) e de melanoma (Ren *et al.*, 2008). No entanto, pouco se conhece acerca dos mecanismos de ação destes retinoides nas linhas celulares tumorais.

Alguns trabalhos têm proposto que os RARs e os ERs, com uma base estrutural semelhante (Chambon, 1996), poderão apresentar mecanismos de interação na inibição do crescimento celular. De facto, tem-se verificado que a inibição do crescimento das células de cancro da mama induzida pelos retinoides é mais pronunciada nas células ER(+) (Simeone e Tari, 2004). Além disso, tem sido referido que os RARs uma vez ativados exercem efeitos antiestrogénicos através da ligação dos ERs com os EREs (Demirpence *et al.*, 1994). Por outro lado, a região N-terminal do recetor ER $\alpha$  modula a atividade de transcrição dos RARs (Rousseau *et al.*, 2003). Mais recentemente, diferentes trabalhos têm demonstrado que o RAR $\alpha$  é, provavelmente, um componente essencial dos ERs (Ross-Innes *et al.*, 2010) e que estes dois recetores nucleares podem cooperar numa atividade de transcrição eficaz em células de cancro da mama (Hua *et al.*, 2009; Ross-Innes *et al.*, 2010). Tem também sido descrito que existe uma ação sinérgica entre os retinoides e o TAM nos mecanismos de morte celular em células do cancro da mama (Searovic *et al.*, 2009; Koay *et al.*, 2010). Assim, estes estudos sugerem que a associação dos retinoides com os antiestrogénios poderá constituir uma terapêutica eficaz no tratamento do cancro.

A eficiência terapêutica do TAM no tratamento do cancro da mama apresenta, todavia, uma grande variabilidade interindividual e ineficácia, em muitos casos devido a diferentes polimorfismos nos genes *CYP3A4* e *CYP2D6* (Damodaran *et al.*, 2012; Kiyotani

*et al.*, 2012). Por outro lado, a utilização terapêutica do TAM tem sido questionada e limitada pelos seus inúmeros efeitos adversos, dos quais se podem destacar o aumento da incidência de cancro no endométrio e hepatomas em doentes com cancro da mama tratados com TAM (Poirier e Schild, 2003; Brown, 2009). Por esses motivos, este composto foi classificado pelo “International Agency for Research on Cancer” como um agente carcinogénico do grupo 1 (IARC, 1996).

O OHTAM, que é um dos metabolitos ativos do TAM, poderá ser usado com algumas vantagens, dado que apresenta uma afinidade para os ERs de 30 a 100 vezes superior, uma maior atividade antiproliferativa (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012), uma maior tolerabilidade farmacológica (Sauvez *et al.*, 1999) e uma menor toxicidade (Cruz Silva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002b) comparativamente com o TAM. Em conformidade, o OHTAM pode constituir uma terapêutica mais eficaz na quimioprevenção do cancro da mama e de outras doenças neoplásicas que expressem os ERs. É também de considerar que os retinoides em associação com os antiestrogénios possam vir a constituir uma alternativa no tratamento do cancro, em que as células carcinogénicas expressem conjuntamente os recetores RARs e ERs, como se observa em algumas linhas celulares de cancro da mama ER(+) e de melanoma. No entanto, permanecem por esclarecer os efeitos antiproliferativos conjuntos da acitretina e da isotretinoína com os antiestrogénios.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antiproliferativos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios, em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama ER(+).

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Reagentes**

O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium), o antibiótico (penicilina-streptomicina-anfotericina), a sulforrodamina B (SRB), o Hoechst 33258, o iodeto de propídio (PI), a ribonuclease (RNase), o Tween 20 e o Triton X-100 foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). O soro bovino fetal (FBS) e a Tripsina-EDTA foram obtidos da Invitrogen (Grand Island, NY, USA).

## 2.2 Culturas celulares

As linhas celulares de melanoma de rato K1735-M2 e de cancro da mama humano ER(+) MCF-7 usadas neste trabalho foram cedidas pelo Doutor Paulo Oliveira do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

As linhas celulares foram cultivadas em monocamada, em meio DMEM, suplementado com 10 % (v/v) de FBS e 1% (v/v) de antibiótico (penicilina-streptomicina-anfotericina). As culturas foram mantidas a 37 °C, sob uma atmosfera humidificada com 5 % de CO<sub>2</sub>. As células foram passadas de 3 em 3 dias, com uma diluição em meio de cultura de 1:8 no caso da linha celular K1735-M2 e de 1:4 no caso da linha celular MCF-7. Após atingirem uma confluência de 80 a 90%, as células foram lavadas duas vezes com tampão de fosfato isotónico (PBS)-EDTA, tendo o EDTA sido utilizado para quelatar o Ca<sup>2+</sup>, permitindo que as células se destacassem mais facilmente do frasco de cultura. A suspensão celular foi incubada com 3 mL de Tripsina-EDTA, durante 3 minutos a 37 °C, com o intuito de destacar as células (tripsinização). Posteriormente, foram adicionados 3 mL de meio de cultura para terminar a reação de tripsinização e obter as células suspensas no meio de cultura.

Num novo frasco de cultura (75 cm<sup>3</sup>) foram adicionados 14 mL de meio de cultura e 1 mL da suspensão de células K1735-M2, enquanto que para a linha celular MCF-7 foram adicionados 13 mL de meio de cultura e 2 mL da suspensão celular. Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respetivos meios foram efetuadas em condições de assepsia, utilizando material estéril e em câmara de fluxo laminar.

## 2.3 Avaliação da viabilidade e morte celular

### 2.3.1 Ensaio da sulforrodamina B

O ensaio da SRB foi utilizado para determinar o efeito da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios na viabilidade das linhas celulares K1735-M2 e MCF-7. O ensaio da SRB, realizado como descrito por Papazisis et al. (1997), consiste na quantificação espectralométrica do conteúdo proteico de células, em cultura, coradas com SRB, um corante brilhante de cor púrpura, que se liga às proteínas. Qualquer alteração no número de células em cultura resulta numa alteração

proporcional da quantidade do corante incorporado nas células, permitindo assim a determinação da viabilidade celular.

Antes de proceder ao ensaio da SRB, as células K1735-M2 e MCF-7 foram tripsinizadas, como descrito anteriormente, e contadas numa câmara de Neubauer, utilizando um microscópio ótico Leica (Wetzlar, Germany). As células foram posteriormente cultivadas em placas de 24 poços com uma densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/mL. Após 24 horas de incubação, adicionou-se a acitretina ou a isotretinoína ao meio de cultura, em diferentes concentrações (0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 40  $\mu\text{M}$ ). O TAM e o OHTAM (1; 2; 5; 7,5 e 10  $\mu\text{M}$ ) foram também adicionados às culturas celulares individualmente ou em associação com a acitretina ou a isotretinoína.

As placas com as células K1735-M2 foram recolhidas às 24, 48 e 72 horas de incubação com os compostos a estudar, enquanto que as placas com as células MCF-7 foram recolhidas apenas após 72 horas de incubação. Nos diferentes tempos de recolha, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas duas vezes com uma solução salina de PBS, pH 7,0. De seguida, adicionou-se 1 mL de ácido acético a 1 % (v/v) em metanol, previamente arrefecido, e incubou-se as placas com as células durante pelo menos 24 horas, para permitir a sua fixação. O metanol em ácido acético foi removido, as placas foram secas numa estufa a 37 °C e foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de SRB 0,5% (w/v) com 1% de ácido acético, a cada poço. O excesso de SRB foi removido e as células foram lisadas, utilizando uma solução de Tris-HCl 10 mM, pH 10. O lisado celular obtido foi homogeneizado e foi determinada a absorvência a 540 nm, usando um leitor de placas (PowerWave Xs, Biotek, USA).

O efeito aditivo, sinérgico ou antagonista dos compostos em cultura foi calculado com base na equação de efeito múltiplo, e quantificado pelo índice de combinação (CI) (Chou, 2006):

$[(D)1 / (Dx)1] + [(D)2 / (Dx)2]$ , onde (Dx)1 e (Dx)2 são as concentrações que induzem x % de inibição do crescimento celular, (D)1 e (D)2 são as concentrações em combinação que também inibem x % do crescimento celular. Os valores de CI <1, CI=1, CI >1 indicam efeitos de sinergismo, aditivismo ou de antagonismo, respetivamente.

### 2.3.2 Ensaio de exclusão do azul de tripano

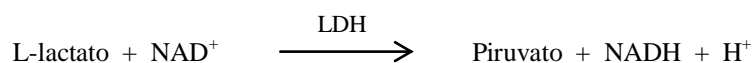
A viabilidade celular das células K1735-M2 foi também avaliada utilizando o ensaio de exclusão do azul de tripano. Este método baseia-se no princípio de que as células não viáveis apresentam uma membrana permeável que permite a entrada do corante nas células, enquanto que as células viáveis apresentam membranas intactas, que impedem a entrada do azul de tripano. Após a entrada do corante nas células não viáveis, este localiza-se nos núcleos que ficam corados de azul, permitindo assim distinguir células viáveis de células não viáveis.

Os compostos em estudo [acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) ou isotretinoína (0,5  $\mu\text{M}$ ) individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM (5  $\mu\text{M}$ )] foram adicionados 24 horas após as células serem cultivadas em placas de 24 poços (1 x 10<sup>5</sup> células/mL), conforme descrito para os ensaios da SRB. Após 72 horas de incubação com os compostos a estudar, procedeu-se à contagem das células presentes no sobrenadante e em monocamada, em cada condição estudada. O sobrenadante de cada condição foi centrifugado a 400 g durante 5 minutos e o sedimento ressuspenso em PBS, pH 7,4. As células da monocamada foram tripsinizadas e centrifugadas a 400 g durante 5 minutos, tendo o sedimento sido também ressuspenso em PBS, pH 7,4. Para a determinação do número de células no sobrenadante e de células aderentes, foram adicionados volumes iguais da suspensão celular e de azul de tripano e as células foram contadas numa câmara de Neubauer, utilizando um microscópio ótico Leica (Wetzlar, Germany).

### 2.3.3 Determinação da lactato desidrogenase

A lactato desidrogenase (LDH) foi quantificada para determinar também o efeito da acitretina e da isotretinoína em associação com o TAM ou o OHTAM na viabilidade celular. Este ensaio baseia-se no facto de que as células que não apresentam uma membrana celular íntegra libertam rapidamente a LDH para o sobrenadante. A viabilidade celular é diretamente proporcional à quantidade de LDH libertada.

A atividade da LDH foi avaliada determinando o NADH formado na reação do lactato com o  $\text{NAD}^+$ , por ação da LDH:



A quantidade de NADH produzida é diretamente proporcional à atividade catalítica da LDH.

As células K1735-M2 foram cultivadas com uma densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/mL, conforme descrito anteriormente, e, após 24 horas, foi adicionada a acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) ou a isotretinoína (0,5  $\mu\text{M}$ ) individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM (5  $\mu\text{M}$ ). O controlo positivo foi realizado após 72 horas de incubação, adicionando 100  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 a 10% (v/v) a um controlo negativo (cultura celular na ausência dos compostos), e incubado durante 45 minutos. Posteriormente, o sobrenadante do controlo positivo e das amostras a estudar foi centrifugado a 14 000 g durante 10 minutos, a 4 °C. De cada ensaio foram retirados 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, ao qual se adicionou 1,90 mL de tampão de Tris-hidrazina (Tris 80 mM, hidrazina 400 mM e EDTA 5 mM, pH 9,5), 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de lactato 1 mM em  $\text{HClO}_4$  a 3% e 0,3 mL de  $\text{NAD}^+$  30 mM.

A quantidade de LDH, proporcional à concentração de NADH formado, foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorvência a 340 nm. A % de LDH foi calculada pela razão entre a absorvência de cada ensaio e do controlo negativo.

#### **2.3.4 Ensaio de coloração com Hoechst**

A morfologia nuclear das células K1735-M2 foi analisada por microscopia de fluorescência, por coloração com Hoechst 33258, um marcador de DNA cuja fluorescência é azul. Este ensaio baseia-se na análise das alterações da morfologia nuclear características do processo de morte por apoptose (Nunes *et al.*, 2008). A membrana plasmática das células fixadas é permeável ao Hoechst 33258 e, por isso, todos os núcleos coram de azul. No entanto, enquanto que os núcleos das células viáveis apresentam uma fluorescência azul difusa, os núcleos das células apoptóticas apresentam maior intensidade de fluorescência, possuindo a cromatina condensada e possivelmente fragmentada, e têm menores dimensões do que os núcleos das células



viáveis, permitindo assim a identificação das células apoptóticas.

As placas de 24 poços foram cobertas com lamelas (12 mm de diâmetro), que recobriram a superfície de cada poço. Posteriormente, as células foram cultivadas ( $1 \times 10^5$  células/mL), e após 24 horas de incubação, a acitretina ( $5 \mu\text{M}$ ) e a isotretinoína ( $0,5 \mu\text{M}$ ) foram adicionadas individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM ( $5 \mu\text{M}$ ). Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com PBS, pH 7,4. As células aderentes foram fixadas com 4 % (v/v) de paraformaldeído durante 15 minutos, seguido de três lavagens com PBS (pH 7,4), para remover o excesso de paraformaldeído. As lamelas foram colocadas sobre uma gota de meio de montagem constituído com 50 % de glicerol em PBS, que continha Hoechst 33258 a  $4 \mu\text{g/mL}$ . As células apoptóticas foram identificadas pelo seu núcleo fragmentado ou núcleo corado de azul brilhante, com DNA condensado, utilizando um microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert (Goettingen, Germany).

#### **2.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo**

A análise do ciclo celular das células K1735-M2 foi avaliada por citometria de fluxo, tal como descrito por Serafim et al. (2008). Este ensaio baseia-se na intensidade de fluorescência relativa dos núcleos corados, utilizando o PI, um composto que intercala com o DNA. Como a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA existente nas células, e o conteúdo de DNA varia nas diferentes fases do ciclo celular, esta técnica permite distinguir as diferentes fases do ciclo celular – G1, S e G2/M.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços, como descrito anteriormente, e após 24 horas foi adicionada a acitretina ( $5 \mu\text{M}$ ) ou a isotretinoína ( $0,5 \mu\text{M}$ ) individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM ( $5 \mu\text{M}$ ). Após 72 horas de incubação, as células foram tripsinizadas e a suspensão celular (células totais: aderentes e não aderentes) foi ressuspensa e fixada numa solução de etanol a 70% (v/v), previamente arrefecida, e posteriormente conservada a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . De seguida, as células foram lavadas em PBS com Tween a 0,1% (PBST). O Tween 20 é um detergente que permeabiliza a membrana das células, permitindo assim a posterior entrada do PI. As células foram posteriormente ressuspensas em 0,5 mL de PBST contendo RNase 20  $\mu\text{g/mL}$  e incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 45 minutos, a fim de prevenir a interferência do RNA na coloração com o PI.

Por último, as células foram incubadas com PI 20 µg/mL a 37 °C durante 30 minutos, para posterior quantificação de DNA utilizando um citómetro de fluxo FACS calibur (BD Bioscience, San José, CA, USA). No total, foram adquiridos 10 000 eventos de cada amostra. A percentagem de células em G1, S e G2/M presentes em cada amostra foi determinada utilizando o programa ModFit LT 3.1.

## **2.5 Análise estatística**

Foi utilizado o SPSS, versão 17 para Windows, Chicago, IL, EUA. Os resultados estão apresentados em média ± SEM (erro padrão da média). As diferenças entre os grupos foram determinadas utilizando OneWay Anova associado ao teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prim 5 (San Diego, California).

## **3. Resultados**

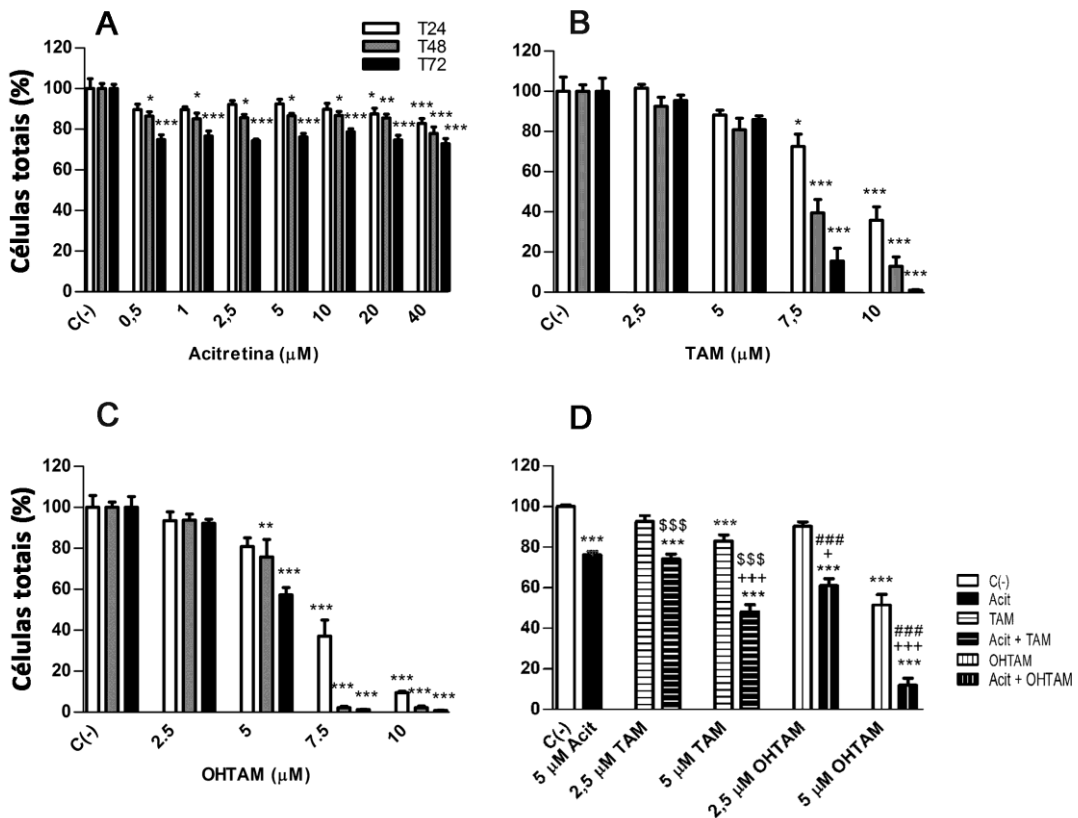
### **3.1 Efeito antiproliferativo da acitretina individualmente ou em associação com os antiestrogénios em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama.**

#### **3.1.1 Resultados**

O efeito antiproliferativo da acitretina individualmente ou em associação com os antiestrogénios foi avaliado em linhas celulares de melanoma K1735-M2 (Fig. 3.1) e de cancro da mama MCF-7 (Fig. 3.2), utilizando o ensaio da SRB.

Nos estudos com concentrações crescentes de acitretina (0,5 – 40 µM) em culturas celulares de melanoma K1735-M2, verificou-se que após 24 horas de incubação, houve um efeito inibidor significativo na proliferação celular, para concentrações iguais ou superiores a 20 µM, comparativamente ao controlo negativo. Após 48 horas de incubação, a acitretina em concentrações  $\geq 0,5$  µM diminuiu significativamente o crescimento celular, sendo este efeito mais pronunciado após 72 horas de incubação (Fig. 3.1A). Os valores de IC50 não foram atingidos para nenhum destes tempos de incubação. Nos estudos com TAM

(2,5 – 10  $\mu\text{M}$ ), observámos um decréscimo significativo na proliferação celular para concentrações  $\geq 7,5 \mu\text{M}$  (Fig. 3.1B). O valor de IC50 após 24 horas de incubação foi de 8,95  $\mu\text{M}$ , enquanto que, após 48 e 72 horas de incubação foram de 7,06 e 6,31  $\mu\text{M}$ , respetivamente. Relativamente ao OHTAM (2,5 – 10  $\mu\text{M}$ ), verificou-se um decréscimo significativo no crescimento celular, para concentrações iguais ou superiores a 7,5  $\mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação. Após 48 e 72 horas, o OHTAM induziu um efeito inibidor significativo para concentrações  $\geq 5 \mu\text{M}$  (Fig. 3.1C). Os valores de IC50, após 24, 48 e 72 horas de incubação foram de 6,95; 5,24 e 5,19  $\mu\text{M}$ , respetivamente.

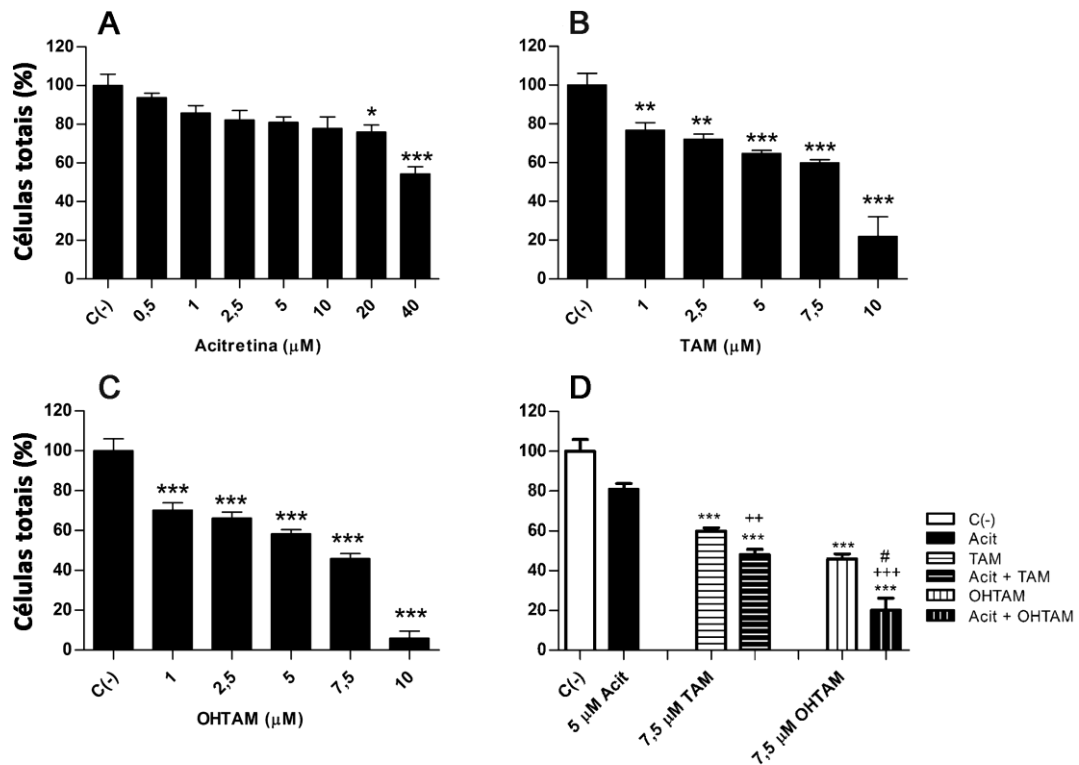


**Figura 3.1** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em cultura de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio da sulforrodamina B. As células foram incubadas com a acitretina (A), o TAM (B) ou o OHTAM (C) individualmente durante 24, 48 e 72 horas e com a acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM durante 72 horas (D). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; T24: 24 horas; T48: 48 horas; T72: 72 horas; Acit: acitretina; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  versus C(-); +++ $p < 0,001$  e + $p < 0,05$  versus acitretina; \$\$\$ $p < 0,001$  versus TAM; ### $p < 0,001$  versus OHTAM.

Quando a acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) foi associada com o TAM (2,5  $\mu\text{M}$ ), verificou-se uma diminuição significativa na proliferação celular, em relação ao controlo negativo e ao TAM individualmente, mas com um valor semelhante à acitretina. No entanto, a associação com o TAM (5  $\mu\text{M}$ ) induziu uma redução significativa no crescimento celular, comparativamente à acitretina e ao TAM (Fig. 3.1D), com um valor de CI de cerca de 0,81. A associação de acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) com o OHTAM (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) induziu uma redução significativa no crescimento celular, em comparação com o controlo negativo, com o OHTAM e a acitretina. A associação com OHTAM (5  $\mu\text{M}$ ) induziu um efeito inibidor mais significativo, relativamente à acitretina (Fig. 3.1D), com um valor de CI de cerca de 0,73.

Os efeitos antiproliferativos da acitretina individualmente ou em associação com o TAM ou o OHTAM foram também avaliados numa linha celular de cancro da mama MCF-7 (Fig. 3.2). Após 72 horas de incubação, a acitretina induziu uma redução significativa no crescimento celular apenas para concentrações iguais ou superiores a 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 3.2A). No entanto, e tal como observado na linha celular K1735-M2, o valor de IC50 também não foi atingido. A incubação do TAM ou do OHTAM em concentrações  $\geq 1$   $\mu\text{M}$  induziu uma diminuição significativa da proliferação celular, comparativamente ao controlo negativo. A proliferação celular diminuiu gradualmente na presença de concentrações crescentes de TAM e OHTAM; tendo sido esta inibição mais acentuada com o OHTAM para todas as concentrações testadas, em comparação com o TAM (Figs. 3.2B e 3.2C).

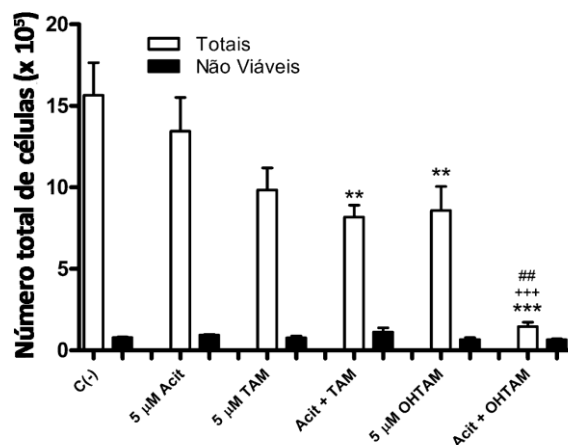
Relativamente à associação da acitretina com os antiestrogénios, observou-se que a acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) associada com o TAM (7,5  $\mu\text{M}$ ) induziu uma diminuição significativa na proliferação celular, em comparação com o controlo negativo e com a acitretina (Fig. 3.2D), apresentando um valor de CI de 0,98. A associação da acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) com o OHTAM (7,5  $\mu\text{M}$ ) induziu um efeito inibidor significativo relativamente ao controlo negativo, à acitretina e ao OHTAM (CI = 0,91) (Fig. 3.2D). No entanto, continuam por esclarecer se estes efeitos antiproliferativos se devem a um mecanismo de paragem do ciclo celular ou à indução de mecanismos de morte celular.



**Figura 3.2** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de cancro da mama MCF-7, utilizando o ensaio da sulforrodamina B. As células foram incubadas com a acitretina (A), o TAM (B), o OHTAM (C) individualmente e com a acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM (D), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; Acit: acitretina; \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05 *versus* C(-); +++p < 0,001 e ++p < 0,01 *versus* acitretina; #p < 0,05 *versus* OHTAM.

Os efeitos citotóxicos induzidos pela acitretina individualmente ou em associação com os antiestrogénios foram também avaliados na linha celular de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio de exclusão do azul de tripano (Fig. 3.3), a determinação da LDH (Tabela 3.1) e o ensaio de coloração com Hoechst (Fig. 3.4). Em todas as condições, o número de células presentes no sobrenadante não representou mais do que 3% do total de células (resultados não apresentados). Analisando as células aderentes, verificou-se que a acitretina (5  $\mu$ M) individualmente ou em associação com o TAM ou com o OHTAM (5  $\mu$ M) não induziram alterações significativas no número de células não viáveis. Contudo, o número total de células diminuiu significativamente quando a acitretina foi associada com o TAM, em comparação com o controlo negativo. O OHTAM (5  $\mu$ M)

individualmente ou em associação com a acitretina também diminuiu significativamente o número de células totais, no entanto a associação destes compostos reduziu significativamente o número de células comparativamente com a acitretina e o OHTAM individualmente (Fig. 3.3).



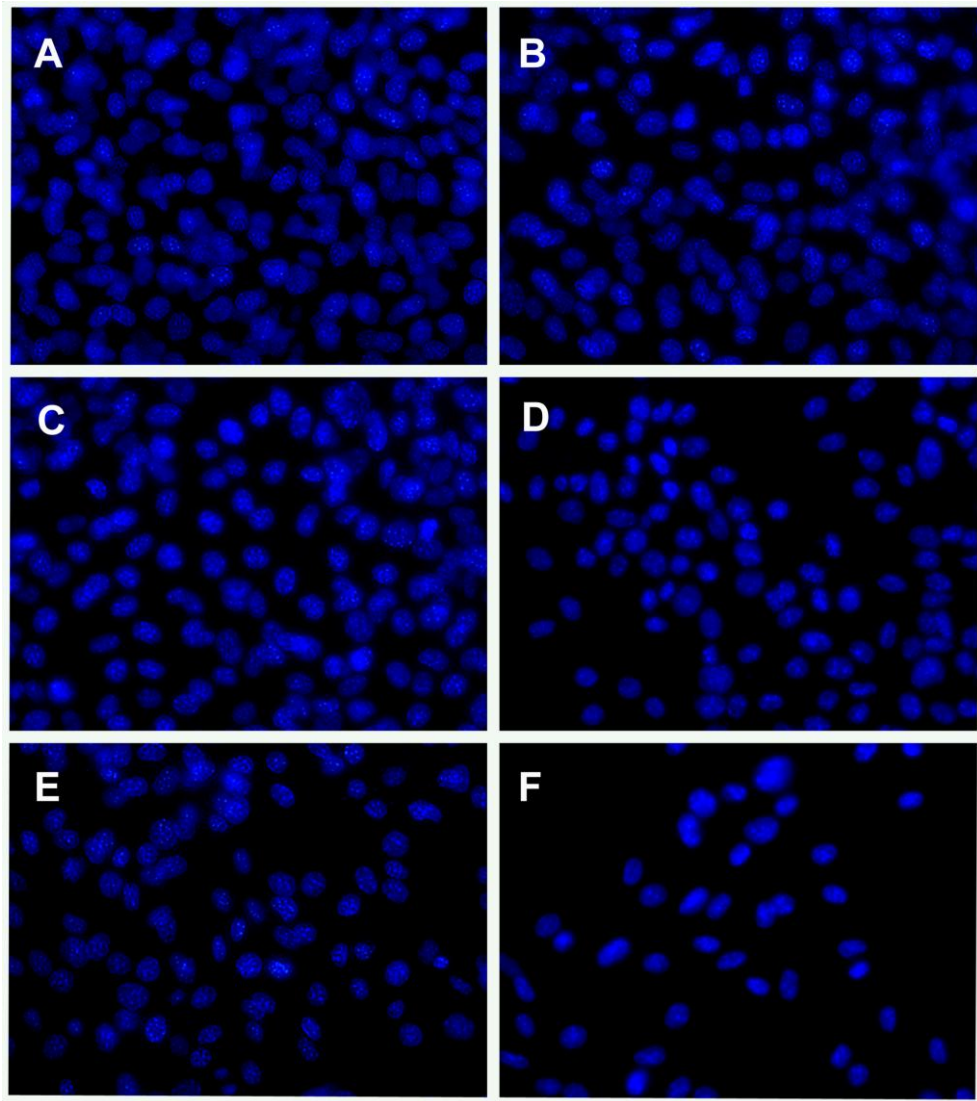
**Figura 3.3** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio de exclusão do azul de tripano. As células foram incubadas com acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM, durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): controlo negativo; Acit: acitretina; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  versus C(-); +++ $p < 0,001$  versus acitretina; ## $p < 0,01$  versus OHTAM.

Os valores de LDH também não foram alterados na presença de acitretina (5  $\mu$ M) individualmente ou em associação com o TAM ou com o OHTAM (5  $\mu$ M) (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** – Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nos níveis de LDH, após 72 horas de incubação.

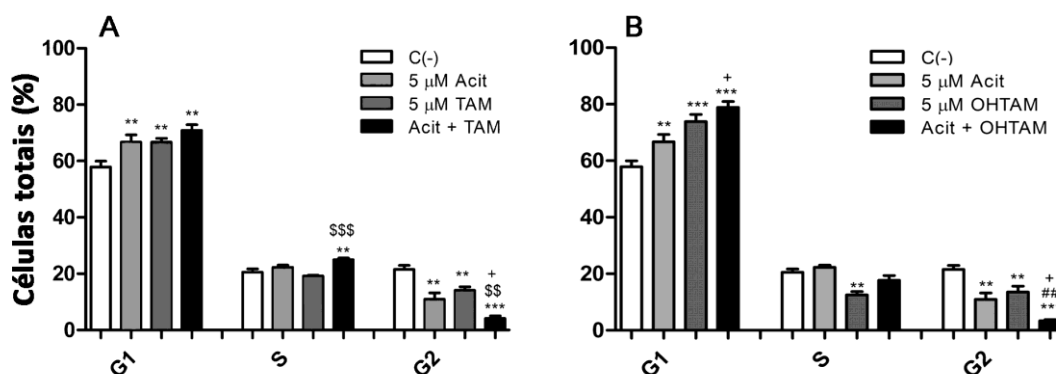
		Acitretina ( $\mu$ M)	LDH (%)
C(-)		---	0,00 $\pm$ 0,02
C(+)		---	100,00 $\pm$ 5,98
---		5	1,48 $\pm$ 0,17
TAM ( $\mu$ M)	5	---	5,54 $\pm$ 0,90
	5	5	5,34 $\pm$ 0,85
OHTAM ( $\mu$ M)	5	---	4,15 $\pm$ 0,62
	5	5	3,77 $\pm$ 0,75

Como se pode observar na figura 3.4, não se verificou qualquer aumento do número de células apoptóticas, após 72 horas de incubação com a acitretina, o TAM ou o OHTAM ou com a acitretina associada com o TAM ou com o OHTAM (Fig. 3.4).



**Figura 3.4** – Imagens de fluorescência de culturas de células de melanoma K1735-M2 incubadas com acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM. As células foram coradas com o corante específico de DNA Hoechst 33258 e incubadas na ausência de compostos (A), na presença de acitretina (B), TAM (C), acitretina + TAM (D), OHTAM (E) e acitretina + OHTAM (F), durante 72 horas. Todas as imagens foram adquiridas com uma ampliação de 400x.

Os efeitos da acitretina individualmente e em associação com os antiestrogénios foram também estudados no ciclo celular na linha de células de melanoma K1735-M2 (Fig. 3.5). A acitretina (5  $\mu$ M), o TAM e o OHTAM (5  $\mu$ M) aumentaram significativamente a percentagem de células em G1 e diminuíram a percentagem de células na fase G2. No entanto, o OHTAM também diminuiu significativamente a percentagem de células na fase S, relativamente às condições controlo. A acitretina (5  $\mu$ M) associada com o TAM (5  $\mu$ M) induziu um aumento significativo na percentagem de células na fase G1 e na fase S, relativamente ao controlo negativo, e no que se refere à fase S, significativo em comparação com o TAM. Observou-se também uma redução significativa na percentagem de células em G2, em comparação com o controlo negativo, com o TAM e com a acitretina (Fig. 3.5A). A associação do OHTAM com a acitretina aumentou também significativamente a percentagem de células em G1, quando comparado com o controlo negativo e com a acitretina; verificou-se igualmente uma diminuição da percentagem de células na fase G2 relativamente ao controlo negativo, e aos dois compostos individualmente (Fig. 3.5B).



**Figura 3.5** - Efeito da acitretina individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nas fases do ciclo celular em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o iodeto de propídeo. As células foram incubadas com acitretina individualmente e em associação com o TAM (A) ou com o OHTAM (B), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): controlo negativo; Acit: acitretina; \*\*\* $p$  <0,001 e \*\* $p$  <0,01 *versus* C(-); + $p$  <0,05 *versus* acitretina; \$\$\$ $p$  <0,001 e \$\$ $p$  <0,01 *versus* TAM; ## $p$  <0,01 *versus* OHTAM.



### 3.1.2 Discussão

Os mecanismos antiproliferativos da acitretina em linhas celulares tumorais estão pouco clarificados e são controversos, provavelmente, porque os ensaios têm sido realizados em diferentes linhas celulares que apresentam diferentes expressões dos RARs. De facto, Ran et al. (2005) verificaram que a acitretina (10  $\mu\text{M}$ ) induz um efeito antiproliferativo numa linha de carcinoma de células escamosas da língua, por induzir paragem do ciclo celular na fase G0/G1, e por promover a morte celular por mecanismos de apoptose através de processos mitocondriais. Todavia, Ren et al. (2008) referiram também que o efeito antiproliferativo da acitretina (10  $\mu\text{M}$ ) numa linha celular de melanoma se deve exclusivamente à capacidade deste retinoide para induzir apoptose por processos mitocondriais.

Os resultados do nosso trabalho demonstraram que a acitretina induziu um efeito antiproliferativo nas linhas celulares K1735-M2 (Fig. 3.1A) e MCF-7 (Fig. 3.2A), com um efeito mais significativo na linha celular de melanoma. Este efeito antiproliferativo da acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) na linha celular K1735-M2 ocorreu essencialmente devido a mecanismos de paragem do ciclo celular e não à indução de mecanismos de morte celular, como se pode observar pelo aumento significativo da percentagem de células na fase G0/G1 (Fig. 3.5), sem haver alterações no número de células não viáveis (Fig. 3.3), nos valores de LDH (Tabela 3.1) e no número de células apoptóticas (Fig. 3.4).

O TAM e o OHTAM apresentaram também um efeito antiproliferativo nas linhas celulares K1735-M2 (Figs. 3.1B e 3.1C) e MCF-7 (Figs. 3.2B e 3.2C), com efeito mais pronunciado na linha celular MCF-7. Verificou-se que o efeito antiproliferativo do TAM e do OHTAM na linha celular de melanoma ocorreu também devido a uma paragem do ciclo celular na fase G0/G1 (Fig. 3.5) e não a mecanismos de morte celular (Figs. 3.3 e 3.4 e Tabela 3.1), à semelhança do que tem sido referido para o TAM (Osborne *et al.*, 1983; Otto *et al.*, 1996) e para o OHTAM (Butler e Kelsey, 1988; Watts *et al.*, 1994) em linhas celulares de cancro da mama. Considerando que o melanoma tem sido descrito como um tumor ER(+) (Mori *et al.*, 2006; de Giorgi *et al.*, 2011), é possível que este efeito antiproliferativo ocorra através de uma via dependente dos ERs, semelhante ao que já foi descrito para a inibição do TAM ou do OHTAM em linhas celulares de cancro da mama (Bardon *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1984). Além disso, é provável que os antiestrogénios possam também induzir paragem do ciclo celular na fase G0/G1 nas linhas celulares de melanoma através de um mecanismo semelhante, dependente dos ERs, em que pode

também ocorrer a diminuição da expressão de vários genes alvo do ER $\alpha$  incluindo a ciclina D1 e a c-myc, o que, conseqüentemente, leva à inibição da síntese de DNA (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003). No entanto, permanece por esclarecer a participação dos ERs, ou dos genes alvo do ER $\alpha$  na inibição do crescimento celular das células de melanoma. É também de referir que o OHTAM apresentou uma atividade antiproliferativa mais significativa do que o TAM nas linhas celulares K1735-M2 (Fig. 3.1B) e MCF-7 (Fig. 3.2B), provavelmente devido à sua maior capacidade antiestrogénica. De facto, sabe-se que o OHTAM tem uma afinidade para os ERs que é cerca de 30 a 100 vezes superior ao TAM e também uma maior ação inibidora da proliferação celular no cancro da mama (Goetz *et al.*, 2008; Kiyotani *et al.*, 2012).

Por outro lado, os resultados demonstraram também que a acitretina (5  $\mu$ M), associada com o TAM ou o OHTAM (5  $\mu$ M) teve um efeito antiproliferativo aditivo/sinergístico na linha celular MCF-7 (CI<sub>Acit + TAM</sub> = 0,98; CI<sub>Acit + OHTAM</sub> = 0,91) (Fig. 3.2B). No entanto, na linha celular K1735-M2 o efeito antiproliferativo foi mais pronunciado (Fig. 3.1B) do que na linha celular MCF-7 (Fig. 3.2B), com uma ação sinérgica em ambas as associações (CI<sub>Acit + TAM</sub> = 0,81; CI<sub>Acit + OHTAM</sub> = 0,73). Além disso, estes efeitos sinérgicos não foram devidos a mecanismos de morte celular (Figs. 3.3 e 3.4 e Tabela 3.1), mas provavelmente à paragem do ciclo celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Fig. 3.5). Contudo, a associação da acitretina com o OHTAM apresentou uma maior percentagem de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Fig. 3.5B) em comparação com a associação de acitretina com o TAM (Fig. 3.5A). Como descrito para os retinoides, que inibem o crescimento de linhas celulares de melanoma através da ativação dos RAR $\gamma$  (Schadendorf *et al.*, 1994), é possível que a acitretina atue através de mecanismos dependentes dos RARs e os antiestrogénios através de mecanismos dependentes de ERs, e que estes dois recetores possam ter um mecanismo de interação nos mecanismos de inibição de crescimento das células do melanoma. Estes resultados podem também ser devidos ao facto dos RA apresentarem uma maior capacidade para inibir as células do cancro da mama ER(+), do que para inibir as células ER(-) (Simeone e Tari, 2004). No entanto, mantém-se por esclarecer o envolvimento dos RARs e dos ERs na inibição do crescimento celular, bem como a identificação das moléculas reguladoras destes mecanismos de paragem do ciclo celular.

Por conseguinte, a capacidade dos antiestrogénios e da acitretina para agirem sinérgicamente na inibição do crescimento das células altamente agressivas e metastáticas de melanoma representa uma estratégia terapêutica promissora para melhorar o efeito

antiproliferativo de cada composto individualmente. Todavia, como a associação da acitretina com o OHTAM apresenta uma maior inibição da proliferação das linhas celulares de cancro, deve considerar-se que esta associação poderá apresentar uma maior eficácia no tratamento do melanoma e do cancro da mama.

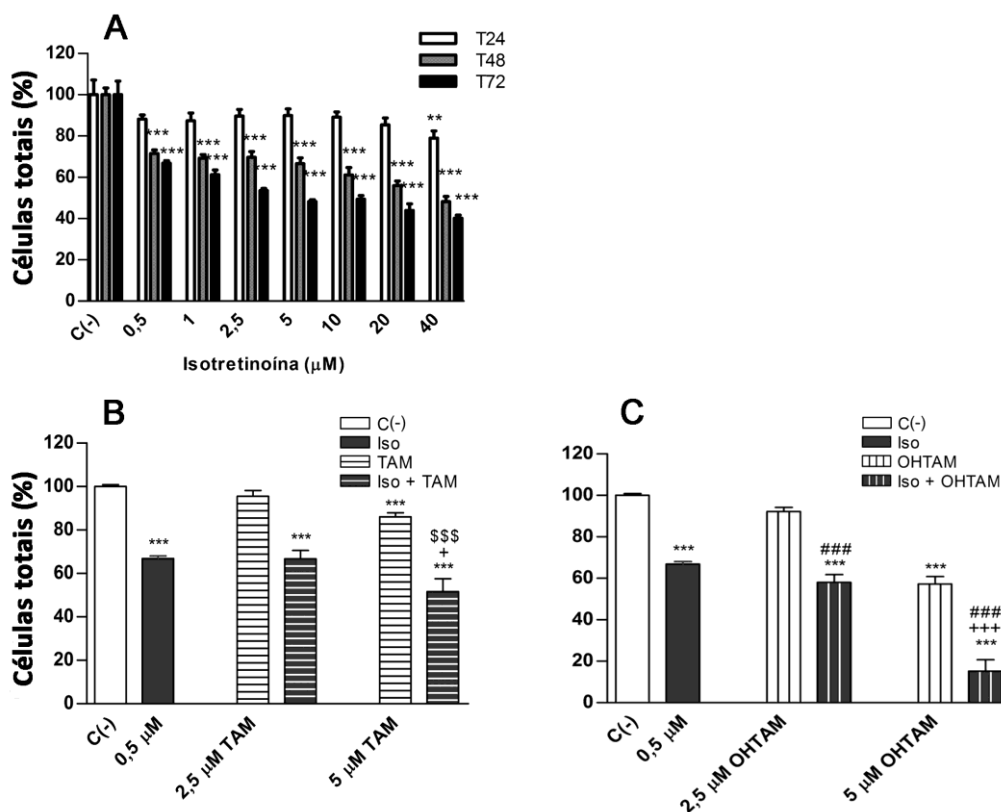
### **3.2 Efeito antiproliferativo da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama**

#### **3.2.1 Resultados**

O efeito antiproliferativo da isotretinoína individualmente e em associação com os antiestrogénios foi avaliado na linha celular de melanoma K1735-M2 (Fig. 3.6) e na linha celular de cancro da mama MCF-7 (Fig. 3.7), utilizando o ensaio da SRB, conforme referido anteriormente para o estudo da acitretina.

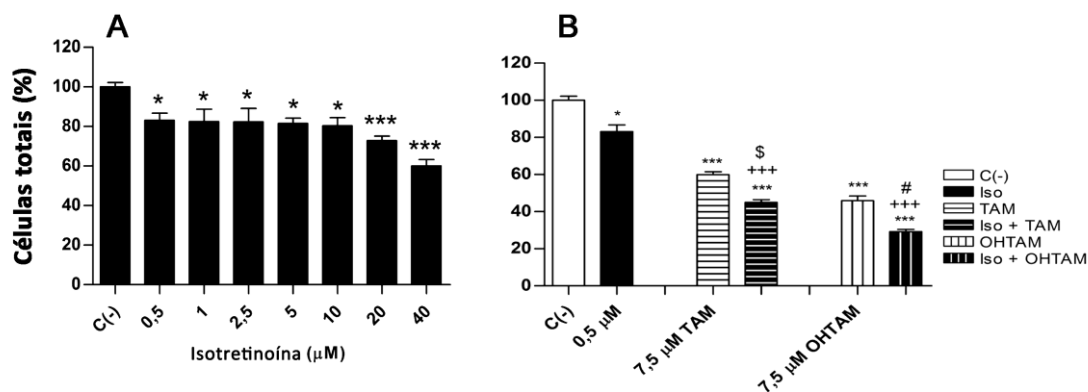
No ensaio da SRB, após 24 horas de incubação das culturas celulares com isotretinoína (0,5 – 40  $\mu\text{M}$ ), verificámos um efeito inibidor significativo na proliferação celular, apenas para a concentração de cerca de 40  $\mu\text{M}$ , comparando com o controlo negativo. Contudo, o valor de IC<sub>50</sub> não foi atingido. Após 48 e 72 horas de incubação, a isotretinoína em concentrações  $\geq 0,5 \mu\text{M}$  induziu uma redução significativa no crescimento celular (Fig. 3.6A) e os valores de IC<sub>50</sub> foram de 27,09 e 0,45  $\mu\text{M}$ , respetivamente.

A associação da isotretinoína (0,5  $\mu\text{M}$ ) com o TAM (2,5  $\mu\text{M}$ ) induziu uma diminuição significativa na proliferação celular, quando comparada com o controlo negativo, mas de valor semelhante à isotretinoína e ao TAM. No entanto, a associação com o TAM (5  $\mu\text{M}$ ) induziu uma redução significativa no crescimento celular em comparação com a isotretinoína e o TAM (Fig. 3.6B), apresentando um valor de CI de 0,93. A isotretinoína (0,5  $\mu\text{M}$ ) associada com o OHTAM (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) reduziu significativamente o crescimento celular em comparação com o controlo negativo e com o OHTAM. Contudo, a associação com o OHTAM (5  $\mu\text{M}$ ) promoveu um efeito inibidor mais pronunciado do que a associação com o TAM, sendo esse efeito estatisticamente significativo relativamente ao controlo negativo, à isotretinoína e ao OHTAM (Fig. 3.6C), apresentando um valor de CI de 0,75.



**Figura 3.6** – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em cultura de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio da sulforradamina B. As células foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas com a isotretinoína individualmente (A) e em associação com o TAM (B) ou com o OHTAM (C), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; T24: 24 horas; T48: 48 horas; T72: 72 horas; Iso: isotretinoína; \*\*\* $p$  < 0.001 e \*\* $p$  < 0.01 *versus* controlo negativo; +++ $p$  < 0.001 e + $p$  < 0.05 *versus* isotretinoína; \$\$\$ $p$  < 0.001 *versus* TAM; ### $p$  < 0.001 *versus* OHTAM.

O estudo do efeito antiproliferativo da isotretinoína (0,5 – 40  $\mu$ M) na linha celular MCF-7 (Fig. 3.7A) sugere que este retinoide, em concentrações  $\geq$  0,5  $\mu$ M reduz a percentagem de células, comparando com o controlo negativo. Quando a isotretinoína foi associada com o TAM (7,5  $\mu$ M) ou com o OHTAM (7,5  $\mu$ M), a proliferação celular diminuiu significativamente quando comparada à isotretinoína, aos antiestrogénios individualmente e ao controlo negativo (Fig. 3.7B), tendo-se verificado um valor de CI de 0,84 para a associação com o OHTAM (7,5  $\mu$ M) e um valor de 0,88 para a associação com o TAM (7,5  $\mu$ M).

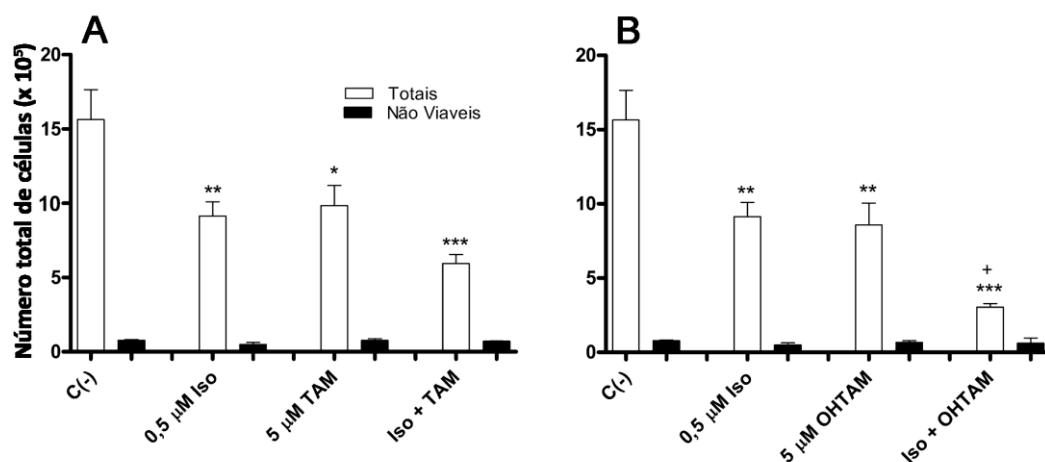


**Figura 3.7** – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de cancro da mama MCF-7, utilizando o ensaio da sulforradamina B. As células foram incubadas com a isotretinoína individualmente (A) e em associação com o TAM (B) ou com o OHTAM (C), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de oito experiências independentes. C(-): controlo negativo; T72: 72 horas; Iso: isotretinoína; \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  versus C(-); +++ $p < 0,001$  versus isotretinoína; \$ $p < 0,05$  versus TAM; # $p < 0,05$  versus OHTAM.

O efeito citotóxico induzido pela isotretinoína individualmente e em associação com os antiestrogénios foi também avaliado na linha celular de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio de exclusão do azul de tripano (Fig. 3.8), a determinação da LDH (Tabela 3.2) e o ensaio de coloração com Hoechst (Fig. 3.9).

Como se pode observar na figura 3.8, após 72 horas de incubação, a isotretinoína (0,5  $\mu$ M) não induziu qualquer efeito significativo no número de células não viáveis. Contudo, verificou-se um decréscimo significativo no número total de células, em comparação com o controlo negativo (Fig. 3.8A).

O TAM e o OHTAM (5  $\mu$ M) individualmente ou a associação do TAM com a isotretinoína não induziram qualquer alteração no número de células não viáveis, contudo o número total de células diminuiu significativamente quando comparado com o controlo negativo (Figs. 3.8A e 3.8B). A associação da isotretinoína com o OHTAM também não induziu diferenças no número de células não viáveis, no entanto o número de células totais foi reduzido, quando comparado com a isotretinoína e com o controlo negativo (Fig. 3.8B).



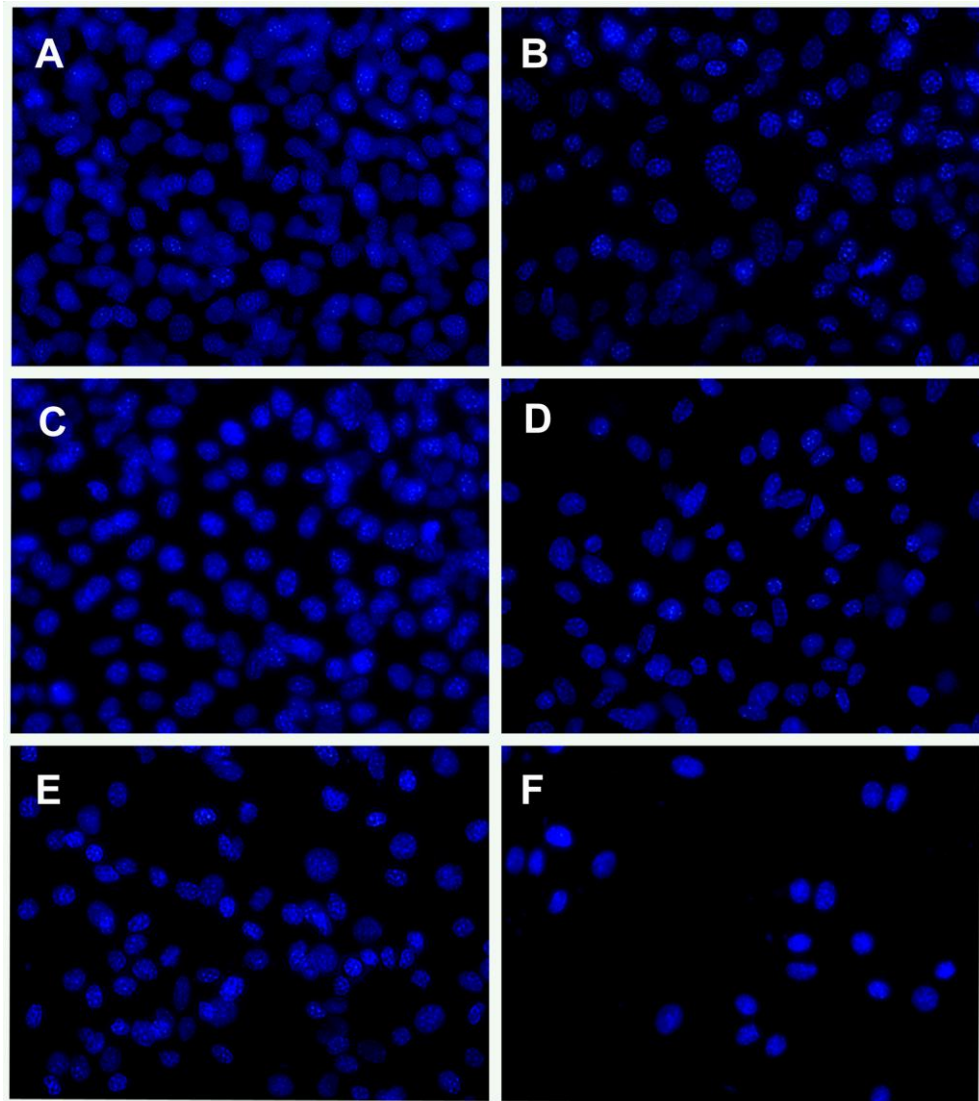
**Figura 3.8** - Efeito da isotretinoína individualmente ou em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o ensaio de exclusão do azul de tripano. As células foram incubadas com a isotretinoína individualmente e em associação com o TAM (A) ou com o OHTAM (B), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): Controlo negativo; Iso: isotretinoína; \*\*\*p <0,001, \*\*p <0,01 e \*p <0,05 versus C(-); +p <0,05 versus isotretinoína.

Após 72 horas de incubação, não foram também observadas alterações nos níveis de LDH na presença de isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** – Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nos níveis de LDH, após 72 horas de incubação.

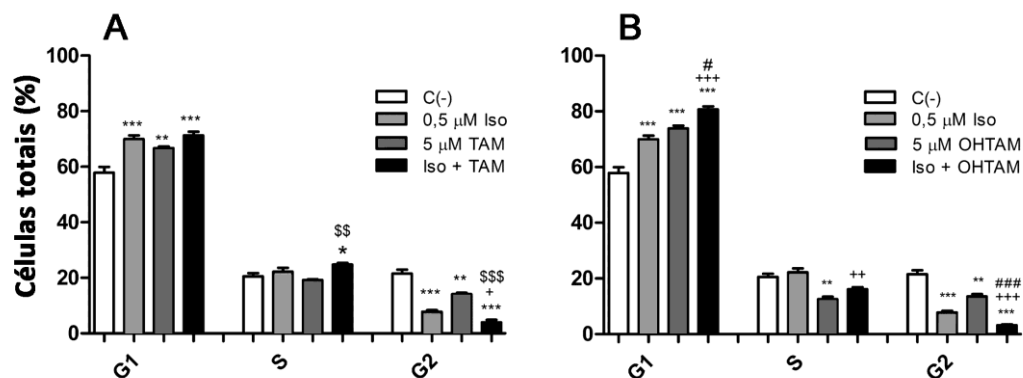
		Isotretinoína (μM)	LDH (%)
C(-)		---	0,00 $\pm$ 0,01
C(+)		---	100,00 $\pm$ 5,98
---		5	1,73 $\pm$ 0,71
TAM (μM)	5	---	5,31 $\pm$ 1,57
	5	5	4,38 $\pm$ 1,49
OHTAM (μM)	5	---	4,80 $\pm$ 1,90
	5	5	1,30 $\pm$ 0,75

Os estudos com o corante de DNA Hoechst não mostraram também qualquer aumento no número de células apoptóticas, após incubação das células com isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM (Fig. 3.9).



**Figura 3.9** - Imagens de fluorescência de culturas de células de melanoma K1735-M2 incubadas com isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM. As células foram coradas com o corante específico de DNA Hoechst 33258 e incubadas na ausência de compostos (A), na presença de isotretinoína (B), TAM (C), isotretinoína + TAM (D), OHTAM (E) e isotretinoína + OHTAM (F), durante 72 horas. Todas as imagens foram adquiridas com uma ampliação de 400x.

O efeito da isotretinoína individualmente e em associação com os antiestrogénios foi também avaliado no ciclo celular em culturas de células de melanoma K1735-M2 (Fig. 3.10).



**Figura 3.10** - Efeito da isotretinoína individualmente e em associação com o TAM ou com o OHTAM nas fases do ciclo celular em culturas de células de melanoma K1735-M2, utilizando o iodeto de propídeo. As células foram incubadas com isotretinoína individualmente e em associação com o TAM (A) ou com o OHTAM (B), durante 72 horas. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três experiências independentes. C(-): controlo negativo; Iso: isotretinoína; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  versus C(-); +++ $p < 0,001$ , ++ $p < 0,01$  e + $p < 0,05$  versus isotretinoína; \$\$\$ $p < 0,001$  e \$\$ $p < 0,01$  versus TAM; ### $p < 0,001$  e # $p < 0,05$  versus OHTAM.

A isotretinoína (0,5  $\mu$ M) induziu um aumento significativo na percentagem de células na fase G1 e uma redução significativa das células na fase G2, em comparação com o controlo negativo. A associação da isotretinoína (0,5  $\mu$ M) com o TAM (5  $\mu$ M) induziu um aumento significativo na percentagem de células na fase G1 e na fase S, relativamente ao controlo negativo, e no que se refere à fase S, significativo em comparação com o TAM. Observou-se também uma diminuição significativa na fase G2 relativamente ao controlo negativo, ao TAM e à isotretinoína (Fig. 3.10A). A associação da isotretinoína com o OHTAM induziu um aumento significativo na percentagem de células na fase G1 e uma redução significativa na percentagem de células na fase G2, quando comparado com o controlo negativo, com a isotretinoína e o OHTAM; e uma redução significativa das células na fase S, relativamente à isotretinoína (Fig. 3.10B).



### 3.2.2 Discussão

Os resultados deste trabalho demonstraram que a isotretinoína em concentrações superiores ou iguais a 0,5  $\mu\text{M}$ , apresentou um efeito antiproliferativo na linha celular K1735-M2, sendo esse efeito mais significativo após 72 horas de incubação (Fig. 3.6). O efeito antiproliferativo da isotretinoína ocorreu devido à paragem do ciclo celular na fase G0/G1 (Fig. 3.10), dado que não se observaram mecanismos de morte celular, tal como se pode verificar pelo número de células não viáveis (Fig. 3.8), pelos níveis de LDH (Tabela 3.2), e pelo número de células apoptóticas (Fig. 3.9). Além disso, como as concentrações de isotretinoína utilizadas nestes ensaios foram inferiores às concentrações utilizadas nos ensaios mitocondriais (Capítulo II), podemos considerar que os efeitos antiproliferativos não estão relacionados com alterações nas funções mitocondriais. Por outro lado, os resultados deste trabalho estão de acordo com outros estudos que descreveram que a isotretinoína inibe o ciclo celular na fase G0/G1 (Niu *et al.*, 2005; Vuletic *et al.*, 2010). Todavia, tem também sido referido que a isotretinoína em concentrações de 10  $\mu\text{M}$  induz mecanismos de apoptose em linhas celulares de melanoma, por processos dependentes da mitocôndria (Niu *et al.*, 2005; Guruvayoorappan *et al.*, 2008), o que se deve, provavelmente, à diferença nas concentrações utilizadas no nosso estudo, que são muito inferiores às utilizadas nos estudos mitocondriais (Capítulo II). Por outro lado, observámos que nas linhas celulares de melanoma e de cancro da mama, o TAM e o OHTAM associados com a isotretinoína aumentaram de forma sinérgica o efeito antiproliferativo de ambos os compostos individualmente e que a associação com o OHTAM teve um efeito inibidor na proliferação celular superior ao da associação com o TAM (Figs. 3.6 e 3.7). Adicionalmente, os resultados na linha celular K1735-M2 sugerem que o efeito antiproliferativo do OHTAM e do TAM, quando associados com a isotretinoína, não ocorreu devido a mecanismos de morte celular (Figs. 3.8 e 3.9 e Tabela 3.2), podendo ser uma consequência da paragem do ciclo celular (Fig. 3.10). De facto, estes resultados indicaram que esta associação aumenta a percentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular de forma semelhante ao que está descrito para o TAM e para a tretinoína nas células MCF-7 (Searovic *et al.*, 2009; Koay *et al.*, 2010).

Considerando que os RARs e os ERs são dois recetores nucleares que têm uma estrutura semelhante e que podem cooperar numa atividade transcricional efetiva nas células do cancro da mama (Hua *et al.*, 2009; Ross-Innes *et al.*, 2010), é também possível

### Efeitos antiproliferativos da acitretina e da isotretinoína

que nas células de melanoma possa ocorrer um mecanismo semelhante. No entanto, pouco se sabe acerca do mecanismo de ação destes recetores nas células de melanoma.

Em conclusão, este estudo sugere que a isotretinoína em associação com o OHTAM ou com o TAM inibe o crescimento das células de melanoma por paragem do ciclo celular na fase G0/G1. No entanto, a associação da isotretinoína com o OHTAM tem uma maior ação antiproliferativa e poderá ser mais eficaz no tratamento do melanoma.

# **Capítulo IV**

## **Efeito citogenotóxico dos retinoides**



## 1. Introdução

A terapêutica com retinoides sintéticos é frequentemente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias da pele. Como descrito anteriormente, a acitretina é frequentemente utilizada no tratamento da psoríase moderada e grave (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011). A isotretinoína é preferencialmente utilizada no tratamento da acne *vulgaris* (Rigopoulos *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2011b), embora possa nalguns casos ser também utilizada no tratamento da psoríase *vulgaris* (Mortazavi *et al.*, 2011).

As terapêuticas com acitretina (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011) e isotretinoína (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011) estão frequentemente associadas a diferentes efeitos adversos, que podem ser reduzidos diminuindo as doses terapêuticas. A associação e o uso alternado de diferentes terapêuticas constitui uma prática clínica comum no tratamento da psoríase *vulgaris*, por aumentar a eficácia terapêutica e minimizar as reações adversas. A monoterapia com acitretina ou com isotretinoína é menos eficaz do que a terapêutica combinada com NBUVB ou com PUVA. Além disso, a associação da acitretina (Ozdemir *et al.*, 2008; Monfrecola e Baldo, 2009) e da isotretinoína (Anstey e Hawk, 1997; Mortazavi *et al.*, 2011) com NBUVB ou com PUVA permite a aplicação de doses mais baixas de cada agente terapêutico, reduzindo simultaneamente os efeitos secundários e aumentando a eficácia terapêutica, relativamente à monoterapia.

No tratamento da acne, para reduzir ou evitar os efeitos adversos, são utilizadas baixas doses de isotretinoína (10-20 mg/dia), por um período de tratamento prolongado (Amichai *et al.*, 2006; Sardana e Garg, 2011).

A escolha do tratamento adequado na psoríase *vulgaris* e na acne *vulgaris* deve ter em conta a eficácia terapêutica e os efeitos adversos. Alguns estudos em linhas celulares e em doentes têm referido que a exposição a NBUVB (Tzung e Runger, 1998; Ferahbas *et al.*, 2004) ou a PUVA (Sardas *et al.*, 1994; Hamurcu *et al.*, 2002; Baysal *et al.*, 2003) induz lesões no DNA e que há um aumento da incidência de cancro de pele nos doentes com psoríase *vulgaris* tratados com PUVA (Archier *et al.*, 2012). Os estudos que existem na literatura sobre a genotoxicidade dos retinoides são, no entanto, controversos. Tem sido referido que a tretinoína *in vitro* (10-100  $\mu\text{M}$ ) aumenta a frequência de MN em linfócitos humanos e em culturas de linfócitos de rato (Alakhras *et al.*, 2011). Relativamente à isotretinoína, um estudo referiu que quando administrada (30-40 mg/dia) a doentes com

acne induz danos no DNA (Georgala *et al.*, 2005), enquanto outro estudo, *in vitro*, descreveu que a isotretinoína (0,01 - 10  $\mu$ M) não causa lesões no DNA (Trizna *et al.*, 1992). Para a acitretina, existe um estudo de genotoxicidade que refere que a acitretina em concentrações elevadas (50-100  $\mu$ M), não tem efeito genotóxico (Stephanou *et al.*, 2004). Pouco se conhece, portanto, sobre o potencial genotóxico da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com as terapêuticas de NBUVB ou de PUVA.

Por outro lado, tendo em conta que os retinoides em associação com os antiestrogénios poderão constituir uma alternativa na quimioprevenção do cancro, torna-se importante determinar o potencial genotóxico da associação dos retinoides com os antiestrogénios.

O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade genotóxica da acitretina e da isotretinoína, através da realização de estudos *in vivo*, utilizando amostras de sangue de doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris*, tratados com acitretina ou isotretinoína em monoterapia ou em terapêuticas associadas com NBUVB ou com PUVA; foram também realizados estudos *in vitro*, utilizando amostras de sangue de voluntários saudáveis, incubados com acitretina ou com isotretinoína a diferentes concentrações, equivalentes ou superiores às atingidas no sangue, com doses terapêuticas. Por último, foram também avaliados os efeitos genotóxicos da acitretina em estudos *in vitro*, utilizando amostras de sangue incubadas com a acitretina em associação com o TAM e com o OHTAM.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Reagentes**

O meio “Roswell Park Memorial Institute Medium” (RPMI) 1640, a L-glutamina, a penicilina, a PHA, a Cyt-B, a ciclofosfamida, a staurosporina, o histopaque 1,119, o histopaque 1,077, a agarose “low melting point”, a agarose “normal melting point” e o SYBR Green foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). O meio de montagem Vectashield foi fornecido por Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA).

## 2.2 Caracterização dos doentes

Os doentes foram selecionados na consulta de dermatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) e incluídos no estudo previamente aprovado pela Comissão de Ética dos HUC. Todos os doentes foram esclarecidos sobre a natureza do ensaio clínico e deram o seu consentimento. Foram incluídos neste estudo 19 doentes (13 homens e 6 mulheres) com psoríase *vulgaris* e 2 doentes (homens) com acne *vulgaris*, com idades entre os 33 e os 66 anos.

Nenhum dos doentes tinha feito medicação sistémica, fototerapia ou fotoquimioterapia no mês anterior à colheita. Foram excluídos deste estudo os doentes com outras patologias, tais como diabetes *mellitus*, doenças hepáticas, renais ou cardiovasculares ou com outras doenças dermatológicas.

Os doentes foram observados clinicamente nas consultas de dermatologia, nos dias da colheita de sangue. A avaliação clínica e analítica dos doentes com psoríase *vulgaris* foi feita quando a doença estava na fase ativa, antes de iniciarem o tratamento (T0), e após 12 semanas (T12) de tratamento.

A gravidade da acne *vulgaris* e da psoríase *vulgaris* foi avaliada pelo mesmo dermatologista, para diminuir a subjetividade da avaliação. A acne *vulgaris* foi classificada como pápulo-pustulosa ligeira ou moderada/grave (Katsambas *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2011b). A psoríase *vulgaris* foi classificada de acordo com a gravidade, como ligeira para valores de PASI abaixo de 10, moderada para valores de PASI entre 10 e 20, e grave para valores de PASI superiores a 20 (Fredriksson e Pettersson, 1978; Naldi e Gambini, 2007).

O tipo de tratamento foi decidido pelo dermatologista, de acordo com a gravidade da doença e da história clínica e terapêutica de cada doente.

Dezasseis doentes com psoríase *vulgaris* (13 homens e 3 mulheres) foram tratados com acitretina (administração oral de uma cápsula Neotigason® -25 mg/dia) em monoterapia ou em associação com NBUVB ou com PUVA.

Cinco doentes (2 homens com acne *vulgaris* e três mulheres com psoríase *vulgaris*) foram tratados com isotretinoína, por administração oral de uma cápsula de 8 mg/dia (isotropil, Lab. Azevedos®) ou de 20 mg/dia (genérico), em monoterapia ou em associação com NBUVB.

A irradiação com NBUVB ( $311 \pm 2$  nm) foi feita numa cabine Waldmann 7001 K (UVA/UVB-TL01; Waldmann Medizintechnik, Villigen-Schwenningen, Germany). A dose inicial, dependente do fototipo do doente, foi de 0,1-0,3 J/cm<sup>2</sup>. Foi aplicado um esquema de dose crescente, aumentando 0,1-0,2 J/cm<sup>2</sup> em cada sessão (três vezes por semana), até ser alcançada uma dose máxima de 2,5 J/cm<sup>2</sup>. A dose total de irradiação NBUVB variou 15,3-54,3 J/cm<sup>2</sup> ( $29,53 \pm 3,33$  J/cm<sup>2</sup>).

A irradiação com UVA (320-400 nm) foi aplicada no mesmo tipo de cabine. O 8-metoxipsoraleno (0,6 mg/kg peso) foi administrado 2 horas antes da irradiação com UVA; a dose inicial foi de 2-3 J/cm<sup>2</sup>, de acordo com o fototipo. Foi também utilizado um esquema de dose crescente, com um aumento de 0,5 J/cm<sup>2</sup> em cada sessão (três vezes por semana), até ser alcançada uma dose máxima de 12 J/cm<sup>2</sup>. A dose total de irradiação UVA variou de 33,0-342,5 J/cm<sup>2</sup> ( $178,0 \pm 24,8$  J/cm<sup>2</sup>). Os olhos e os órgãos genitais foram protegidos durante a irradiação.

Dos 16 doentes tratados com acitretina, cinco foram tratados com acitretina em monoterapia e os outros com terapêutica combinada. Destes, cinco foram tratados com acitretina + PUVA e seis com acitretina + NBUVB (Tabela 4.1).

Os 16 doentes foram estudados clinicamente e as amostras de sangue foram recolhidas para os estudos de genotoxicidade na fase ativa da psoríase *vulgaris*, antes de iniciar o tratamento, como se referiu anteriormente, e reavaliados após 12 semanas de tratamento (T12).

A tabela 4.2 apresenta os dados demográficos e clínicos dos doentes tratados com isotretinoína. Dois doentes apresentavam acne *vulgaris*, um ligeiro e outro moderado/grave, e foram tratados durante 12 semanas com 8 mg/dia e 20 mg/dia de isotretinoína (administração oral), respetivamente. Três doentes apresentavam psoríase *vulgaris*, um com psoríase moderada, que foi tratado com 20 mg de isotretinoína/dia, durante 24 semanas, e dois com psoríase grave, que foram tratados com 20 mg/dia de isotretinoína + NBUVB, durante 12 semanas. Todos os doentes foram avaliados clinicamente e as amostras de sangue recolhidas para os estudos de genotoxicidade, na fase ativa da doença, antes de iniciar a terapêutica (T0) e após 12 semanas de terapêutica (T12); os doentes tratados com isotretinoína durante 24 semanas (dois com acne e um com psoríase), foram também avaliados, após as 24 semanas de tratamento.



**Tabela 4.1** – Dados demográficos e clínicos dos doentes com psoríase *vulgaris*, tratados com acitretina em monoterapia ou em associação com irradiação com NBUVB ou com irradiação com PUVA.

	Acitretina (n = 5)		Acitretina + NBUVB (n = 6)		Acitretina + PUVA (n = 5)	
<b>Idade</b> (anos)	51,6 ± 4,9 38 – 66		51,3 ± 3,5 39 – 60		53,6 ± 3,3 45 – 62	
<b>Duração da Doença</b> (anos)	29,0 ± 6,2 12 – 49		27,3 ± 4,3 15 – 44		20,6 ± 7,8 1 – 47	
<b>12 semanas de Tratamento</b>	25 mg acitretina (diário)		25 mg acitretina (diário) NBUVB (três vezes semana)		25 mg acitretina (diário) PUVA (três vezes semana)	
<b>Dose Total NBUVB/ UVA</b> (J/ cm <sup>2</sup> )	--		29,53 ± 3,33 15,3 – 54,3		178,0 ± 24,8 33,0 – 342,5	
	<i>T0</i>	<i>T12</i>	<i>T0</i>	<i>T12</i>	<i>T0</i>	<i>T12</i>
<b>PASI</b>	14,2 ± 5,1	6,7 ± 2,3	26,3 ± 4,6	4,6 ± 1,4**	39,8 ± 4,2	10,2 ± 8,7*

Os valores são apresentados como a média ± SEM (erro padrão da média) e intervalo entre valor máximo e mínimo; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; \*\*p < 0,01, \*p < 0,05 *versus* T0.

**Tabela 4.2** – Dados demográficos e clínicos dos cinco doentes com psoríase *vulgaris* e com acne *vulgaris* tratados com isotretinoína em monoterapia ou em associação com irradiação com NBUVB.

<b>Idade</b> (anos)	35	33	35	35	35
<b>Doença e Tipo de Tratamento</b> (semanas)	Acne 24 sem	Acne 24 sem	Psoríase 24 sem	Psoríase 12 sem	Psoríase 12 sem
<b>Doença Severidade</b>					
<i>Acne</i>	Pápulo-pustulosa Ligeira	Pápulo-pustulosa Moderada/grave			
<i>Psoríase</i>			Moderada (PASI = 13.3)	Grave (PASI = 24.0)	Grave (PASI = 41.7)
<b>Duração da Doença</b> (anos)	1	1	3	10	20

Para os ensaios *in vitro* foi colhido sangue de cinco voluntários aparentemente saudáveis, com valores hematológicos e bioquímicos normais, sem história de doenças inflamatórias, infecciosas ou dermatológicas, não fumadores e sem terem recebido qualquer tratamento no mês anterior a este estudo. Estes cinco voluntários saudáveis foram utilizados como grupo controle para os estudos *in vivo*, feitos em doentes com psoríase *vulgaris* e com acne *vulgaris*.

## 2.3 Avaliação da citogenotoxicidade

As amostras de sangue periférico foram colhidas para tubos com heparina. Para proceder aos ensaios *in vitro* e *in vivo*, as amostras de sangue (0,3 mL) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com FBS a 10 % (v/v), contendo L-glutamina 200 mM, penicilina (50 IU/mL) e PHA a 1 % (v/v) para promover a proliferação dos linfócitos. Este procedimento decorreu em condições de assepsia, utilizando uma câmara de fluxo laminar e material esterilizado.

### 2.3.1 Ensaios *in vitro*

Para estudar os efeitos citogenotóxicos da acitretina e da isotretinoína em culturas de sangue *in vitro*, a acitretina e a isotretinoína foram adicionadas em diferentes concentrações (1,2; 2,4; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) ao meio de cultura, após a adição de PHA. A acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) foi também adicionada em associação com o TAM ou com o OHTAM (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), após a adição de PHA. Apesar da acitretina, da isotretinoína, do TAM e do OHTAM serem metabolizados pelas enzimas do complexo enzimático P450, os ensaios *in vitro* foram efetuados na ausência da mistura enzimática S9, uma vez que o nosso objetivo era estudar os efeitos genotóxicos da acitretina e da isotretinoína individualmente, e da acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM, e não dos seus metabolitos; além disso, permitiu-nos comparar os resultados dos estudos *in vitro* com os obtidos nos estudos *in vivo* em que os retinóides passaram por processos de absorção e de metabolismo.

O controlo negativo (amostras de sangue de voluntários com 0,4 % (v/v) de PBS) e o controlo positivo (com ciclofosfamida 17,9  $\mu\text{M}$  ou com staurosporina 10,7  $\mu\text{M}$ , para o

ensaio do CBMN e para o ensaio do cometa, respetivamente), e tal como as amostras teste, foram incubados durante 72 horas (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>), após a adição de PHA, e dos compostos em estudo.

### **2.3.2 Ensaaios *in vivo***

Para o estudo *in vivo* do efeito citogenotóxico da acitretina e da isotretinoína procedeu-se à cultura de sangue de doentes com psoríase *vulgaris* e com acne *vulgaris*, segundo os procedimentos já referidos nos ensaios *in vitro*, antes do início da terapêutica e após 12 semanas de tratamento. As culturas celulares foram também mantidas a 37°C numa atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 72 horas.

### **2.3.3 Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)**

O ensaio do CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2000), em ambos os estudos *in vivo* e *in vitro*. As culturas de células foram preparadas como descrito anteriormente. Após 44 horas de incubação, foi adicionada Cyt-B (5 mg/mL), um inibidor do fuso mitótico que inibe a citocinese, e que permite, portanto, identificar os linfócitos mitóticos sob a forma de linfócitos binucleados. Após 72 horas de incubação, os linfócitos foram isolados por centrifugação em gradiente de densidade (700 g, 20 minutos, temperatura ambiente), utilizando dois meios com densidades diferentes (histopaque 1,119 e histopaque 1,077). Os linfócitos foram lavados duas vezes com PBS a pH 7,4, contendo 3 % (v/v) de FBS (400 g, 8 minutos, temperatura ambiente), e de seguida foram fixados com uma solução de ácido acético e metanol (3:1). Após centrifugação (400 g, 8 minutos, 4 °C) o sedimento de linfócitos foi ressuspensão em cerca de 100 µL da mesma solução de ácido acético e metanol, e a suspensão celular foi colocada em lâminas de vidro e corada com corante Wright (Haematology, 1984). Procedeu-se à observação microscópica (microscópio ótico Leica Wetzlar, Germany), registando-se o número de linfócitos binucleados com MN, de acordo com os critérios propostos por Fenech (2000). Foi também avaliada a percentagem de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, contando 500 linfócitos em cada lâmina.

O CBPI foi calculado de acordo com Surreales et al. (1995):

$[1 \times N1] + [2 \times N2] + [3 \times (N3 + N4)]/N$ , onde N1-N4 representa o número de células com 1-4 núcleos, respetivamente, e N o número total de células contadas. A % de citostase foi calculada para avaliar a inibição da proliferação celular, como se segue:

$100 - 100 [(CBPI_T-1)/(CBPI_C-1)]$ , onde  $CBPI_T$  e  $CBPI_C$  representam o CBPI das amostras teste e do controlo, respetivamente (OECD, 2010). A frequência de células apoptóticas e necróticas foi determinada num total de 1000 células (viáveis e não viáveis), de acordo com Fenech et al. (1999): células apoptóticas - células com condensação da cromatina, fragmentação nuclear, corpos apoptóticos e com membrana citoplasmática intacta; células necróticas - células com citoplasma pálido ou perda de citoplasma, membrana citoplasmática danificada, membrana nuclear danificada/irregular e estrutura nuclear parcialmente intacta. Este ensaio permite, portanto, avaliar não só a genotoxicidade, mas também a citotoxicidade de um composto em estudo.

#### 2.3.4 Ensaio do cometa

Este teste foi efetuado nos ensaios *in vitro* e *in vivo* e realizado de acordo com Tice et al. (1991). Para os ensaios *in vivo* e *in vitro* usou-se sangue de doentes e de indivíduos saudáveis, respetivamente. Os linfócitos foram isolados por gradiente de densidade e lavados com PBS a pH 7,4, contendo FBS 3 % (v/v). Obtida a suspensão de linfócitos, foi avaliada a concentração celular da suspensão, contando os linfócitos numa câmara de Neubauer, num microscópio ótico (Leica, Wetzlar, Germany). Preparou-se uma suspensão celular de  $1 \times 10^6$  linfócitos/mL. Adicionaram-se 15  $\mu$ L desta suspensão celular a 85  $\mu$ L de agarose “low melting point” a 1% (w/v), previamente aquecida a 37 °C. Esta mistura, foi colocada sobre uma lâmina previamente coberta com 2 mL de agarose “normal melting point” a 1% (w/v), sobrepondo seguidamente uma lamela, de forma a cobrir a superfície da agarose. As lâminas foram colocadas a 4 °C durante 5 minutos, para solidificar a agarose. Removida a lamela, as lâminas foram imersas numa solução constituída por NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e 1% (v/v) de Triton-X-100 (pH 10), durante 1 hora e 45 minutos à temperatura de 4 °C, para promover a lise celular. As lâminas foram posteriormente imersas numa solução altamente alcalina constituída por NaOH 300 mM e EDTA 1 mM (pH 13), durante 1 hora a 4 °C, para permitir o desenrolamento do DNA. As lâminas foram lavadas duas vezes numa solução de Tris-Borato-EDTA (TBE), durante

10 minutos, a 4 °C. De seguida foram colocadas numa tina de eletroforese horizontal e imersas na solução de TBE. A tina foi ligada a uma fonte de energia (Power Pac Basic, Bio-Rad, UK) tendo-se procedido à eletroforese, a uma voltagem constante de 25 V, durante 30 minutos. Todo este procedimento foi realizado a 4 °C, no escuro, para prevenir a degradação do DNA. As lâminas foram imersas por três vezes numa solução tampão constituída por Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5), durante 10 minutos a 4 °C, para neutralizar as amostras. De seguida procedeu-se à coloração com SYBR Green previamente diluído em Vectashield (1/1000). Utilizando um microscópio de fluorescência (Nikon, Japan), foram contadas 100 células por amostra, e avaliado o TL e o TM utilizando o software de análise Comet Score<sup>TM</sup> versão 1.5 (TriTek Corp).

## **2.4 Análise estatística**

Foi utilizado o SPSS, versão 17 para Windows, Chicago, IL, EUA. Os resultados dos ensaios *in vitro* são apresentados em média  $\pm$  SEM e em mediana (interquartil 25 - 75). Os resultados dos ensaios *in vivo* são apresentados em média  $\pm$  SEM ou em valores médios para cada doente (os ensaios foram feitos em triplicado). As diferenças entre os grupos (testes *in vitro*) foram determinadas usando o teste OneWay Anova associado ao teste de Tukey para comparações múltiplas, para os parâmetros que apresentaram uma distribuição normal. O teste não-paramétrico de Kruskal Wallis H foi utilizado no caso dos parâmetros apresentarem uma distribuição não-Gaussiana, e em caso de significado estatístico, foram efetuadas comparações individuais (dois grupos) utilizando o teste de Mann-Whitney. Para comparar os parâmetros apresentados pelos doentes antes de iniciar a terapêutica (T0) e após 12 semanas de tratamento (T12), foi utilizado o teste *t*-Student emparelhado. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prim 5 (San Diego, California).

### 3. Resultados

#### 3.1 Efeito citogenotóxico da acitretina individualmente ou em associação com antiestrogénios, fotoquimioterapia ou com fototerapia de banda estreita

##### 3.1.1 Resultados

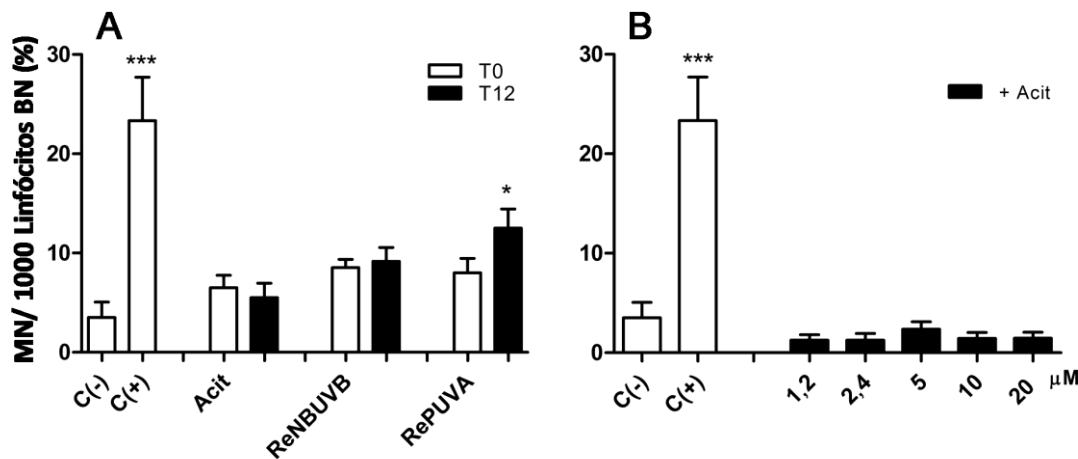
Os resultados apresentados pelos doentes com psoríase *vulgaris* foram analisados de acordo com a terapêutica utilizada - acitretina, acitretina + NBUVB e acitretina + PUVA. Os dados clínicos e demográficos dos doentes com psoríase *vulgaris* foram já apresentados na Tabela 4.1.

Os três grupos apresentavam idades e duração da doença semelhantes. A maioria dos doentes apresentou na fase ativa da doença, em T0, uma psoríase moderada a grave. Após 12 semanas de terapêutica (T12), os três grupos apresentaram uma diminuição dos valores de PASI; o grupo de doentes tratados com acitretina + PUVA apresentou uma redução significativa do valor de PASI e apenas um doente não atingiu o estado de remissão; dos doentes tratados com acitretina + NBUVB, apesar da diminuição significativa no PASI, apenas três doentes atingiram a remissão; o grupo de doentes tratados com acitretina apresentou uma redução do PASI, embora sem significado estatístico, e o estado de remissão foi apenas atingido por um doente. Estes resultados sugerem que as associações terapêuticas, acitretina + NBUVB e acitretina + PUVA, são mais eficazes do que a acitretina em monoterapia.

A figura 4.1 apresenta as frequências de MN observadas em doentes com psoríase (Fig. 4.1A), de acordo com o tratamento, e nos estudos *in vitro* (Fig. 4.1B), de acordo com a concentração de acitretina.

Os estudos *in vivo* mostraram que em T0 todos os doentes apresentavam uma frequência de MN semelhante ao controlo negativo; em T12, tanto os doentes tratados com acitretina + NBUVB como os tratados com acitretina + PUVA, apresentavam uma tendência para valores superiores na frequência de MN; no entanto, apenas os doentes tratados com acitretina + PUVA atingiram um aumento estatisticamente significativo na frequência de MN, quando comparados com o controlo negativo. O grupo de acitretina apresentou uma tendência para a redução na frequência de MN (Fig. 4.1A).

Os estudos *in vitro* com a acitretina em concentrações de 1,2-20  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.1B) reforçaram os resultados dos estudos *in vivo*, uma vez que se observou também uma tendência para a redução da frequência de MN, em comparação com o controlo negativo.



**Figura 4.1** - Frequência de micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) observada nos estudos *in vivo* em doentes com psoríase *vulgaris*, de acordo com o tratamento instituído (A), e em estudos *in vitro*, de acordo com a concentração de acitretina (B). Para o controlo negativo [C(-)] e para o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9  $\mu\text{M}$ ; Acit: acitretina; ReNBUVB: acitretina + NBUVB; RePUVA: acitretina + PUVA; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  versus C(-). Controlo histórico de nosso laboratório para a frequência de MN do controlo negativo (n = 36): 3,00 (2,00-3,00).

Para estudar os efeitos genotóxicos foi também utilizado o ensaio do cometa, como foi referido, (Tabela 4.3), tendo-se avaliado os valores de TL e TM, parâmetros que refletem lesões no DNA.

Tal como observado para as frequências de MN, os doentes com psoríase apresentaram valores de TL e TM, em T0 e em T12, semelhantes aos do controlo negativo. Os resultados dos estudos *in vitro* com a acitretina em concentrações crescentes de 1,2-20  $\mu\text{M}$  (Tabela 4.3) mostraram também valores semelhantes de TL e TM, comparados com o controlo negativo.



**Tabela 4.3** – Análise do ensaio do cometa em doentes com psoríase *vulgaris*, de acordo com a terapêutica instituída, e em estudos *in vitro* com diferentes concentrações de acitretina.

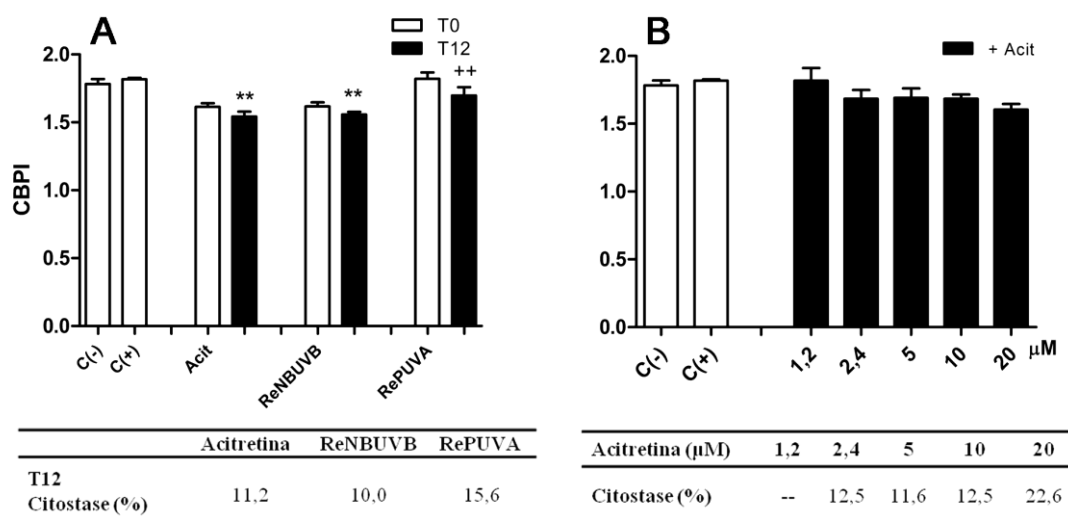
		Comprimento da Cauda (TL) ( $\mu\text{m}$ )	“Tail moment” (TM) (%)
C(-)	--	5,36 $\pm$ 0,66	0,20 $\pm$ 0,02
C(+)	--	38,55 $\pm$ 5,70***	14,81 $\pm$ 2,46***
<b>Estudos <i>in vivo</i></b>			
Acitretina	T0	5,27 $\pm$ 0,41	0,33 $\pm$ 0,06
	T12	4,28 $\pm$ 0,86	0,27 $\pm$ 0,04
Acitretina + NBUVB	T0	9,03 $\pm$ 1,86	0,61 $\pm$ 0,14
	T12	7,80 $\pm$ 1,30	0,61 $\pm$ 0,15
Acitretina + PUVA	T0	6,13 $\pm$ 2,36	0,48 $\pm$ 0,33
	T12	7,53 $\pm$ 1,43	0,45 $\pm$ 0,27
<b>Estudos <i>in vitro</i></b>			
Acitretina ( $\mu\text{M}$ )	1,2	2,91 $\pm$ 0,97	0,16 $\pm$ 0,04
	2,4	4,06 $\pm$ 1,37	0,20 $\pm$ 0,08
	5	4,87 $\pm$ 0,87	0,18 $\pm$ 0,02
	10	4,75 $\pm$ 1,31	0,22 $\pm$ 0,08
	20	4,88 $\pm$ 2,02	0,19 $\pm$ 0,06

Os valores estão expressos como a média  $\pm$  SEM (erro padrão da média). Para o controlo negativo [C(-)] e para o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com staurosporina 10,7  $\mu\text{M}$ ; ReNBUVB: acitretina + NBUVB; RePUVA: acitretina + PUVA; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; \*\*\*p < 0,001 *versus* C(-). Controlo histórico do nosso laboratório para os parâmetros TL e TM do controlo negativo (n= 36): 3,00 (3,00-10,50) e 0,13 (0,05 - 0,57), respetivamente.

O ensaio do CBMN permite também avaliar o CBPI, que reflete a proliferação celular e a extensão da citostase (%). Antes de iniciarem a terapêutica, os doentes dos diferentes grupos apresentaram valores de CBPI semelhantes aos do controlo negativo (Fig. 4.2A). Após 12 semanas de terapêutica, os doentes tratados com acitretina ou com acitretina + NBUVB apresentaram valores significativamente menores de CBPI, em

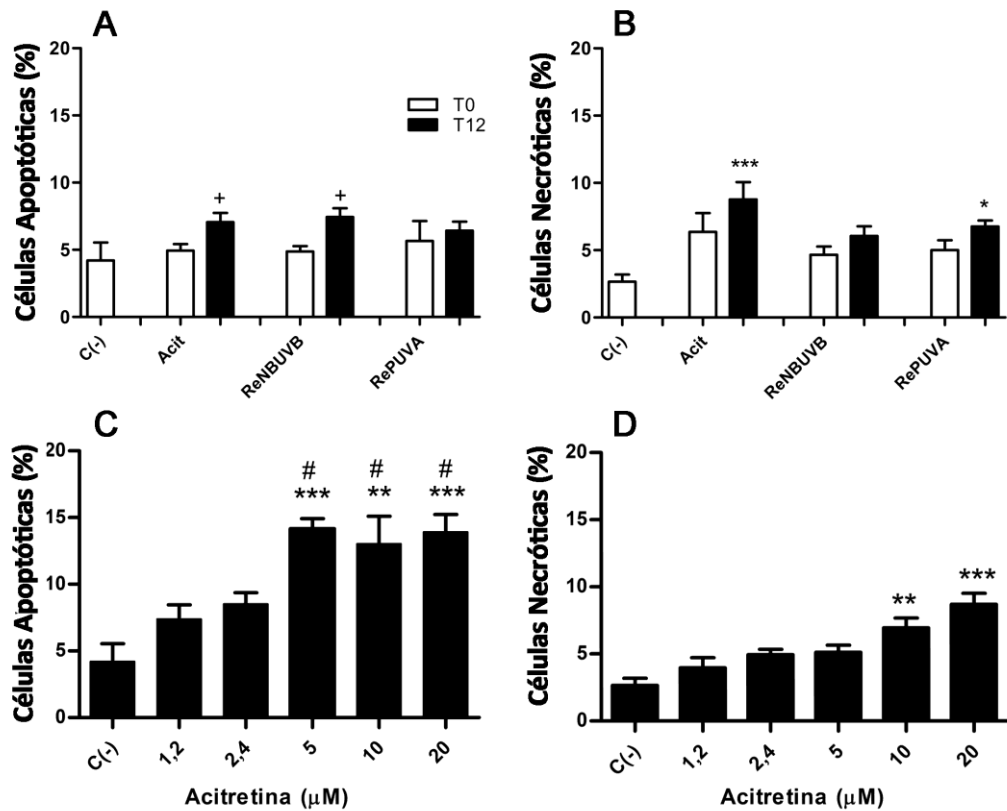
comparação com o controlo negativo. No entanto, o grupo tratado com acitretina + PUVA, durante 12 semanas, apresentou uma redução significativa nos valores de CBPI, comparativamente com T0. Em conformidade com estes resultados, os grupos de acitretina e de acitretina + NBUVB apresentaram valores de citostase mais baixos que os dos doentes tratados com acitretina + PUVA (Fig. 4.2A).

Os estudos *in vitro* com concentrações crescentes de acitretina (Fig. 4.2B) mostraram uma tendência para diminuir os valores de CBPI e para aumentar a percentagem de citostase, o que está de acordo com os resultados *in vivo* (Fig. 4.2B).



**Figura 4.2** - Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) observado nos estudos *in vivo* em doentes com psoríase *vulgaris*, de acordo com o tratamento instituído (A) e em estudos *in vitro* com diferentes concentrações de acitretina (B). O controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram preparados com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9 µM. Acit: Acitretina; ReNBUVB: Acitretina + NBUVB; RePUVA: Acitretina + PUVA; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; \*\*p <0,01 versus C(-); ++p <0,01 versus T0. Controlo histórico de nosso laboratório para os valores de CBPI do controlo negativo (n = 36): 1,63 (1,61-1,64).

Como foi referido, o ensaio do CBMN permite também avaliar os efeitos citotóxicos, tendo sido determinada a percentagem de linfócitos apoptóticos e necróticos nos diferentes grupos terapêuticos dos doentes com psoríase *vulgaris* e nos estudos *in vitro* com diferentes concentrações de acitretina (Fig. 4.3).



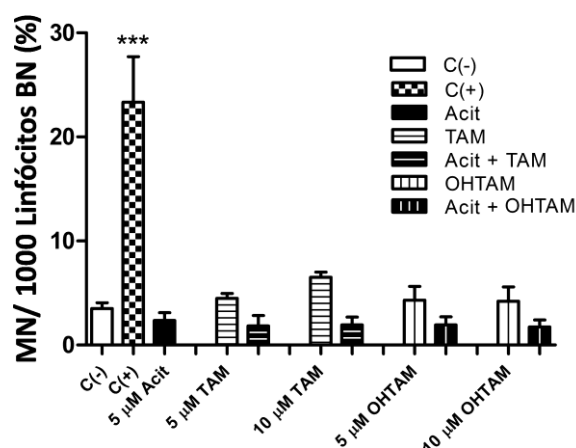
**Figura 4.3** - Percentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) observada nos estudos *in vivo* em doentes com psoríase *vulgaris*, de acordo com a terapêutica, e a percentagem de células apoptóticas (C) e necróticas (D) em estudos *in vitro* com diferentes concentrações de acitretina. O controlo negativo [C(-)] foi preparado com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); Acit: Acitretina; ReNBUVB: Acitretina + NBUVB; RePUVA: Acitretina + PUVA; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  versus C(-); + $p < 0,05$  versus T0; # $p < 0,05$  versus 1,2  $\mu\text{M}$  acitretina. Controlo histórico do nosso laboratório da percentagem de células apoptóticas e necróticas do controlo negativo (n = 36): 2,16 (1,71-2,93) e 2,36 (1,90-3,28), respetivamente.

Após 12 semanas de terapêutica, verificou-se que os doentes tratados com acitretina ou com acitretina + NBUVB apresentaram um aumento significativo na percentagem de linfócitos apoptóticos, em comparação com T0. Embora não tenha sido observada nenhuma alteração significativa nos doentes tratados com acitretina + PUVA, verificou-se uma tendência para o aumento das células apoptóticas (Fig. 4.3A). Relativamente às células necróticas, verificou-se que nenhuma das terapêuticas induziu alterações

significativas (T0 *versus* T12). No entanto, os grupos de acitretina e acitretina + PUVA apresentaram uma percentagem de células necróticas significativamente mais alta do que o controlo negativo (Fig. 4.3B).

Os estudos *in vitro* com acitretina demonstraram que a % de células apoptóticas aumentou com concentrações crescentes de acitretina, atingindo um valor significativo para concentrações de 5  $\mu$ M; para concentrações mais elevadas de 10 e 20  $\mu$ M, a percentagem de células apoptóticas não aumentou (Fig. 4.3C). Verificou-se também que a percentagem de células necróticas aumentou com concentrações crescentes de acitretina, atingindo um valor significativo para concentrações de acitretina de 10 e 20  $\mu$ M (Fig. 4.3D).

Quando a acitretina (5  $\mu$ M) foi associada com o TAM ou com o OHTAM (5 e 10  $\mu$ M) as frequências de MN (Fig. 4.4) e os valores de TL e TM (Tabela 4.4) foram semelhantes aos observados com o controlo negativo.



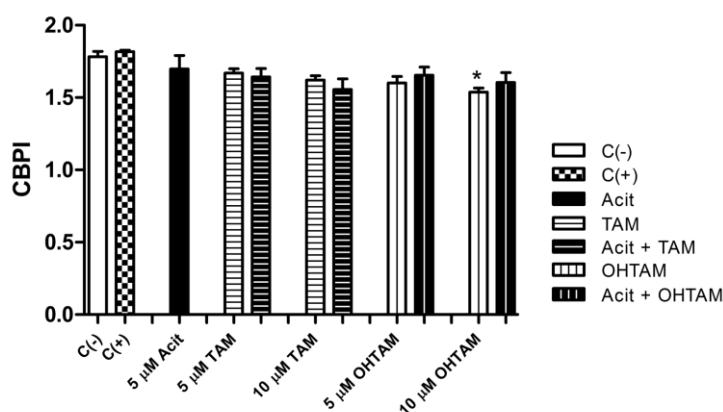
**Figura 4.4** – Frequência de micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) observada em estudos *in vitro* com acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM. Para o controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9  $\mu$ M; Acit: acitretina; \*\*\* $p$ < 0,001 *versus* C(-).

**Tabela 4.4** - Análise do ensaio do cometa, de cinco experiências *in vitro* com acitretina em associação com os antiestrogénios, TAM e OHTAM.

	Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	Acitretina ( $\mu\text{M}$ )	Comprimento da Cauda ( $\mu\text{m}$ )	“Tail moment” (%)
C(-)	--	--	5,04 $\pm$ 0,66	0,20 $\pm$ 0,02
C(+)	17,9	--	38,55 $\pm$ 5,70***	14,81 $\pm$ 2,46***
--	--	5	4,84 $\pm$ 0,98	0,18 $\pm$ 0,03
TAM	5	--	6,58 $\pm$ 1,19	0,21 $\pm$ 0,04
	5	5	5,19 $\pm$ 0,79	0,22 $\pm$ 0,06
	10	--	8,92 $\pm$ 1,49	0,33 $\pm$ 0,08
	10	5	6,98 $\pm$ 1,02	0,28 $\pm$ 0,10
OHTAM	5	--	6,41 $\pm$ 1,36	0,18 $\pm$ 0,05
	5	5	5,69 $\pm$ 0,89	0,18 $\pm$ 0,03
	10	--	6,05 $\pm$ 0,83	0,23 $\pm$ 0,04
	10	5	5,83 $\pm$ 0,73	0,21 $\pm$ 0,03

Os valores estão expressos como a média  $\pm$  SEM (erro padrão da média). Para o controlo negativo [C(-)] e para o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com staurosporina 10,7  $\mu\text{M}$ . \*\*\* $p < 0,001$  versus C(-).

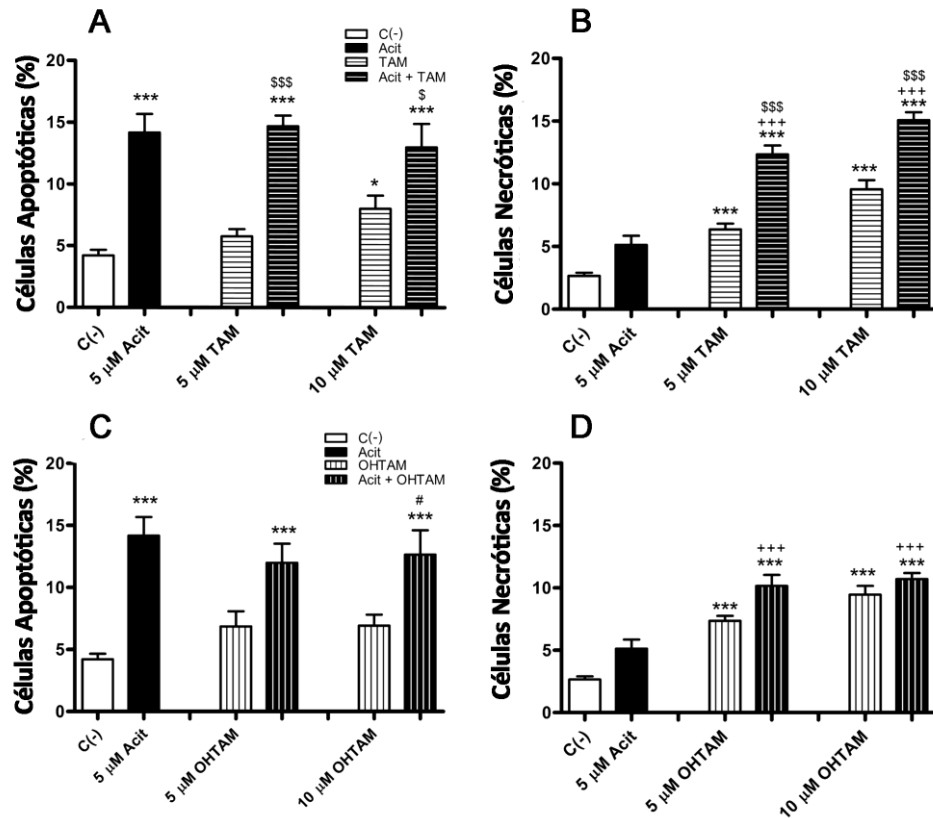
Relativamente ao efeito da acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM na proliferação dos linfócitos, verificou-se que os valores de CBPI e da percentagem de citostase eram semelhantes aos apresentados pelo controlo negativo. O OHTAM (10  $\mu\text{M}$ ), individualmente, induziu uma diminuição significativa no valor de CBPI, no entanto, como se referiu, a sua associação com a acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) não induziu nenhuma alteração significativa nos valores de CBPI e de citostase, em comparação com o controlo negativo (Fig. 4.5).



	TAM (μM)				OHTAM (μM)				
	--	5	5	10	10	5	5	10	10
Acitretina (μM)	5	--	5	--	5	--	5	--	5
Citostase (%)	8	11	14	16	23	18	13	24	18

**Figura 4.5** – Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) observado em estudos *in vitro* com acitretina (5 μM) em associação com o TAM ou com o OHTAM (5 e 10 μM). O controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram preparados com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9 μM; Acit: acitretina; \*p <0,05 versus C(-).

Os efeitos citotóxicos da acitretina individualmente ou em associação com o TAM ou com o OHTAM foram também avaliados pela determinação da percentagem de linfócitos apoptóticos e necróticos, utilizando o ensaio do CBMN (Fig. 4.6). A adição de TAM ou de OHTAM (5 e 10 μM) induziu um aumento significativo na percentagem de células necróticas, em comparação com o controlo negativo. Quando a acitretina foi associada com o TAM ou com o OHTAM verificou-se um aumento da percentagem de células apoptóticas, relativamente aos antiestrogénios individualmente e ao controlo negativo. Além disso, as associações com o TAM e o OHTAM aumentaram também a percentagem de células necróticas em comparação com a acitretina e com as condições controlo, no entanto, a associação com o TAM aumentou também a percentagem de células necróticas relativamente ao TAM individualmente (Fig. 4.6).



**Figura 4.6** - Percentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) observada nos estudos *in vitro* com acitretina (5 µM) associada com o TAM (5 e 10 µM), e percentagem de células apoptóticas (C) e necróticas da acitretina (5 µM) associada com o OHTAM (5 e 10 µM) (D). O controlo negativo [C(-)] foi preparado com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); Acit: acitretina; \*\*\*p <0,001 versus C(-); +++p <0,001 e +p <0,05 versus acitretina; \$\$\$p <0,001 e \$p <0,05 versus TAM; #p <0,05 versus OHTAM.

### 3.1.2 Discussão

A acitretina é atualmente usada no tratamento da psoríase moderada e grave, no entanto, o efeito citotóxico e o potencial risco genotóxico estão pouco esclarecidos. Neste sentido, procedeu-se ao estudo dos efeitos citotóxicos e genotóxicos da acitretina, através da realização de estudos *in vivo*, utilizando culturas de sangue de doentes tratados com acitretina em monoterapia ou em associação com NBUBV ou com PUVA, e de estudos *in vitro* utilizando culturas de sangue de voluntários saudáveis, incubados com acitretina em concentrações equivalentes ou superiores às concentrações séricas de acitretina atingidas

nos doentes sob esta terapêutica. Procedeu-se também ao estudo *in vitro* da genotoxicidade da acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM. Para tal, foram utilizados o ensaio do CBMN e o ensaio do cometa. O ensaio do CBMN permite uma análise simples e precisa dos efeitos genotóxicos, que refletem a quebra e a perda cromossômica (Fenech, 2000) e a avaliação dos efeitos citotóxicos e de citostase, por avaliação do CBPI, da percentagem de citostase e da frequência de células apoptóticas e necróticas (OECD, 2010). O ensaio do cometa também avalia o potencial genotóxico, através da determinação dos valores de TL e TM, que refletem lesões no DNA (Collins *et al.*, 2008).

Segundo, Karaman *et al.* (2008) os doentes com psoríase apresentam instabilidade cromossômica. Existem também alguns estudos que evidenciam que a prevalência de diversos tipos de cancro é mais elevada em doentes com psoríase do que na população em geral (Ji *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011); contudo, os mecanismos subjacentes a esta maior prevalência são pouco conhecidos. É de referir que os doentes com psoríase apresentam níveis plasmáticos elevados de moléculas inflamatórias, importantes mediadores da resposta imune e inflamatória na psoríase (Coimbra *et al.*, 2010d; Coimbra *et al.*, 2012a), que poderão contribuir para o desenvolvimento e/ou progressão de tumores (Alexandrescu *et al.*, 2011). A frequência média de MN e os valores de TM que observámos nos doentes com psoríase, na fase ativa da doença, em T0, eram mais elevados do que os valores do controlo negativo (voluntários saudáveis), embora sem significado estatístico.

O tratamento dos doentes com acitretina, durante 12 semanas, não induziu alterações genotóxicas, conforme se pode verificar pelos valores de MN (Fig. 4.1), TL e TM (Tabela 4.3), que eram semelhantes aos valores basais e aos valores do controlo negativo.

Os estudos *in vitro* demonstraram também que a acitretina não induziu alterações genotóxicas nas concentrações estudadas (1,2-20 µM) (Fig. 4.1, Tabela 4.3). Stephanou *et al.* (2004), trabalhando com culturas de sangue incubadas com acitretina, usando concentrações mais elevadas (50-100 µM), verificaram que a acitretina não induz efeitos genotóxicos.

Estudos *in vivo* (Ferahbas *et al.*, 2004) e *in vitro* (Tzung e Runger, 1998) sobre a genotoxicidade da terapêutica de NBUVB têm sugerido um efeito genotóxico. Os estudos *in vivo* que realizámos, em doentes tratados com acitretina em associação com uma dose total baixa de NBUVB ( $29,53 \pm 3,33 \text{ J/cm}^2$ ,  $15,3-54,3 \text{ J/cm}^2$ ) não demonstraram um efeito genotóxico para estas doses terapêuticas.

Diferentes estudos *in vivo* têm descrito que a monoterapia com PUVA induz um aumento na frequência de MN (Hamurcu *et al.*, 2002), troca de cromátides irmãs (Sardas *et*



*al.*, 1994; Baysal *et al.*, 2003) e um risco aumentado de desenvolver cancro de pele (Archier *et al.*, 2012). Nos estudo *in vivo* de doentes com psoríase *vulgaris* tratados com acitretina associada com PUVA utilizando uma irradiação total de UVA de  $178,0 \pm 24,8 \text{ J/cm}^2$  ( $33,0\text{-}342,5 \text{ J/cm}^2$ ), não observámos alterações na frequência de MN, nem alterações no ensaio do cometa, após 12 semanas de tratamento. No entanto, observámos um aumento significativo na frequência de MN em doentes tratados com acitretina + PUVA, em comparação com o controlo negativo (Fig. 4.1A), sugerindo que esta associação terapêutica induz um ligeiro potencial genotóxico. A irradiação com PUVA induz ligações cruzadas entre as cadeias de DNA, podendo ocorrer uma redução na migração do DNA, pelo que o ensaio do cometa pode não refletir o verdadeiro dano causado pelo tratamento com PUVA (Wu *et al.*, 2009). Este efeito poderá explicar as pequenas diferenças observadas na frequência de MN (Fig. 4.1), que não foram observadas no ensaio do cometa (Tabela 4.3).

Os doentes com psoríase *vulgaris*, na fase ativa da doença, antes de iniciarem o tratamento, apresentaram valores de CBPI semelhantes aos do controlo negativo (Fig. 4.2A). No entanto, após o tratamento com acitretina ou com acitretina + NBUVB, verificou-se uma tendência para o valor de CBPI diminuir, atingindo um valor significativamente mais baixo quando comparado com o controlo negativo, sugerindo uma atividade terapêutica citostática, por redução da taxa de proliferação celular. Os estudos *in vitro* com acitretina (Fig. 4.2B) demonstraram também uma tendência para a diminuição da taxa de proliferação.

O tratamento de doentes com acitretina + PUVA induziu uma redução significativa no valor de CBPI, comparado com o valor a T0, o que sugere uma maior citotoxicidade para esta terapêutica. Este grupo apresentou também uma maior redução no PASI, após 12 semanas de tratamento, que resulta, provavelmente, de uma maior inibição da proliferação celular, nomeadamente de linfócitos T, envolvidos na resposta inflamatória (Krueger e Ellis, 2005; Ghoreschi *et al.*, 2007). Coimbra *et al.* (2010b) referiram que o tratamento com PUVA e com NBUVB diminuem a resposta inflamatória em doentes com psoríase *vulgaris* e que a terapêutica com PUVA induz uma maior diminuição na resposta inflamatória e nos valores do PASI do que o tratamento com NBUVB. Um outro estudo demonstrou que o tratamento com PUVA induz a paragem do ciclo celular e apoptose de linfócitos T (Johnson *et al.*, 1996), o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

É atualmente aceite que os retinoides induzem mecanismos de apoptose (Szondy *et al.*, 1998), no entanto não existem estudos sobre o efeito da acitretina em linfócitos humanos. O nosso estudo demonstrou que os doentes tratados com acitretina ou com acitretina + NBUVB apresentaram um aumento na percentagem de linfócitos apoptóticos, após 12 semanas de terapêutica (Fig. 4.3A). De facto, alguns estudos descreveram que o tratamento com NBUVB induz apoptose em linfócitos T (Ozawa *et al.*, 1999; Bianchi *et al.*, 2003) e que tem a capacidade de induzir ambas as vias, intrínseca e extrínseca, da apoptose, em doses terapêuticas utilizadas em fototerapia (Tuchinda *et al.*, 2007). Neste estudo verificámos que a acitretina *in vitro* em concentrações iguais ou superiores a 5  $\mu$ M induziu mecanismos de apoptose, como se pode observar pelo aumento significativo da percentagem de linfócitos apoptóticos (Fig. 4.3C). Este efeito citostático/citotóxico pode ser devido a mecanismos dependentes dos RARs, dado que os RAR $\alpha$  e RAR $\gamma$  estão expressos nos linfócitos (Ballow *et al.*, 2003), e que os RARs estão provavelmente envolvidos nos mecanismos de regulação da função dos linfócitos (Dzhagalov *et al.*, 2007). Outra hipótese é que estes mecanismos de morte celular por apoptose estejam relacionados com mecanismos independentes dos RARs, tal como foi proposto num estudo com uma linha de células escamosas da língua (Ran *et al.*, 2005), e como os resultados que apresentámos no Capítulo II sugerem; de facto, verificou-se que a acitretina perturba a síntese de ATP (Figs. 2.1 e 2.2 e Tabela 2.1), induz a MPT (Figs 2.4 e 2.5) por interação com o ANT (Fig. 2.3), o que pode explicar os mecanismos de morte celular por apoptose nos linfócitos, e sugere que a acitretina induz morte celular por apoptose por mecanismos mitocondriais.

Os resultados obtidos demonstraram também que a acitretina em concentrações mais elevadas, 10 e 20  $\mu$ M, induziu morte celular por necrose (Fig. 4.3D), provavelmente através de mecanismos inespecíficos. No entanto, são necessários estudos adicionais para quantificar de forma mais precisa a percentagem de células apoptóticas e necróticas, utilizando, por exemplo, técnicas de citometria de fluxo.

Por outro lado, quando se avaliaram os efeitos genotóxicos das associações da acitretina com o TAM ou com o OHTAM, verificámos que ambas as associações apresentaram valores semelhantes de frequência de MN (Fig. 4.4) e de TL e TM (Tabela 4.4), o que ocorreu devido, provavelmente, ao seu efeito antigenotóxico (Stephanou *et al.*, 2004). No entanto, o seu mecanismo de antigenotoxicidade permanece ainda por esclarecer.

Relativamente aos efeitos citostáticos e citotóxicos da acitretina em associação com o TAM ou com o OHTAM em culturas celulares, verificou-se que a inibição da proliferação dos linfócitos não foi potenciada pela adição de acitretina (Fig. 4.5). É de referir que estas associações apresentaram uma tendência para diminuir a percentagem de células apoptóticas induzidas pela acitretina, o que se pode dever ao efeito inibidor destes antiestrogénios na indução da MPT (resultados apresentados no Capítulo II); no entanto a percentagem de morte celular por necrose aumentou, principalmente na associação com o TAM (Fig. 4.6). Estes mecanismos celulares de morte por necrose que ocorreram em presença de TAM ou em menor extensão com o OHTAM, podem ser devidos a efeitos inespecíficos, nomeadamente à depleção de ATP, por induzirem alterações mitocondriais (Cardoso *et al.*, 2003).

Em conclusão, este estudo sugere que a terapêutica com acitretina ou com acitretina + NBUVB não tem um potencial genotóxico, reduz a taxa de proliferação e induz apoptose e necrose nos linfócitos. A associação da acitretina + PUVA também reduz a proliferação de linfócitos e aumenta a percentagem de linfócitos necróticos, no entanto, induz ligeiros efeitos genotóxicos, pelo que são necessários mais estudos para esclarecer o seu potencial genotóxico.

Relativamente às associações da acitretina com os antiestrogénios verifica-se que também não têm um potencial genotóxico. No entanto, a associação da acitretina com o OHTAM em culturas de sangue apresenta menos efeitos citostáticos/citotóxicos do que a associação da acitretina com o TAM.

## **3.2 Efeito citogenotóxico da isotretinoína individualmente ou em associação com fototerapia de banda estreita**

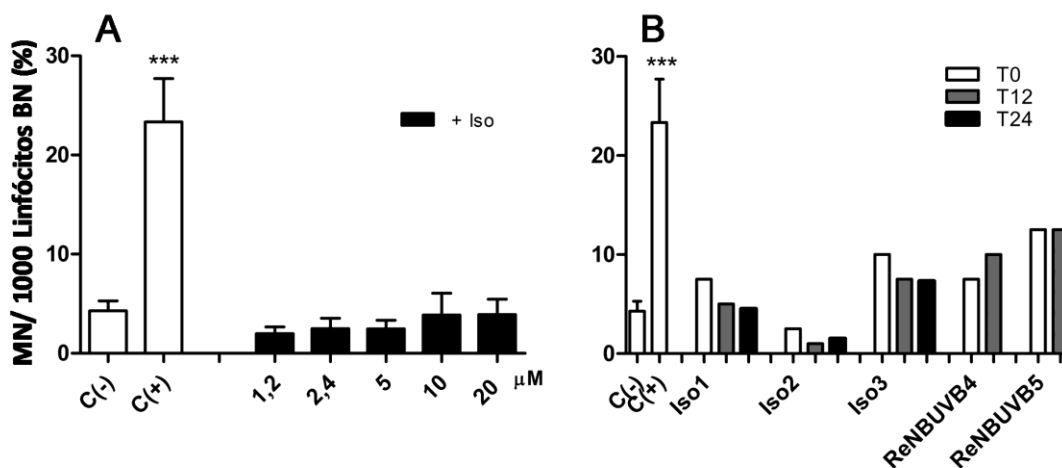
### **3.2.1 Resultados**

Os dados demográficos e clínicos dos cinco doentes estudados, com acne *vulgaris* e com psoríase *vulgaris* são apresentados na Tabela 4.2.

Os dois doentes com acne *vulgaris* pápulo-pustulosa ligeira e moderada/grave e um doente com psoríase *vulgaris* moderada foram estudados antes de iniciar a terapêutica com isotretinoína em monoterapia, e foram reavaliados após 12 e 24 semanas de tratamento. Estes três doentes atingiram o estado de remissão após 24 semanas de tratamento

(resultados não apresentados). Os outros dois doentes com psoríase *vulgaris* grave foram estudados antes de iniciar o tratamento e reavaliados após 12 semanas de terapêutica com isotretinoína associada com irradiação por NBUVB. Ambos os doentes apresentaram uma diminuição no valor de PASI, no entanto, apenas um doente atingiu a remissão (resultados não apresentados).

Nas figuras 4.7A e 4.7B são apresentadas as frequências de MN observadas nos estudos *in vitro*, com diferentes concentrações de isotretinoína (Fig. 4.7A), e nos estudos *in vivo*, em doentes tratados com isotretinoína em monoterapia ou em associação com NBUVB (Fig. 4.7B). Os resultados *in vivo* foram analisados individualmente, devido ao número reduzido de doentes sob terapêutica com a isotretinoína.



**Figura 4.7** - Frequência de micronúcleos (MN) em linfócitos binucleadas (BN) observada em estudos *in vitro* com isotretinoína (A) e em estudos *in vivo* com cinco doentes, de acordo com o tratamento instituído (B). Para o controlo negativo [C(-)] e para o controlo positivo [C(+)] foram usadas amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9 µM. ISO1: doente 1; ISO2: doente 2; ISO3: doente 3; ReNBUVB4: doente 4; ReNBUVB5: doente 5 (ver Tabela 4.2); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; \*\*\*p <0,001 *versus* C(-). Controlo histórico de nosso laboratório para a frequência de MN do controlo negativo (n = 36): 3,00 (2,00-3,00).

Os estudos *in vitro*, utilizando sangue de 5 indivíduos saudáveis, incubado com diferentes concentrações de isotretinoína, demonstraram que as frequências de MN, para todas as concentrações de isotretinoína estudadas, eram semelhantes às do controlo negativo (Fig. 4.7A).

Os estudos *in vivo* (Fig. 4.7B) demonstraram que os doentes 1, 3, 4 e 5 apresentavam, antes do tratamento, uma frequência de MN superior ao valor médio observado no controlo negativo. Além disso, os doentes 1, 2 e 3 sob monoterapia com isotretinoína não apresentaram um aumento na frequência de MN durante o tratamento, enquanto que os doentes 4 e 5 com psoríase *vulgaris*, após 12 semanas de tratamento com isotretinoína associada com NBUVB apresentaram um valor semelhante e um aumento na frequência de MN, respetivamente, comparando com o valor basal.

Como referido anteriormente, o potencial genotóxico foi também estudado através do ensaio do cometa (Tabela 4.5), tendo-se avaliado os valores de TL e de TM que refletem lesões no DNA.

Tal como tínhamos observado para as frequências de MN, os estudos *in vitro* com isotretinoína (1,2-20  $\mu\text{M}$ ) também não apresentaram alterações significativas nos valores de TL e TM (Tabela 4.5), comparando com o controlo negativo.

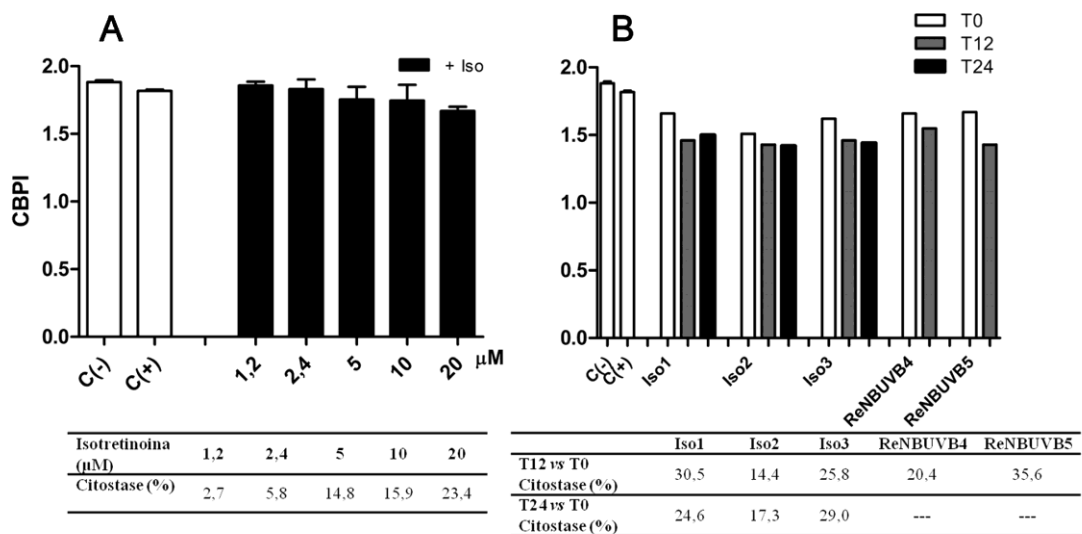
Os estudos *in vivo*, utilizando o ensaio do cometa (Tabela 4.5), não mostraram diferenças significativas antes de iniciar o tratamento, nem durante o tratamento, comparando com o controlo negativo. Apenas os doentes 2 e 4 apresentaram, antes de iniciarem o tratamento, valores de TL e TM semelhantes aos do controlo negativo, apresentando os outros doentes valores superiores. Após 12 semanas de tratamento, os doentes 1, 2 e 3, sob monoterapia com isotretinoína, não apresentaram aumentos nos valores de TL e TM, enquanto que os doentes 4 e 5, sob terapêutica combinada apresentaram valores mais elevados de TL e TM. Os doentes 1, 2 e 3, que continuaram a monoterapia com isotretinoína por mais 12 semanas (T24), mantiveram os valores de TL e TM apresentados em T12, os quais são também semelhantes ao controlo negativo.

**Tabela 4.5** – Análise do ensaio do cometa, de cinco experiências *in vitro* independentes, com diferentes concentrações de isotretinoína, e de cinco doentes avaliados, de acordo com a terapêutica instituída.

		Comprimento da cauda (µm) (TL)	“Tail moment” (%) (TM)
C(-)	--	5,76 (4,99 – 8,44)	0,32 (0,29 – 0,44)
C(+)	--	41,15*** (26,74 – 47,76)	16,03*** (9,75 – 18,66)
<b>Estudos <i>in vitro</i></b>			
<b>Isotretinoína</b> (µM)	<b>1,2</b>	5,90 (3,58 – 6,82)	0,34 (0,29 – 0,39)
	<b>2,4</b>	3,30 (2,39 – 6,28)	0,21 (0,12 – 0,54)
	<b>5</b>	3,75 (1,89 – 4,79)	0,13 (0,06 – 0,31)
	<b>10</b>	5,52 (4,99 – 9,76)	0,35 (0,24 – 1,16)
	<b>20</b>	5,97 (5,84 – 9,61)	0,50 (0,39 – 1,21)
<b>Estudos <i>in vivo</i></b>			
<b>Iso 1</b>	<b>T0</b>	11,65	0,52
	<b>T12</b>	11,99	0,50
	<b>T24</b>	10,23	0,44
<b>Iso 2</b>	<b>T0</b>	4,36	0,17
	<b>T12</b>	1,33	0,09
	<b>T24</b>	2,52	0,10
<b>Iso 3</b>	<b>T0</b>	10,78	0,49
	<b>T12</b>	7,04	0,23
	<b>T24</b>	7,59	0,25
<b>ReNBUVB 4</b>	<b>T0</b>	6,39	0,40
	<b>T12</b>	11,66	0,34
<b>ReNBUVB 5</b>	<b>T0</b>	12,33	1,04
	<b>T12</b>	13,97	1,94

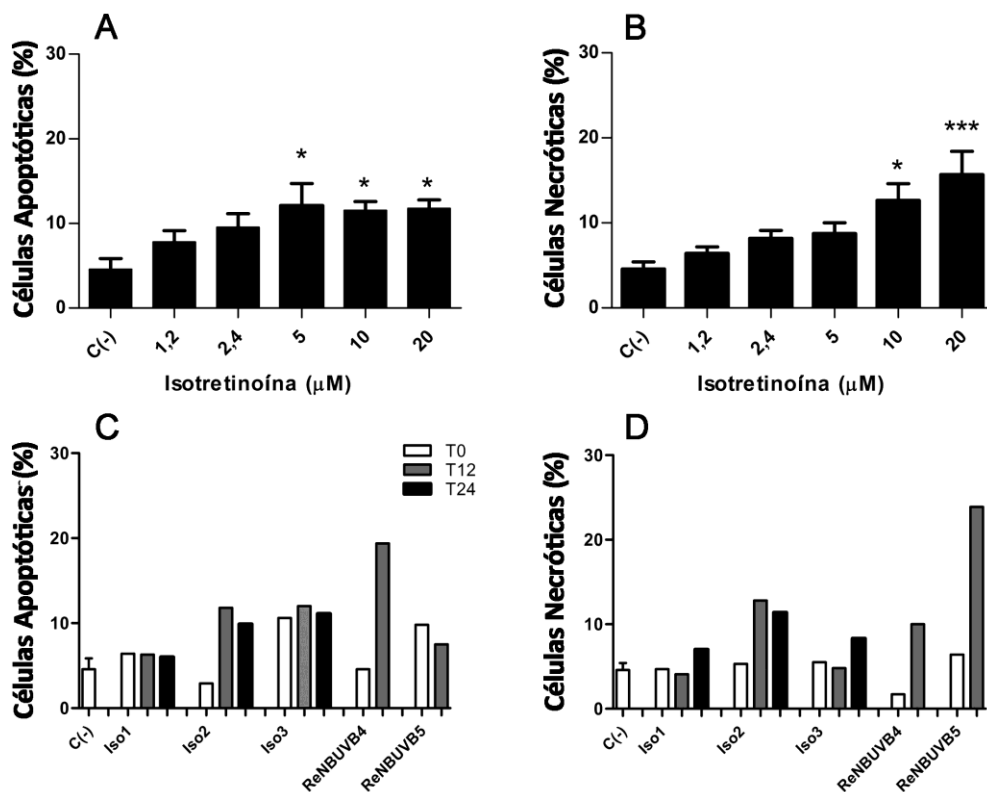
Os valores são expressos em mediana (interquartil 25 - 75) e valores médios. O controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram preparados com sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com staurosporina 10,7 µM. ISO 1: doente 1; ISO 2: doente 2; ISO 3: doente 3; ReNBUVB 4: doente 4; ReNBUVB 5: doente 5 (ver Tabela 4.2); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; \*\*\*p <0,001 *versus* C(-). Controlo histórico do nosso laboratório para TL e TM dos controlos negativos (n = 36): 3,00 (3,00-10,50) e 0,13 (0,05 - 0,57), respetivamente.

Conforme foi referido, o ensaio do CBMN permite também avaliar o CBPI, que reflete a taxa de proliferação celular e a citostase. Como se pode verificar na figura 4.8A, concentrações crescentes de isotretinoína (1,2-20  $\mu\text{M}$ ) não induziram alterações estatisticamente significativas nos valores de CBPI e de citostase. Todos os doentes, após 12 semanas de monoterapia com isotretinoína ou com isotretinoína + NBUVB, apresentaram uma redução dos valores de CBPI e um aumento da percentagem de citostase, quando comparados com T0. No entanto, quando a terapêutica com isotretinoína foi continuada durante mais 12 semanas (T24), os valores de CBPI e a percentagem de citostase não sofreram alterações (Figura 4.8B).



**Figura 4.8** - Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) observado em estudos *in vitro* com isotretinoína (A) e em estudos *in vivo* com cinco doentes, de acordo com o tratamento instituído (B). O controlo negativo [C(-)] e o controlo positivo [C(+)] foram preparados com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v), [C(+)]: sangue total com ciclofosfamida 17,9  $\mu\text{M}$ . ISO1: doente 1; ISO2: doente 2; ISO3: doente 3; ReNBUVB4: doente 4; ReNBUVB5: doente 5 (ver Tabela 4.2); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento. Controlo histórico do nosso laboratório para os valores de CBPI dos controlos negativos (n = 36): 1,63 (1,61-1,64).

Os efeitos citotóxicos da isotretinoína foram também avaliados nos estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando o ensaio do CBMN, e avaliando a percentagem de linfócitos apoptóticos e necróticos (Fig. 4.9).



**Figura 4.9** - Percentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) observada em estudos *in vitro* com isotretinoína, e percentagem de células apoptóticas (C) e necróticas (D) em estudos *in vivo* com cinco doentes, de acordo com a terapêutica. O controlo negativo [C(-)] foi preparado com amostras de sangue de cinco voluntários saudáveis. [C(-)]: sangue total com PBS (0,4%, v/v); ISO1: doente 1; ISO2: doente 2; ISO3: doente 3; ReNBUVB4: doente 4; ReNBUVB5: doente 5 (ver Tabela 4.2); T0: antes do início a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; \*\*\*p <0,001 e \*p <0,05 *versus* C(-). Controlo histórico do nosso laboratório da percentagem de células apoptóticas e necróticas do controlo negativo (n = 36): 2,16 (1,71-2,93) e 2,36 (1,90-3,28), respetivamente.

A isotretinoína induziu um aumento significativo na percentagem de células apoptóticas, para concentrações de 5, 10 e 20 μM, de forma independente da concentração (Fig. 4.9A). Além disso, a percentagem de células necróticas aumentou com concentrações



crecentes de isotretinoína, atingindo um valor significativo para 10 e 20  $\mu\text{M}$  de isotretinoína (Fig. 4.9B).

Os estudos *in vivo* demonstraram que, antes de iniciar o tratamento, apenas os doentes 3 e 5, com psoríase apresentaram, uma maior percentagem de células apoptóticas (Fig. 4.9C) e uma maior percentagem de células necróticas (Fig. 4.9D), comparando com o controlo negativo. O efeito do tratamento com isotretinoína após 12 semanas (T12 *versus* T0), na percentagem de células apoptóticas e necróticas não foi consistente, os doentes 2, 3 e 4 apresentaram um aumento da percentagem de células apoptóticas (Fig. 4.9C), enquanto que nos doentes 2, 4 e 5 se observou um aumento da percentagem de células necróticas. Após 24 semanas de tratamento (T24) (*versus* T12), os doentes 1 e 3 apresentaram um aumento da percentagem de células necróticas (Fig. 4.9D).

### 3.2.2 Discussão

A isotretinoína é um retinoide frequentemente utilizado, em monoterapia ou em associação com a NBUVB, para o tratamento de doentes com acne *vulgaris* e com psoríase *vulgaris*. Como ambas as doenças necessitam de intervenções terapêuticas frequentes e/ou prolongadas com isotretinoína, o estudo da genotoxicidade da isotretinoína torna-se uma questão importante para estes doentes.

Como foi referido anteriormente, os estudos que existem na literatura sobre a genotoxicidade da isotretinoína são controversos. Trizna et al. (1992) em estudos *in vitro* com isotretinoína (0,01-10  $\mu\text{M}$ ), utilizando linfócitos humanos e linhas celulares linfoblastóides, verificaram que a isotretinoína não induz aberrações cromossómicas estruturais. Watanabe et al. (1991), também em estudos *in vitro* com este retinóide, utilizando células mesenquimais embrionárias humanas, e Benner et al. (1994), utilizando a isotretinoína na quimioprevenção de doentes com pré-malignidade oral, descreveram também que a isotretinoína não causa lesões no DNA. No entanto, Georgala et al. (2005) referiram que a isotretinoína (30-40 mg/dia) utilizada em doentes com acne induz um aumento de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, um marcador de lesões no DNA. É, pois, controverso o potencial risco mutagénico e o efeito citotóxico da isotretinoína, sendo importante estudar os efeitos genotóxicos da isotretinoína *in vitro* e *in vivo*, para clarificar esses riscos. Os estudos *in vitro* sem a utilização da mistura enzimática S9 permitem estudar apenas os efeitos genotóxicos da isotretinoína e não dos seus metabolitos; os

estudos *in vivo* permitem avaliar se os mecanismos de absorção e o metabolismo da isotretinoína, ou o impacto da doença *per se*, modificam o potencial mutagénico observado nos estudos *in vitro*.

Os estudos *in vitro* foram realizados em culturas de sangue de voluntários saudáveis, incubados com isotretinoína em concentrações equivalentes (1,2 e 2,4 µM) (Gronhoj Larsen *et al.*, 2009) ou superiores às observadas no sangue de doentes sob terapêutica com isotretinoína (5, 10 e 20 µM). Nos estudos *in vivo* foram utilizadas culturas de sangue de doentes tratados com isotretinoína em monoterapia ou em associação com NBUVB. Para tal, foram utilizados o ensaio do CBMN e o ensaio do cometa.

Os resultados dos estudos *in vivo* foram analisados de acordo com o tipo de doença, a sua gravidade e o tipo de intervenção terapêutica. Não se observaram diferenças significativas com os diferentes tipos de tratamento utilizados, sugerindo que as terapêuticas estudadas não apresentam efeitos genotóxicos. No entanto, como estes resultados podem ser devidos ao baixo número de casos estudados, apresentámos e analisámos os resultados individualmente para cada doente.

No que diz respeito a estudos *in vivo* dos doentes com acne *vulgaris* verificou-se que antes de iniciar o tratamento o doente 2 apresentava valores de MN (Fig. 4.7B), TL e TM (Tabela 4.5) mais baixos do que o controlo negativo, enquanto que o doente 1 apresentava uma frequência de MN (Fig. 4.7B) e valores de TL e TM (Tabela 4.5) superiores aos encontrados no controlo negativo. Estes resultados contraditórios não parecem estar relacionados com a própria doença, mas são, provavelmente, o resultado do estilo de vida (Fenech e Bonassi, 2011), da predisposição genética (Iarmarcovai *et al.*, 2008; Mateuca *et al.*, 2008) ou da história terapêutica dos doentes. Tanto quanto se sabe, não existem estudos sobre o potencial genotóxico ou carcinogénico em doentes com acne *vulgaris*. Considerando a intervenção terapêutica nos doentes com acne, um doente com 8 mg/dia e dois doentes com 20 mg/dia, durante 24 semanas, verificou-se que, no final do tratamento, as alterações eram semelhantes em ambos os doentes e apenas se observou um aumento na percentagem de células apoptóticas e necróticas nos doentes tratados com uma dose mais elevada de isotretinoína. No entanto, e conforme descrito anteriormente, estes resultados não podem ser considerados com significado biológico, por não ter sido efetuada análise estatística, devido ao baixo número de doentes.

Os três doentes com psoríase *vulgaris* apresentaram, antes de iniciar o tratamento, frequências de MN (Fig. 4.7B) e valores de TL e TM (Tabela 4.5) superiores aos do controlo negativo, e o doente com maior duração e gravidade da doença apresentou valores

mais elevados de MN (Fig. 4.7B) e de lesões no DNA (Tabela 4.5). Estes resultados sugerem que a psoríase *per si*, a gravidade e a duração da doença representam um potencial risco mutagénico. Em conformidade com estes resultados, Karaman et al. (2008) descreveram que os doentes com psoríase têm instabilidade cromossómica. Além disso, e como descrito anteriormente, tem também sido proposto que os doentes com psoríase apresentam uma maior prevalência de diversos tipos de cancro, relativamente ao que se observa na população em geral (Ji et al., 2009; Chen et al., 2011). No entanto, os mecanismos subjacentes ao processo de carcinogénese nos doentes com psoríase permanecem por esclarecer, tal como descrito anteriormente. De facto, existem na psoríase vários marcadores de fase aguda, fatores de crescimento e citocinas que desempenham um papel importante na patogénese da psoríase (Rocha-Pereira et al., 2004b). Estes doentes têm níveis plasmáticos elevados de diversas citocinas (Coimbra et al., 2010c), que são importantes na iniciação e mediação da resposta imuno-inflamatória na psoríase. Além disso, a inflamação parece estar fortemente associada à angiogénese e ao stresse oxidativo, que podem induzir modificações oxidativas nas células e em diferentes componentes do sangue (Coimbra et al., 2012b). A inflamação local e sistémica na psoríase, através da produção e libertação de várias moléculas inflamatórias (Coimbra et al., 2010d; Coimbra et al., 2012a), pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do tumor (Alexandrescu et al., 2011).

Os três doentes (1, 2 e 3) tratados com isotretinoína em monoterapia (doente 1 com 8 mg/dia e os doentes 2 e 3 com 20 mg/dia) demonstraram que após 12 semanas de tratamento ocorreu uma diminuição na frequência de MN (Fig. 4.7B) e uma redução nos valores de TM (Tabela 4.5). Além disso, das 12 para as 24 semanas de tratamento com isotretinoína, a frequência de MN e as lesões no DNA não aumentaram, o que sugere que não existe um efeito cumulativo genotóxico da isotretinoína, uma vez que uma terapêutica mais prolongada com isotretinoína não aumentou os efeitos genotóxicos deste retinoide.

Os doentes 4 e 5 com psoríase grave foram tratados com isotretinoína (20 mg/ dia) associada com NBUVB, durante 12 semanas, tendo-se verificado que o doente 5 apresentou um aumento nos valores de TL e TM e que o doente 4 apresentou um aumento na frequência de MN e no valor de TL. Há poucos estudos sobre a genotoxicidade da isotretinoína associada com NBUVB. No entanto, Ferahbas et al. (2004) descreveram que doentes tratados com NBUVB apresentam maiores frequências de MN, do que antes de iniciarem a terapêutica. Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a irradiação com UVB aumenta a frequência de MN em linfócitos (Keulers et al., 1998), queratinócitos (Weller et

*al.*, 1996), melanócitos e em culturas de fibroblastos (Emri *et al.*, 2000), sugerindo que a irradiação UVB apresenta um potencial genotóxico. Tem sido proposto que a isotretinoína quando associada com NBUVB pode ter um efeito de proteção genotóxica. De facto, Sanford *et al.* (1992) referiram que os doentes com xeroderma pigmentoso, uma doença caracterizada por sensibilidade à luz solar, causada por uma deficiência nos mecanismos de reparação das lesões no DNA induzidas pela radiação ultravioleta, e que apresentam uma maior incidência de cancro de pele, quando tratados com isotretinoína (30-40 mg/dia) apresentam uma redução significativa do número de quebras de cromátides. Além disso, os linfócitos de voluntários saudáveis incubados com isotretinoína (0.001  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) e expostos a raios-X apresentam uma redução semelhante nas lesões de DNA. AIDosari *et al.* (1996) demonstraram também que a administração de isotretinoína (20-150 mg/kg) com benzilisotiocianato (um agente mutagénico) diminui significativamente a frequência de MN induzida por benzilisotiocianato em células da medula óssea de rato.

No que diz respeito aos estudos *in vitro*, verificámos que as culturas de sangue incubadas com concentrações crescentes de isotretinoína (1,2-20  $\mu\text{M}$ ), apresentaram frequências de MN (Fig. 4.7A), valores de TL e TM (Tabela 4.5) semelhantes aos do controlo negativo, sugerindo que a isotretinoína não tem efeito genotóxico. Trizna *et al.* (1992) realizaram também estudos *in vitro* com isotretinoína (0,01  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ), utilizando linfócitos humanos e linhas de células linfoblastóides, e verificaram que o número de quebras de cromátides induzidas por um agente mutagénico foi reduzido quando as células foram incubadas com isotretinoína, sugerindo que este retinoide pode atuar como um inibidor do desenvolvimento do cancro. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer o seu efeito anticarcinogénico.

Vários estudos têm demonstrado que a isotretinoína influencia a progressão do ciclo celular, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose em diferentes tipos de células, incluindo as linhas celulares de cancro da mama humano (Toma *et al.*, 1997; Czczuga-Semeniuk *et al.*, 2001), hepatoma (Arce *et al.*, 2005) e de melanoma (Niu *et al.*, 2005; Guruvayoorappan *et al.*, 2008).

Os estudos *in vitro* demonstraram que as culturas de sangue incubadas com isotretinoína (1,2-20  $\mu\text{M}$ ) apresentaram uma diminuição no valor de CBPI e um aumento na percentagem de citostase, embora sem significado estatístico, comparando com o controlo negativo (Fig. 4.8A). Os ensaios *in vivo* demonstraram que, após o tratamento com isotretinoína em monoterapia ou em associação com NBUVB, todos os doentes apresentaram uma ligeira diminuição na taxa de proliferação (Fig. 4.8B). Estes resultados

estão, provavelmente, relacionados com o efeito terapêutico da isotretinoína. De facto, sabe-se que a isotretinoína reduz a infiltração inflamatória em doentes com acne *vulgaris* (Layton, 2009; Rigopoulos *et al.*, 2010). Embora pouco se saiba sobre o mecanismo de ação da isotretinoína individualmente ou associada com NBUVB em doentes com psoríase, é possível que a isotretinoína também atue através da redução do processo inflamatório, semelhante ao que tem sido descrito para a terapêutica de NBUVB (Coimbra *et al.*, 2010b). Outra hipótese para explicar as diferenças observadas nos estudos *in vitro* e *in vivo*, relativamente aos valores de CBPI e da citostase, é a de que alguns dos efeitos observados *in vivo* podem ser devidos aos metabolitos da isotretinoína (ou seja, 4-oxo-isotretinoína), que são produzidos pelas enzimas hepáticas da família P450 (Gronhoj Larsen *et al.*, 2009).

Estes estudos demonstraram também que a isotretinoína em concentrações superiores ou iguais a 5  $\mu\text{M}$  induziu mecanismos de apoptose em linfócitos humanos, como evidencia o aumento observado na percentagem de linfócitos apoptóticos (Fig. 4.9A). Estes resultados sugerem que a isotretinoína pode desencadear mecanismos de morte celular apoptótica. É possível que o efeito citostático/citotóxico possa ocorrer através de mecanismos dependentes dos RARs, dado que o RAR $\alpha$  e o RAR $\gamma$  estão expressos nos linfócitos (Ballow *et al.*, 2003) e estão provavelmente envolvidos nos seus mecanismos de regulação (Dzhagalov *et al.*, 2007), tal como descrito anteriormente. No entanto, é também possível que a morte celular por apoptose ocorra através de mecanismos independentes dos RARs. De facto, os resultados deste trabalho (Capítulo II) demonstraram que a isotretinoína induz diferentes alterações mitocondriais, nomeadamente a indução da MPT (Figs. 2.7 e 2.8) e diminui a eficiência de produção de energia (Figs. 2.9 a 2.12 e Tabela 2.2), por interagir com o ANT (Fig. 2.13), o que pode explicar os mecanismos de morte celular. De acordo com estes resultados, vários estudos demonstraram também que a isotretinoína provoca alterações mitocondriais, associadas a uma diminuição na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Guruvayoorappan *et al.*, 2008; Vuletic *et al.*, 2010), a indução da MPT, a libertação do citocromo *c* (Rigobello *et al.*, 1999), a ativação da caspase-3 (Arce *et al.*, 2005; Guruvayoorappan *et al.*, 2008), desencadeando mecanismos de morte celular por apoptose.

Verificámos que a isotretinoína, nas concentrações mais elevadas 10 e 20  $\mu\text{M}$ , induziu também morte celular por necrose (Fig. 4.9B), provavelmente, por um mecanismo de depleção de ATP, devido à indução de disfunções mitocondriais.

### Efeito citogenotóxico dos retinóides

Os ensaios *in vivo* demonstraram que, após 12 semanas de tratamento, a maioria dos doentes apresentaram um aumento das células não viáveis, embora sem modificações consistentes, provavelmente devido às menores concentrações de isotretinoína atingidas no sangue (0,3-2  $\mu\text{M}$ ) (Gronhoj Larsen *et al.*, 2009).

Em conclusão, os estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a isotretinoína individualmente, nas doses utilizadas no tratamento da acne *vulgaris* e da psoríase *vulgaris*, não induz modificações genotóxicas consistentes. Os estudos *in vivo* com doentes tratados com isotretinoína e NBUVB não são consistentes. Contudo, os estudos *in vitro* demonstram que a isotretinoína, em doses mais elevadas, induz apoptose e necrose em linfócitos humanos.

## **Capítulo V**

**Avaliação hematológica e bioquímica de doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris* tratados com retinoides**





## 1. Introdução

A psoríase *vulgaris* e a acne *vulgaris* são duas doenças dermatológicas que envolvem mecanismos inflamatórios e que estão associadas frequentemente ao desenvolvimento de comorbilidades. As comorbilidades mais frequentes na psoríase são a obesidade, a dislipidemia, a diabetes *mellitus*, as DCV (Takahashi e Iizuka, 2012) e o fígado gordo (Wenk *et al.*, 2011).

O processo inflamatório impõe alterações oxidativas e proteolíticas nos glóbulos vermelhos (GV), que podem determinar um envelhecimento acelerado e remoção prematura dos GV (Rocha-Pereira *et al.*, 2004b). O processo de remoção dos GV está associado com o desenvolvimento de um neoantigénio na membrana, imunologicamente relacionado com a proteína banda 3, uma proteína transmembranar dos GV (Kay *et al.*, 1983; Kay, 1984). A degradação do metabolismo dos GV e das defesas antioxidantes, que ocorrem por envelhecimento da célula, favorecem a oxidação da hemoglobina (Hb), que se liga à proteína banda 3, promovendo a sua agregação e a ligação de autoanticorpos naturais anti-banda 3 que, juntamente com a ativação do complemento, medeiam a eliminação dos GV (Lutz *et al.*, 1987; Low, 1991). O perfil da proteína banda 3 e o valor de hemoglobina ligada à membrana (HbLM) são dois bons marcadores cumulativos de envelhecimento dos eritrócitos e/ou de lesão eritrocitária (Santos-Silva *et al.*, 1995; Santos-Silva *et al.*, 2001; Catarino *et al.*, 2009). Embora não existam estudos do perfil da proteína banda 3 e da HbLM em doentes com acne *vulgaris*, estudos anteriores em doentes com psoríase *vulgaris* mostraram um perfil alterado da proteína banda 3 e um aumento da HbLM, particularmente acentuado nas formas ativas da psoríase (Rocha-Pereira *et al.*, 2004b; Coimbra *et al.*, 2012b).

A acne *vulgaris* é uma patologia que necessita de intervenções terapêuticas prolongadas, enquanto que a psoríase sendo uma doença recorrente, necessita, portanto, de intervenções terapêuticas frequentes. A escolha do tratamento, como já se referiu, depende de muitos fatores, incluindo a gravidade da patologia, o impacto na qualidade de vida do doente, a resposta a tratamentos anteriores, a idade do doente e a história clínica e terapêutica. É necessário avaliar o equilíbrio risco-benefício, tendo em linha de conta a eficácia e a segurança a curto e a longo prazo da terapêutica, a sua tolerabilidade e a preferência do doente (Mrowietz, 2012).

Existem diferentes terapêuticas tópicas e sistêmicas disponíveis para o tratamento da acne *vulgaris*, que têm como objetivo controlar a hiperqueratose, reduzir a produção de sebo, a população bacteriana e eliminar o processo inflamatório (Figueiredo *et al.*, 2011b; Kraft e Freiman, 2011).

A isotretinoína sistêmica tem mostrado ser uma terapêutica muito eficaz no tratamento da acne *vulgaris*. No entanto, as doses terapêuticas utilizadas (30-80 mg/dia) têm sido associadas a diferentes efeitos adversos, tais como teratogenicidade, efeitos mucocutâneos, alopecia, fotossensibilidade, mialgia, artralgia, hiperlipidemia e alterações nas enzimas hepáticas (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011). Para reduzir ou evitar estes efeitos adversos no tratamento da acne moderada são frequentemente utilizadas doses mais baixas de isotretinoína (10-20 mg/dia), por períodos mais prolongados de tratamento (Amichai *et al.*, 2006; Sardana e Garg, 2011).

Relativamente à psoríase *vulgaris*, como já foi referido, existem várias abordagens terapêuticas, desde agentes tópicos, para as formas mais ligeiras e de localização bem definida, à fototerapia e à fotoquimioterapia, e a agentes sistêmicos, que são utilizados em casos de psoríase moderada e grave (Murphy e Reich, 2011). Todas estas terapêuticas têm como principal objetivo o controlo das manifestações clínicas, de forma a eliminar as lesões psoriáticas e a diminuir o número e a gravidade das recidivas (Mrowietz, 2012).

A acitretina e a isotretinoína são eficazes no tratamento da psoríase ligeira a moderada, no entanto são menos eficazes em algumas formas graves de psoríase. A sua utilização clínica é limitada pelos seus potenciais efeitos teratogénicos e outros efeitos adversos, que podem ser reduzidos utilizando doses mais baixas destes retinoides, em associação com a fototerapia e a fotoquimioterapia (Ozdemir *et al.*, 2008; Monfrecola e Baldo, 2009; Mortazavi *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos sobre as várias abordagens terapêuticas no tratamento da acne *vulgaris* e da psoríase *vulgaris* referem, principalmente, o seu sucesso terapêutico, e pouco sobre os seus efeitos adversos. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas em doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris* tratados com acitretina ou com isotretinoína em monoterapia ou associadas com NBUVB ou com PUVA. Foram também avaliadas outras reações adversas descritas pelos doentes, que podem estar relacionadas com a terapêutica administrada.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Reagentes

O fluoreto de fenilmetilsulfóxido (PMSF), a acrilamida, o persulfato de amónio (PSA), o N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), o  $\alpha$ -cloronaftol, as folhas de nitrocelulose com uma porosidade de 0,2  $\mu$ m e as folhas de papel 3 MM, foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

### 2.2 Caracterização dos doentes

Participaram neste estudo 20 doentes com psoríase *vulgaris* (7 mulheres e 13 homens) e 2 doentes com acne *vulgaris* (2 homens), da consulta de dermatologia dos HUC. Como descrito anteriormente, este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética dos HUC, e todos os doentes foram esclarecidos sobre a natureza do ensaio clínico e deram o seu consentimento. Os doentes com outras doenças dermatológicas, com diabetes *mellitus*, ou com doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, cardiovasculares ou renais, foram excluídos do estudo. Nenhum dos doentes tinha recebido tratamento no mês anterior ao início do estudo.

A informação demográfica relativamente aos doentes tratados com acitretina está apresentada na Tabela 4.1, e com isotretinoína na Tabela 4.2.

Como descrito anteriormente, a gravidade da acne *vulgaris* e da psoríase *vulgaris* foi avaliada pelo mesmo dermatologista, para diminuir a subjetividade da avaliação. A acne foi classificada como pápulo-pustulosa ligeira ou moderada/grave (Katsambas *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2011b), e a gravidade da psoríase foi avaliada pelo PASI (Fredriksson e Pettersson, 1978; Naldi e Gambini, 2007).

A terapêutica administrada foi decidida pelo dermatologista, de acordo com a gravidade da doença e história clínica e terapêutica de cada doente.

Dezassete doentes com psoríase *vulgaris* (13 homens e 4 mulheres) foram tratados com acitretina em monoterapia (administração oral de uma cápsula Neotigason® -25 mg/dia) ou em associação com irradiação com NBUVB ou com PUVA; e 5 doentes (2 homens com acne *vulgaris* e três mulheres com psoríase *vulgaris*) foram tratados com

isotretinoína em monoterapia [por administração oral de uma cápsula de 8 mg/dia (isotropil, Lab. Azevedos®) ou 20 mg/dia (genérico)] ou em associação com a irradiação com NBUVB.

O tratamento com irradiação por NBUVB e PUVA foi administrado segundo os protocolos descritos no capítulo IV.

Dos 17 doentes com acitretina, 5 foram tratados em monoterapia, 7 doentes com acitretina + NBUVB e cinco doentes com acitretina + PUVA. Dos 5 doentes sob monoterapia com acitretina, 2 doentes continuaram o tratamento por mais 12 semanas, e os outros 2 doentes por mais 24 semanas.

Os 12 doentes sob terapêutica combinada pararam a fototerapia após 12 semanas de tratamento (para não exceder a dose máxima de irradiação), no entanto 7 doentes continuaram o tratamento com acitretina em monoterapia, 2 doentes por mais 12 semanas, e os outros 5 doentes por mais 24 semanas.

Dos 5 doentes tratados com isotretinoína, 3 doentes apresentavam psoríase *vulgaris*, tendo um sido tratado com isotretinoína 20 mg/dia durante 24 semanas e os outros dois com 20 mg isotretinoína/dia e irradiação com NBUVB (três vezes por semana) durante 12 semanas. Os 2 doentes que apresentavam acne *vulgaris* foram tratados durante 24 semanas com isotretinoína: um com uma dose de 8 mg/dia e o outro com uma dose de 20 mg/dia.

### **2.3 Estudo bioquímico e hematológico**

As amostras de sangue foram recolhidas para tubos com EDTA e sem anticoagulante, para obter sangue total e soro, respetivamente.

Para o estudo lipídico, procedeu-se à determinação dos níveis séricos de colesterol total e TG, utilizando ensaios enzimáticos colorimétricos (CHOD PAP e TRIGS, Roche, Germany).

A função hepática foi avaliada determinando a atividade enzimática da transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO), da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), da gama-glutamyl-transferase ( $\gamma$ -GT) e da fosfatase alcalina (ALP), utilizando ensaios da rotina clínica laboratorial (ASTL, ALTL, GGT-2 e ALP2S, Roche, Germany).

Para avaliação da função muscular determinou-se a atividade da creatina cinase (CK), utilizando um ensaio colorimétrico (CKL, Roche, Germany).

A função renal foi avaliada pela determinação das concentrações séricas de ácido úrico e ureia, utilizando os ensaios enzimáticos UREAL e UA2 (Roche, Germany), e pela determinação da concentração de creatinina, utilizando um ensaio colorimétrico (CREJ2 Roche, Germany). Para a realização destes ensaios de rotina analítica utilizou-se um autoanalisador Cobas Integra 400 plus (Roche, Germany).

O estudo do metabolismo da glucose incluiu a avaliação da concentração sérica de glucose, utilizando o kit enzimático GLUCL3 (Roche, Germany), num autoanalisador Cobas Integra 400 plus (Roche, Germany); da concentração de insulina utilizando um imunoenensaio de eletroquimioluminescência (Elecsys Insulin, Roche, Germany), num autoanalisador (Elecsys 2010, Roche, Germany); a hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) foi determinada em amostras de sangue total por HPLC de troca iónica de fase reversa, utilizando um analisador automatizado de hemoglobina (Hi Auto-A<sub>1c</sub> HA-8140, Menarini, Italy).

A resistência à insulina foi calculada usando o modelo de avaliação da homeostase (HOMA-IR), de acordo com Turner et al. (1979):

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Glucose (mg/dL)} \times \text{Insulina (\mu U/mL)}] / 405$$

A sensibilidade à insulina foi determinada pelo índice de verificação quantitativa da sensibilidade à insulina (QUICKI) (Katz *et al.*, 2000):

$$\text{QUICKI} = 1 / \log \text{Insulina (\mu U/mL)} + \log \text{Glucose (mg/dL)}.$$

Para o estudo da inflamação foram avaliados os níveis séricos da proteína C-reativa (PCR), por um ensaio imunoturbidimétrico de alta sensibilidade (CRPHS, Roche, Germany), num autoanalisador Hitachi 911 (Roche, Germany).

A contagem total e diferencial de leucócitos, a concentração de GV, de hemoglobina, o valor de hematócrito e os índices hematimétricos foram avaliados utilizando um analisador automático Sysmex XT-1800i (Roche, Germany). Foram feitos esfregaços de sangue periférico e corados pela técnica de Wright (Haematology, 1984), para avaliação morfológica das células sanguíneas.

A contagem de reticulócitos foi feita microscopicamente em esfregaços de sangue previamente corados com azul de metileno Novo (“Reticulocyte stain”).

Os níveis séricos de bilirrubina total foram determinados utilizando um ensaio colorimétrico (BILT2, Roche, Germany), num autoanalisador Cobas Integra 400 plus (Roche, Germany).

Procedeu-se, ainda, ao estudo de modificações oxidativas na membrana do eritrócito. Para isso, as amostras de sangue total (EDTA como anticoagulante) foram centrifugadas

em gradiente de densidade (histopaque 1,119 e histopaque 1,077) para isolar os eritrócitos. Após lavagem dos eritrócitos com PBS, procedeu-se a uma hemólise hipotónica, de acordo com a metodologia de Dodge et al. (1963), por adição de PBS 5 mM a pH 8,0, contendo um inibidor de proteases, o PMSF, numa concentração final de 0,1 mM. As membranas foram seguidamente lavadas (duas centrifugações a 20 000 g durante 10 minutos, a 4 °C) com PBS, contendo PMSF. As membranas foram lavadas mais duas vezes com PBS, na ausência de PMSF, nas mesmas condições das centrifugações anteriores. Na última centrifugação o sobrenadante foi rejeitado o mais possível, de forma a que as membranas ficassem com uma concentração final de 2,5 a 4,0 µg/µL. A concentração proteica das suspensões de membranas obtidas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A % de HbLM foi determinada espectrofotometricamente, após dissociação das proteínas das membranas com 5% (v/v) de Triton X-100 em PBS 5 mM, pH 8,0. A absorvência foi lida a um comprimento de onda de 415 nm, correspondente à absorção máxima da hemoglobina, e a 700 nm, correspondente à linha basal das outras proteínas, num leitor de placas (PowerWave Xs, Biotek, USA). A % de HbLM foi calculada subtraindo ao valor da absorvência a 415 nm o valor da absorvência a 700 nm, considerando a concentração proteica da suspensão de membranas e a diluição da amostra.

As suspensões de membranas eritrocitárias foram tratadas com um volume igual de tampão de solubilização (Tris-HCl 0,125 M a pH 6,8, 4% de SDS, 20% de glicol, 10% de 2-mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol), desnaturadas pelo calor e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (SDS-PAGE) (20 µg de proteína por amostra), utilizando um sistema descontínuo de Laemmli (o “running gel” com uma solução de poliacrilamida a 9% e o “stacking gel” com uma solução de poliacrilamida a 4,5%) (Laemmli, 1970). As proteínas foram de seguida transferidas eletroforeticamente do gel de acrilamida e SDS para uma folha de nitrocelulose com uma porosidade de 0,2 µm (Towbin *et al.*, 1979). Uma vez feita a transferência das proteínas, a nitrocelulose foi imersa numa solução de leite em pó a 5% (v/v) em PBS (pH 7,0) contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100, durante a noite, com agitação suave, para bloquear reações inespecíficas.

Para a deteção da proteína banda 3 foi utilizado um sistema de dois anticorpos; na primeira incubação da nitrocelulose foi utilizado um anticorpo monoclonal, produzido no rato (IgG) e específico para a proteína banda 3 humana, que reconhece um epítopo localizado no polo citoplasmático da molécula de banda 3. A nitrocelulose foi incubada com este anticorpo (diluição 1:3000) durante 4 horas. Após a lavagem da membrana de nitrocelulose, fez-se a incubação com o segundo anticorpo, dirigido para as

imunoglobulinas de rato e conjugado com uma peroxidase (“anti-mouse Ig peroxidase linked”) (1/4000), durante 1 hora. As incubações foram efetuadas à temperatura ambiente e os anticorpos foram diluídos numa solução de leite em pó a 0,5% (v/v) em PBS, pH 7,0, com 0,1% (v/v) de Triton X-100. As lavagens foram feitas com PBS pH 7,0, contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100. O peróxido de hidrogénio e o  $\alpha$ -cloronaftol foram utilizados no processo de revelação (Santos-Silva *et al.*, 1995). A quantificação relativa das diferentes bandas, correspondentes aos agregados de alto peso molecular da proteína banda 3 (HMWAg), aos monómeros da proteína banda 3 (Bd3) e aos fragmentos proteolíticos da proteína banda 3 (PFrag), foi feita por densitometria (Darkroom CN UV/wl, BioCaptMW version 99; Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France).

## 2.4 Análise estatística

Foi utilizado o SPSS, versão 17 para Windows, Chicago, IL, EUA. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SD (desvio padrão), mediana (interquartil 25 - 75) ou valores médios para cada doente em estudo. As diferenças entre os grupos de doentes sob diferentes terapêuticas foram determinadas usando OneWay Anova associado ao teste de Tukey, para os parâmetros que apresentaram uma distribuição Gaussiana; o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis H foi utilizado no caso de parâmetros com distribuição não-Gaussiana, tendo sido efetuadas comparações individuais (dois grupos) utilizando o teste de Mann-Whitney, em caso de significado estatístico. Para o estudo longitudinal, efetuaram-se comparações dos valores apresentados pelos doentes durante o tratamento, utilizando o teste *t*-Student emparelhado ou o teste de Wilcoxon, consoante os parâmetros apresentavam uma distribuição Gaussiana ou não-Gaussiana, respetivamente. A análise de correlação foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman, consoante os parâmetros apresentavam uma distribuição Gaussiana ou não-Gaussiana, respetivamente. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prim 5 (San Diego, California).

### **3 Resultados**

#### **3.1 Efeitos da acitretina individualmente ou em associação com a fotoquimioterapia e a fototerapia de banda estreita nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de doentes com psoríase *vulgaris***

##### **3.1.1 Resultados**

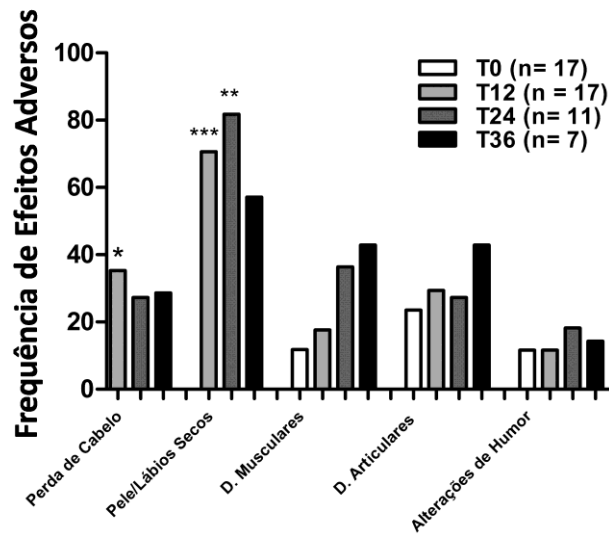
Os resultados foram analisados de acordo com o tipo de tratamento - acitretina, acitretina + NBUVB e acitretina + PUVA (Tabela 4.1), antes de iniciar o tratamento (T0) e após 12 semanas de tratamento (T12). Alguns doentes continuaram a terapêutica durante mais 12 ou 24 semanas de tratamento (T24 e T36) (resultados não apresentados).

Após 12 semanas de terapêutica, os três grupos apresentaram uma diminuição do PASI, mais acentuada e significativa nos doentes tratados com acitretina + NBUVB e com acitretina + PUVA.

No caso dos doentes que prolongaram o tratamento com acitretina, observou-se que o PASI se manteve durante as posteriores 12 ou 24 semanas de tratamento (T24 e T36) (resultados não apresentados).

Durante a terapêutica os doentes descreveram alguns efeitos secundários, nomeadamente, perda de cabelo (35%) e pele/lábios secos (71%), após 12 semanas de tratamento com acitretina, acitretina + NBUVB ou acitretina + PUVA. Quando o tratamento foi prolongado por mais 12 semanas com acitretina em monoterapia (T24), acentuaram-se os casos de pele/lábios secos (82%) e verificou-se um aumento da referência a dores musculares (12% em T0 e 36% em T24). Após mais 12 semanas de tratamento com acitretina em monoterapia (T36), acentuou-se a referência a dores musculares (43%) e articulares (43%). Não se observou qualquer mudança de humor antes e durante o tratamento (Fig. 5.1).





**Figura 5.1** – Frequência de efeitos adversos referidos pelos doentes com psoríase de acordo com o tempo de terapêutica. T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; T36: após 36 semanas de tratamento; D.: dores; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  versus T0.

Os doentes tratados com acitretina + NBUVB e acitretina + PUVA, com valores de PASI mais elevados, apresentaram valores significativamente mais elevados de ácido úrico do que os doentes tratados com acitretina em monoterapia. No entanto, os valores de ureia e creatinina eram semelhantes para os três grupos, antes de iniciar o tratamento (Tabela 5.1).

Após 12 semanas de tratamento não se observaram alterações significativas nos níveis de ácido úrico, ureia e creatinina, exceto no caso dos doentes tratados com acitretina + NBUVB, que apresentaram um aumento significativo nos níveis de creatinina (Tabela 5.1).

Por outro lado, os doentes que continuaram o tratamento com acitretina em monoterapia não apresentaram modificações significativas nestes parâmetros da função renal (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1** – Estudo da função renal dos doentes em estudo, de acordo com a terapêutica instituída.

		Ácido Úrico (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
<b>Acitretina</b> (n = 5)	<b>T0</b>	3,80 (3,65 – 5,50)	35,60 ± 6,43	0,73 ± 0,17
	<b>T12</b>	4,10 (3,70 – 5,20)	40,80 ± 14,01	0,73 ± 0,13
<b>Acitretina + NBUVB</b> (n = 7)	<b>T0</b>	6,70 <sup>++</sup> (6,10 – 7,70)	29,64 ± 13,99	0,78 ± 0,16
	<b>T12</b>	7,30 (6,10 – 7,80)	29,89 ± 11,71	0,89 ± 0,20 <sup>**</sup>
<b>Acitretina + PUVA</b> (n = 5)	<b>T0</b>	6,90 <sup>+</sup> (5,35 – 7,35)	28,82 ± 9,68	0,85 ± 0,22
	<b>T12</b>	6,40 (5,45 – 7,00)	40,12 ± 23,76	0,90 ± 0,14
<b>Tratamento prolongado com acitretina</b>				
(n = 11)	<b>T24</b>	5,80 (4,10 – 8,20)	32,83 ± 12,41	0,82 ± 0,19
(n = 7)	<b>T36</b>	6,50 (5,30 – 8,60)	30,34 ± 13,41	0,83 ± 0,14

Os valores são apresentados como média ± SD (desvio padrão), ou como mediana (interquartil 25 -75); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; T36: após 36 semanas de tratamento; <sup>\*\*</sup>p <0,01 *versus* T0; <sup>++</sup>p <0,01, <sup>+</sup>p <0,05 *versus* acitretina.

Quanto à função hepática, verificou-se que, antes de iniciar o tratamento, o grupo de acitretina + NBUVB apresentou valores significativamente mais elevados de TGP,  $\gamma$ -GT e ALP, comparando com o grupo de acitretina, e que o grupo de acitretina + PUVA apresentava também valores mais elevados de  $\gamma$ -GT e de ALP (Tabela 5.2).

Após 12 semanas de tratamento não se observaram alterações na função hepática; o grupo tratado com acitretina + NBUVB apresentou um decréscimo significativo nos valores de  $\gamma$ -GT e ALP (Tabela 5.2).

No entanto, os doentes que continuaram o tratamento com acitretina em monoterapia por mais 24 semanas (T36) apresentaram um aumento significativo nos níveis de TGO e de  $\gamma$ -GT (Tabela 5.2).

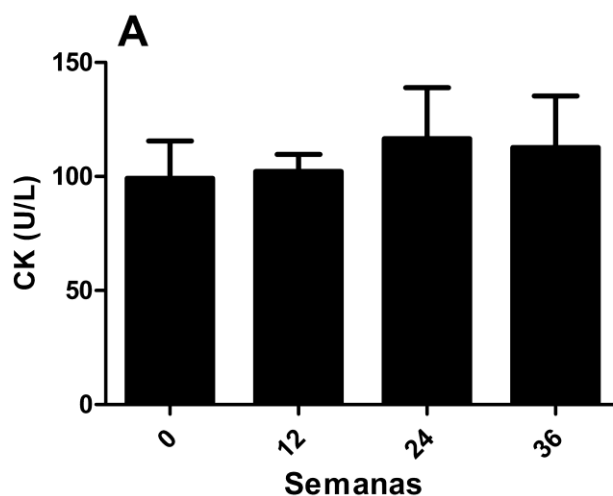
**Tabela 5.2** – Estudo da função hepática dos doentes em estudo, de acordo com a terapêutica instituída.

		<b>TGP (U/L)</b>	<b>TGO (U/L)</b>	<b><math>\gamma</math>-GT (U/L)</b>	<b>ALP (U/L)</b>
<b>Acitretina</b> (n = 5)	<b>T0</b>	12,00 (9,50 – 13,50)	16,00 (12,00 – 18,50)	17,60 ± 9,34	46,20 ± 9,26
	<b>T12</b>	11,00 (8,50 – 13,50)	19,00 (14,00 – 20,00)	18,20 ± 9,12	46,80 ± 11,10
<b>Acitretina + NBUVB</b> (n = 7)	<b>T0</b>	27,00 <sup>++</sup> (22,00 – 43,00)	23,00 (22,00 – 30,00)	62,86 ± 29,31 <sup>++</sup>	66,00 ± 12,83 <sup>++</sup>
	<b>T12</b>	26,00 (16,00 – 36,00)	21,00 (18,00 – 27,00)	55,29 ± 23,58*	56,29 ± 12,46*
<b>Acitretina + PUVA</b> (n = 5)	<b>T0</b>	28,00 (11,00 – 46,50)	21,00 (16,50 – 41,00)	33,25 ± 15,75 <sup>+</sup>	66,60 ± 9,48 <sup>++</sup>
	<b>T12</b>	30,00 (11,50 – 36,50)	23,00 (15,50 – 28,00)	37,75 ± 21,05	69,00 ± 9,03
<b>Tratamento prolongado com acitretina</b>					
(n = 11)	<b>T24</b>	24,00 (15,00 – 40,00)	20,00 (20,00 – 24,00)	51,60 ± 33,46	56,73 ± 16,76
(n = 7)	<b>T36</b>	25,00 (20,00 – 52,00)	26,00* (19,00 – 33,00)	57,14 ± 31,42*	58,43 ± 15,35

Os valores são apresentados como média ± SD (desvio padrão) ou como mediana (interquartil 25 - 75); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; T36: após 36 semanas de tratamento; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética;  $\gamma$ -GT: gama-glutamyl-transferase; ALP: fosfatase alcalina; \*p <0,05 *versus* T0; ++p <0,01, +p <0,05 *versus* acitretina.

Para avaliar o efeito das terapêuticas na função muscular foram determinados os níveis de CK em sete doentes tratados durante 12 semanas com acitretina, acitretina + NBUVB ou com acitretina + PUVA, a que se seguiram mais 24 semanas de

tratamento com acitretina em monoterapia. Observou-se que os níveis de CK apresentaram uma tendência para aumentar após as 24 semanas de tratamento (Fig. 5.2).



**Figura 5.2** - Valores médios de creatinina cinase (CK) em doentes com psoríase ao longo do tratamento.

Relativamente ao estudo do metabolismo da glucose, verificou-se que os grupos de acitretina + NBUVB e de acitretina + PUVA apresentaram valores significativamente mais elevados de IMC, comparando com a acitretina em monoterapia (Tabela 5.3). Apesar de não haver valor estatístico, verificou-se que estes dois grupos apresentaram uma tendência para ter valores mais elevados de glucose, HbA<sub>1C</sub>, insulina e HOMA-IR, e uma tendência para ter valores mais baixos de QUICKI, relativamente à acitretina em monoterapia (Tabela 5.3).

Após 12 semanas de tratamento com acitretina + NBUVB observou-se uma redução significativa nos níveis de HbA<sub>1C</sub>. No grupo tratado com acitretina + PUVA, observou-se um aumento significativo nos níveis de glucose, após 12 semanas de tratamento (Tabela 5.3).

Os doentes que continuaram o tratamento apresentaram valores significativamente mais elevados de insulina e de HOMA-IR, comparando com os valores apresentados às 12 semanas de tratamento (Tabela 5.3).

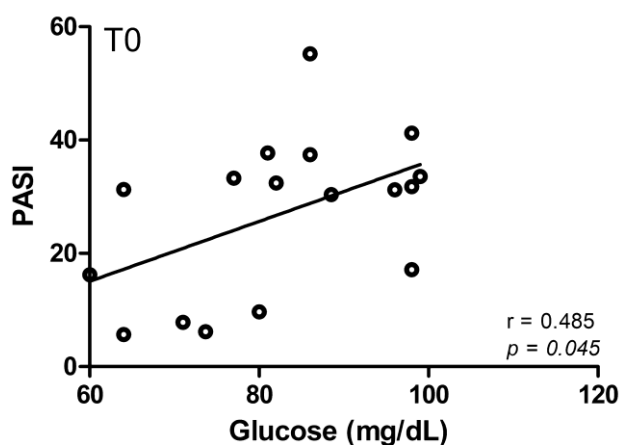
**Tabela 5.3** – Estudo lipídico e do metabolismo da glucose, de acordo com a terapêutica instituída.

	Acitretina (n = 5)		Acitretina + NBUVB (n = 7)		Acitretina + PUVA (n = 5)		Tratamento prolongado com acitretina	
	T0	T12	T0	T12	T0	T12	T24 (n=11)	T36 (n=7)
<b>IMC</b>	23,16 ± 3,58	23,16 ± 3,52	30,74 ± 4,01 <sup>+</sup>	30,49 ± 4,09 <sup>*+</sup>	32,89 ± 3,91 <sup>++</sup>	32,47 ± 3,94 <sup>++</sup>	28,65 ± 6,03	30,89 ± 7,00
<b>Glucose (mg/dL)</b>	71,96 ± 9,26	74,32 ± 9,40	88,50 ± 9,93	84,00 ± 12,64	85,60 ± 14,33	88,00 ± 26,01 <sup>*</sup>	88,42 ± 21,89	89,86 ± 13,77
<b>HbA<sub>1c</sub> (mg/dL)</b>	5,37 ± 0,35	5,39 ± 0,25	5,68 ± 0,36	5,35 ± 0,24 <sup>**</sup>	5,46 ± 0,59	5,46 ± 0,78	5,43 ± 0,72	5,59 ± 0,68
<b>Insulina (μU/mL)</b>	7,70 (5,29 – 11,38)	4,11 (3,38 – 5,77)	14,18 (6,34 – 16,74)	14,41 (6,19 – 20,00)	13,05 (3,10 – 21,81)	15,73 (6,19 – 18,89)	7,00 (3,47 – 18,42)	10,94 <sup>§</sup> (6,85 -22,48)
<b>HOMA-IR</b>	1,56 (0,84 – 2,05)	0,69 (0,54 – 1,04)	3,36 (1,35 – 3,70)	2,99 (1,46 – 4,66)	2,06 (0,64 – 5,01)	3,65 <sup>+</sup> (1,39 – 4,59)	1,34 (0,72 – 4,73)	2,59 <sup>§</sup> (1,22 – 5,77)
<b>QUICKI</b>	0,36 (0,34 – 0,40)	0,41 (0,38 – 0,43)	0,32 (0,32 – 0,36)	0,36 (0,31 – 0,36)	0,34 (0,30 – 0,43)	0,32 (0,31 – 0,41)	0,37 (0,31 – 0,41)	0,33 (0,30 – 0,37)
<b>Col (mg/dL)</b>	175,2 ± 31,31	180,2 ± 26,88	221,1 ± 36,04	202,7 ± 28,56	226,2 ± 60,31	229,8 ± 46,47	203,4 ± 27,17	222,4 ± 44,39 <sup>*</sup>
<b>TG (mg/dL)</b>	83,20 ± 20,29	104,8 ± 36,12	142,4 ± 78,70	139,7 ± 79,88	125,60 ± 35,58	129,0 ± 28,20	116,1 ± 45,12	123,0 ± 52,34

Os valores são apresentados como média ± SD (desvio padrão), ou como mediana (interquartil 25 - 75); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; T36: após 36 semanas de tratamento; IMC: índice de massa corporal; HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicada; HOMA-IR: resistência à insulina pelo modelo de avaliação da homeostase; QUICKI: índice de verificação quantitativa da sensibilidade à insulina; Col: colesterol; TG: triglicéridos; \*\*p <0,01, \*p <0,05 *versus* T0; §p <0,05 *versus* T12; ++p <0,01, +p <0,05 *versus* acitretina.

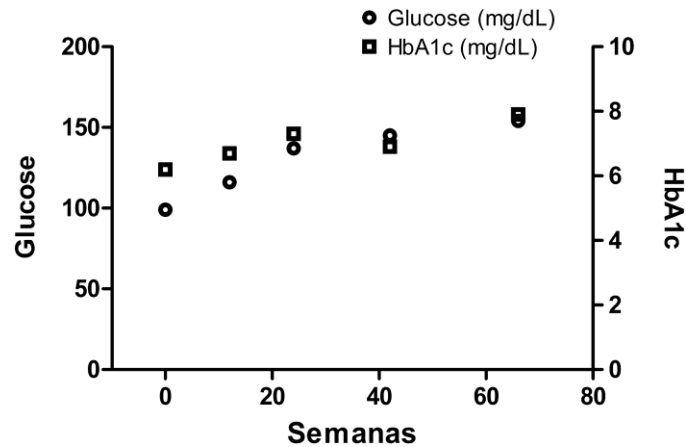
Não foram observadas diferenças significativas nos resultados referentes ao estudo da função lipídica para qualquer dos grupos de tratamento. Verificou-se, no entanto, que os valores de colesterol total aumentaram significativamente nos doentes em que se tinha prolongado o tratamento com acitretina em monoterapia por mais 24 semanas (T36) (Tabela 5.3).

Tendo em conta que a psoríase parece estar associada com o desenvolvimento da diabetes *mellitus* (Takahashi e Iizuka, 2012) e que, antes de iniciar a terapêutica, os doentes com psoríase mais grave (acitretina + NBUVB e acitretina + PUVA, de acordo com os valores de PASI) apresentavam valores mais elevados de HbA<sub>1C</sub>, glucose e insulina, que os doentes sob terapêutica com acitretina, estudaram-se as correlações entre os parâmetros do metabolismo da glucose com o PASI. Verificou-se que a glucose se correlacionava com o PASI, em T0 (Fig. 5.3).



**Figura 5.3** - Correlação observada entre o índice de severidade e área psoriática (PASI) e os níveis de glucose antes de iniciar a terapêutica (T0).

Por outro lado, verificou-se também que um dos doentes tratado durante 12 semanas com acitretina + PUVA e que continuou o tratamento por mais 54 semanas com acitretina em monoterapia, apresentou um aumento contínuo dos níveis de glucose e de HbA<sub>1C</sub> (Fig. 5.4).



**Figura 5.4** - Valores de glucose e hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) apresentados por um doente com psoríase tratado, com acitretina + PUVA ao longo de 12 semanas, e com acitretina em monoterapia, por mais 54 semanas de tratamento.

O estudo eritrocitário [GV, Hb, hematócrito (Ht), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração da hemoglobina globular média (CHGM), coeficiente de variação eritrocitária (RDW)] não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos, antes de iniciar o tratamento (Tabela 5.4).

O número de reticulócitos aumentou significativamente nos doentes tratados com acitretina em monoterapia; os grupos de acitretina + PUVA e de acitretina + NBUVB apresentaram também um aumento no valor de reticulócitos, embora sem significado estatístico. Além disso, também não se observaram modificações significativas nos valores de bilirrubina total entre os grupos, nem após o tratamento (Tabela 5.4).

Por outro lado, os marcadores de lesão eritrocitária (HbLM e perfil da proteína banda 3) não apresentaram diferenças entre os três grupos terapêuticos, nem antes nem após o tratamento, embora se tenha observado uma tendência para os valores de HbLM diminuírem com o tratamento (Tabela 5.4).

Nos doentes em que o tratamento foi prolongado com acitretina em monoterapia, verificou-se que o número de GV e o hematócrito aumentou significativamente após mais 24 semanas de tratamento (T12 *versus* T36), mantendo-se os valores de reticulócitos. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de bilirrubina total, de HbLM e no perfil da proteína banda 3 (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4** – Estudo eritrocitário, de acordo com a terapêutica instituída.

	Acitretina (n = 5)		Acitretina + NBUVB (n = 7)		Acitretina + PUVA (n = 5)		Tratamento prolongado com acitretina	
	T0	T12	T0	T12	T0	T12	T24 (n=11)	T36 (n=7)
<b>GV (x 10<sup>12</sup>/L)</b>	4,54 ± 0,58	4,68 ± 0,54	4,93 ± 0,41	4,77 ± 0,27	4,75 ± 0,50	4,90 ± 0,32	4,99 ± 0,49	5,04 ± 0,25 <sup>s</sup>
<b>Hematócrito (%)</b>	43,40 ± 3,20	44,54 ± 3,43	46,31 ± 3,01	45,30 ± 2,34	45,63 ± 6,62	47,42 ± 2,81	47,00 ± 4,40	48,37 ± 2,49 <sup>s</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,82 ± 0,98	14,26 ± 0,81	15,20 ± 1,53	14,66 ± 1,01	15,14 ± 2,25	15,56 ± 1,22	15,30 ± 1,67	15,50 ± 0,57 <sup>s</sup>
<b>VGM (fL)</b>	96,28 ± 8,76	95,44 ± 4,20	94,11 ± 3,00	95,09 ± 4,47	95,62 ± 4,47	95,58 ± 6,28	94,16 ± 4,87	95,66 ± 2,21
<b>HGM (pg)</b>	30,66 ± 2,02	30,62 ± 2,25	30,80 ± 0,84	30,71 ± 1,04	31,72 ± 1,78	31,28 ± 1,15	30,63 ± 1,57*	30,80 ± 0,67*
<b>CHGM (g/dL)</b>	31,88 ± 1,20	32,08 ± 1,59	32,76 ± 1,40	32,34 ± 1,22	33,18 ± 0,66	32,80 ± 1,75	32,50 ± 1,03	32,06 ± 0,80
<b>RDW (%)</b>	13,98 ± 0,64	13,50 ± 0,48	13,96 ± 1,05	14,01 ± 1,03	13,50 ± 0,31	14,14 ± 0,80	14,37 ± 1,22	13,54 ± 0,69
<b>Reticulócitos (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	20,28 (15,82-40,97)	56,68* (22,18-70,96)	45,27 (34,65-62,15)	65,80 (54,00-75,48)	46,53 (26,34-54,76)	77,92 (42,17-90,02)	76,84** <sup>\$\$</sup> (60,96-140,90)	78,40* (63,83 - 142,50)
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	0,40 ± 0,18	0,44 ± 0,14	0,57 ± 0,24	0,62 ± 0,25	0,73 ± 0,20	0,58 ± 0,19	0,55 ± 0,18	0,55 ± 0,23
<b>HbLM (x 10<sup>-4</sup> %)</b>	115 (90-153)	83 (50-133)	147 (89-196)	87 (78-125)	107 (34-160)	52 (32-156)	100 (58-217)	100 (82-136)
<b>Perfil Banda 3 (%)</b>								
<b>HMWAg</b>	11,61 ± 8,37	15,54 ± 3,27	13,31 ± 8,71	13,81 ± 10,89	9,24 ± 5,20	10,44 ± 4,59	11,23 ± 9,52	15,95 ± 8,59
<b>Bd3</b>	71,68 ± 65,02	65,02 ± 8,14	72,49 ± 4,77	73,37 ± 11,10	76,56 ± 7,98	74,89 ± 3,40	68,68 ± 8,06	66,21 ± 5,27
<b>Pfrag</b>	16,72 ± 7,86	19,44 ± 8,21	14,21 ± 8,65	12,83 ± 5,78	14,22 ± 8,85	14,67 ± 7,13	20,08 ± 8,31	17,84 ± 9,26

Os valores são apresentados como média ± SD (desvio padrão) ou como mediana (interquartil 25 - 75); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; T36: após 36 semanas de tratamento; GV: glóbulos vermelhos; VGM: volume globular médio; HGM: hemoglobina globular média; CHGM: concentração HGM; RDW: coeficiente de variação eritrocitária; HbLM: hemoglobina ligada à membrana; HMWAg: agregados de alto peso molecular da proteína banda 3; Bd3: Monómeros da proteína banda 3; Pfrag: fragmentos proteolíticos da proteína banda 3; \*\*p <0,01, \*p <0,05 versus T0; \$\$p <0,01, \$p <0,05 versus T12.



**Tabela 5.5** – Contagem total e diferencial de leucócitos, de acordo com a terapêutica instituída.

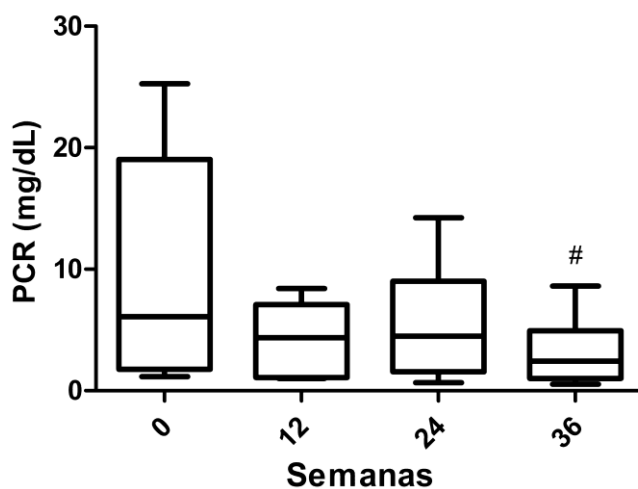
	Acitretina (n = 5)		Acitretina + NBUVB (n = 7)		Acitretina + PUVA (n = 5)		Tratamento prolongado com acitretina (n=11) (n=7)	
	T0	T12	T0	T12	T0	T12	T24	T36
<b>GB</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	5,30 ± 1,45	6,39 ± 1,25*	7,87 ± 1,81	5,26 ± 0,74*	6,01 ± 0,67	6,15 ± 1,47	6,00 ± 1,84	5,85 ± 0,69
<b>Linf</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	1,73 ± 0,41	1,95 ± 0,28	1,99 ± 0,68	1,82 ± 0,22	1,58 ± 0,77	1,64 ± 0,44	1,78 ± 0,58	2,38 ± 0,54 <sup>§###</sup>
<b>Mon</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,44 ± 0,20	0,53 ± 0,09	0,52 ± 0,23	0,52 ± 0,17	0,48 ± 0,15	0,47 ± 0,17	0,48 ± 0,13	0,51 ± 0,11
<b>Neu</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	3,09 ± 1,58	3,71 ± 1,01	4,64 ± 1,60	2,77 ± 0,61*	4,37 ± 0,83	4,04 ± 1,09	3,96 ± 1,85	3,82 ± 1,41
<b>Eos</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,12 ± 0,06	0,13 ± 0,10	0,13 ± 0,14	0,16 ± 0,15	0,13 ± 0,05	0,19 ± 0,15	0,15 ± 0,08	0,13 ± 0,07
<b>Bas</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,03 (0,02 – 0,07)	0,05 (0,03 – 0,06)	0,04 (0,02 – 0,06)	0,05 (0,02 – 0,06)	0,02 (0,02 – 0,03)	0,02 (0,02 – 0,03)	0,04 (0,01 – 0,07)	0,03 (0,02 – 0,05)

Os valores são apresentados como média ± SD (desvio padrão), ou como mediana (interquartil 25 - 75); T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; T36: após 36 semanas de tratamento; GB: glóbulos brancos; Linf: linfócitos; Mon: monócitos; Neu: neutrófilos; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; \*p <0,05 versus T0; §p <0,05 versus T12; ###p <0,001 versus T24.

O estudo leucocitário não evidenciou diferenças significativas entre os grupos antes de iniciarem o tratamento. Após 12 semanas de tratamento com acitretina em monoterapia os doentes apresentaram um aumento significativo no número de glóbulos brancos (GB) e os doentes tratados com acitretina + NBUVB apresentaram uma diminuição significativa de GB e neutrófilos. No grupo de doentes tratados com acitretina + PUVA não se observaram alterações significativas (Tabela 5.5).

De referir ainda que, os doentes que prolongaram o tratamento com acitretina em monoterapia, apresentaram um aumento significativo de linfócitos após 36 semanas de tratamento, em comparação com T12 e T24 (Tabela 5.5).

Os níveis de PCR observados em sete doentes com psoríase às 12 semanas de tratamento com acitretina, acitretina + NBUVB ou acitretina + PUVA, às 24 e às 36 semanas de tratamento com acitretina em monoterapia são apresentados na figura 5.5. Após 36 semanas de tratamento observou-se uma diminuição significativa, comparando com o valor de PCR em T24 (Fig. 5.5).



**Figura 5.5** - Valores de proteína C-reativa (PCR) ao longo do tempo de tratamento.

#p <0,05 *versus* T24.

### 3.1.2 Discussão

Existem vários trabalhos que estudam o sucesso terapêutico do tratamento da acitretina em monoterapia ou em associação com a NBUVB ou com a PUVA em doentes com psoríase, no entanto apenas alguns descrevem os seus efeitos adversos.

Neste trabalho, a maioria dos doentes atingiu a remissão após 12 semanas de tratamento, tendo-se verificado que as terapêuticas com acitretina + NBUVB ou com acitretina + PUVA apresentaram maior eficácia do que a acitretina em monoterapia, como sugerem os valores de PASI (Tabela 4.1). Relativamente aos efeitos adversos descritos pelos doentes, destacaram-se as queixas de perda de cabelo e de pele/lábios secos (Fig. 5.1), já descritos noutros estudos (Ormerod *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011), e as dores musculares e articulares (Fig. 5.1).

A associação da psoríase com a disfunção renal tem sido descrita como consequência dos efeitos nefrotóxicos de diferentes terapêuticas utilizadas para tratar esta patologia (Soon e Ilchyshyn, 2005; Maza *et al.*, 2011). Alguns estudos referiram que os doentes com psoríase apresentam um aumento da excreção urinária de albumina (Cassano *et al.*, 2011; Dervisoglu *et al.*, 2012) e um aumento do nível sérico de creatinina (Dervisoglu *et al.*, 2012).

Os grupos de acitretina + NBUVB e acitretina + PUVA, que apresentaram valores de PASI mais elevados que o grupo de acitretina em monoterapia (Tabela 4.1), apresentaram também valores mais elevados de IMC (Tabela 5.3) e de ácido úrico (Tabela 5.1), o que sugere que os valores mais elevados de ácido úrico podem estar relacionados com a gravidade da doença ou com a obesidade. É reconhecido que os valores de ácido úrico podem aumentar em situações associadas a um elevado metabolismo celular e/ou disfunção renal.

O tratamento com acitretina em monoterapia ou em associação com PUVA durante 12 semanas não induziu toxicidade renal, uma vez que não foram observadas modificações nos valores de ureia, creatinina e de ácido úrico (Tabela 5.1). No entanto, a terapêutica de associação da acitretina + NBUVB, induziu um aumento significativo nos valores de creatinina, após 12 semanas de tratamento (Tabela 5.1), o que sugere que esta terapêutica pode induzir toxicidade renal. Na literatura não há qualquer descrição sobre este efeito.

Nos doentes que continuaram o tratamento com acitretina por mais 12 ou 24 semanas (24 ou 36 semanas de tratamento), não se observaram alterações nos parâmetros da função renal (Tabela 5.1), sugerindo que não existe um efeito cumulativo.

Como a psoríase está frequentemente associada à obesidade abdominal, diabetes *mellitus* tipo 2, resistência à insulina e dislipidemia (Gisoni *et al.*, 2007), foram estudados marcadores bioquímicos antes e ao longo do tratamento com acitretina em monoterapia ou em associação com NBUVB ou com PUVA. Não se observaram alterações nos níveis de colesterol e de TG após 12 semanas de terapêutica; no entanto, o valor de colesterol aumentou significativamente nos doentes que prolongaram o tratamento por mais 24 semanas, com acitretina em monoterapia (Tabela 5.3).

A obesidade promove um estado de inflamação crónica que pode contribuir para o desenvolvimento de outros componentes do síndrome metabólico (Lee e Pratley, 2005). A resistência à insulina na psoríase pode ocorrer como uma complicação da inflamação sistémica. Ucak *et al.* (2006) referiram que doentes com psoríase apresentam valores mais elevados de insulina em jejum, intolerância à glucose e diminuição da função das células beta, em comparação com um grupo controlo. No presente estudo verificámos que, em T0, os grupos de acitretina + NBUVB e acitretina + PUVA, com valores de PASI mais elevados, apresentavam valores mais elevados de glucose, HbA<sub>1C</sub>, insulina e HOMA-IR e valores mais baixos de QUICKI do que o grupo de acitretina (Tabela 5.3), o que, embora sem significado estatístico, sugere que a psoríase mais grave poderá estar associada a uma maior resistência à insulina. Boehncke *et al.* (2007) descreveram, de facto, uma correlação positiva entre a secreção de insulina e o valor de PASI. Neste trabalho, não observámos esta correlação, mas verificámos que o PASI se correlacionava positivamente com os níveis de glucose (Fig. 5.3).

Matsumoto *et al.* (2004) descreveram um caso de esteatohepatite não alcoólica, num doente obeso com psoríase, que apresentava resistência à insulina e um aumento nas enzimas hepáticas, TGO e TGP. Estes autores propuseram que as citocinas pró-inflamatórias, habitualmente elevadas nos doentes com psoríase, podem contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina, e que estes doentes apresentam um elevado risco de desenvolver doença de fígado gordo não alcoólico. No presente estudo, o grupo de acitretina + NBUVB apresentou valores mais elevados de TGP,  $\gamma$ -GT e ALP e o grupo de acitretina + PUVA apresentou valores mais elevados de  $\gamma$ -GT e ALP (Tabela 5.2). Estes resultados sugerem que os doentes com psoríase mais grave podem apresentar um risco mais elevado de desenvolver doença hepática não alcoólica. Vários estudos mostram que a prevalência de doença hepática não alcoólica, está significativamente aumentada em doentes com psoríase (Gisoni *et al.*, 2009; Miele *et al.*,

2009) e que, por isso, estes doentes devem ser monitorizados, avaliando o metabolismo da glucose e a função hepática.

Quando se analisaram os resultados após o tratamento, verificou-se que a terapêutica com acitretina em monoterapia ou associada com NBUVB ou com PUVA durante 12 semanas, não alterou o metabolismo da glucose. No entanto, os doentes que prolongaram o tratamento com acitretina em monoterapia apresentaram uma diminuição da sensibilidade à insulina (T36), como sugere o aumento dos níveis de insulina e de HOMA-IR (Tabela 5.3). Estes resultados são reforçados pelo estudo de um doente que foi tratado durante 66 semanas com acitretina e que desenvolveu diabetes *mellitus* (Fig. 5.4).

O mecanismo molecular pelo qual a acitretina altera a sensibilidade à insulina permanece por esclarecer. Os poucos estudos que existem na literatura sobre o efeito da acitretina no metabolismo da glucose são controversos. Alguns autores (Hartmann *et al.*, 1992) referiram que o tratamento com acitretina (50 mg/dia) durante 10 dias aumenta a sensibilidade à insulina endógena, enquanto outros autores referiram que o tratamento com acitretina durante 4 e 12 semanas aumenta a resistência à insulina (Corbetta *et al.*, 2006). Estes resultados, contraditórios, são semelhantes aos descritos para a isotretinoína. Krskova-Tybitanclova *et al.* (2008) sugeriram que o efeito da isotretinoína na homeostase da glucose depende da dose e da duração da terapêutica. Um tratamento de curta duração com isotretinoína aumenta a transcrição dos genes *PPAR* e *GLUT4* nos adipócitos, diminuindo a resistência à insulina no tecido adiposo (Krskova-Tybitanclova *et al.*, 2008). No entanto, um tratamento longo com isotretinoína está frequentemente associado à desregulação da homeostase da glucose (Koistinen *et al.*, 2001; Heliovaara *et al.*, 2007). Estes mecanismos não são atualmente conhecidos, no entanto, sabe-se que a tretinoína pode também servir como um ligando para o recetor nuclear,  $PPAR\beta/\delta$ , ativar o heterodímero  $PPAR/RXR$  e diminuir a resistência à insulina no tecido adiposo (Berry e Noy, 2009). É possível que a acitretina num tratamento de curta duração ative o heterodímero  $PPAR/RXR$  e aumente a sensibilidade à insulina. Num tratamento longo é possível que a acitretina, á semelhança do que é descrito para a tretinoína, aumente a glucocinase e a secreção de insulina no pâncreas (Cabrera-Valladares *et al.*, 1999) e aumente a transcrição do gene *PEPCK*, que catalisa um passo regulador da gluconeogénese, aumentando a produção de glucose (Lee *et al.*, 2002). A toxicidade mitocondrial da acitretina pode também explicar o aumento da resistência à insulina. De facto, os resultados apresentados no Capítulo II mostram que a acitretina diminui a capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial (Figs 2.1 e 2.2 e Tabela 2.1), por

inibição do ANT (Fig. 2.3), o que poderá diminuir a  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e contribuir assim para o desenvolvimento da diabetes *mellitus* tipo 2 (Kim *et al.*, 2010b). É possível que a acitretina ao inibir os componentes do ANT possa desencadear o desenvolvimento da diabetes *mellitus* tipo 2 nos doentes com psoríase tratados com acitretina. Um tratamento curto com acitretina pode melhorar a sensibilidade à insulina, reduzida nos doentes psoriáticos. No entanto, um tratamento longo pode reduzir a sensibilidade à insulina e, eventualmente, levar ao desenvolvimento da diabetes *mellitus*.

Relativamente à função hepática dos doentes com psoríase tratados com acitretina em monoterapia ou associada com PUVA ao longo de 12 semanas de tratamento, como já se referiu, não se observou toxicidade hepática (Tabela 5.2). No entanto, após 36 semanas de tratamento com acitretina em monoterapia verificou-se um efeito cumulativo de disfunção hepática, induzido pela acitretina. Pearce *et al.* (2006) também verificaram que após 24 semanas de tratamento com acitretina (25 e 50 mg/dia) os níveis das transaminases aumentam. Outros autores (Roeningk *et al.*, 1999) referiram também que a acitretina (25 - 75 mg/dia) induz um aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas, em cerca de 25% dos doentes, tendo já sido descrito um caso de insuficiência hepática fulminante após sobredosagem da acitretina (Leithead *et al.*, 2009). No entanto, continua por esclarecer o mecanismo de hepatotoxicidade. É possível que este efeito ocorra através de mecanismos independentes dos RARs, provavelmente devido à indução da MPT (Figs. 2.4 e 2.5) por interação com o ANT (Fig. 2.3), que poderá desencadear hepatotoxicidade e mecanismos de apoptose. Contudo, o efeito hepatotóxico é frequentemente reversível e as reações hepatotóxicas graves resultantes da terapêutica com acitretina são raras e idiossincráticas (Katz *et al.*, 1999).

De referir, ainda, que às 36 semanas de tratamento, o aumento da TGO também pode ser devido a disfunção muscular. De facto, 2 dos 7 doentes apresentaram valores de CK mais elevados e alguns doentes, como se referiu, apresentaram queixas de dores musculares (Fig. 5.1). Um estudo feito por Lister *et al.* (1996) referiu que a acitretina pode induzir miopatia, sugerindo toxicidade muscular.

A psoríase é, como já se referiu, caracterizada por um processo inflamatório, com infiltração leucocitária a nível da derme e da epiderme, estando o número de GB e de neutrófilos frequentemente aumentados nestes doentes. Antes do tratamento, não se observaram diferenças entre os grupos terapêuticos definidos (Tabela 5.5).

Durante o tratamento da psoríase observou-se uma redução progressiva das lesões, acompanhada de uma redução significativa nos valores de PASI, devido a uma redução do

processo inflamatório. De facto, nos 7 doentes em que se avaliou a PCR ao longo de 36 semanas de tratamento, verificou-se um decréscimo no seu valor (Fig. 5.5).

Os doentes com psoríase tratados com acitretina + PUVA ao longo de 12 semanas de tratamento não apresentaram nenhuma alteração no número de GB e de neutrófilos (Tabela 5.5). Em contraste com os resultados deste trabalho, foi descrito que a PUVA por si só leva à diminuição do número de neutrófilos em doentes expostos a esta terapêutica, como uma consequência da diminuição do processo inflamatório (Coimbra *et al.*, 2009). No nosso estudo, o grupo tratado com a acitretina + PUVA foi o que apresentou uma maior redução no PASI, sendo provável que o número de GB e de neutrófilos seja devido aos efeitos da acitretina, dado que o grupo de doentes tratados com acitretina em monoterapia apresentou um aumento no número de GB e neutrófilos (Tabela 5.5). De facto, vários estudos têm mostrado que a tretinoína regula a diferenciação neutrofílica através dos RARs (Lawson e Berliner, 1999; Evans, 2005), embora não existam estudos sobre o efeito de acitretina na regulação dos neutrófilos. Assim, é possível que a acitretina, de forma semelhante à tretinoína, também regule a diferenciação neutrofílica.

No grupo de acitretina + NBUVB o número de GB e neutrófilos diminuiu significativamente (Tabela 5.5), sendo também possível que a acitretina regule a produção de neutrófilos, embora em menor extensão.

Sabe-se que o processo inflamatório, nomeadamente os produtos de ativação leucocitária, induzem modificações oxidativas e/ou proteolíticas nos GV, que podem condicionar a remoção prematura dos GV (Gornicki, 2002; Rocha-Pereira *et al.*, 2004a; Coimbra *et al.*, 2012b). Estas modificações oxidativas estão associadas a um aumento de HbLM e a uma maior agregação da proteína banda 3, dois marcadores de lesão eritrocitária, bem como a um valor mais alto dos níveis de bilirrubina, um marcador de remoção dos GV. O estudo destes parâmetros mostrou uma tendência para uma diminuição dos valores de HbLM após 12 semanas de tratamento, sem modificação do perfil da proteína banda 3 (Tabela 5.4). Verificou-se, ainda, uma tendência para o aumento do número de GV após 12 semanas de tratamento com acitretina + PUVA ou com acitretina, associado a um aumento do número de reticulócitos, significativo para o tratamento com acitretina. Embora não se tenha verificado um aumento do número de GV nos doentes tratados com acitretina+ NBUVB, verificou-se também uma tendência para o aumento do número de reticulócitos (Tabela 5.4). Após 36 semanas de tratamento com acitretina (*versus* T12) observou-se um aumento no número de GV, Hb, Ht e reticulócitos. Estes resultados estão de acordo com Coimbra *et al.* (2012b), que descreveram que o tratamento

com PUVA ou com NBUVB é acompanhado por um aumento no número de eritrócitos e de reticulócitos, e por uma diminuição nos valores de HbLM e de agregados da proteína banda 3, o que se deve a um aumento da eritropoiese, como uma consequência de redução do processo inflamatório.

Sabe-se que a tretinoína altera a eritropoiese hepática no período fetal, aumentando a produção de EPO (Makita *et al.*, 2001; Evans, 2005), tendo também sido referido que altera a produção de EPO no adulto (Okano *et al.*, 1994). O aumento do número de GV observado pode ser devido não só à redução do processo inflamatório mas também a um aumento da produção de EPO.

Os resultados deste estudo sugerem, portanto, que os doentes com psoríase mais grave apresentam um risco aumentado de desenvolver DCV, diabetes e doenças hepáticas. A terapêutica com acitretina em monoterapia ou em associação com a PUVA por períodos curtos não apresenta toxicidade hepática, renal e muscular. No entanto, a monoterapia da acitretina por períodos longos sugere toxicidade hepática e muscular e também um aumento da resistência à insulina. A terapêutica com acitretina + NBUVB não afeta a função hepática e muscular, porém são necessários mais estudos para esclarecer a possível toxicidade renal.

### **3.2 Efeitos da isotretinoína individualmente ou em associação com a fototerapia de banda estreita nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris***

#### **3.2.1 Resultados**

Como descrito anteriormente, foram tratados cinco doentes (2 homens com acne *vulgaris* e três mulheres com psoríase *vulgaris*) com isotretinoína em monoterapia ou em associação com NBUVB (Tabela 4.2).

Os dois doentes com acne *vulgaris* foram tratados com isotretinoína em monoterapia durante 24 semanas: um doente apresentava acne pápulo-pustulosa ligeira e foi tratado com 8 mg isotretinoína/dia (doente 1) e o outro doente, com acne pápulo-pustulosa moderada foi tratado com 20 mg isotretinoína/dia (doente 2). Ambos os doentes atingiram remissão após as 24 semanas de tratamento.



Dos três doentes com psoríase *vulgaris*, um apresentava psoríase moderada (doente 3) e foi tratado com 20 mg de isotretinoína/dia durante 24 semanas; os outros dois doentes com psoríase grave (doentes 4 e 5) foram tratados com 20 mg isotretinoína/dia associada com NBUVB durante 12 semanas. O doente com psoríase moderada atingiu remissão após as 24 semanas de tratamento; os doentes com psoríase grave apresentaram uma diminuição no valor de PASI, no entanto, apenas um doente atingiu o estado de remissão (resultados não apresentados).

Relativamente à frequência de efeitos secundários descritos pelos cinco doentes tratados com isotretinoína verificou-se que após 12 semanas de tratamento, três dos cinco doentes referiram queda de cabelo (60%) e pele/lábios secos (60%). Dos três doentes que continuaram o tratamento por mais 12 semanas, todos referiram pele/lábios secos, 2 continuaram a referir queda de cabelo (67%), 1 dos doentes referiu ainda dores musculares (33%) e 2 dores articulares (67%). Apenas um doente referiu alterações de humor após as 24 semanas de tratamento (33%) (resultados não apresentados).

Não foram observadas alterações na função renal, os níveis do ácido úrico, ureia e creatinina, após 12 e 24 semanas de tratamento, apresentaram valores semelhantes aos observados antes de iniciar o tratamento (Tabela 5.6).

**Tabela 5.6** – Estudo da função renal, de acordo com a terapêutica instituída.

		Ácido Úrico (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
<b>Iso 1</b>	<i>T0</i>	2,5	33,0	0,7
	<i>T12</i>	3,2	34,0	0,8
	<i>T24</i>	3,0	30,0	0,6
<b>Iso 2</b>	<i>T0</i>	4,8	12,4	0,8
	<i>T12</i>	5,5	14,4	0,9
	<i>T24</i>	5,7	18,9	0,9
<b>Iso 3</b>	<i>T0</i>	2,5	23,0	0,6
	<i>T12</i>	2,5	25,0	0,7
	<i>T24</i>	2,3	24,0	0,6
<b>ReNBUVB 4</b>	<i>T0</i>	3,7	7,1	0,7
	<i>T12</i>	3,7	9,7	0,7
<b>ReNBUVB 5</b>	<i>T0</i>	4,9	8,4	0,6
	<i>T12</i>	4,9	8,6	0,7

Os resultados são apresentados como valores médios de cada doente; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; Iso 1: doente 1; Iso 2: doente 2; Iso 3: doente 3; ReNBUVB 4: doente 4; ReNBUVB 5: doente 5.

Relativamente à função hepática verificou-se que todos os doentes apresentaram um aumento nos níveis de TGO com o tratamento (T12 e T24). No entanto, os níveis de TGP só aumentaram para os doentes 2, 4 e 5, após 12 semanas de tratamento. Os níveis de  $\gamma$ -GT também apresentaram um aumento nos três doentes que estiveram sob tratamento com isotretinoína durante 24 semanas (T24) e nos dois doentes que foram tratados com isotretinoína em associação com NBUVB, após 12 semanas de tratamento. Estes dois doentes apresentaram também um aumento na ALP, no final do tratamento (Tabela 5.7).

**Tabela 5.7** – Estudo da função hepática, de acordo com a terapêutica instituída.

		<b>TGP (U/L)</b>	<b>TGO (U/L)</b>	<b><math>\gamma</math>-GT (U/L)</b>	<b>ALP (U/L)</b>
<b>Iso 1</b>	<i>T0</i>	10	8	20	30
	<i>T12</i>	9	10	19	29
	<i>T24</i>	10	11	22	28
<b>Iso 2</b>	<i>T0</i>	37	21	36	67
	<i>T12</i>	40	22	38	67
	<i>T24</i>	39	38	39	59
<b>Iso 3</b>	<i>T0</i>	12	17	15	71
	<i>T12</i>	4	17	14	57
	<i>T24</i>	11	19	16	48
<b>ReNBUVB 4</b>	<i>T0</i>	8	12	12	53
	<i>T12</i>	9	14	15	55
<b>ReNBUVB 5</b>	<i>T0</i>	12	19	9	40
	<i>T12</i>	19	21	12	71

Os resultados são apresentados como valores médios de cada doente; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética;  $\gamma$ -GT: gama-glutamil-transferase; ALP: fosfatase alcalina; Iso 1: doente 1; Iso 2: doente 2; Iso 3: doente 3; ReNBUVB 4: doente 4; ReNBUVB 5: doente 5.

Relativamente ao estudo do metabolismo da glucose, observou-se que os doentes 1, 2, 4 e 5 apresentaram níveis de glucose mais elevados após 12 e 24 semanas de tratamento, e que estes valores se mantiveram por mais 12 semanas, no caso dos doentes 1 e 2. Não se observaram alterações nos níveis de HbA<sub>1C</sub>. As alterações nos níveis de insulina, de HOMA-IR e de QUICKI são inconsistentes. Após 12 semanas de tratamento, os doentes 1, 3 e 5 apresentaram uma diminuição nos níveis de insulina e no HOMA-IR e um aumento

no QUICKI, enquanto que os doentes 2 e 4 apresentaram um aumento nos níveis de insulina, no HOMA-IR e uma diminuição no QUICKI. Após 24 semanas de tratamento com isotretinoína em monoterapia, todos os doentes (1, 2 e 3) apresentaram um aumento nos níveis de insulina e HOMA-IR, e uma diminuição no QUICKI (Tabela 5.8).

No estudo do perfil lipídico, observámos que as modificações nos níveis de colesterol eram inconsistentes; para os níveis de TG observou-se um aumento nos doentes tratados com isotretinoína em monoterapia e uma redução nos doentes tratados com isotretinoína em associação com NBUVB (Tabela 5.8).

Analisando os resultados de acordo com os parâmetros eritrocitários, verificou-se que após 12 e 24 semanas de tratamento com isotretinoína em monoterapia ocorreu uma redução no número de GV, concentração de Hb e no valor de Ht, nos doentes 1, 3 e 4, que foi acompanhada de um aumento no número de reticulócitos e alterações no perfil da proteína banda 3, habitualmente observados em caso de lesão oxidativa das células (aumento de agregados da proteína banda 3 e redução dos fragmentos da proteína banda 3). Os doentes tratados durante 12 semanas com isotretinoína em associação com NBUVB apresentaram maiores modificações, associadas, ainda, a um aumento no valor de HbLM (Tabela 5.9).

Observou-se, ainda, uma redução no valor de GB e de neutrófilos no final do tratamento (isotretinoína em monoterapia ou em associação com NBUVB), exceto para um dos doentes em estudo (Tabela 5.10).

**Tabela 5.8** – Estudo lipídico e metabolismo da glucose, de acordo com a terapêutica instituída.

		<b>IMC</b>	<b>Glucose (mg/dL)</b>	<b>HbA<sub>1C</sub> (mg/dL)</b>	<b>Insulina (<math>\mu</math>U/mL)</b>	<b>HOMA-IR</b>	<b>QUICKI</b>	<b>Col (mg/dL)</b>	<b>TG (mg/dL)</b>
<b>Iso 1</b>	<i>T0</i>	21,43	62	4,8	12,86	1,97	0,34	152	84
	<i>T12</i>	20,53	77	5,0	4,11	0,78	0,40	151	88
	<i>T24</i>	19,93	74	4,7	15,48	2,83	0,33	185	110
<b>Iso 2</b>	<i>T0</i>	28,71	81	5,6	10,29	2,05	0,34	181	65
	<i>T12</i>	27,46	92	5,5	12,21	2,77	0,33	201	140
	<i>T24</i>	26,53	96	5,8	20,05	4,75	0,30	209	107
<b>Iso 3</b>	<i>T0</i>	19,49	107	4,8	23,08	6,10	0,29	309	65
	<i>T12</i>	19,49	82	5,0	4,50	0,91	0,39	301	116
	<i>T24</i>	19,49	71	4,9	6,50	1,15	0,37	303	169
<b>ReNBUVB 4</b>	<i>T0</i>	22,59	76	5,3	10,48	1,97	0,34	209	107
	<i>T12</i>	23,39	80	4,9	10,76	2,12	0,34	249	93
<b>ReNBUVB 5</b>	<i>T0</i>	24,39	70	5,1	6,77	1,17	0,37	175	79
	<i>T12</i>	23,62	82	4,9	4,92	1,00	0,38	172	43

Os resultados são apresentados como valores médios de cada doente; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; IMC: índice de massa corporal; HbA<sub>1C</sub>: hemoglobina glicada; HOMA-IR: resistência à insulina pelo modelo de avaliação da homeostase; QUICKI: índice de verificação quantitativa da sensibilidade à insulina; Col: colesterol; TG: triglicéridos; Iso 1: doente 1; Iso 2: doente 2; Iso 3: doente 3; ReNBUVB 4: doente 4; ReNBUVB 5: doente 5.

**Tabela 5.9** - Estudo eritrócitário, de acordo com a terapêutica instituída.

	Iso 1			Iso 2			Iso 3			ReNBUVB 4		ReNBUVB 5	
	T0	T12	T24	T0	T12	T24	T0	T12	T24	T0	T12	T0	T12
<b>GV (x 10<sup>12</sup>/L)</b>	4,36	4,49	4,27	4,78	4,85	4,84	4,56	4,14	4,07	5,05	4,16	4,58	4,64
<b>Hematócrito (%)</b>	41,6	41,7	39,1	43,4	43,6	44,0	45,1	41,0	40,0	47,7	39,9	42,0	44,1
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,6	13,7	13,1	14,3	14,4	14,3	14,5	12,8	13,3	16,8	12,9	14,2	14,4
<b>VGM (fL)</b>	95,4	92,9	91,6	90,0	89,9	90,9	98,8	99,0	98,3	94,5	95,9	91,7	95,0
<b>HGM (pg)</b>	31,2	30,5	30,7	29,9	29,7	29,5	31,8	30,9	32,7	33,3	31,0	31,0	31,0
<b>CHGM (g/dL)</b>	32,7	32,9	33,5	32,9	33,0	32,5	32,2	31,2	33,3	35,2	32,3	33,8	32,7
<b>RDW (%)</b>	13,9	13,4	13,1	14,0	14,2	14,3	13,8	13,5	13,3	13,3	13,4	12,8	13,7
<b>Reticulócitos (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	17,44	31,43	55,51	19,21	24,25	53,24	13,68	41,40	36,63	25,25	29,12	9,16	37,12
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	0,21	0,34	0,40	1,50	1,20	0,80	0,50	0,50	0,30	0,50	0,60	0,90	0,70
<b>HbLM (x 10<sup>-4</sup>%)</b>	70	50	130	20	190	70	77	260	23	59	90	51	89
<b>Perfil Banda 3 (%)</b>													
<b>HMWAg</b>	27,42	26,58	33,95	10,95	12,19	11,87	4,61	8,34	7,22	14,56	17,82	10,47	21,95
<b>Bd3</b>	62,66	58,91	59,52	51,40	51,67	51,44	69,68	65,44	66,54	74,17	74,30	73,81	72,85
<b>Pfrag</b>	9,92	14,51	6,53	37,54	36,45	36,68	25,71	26,22	26,24	11,28	7,88	15,72	5,19

Os resultados são apresentados como valores médios de cada doente; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; GV: glóbulos vermelhos; VGM: volume globular médio; HGM: hemoglobina globular média; CHGM: concentração HGM; RDW: coeficiente de variação eritrócitária; HbLM: hemoglobina ligada à membrana; HMWAg: agregados de alto peso molecular da proteína banda 3; Bd3: Monómeros da proteína banda 3; Pfrag: fragmentos proteolíticos da proteína banda 3; Iso 1: doente 1; Iso 2: doente 2; Iso 3: doente 3; ReNBUVB 4: doente 4; ReNBUVB 5: doente 5.

**Tabela 5.10** – Contagem total e diferencial de leucócitos, de acordo com a terapêutica instituída.

	Iso 1			Iso 2			Iso 3			ReNBUVB 4		ReNBUVB 5	
	<i>T0</i>	<i>T12</i>	<i>T24</i>	<i>T0</i>	<i>T12</i>	<i>T24</i>	<i>T0</i>	<i>T12</i>	<i>T24</i>	<i>T0</i>	<i>T12</i>	<i>T0</i>	<i>T12</i>
<b>GB</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	5,55	6,91	6,13	8,69	8,19	8,07	10,14	3,22	4,73	9,84	3,37	4,66	3,97
<b>Linf</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	2,48	2,66	2,74	1,59	2,61	2,28	2,24	1,58	1,78	4,55	2,45	1,14	0,59
<b>Mon</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,56	0,50	0,48	0,68	0,66	0,51	0,50	0,31	0,37	0,60	0,36	0,31	0,37
<b>Neu</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	2,37	2,61	2,76	6,00	4,58	4,97	7,31	1,16	2,40	4,59	0,51	3,00	2,76
<b>Eos</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,10	0,06	0,09	0,38	0,29	0,27	0,06	0,17	0,12	0,07	0,04	0,19	0,18
<b>Bas</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,04	0,08	0,06	0,04	0,05	0,04	0,03	0,01	0,05	0,03	0,01	0,02	0,07

Os resultados são apresentados como valor médio de cada doente; T0: antes de iniciar a terapêutica; T12: após 12 semanas de tratamento; T24: após 24 semanas de tratamento; GB: glóbulos brancos; Linf: linfócitos; Mon: monócitos; Neu: neutrófilos; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; Iso 1: doente 1; Iso 2: doente 2; Iso 3: doente 3; ReNBUVB 4: doente 4; ReNBUVB 5: doente 5.

### 3.2.2 Discussão

Existem poucos estudos acerca dos efeitos adversos do tratamento da psoríase *vulgaris* e da acne *vulgaris* com baixas doses de isotretinoína por períodos longos e em associação com a NBUVB. No presente trabalho, os doentes referiram algumas queixas, nomeadamente perda de cabelo e pele/lábios secos e dores articulares (resultados não apresentados), semelhante ao que tem sido descrito na literatura (Purdy e de Berker, 2006; Goodfield *et al.*, 2010). Estes efeitos adversos foram também observados nos doentes sob terapêutica com acitretina (Fig. 5.1) e são reversíveis após o término da terapêutica.

Não se verificaram alterações de toxicidade renal, como sugerem os valores de creatinina, ureia e ácido úrico após o tratamento (Tabela 5.6). Pouco tem sido descrito sobre a toxicidade renal da terapêutica com isotretinoína, contudo existem alguns casos descritos na literatura de alterações na função renal (Pavese *et al.*, 1997; van Oers *et al.*, 2000), que estão associados a doses mais altas de isotretinoína.

Verificou-se que no final do tratamento todos os doentes apresentaram um ligeiro aumento nos valores de TGO e de  $\gamma$ -GT (Tabela 5.7), que pode estar relacionado com uma alteração da função hepática (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011). Contudo, o aumento da TGO pode também ser devido a situações de disfunção muscular e a casos de miopatias, de acordo com o referido na literatura (Chroni *et al.*, 2010).

Observou-se que 4 dos 5 doentes apresentaram no final do tratamento um aumento do valor de glucose, apresentando todos os outros parâmetros do metabolismo da glucose modificações inconsistentes. No entanto, é de referir que após as 24 semanas de terapêutica todos os doentes apresentaram um aumento nos níveis de insulina e HOMA-IR, acompanhado por uma diminuição no QUICKI (Tabela 5.8), o que poderá ser indicativo de desenvolvimento de resistência à insulina, semelhante ao que foi descrito para os doentes tratados com acitretina (Tabela 5.3).

Relativamente ao estudo do perfil lipídico, verificou-se que as alterações dos níveis de colesterol eram inconsistentes, observando-se no entanto um aumento dos níveis de TG nos doentes tratados com isotretinoína em monoterapia (Tabela 5.8), o que está de acordo com vários estudos que referem que os TG são o principal parâmetro do perfil lipídico a ser alterado durante a terapêutica com isotretinoína (Goodfield *et al.*, 2010; Sardana e Garg, 2011).

Quando se analisaram os parâmetros eritrocitários, verificou-se que os doentes sob terapêutica com isotretinoína apresentaram uma diminuição no número de GV, de Ht e dos

níveis de Hb, em 3 dos 5 doentes, e que estas alterações foram acompanhadas por alterações do perfil da proteína banda 3, nomeadamente pelo aumento dos agregados da proteína banda 3 e pela diminuição dos fragmentos proteolíticos da proteína banda 3 (Tabela 5.9). Esta alteração no perfil da proteína banda 3 esteve também associada a um aumento no valor de HbLM nos doentes tratados com isotretinoína em associação com NBUVB, o que se deve provavelmente a uma lesão oxidativa dos GV. O aumento de reticulócitos observado em todos os doentes (Tabela 5.9) pode dever-se também ao facto da isotretinoína poder estimular a eritropoiese, por regular os níveis de EPO, de forma semelhante ao que foi descrito para o caso da acitretina (Tabela 5.4). No entanto, torna-se necessário quantificar os níveis de EPO em estudos posteriores para clarificar estes efeitos.

Os resultados deste trabalho mostraram também uma diminuição do número de GB e de neutrófilos em 4 dos 5 doentes (Tabela 5.10), que deve ser uma consequência do tratamento, por diminuição do estado inflamatório, quer na acne quer na psoríase. No entanto, os efeitos da isotretinoína a nível dos GB, também se podem dever à sua função a nível da regulação da produção dos neutrófilos, uma vez que se sabe que os RA têm a capacidade de regular a sua diferenciação (Lawson e Berliner, 1999; Evans, 2005).

Em conclusão, os resultados deste trabalho sugerem que o tratamento com isotretinoína em monoterapia ou em associação com a NBUVB apresenta uma elevada eficácia terapêutica no tratamento da acne e da psoríase. Além disso, esta terapêutica, por períodos curtos, não apresenta toxicidade hepática e renal; no entanto, poderá desencadear mecanismos de lesão eritrocitária. Por outro lado, a monoterapia da isotretinoína por períodos de tratamento longos sugere toxicidade hepática e muscular e aumento da resistência à insulina.



# **Capítulo VI**

## **Discussão geral e conclusões**



A associação terapêutica dos retinoides com os antiestrogénios tem sido estudada com o objetivo de minimizar os efeitos adversos e aumentar a eficácia terapêutica de cada composto individualmente. No entanto, pouco se conhece acerca dos mecanismos de ação farmacológica e toxicológica da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios. Por outro lado, os efeitos secundários destes dois retinoides em monoterapia ou em associação com irradiação NBUVB ou com PUVA no tratamento de doenças inflamatórias da pele requerem uma caracterização adequada que permita a sua utilização de um modo seguro e eficaz.

Este trabalho incluiu estudos mitocondriais, estudos em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama ER(+), e estudos de citogenotoxicidade em culturas de sangue, em que se avaliaram os efeitos destes retinoides, em associação com o TAM ou com o OHTAM. Foram também realizados estudos de citogenotoxicidade, estudos hematológicos e bioquímicos em doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris* tratados com a acitretina ou com a isotretinoína em monoterapia ou em associação com irradiação NBUVB ou com PUVA.

Os estudos mitocondriais demonstraram que a acitretina e a isotretinoína (5 nmoles/mg proteína ou 5  $\mu\text{M}$ ) diminuíram a produção de energia, como é evidenciado pela diminuição do estado 3 da respiração e dos níveis de ATP, e pelo aumento do tempo necessário para a fosforilação de ADP, sem alteração do sistema transportador de eletrões nem do potencial de membrana mitocondrial. Verificámos, ainda, que a acitretina e a isotretinoína (5 nmoles/mg proteína ou 2,5  $\mu\text{M}$ ) aumentaram a sensibilidade das mitocôndrias hepáticas para a MPT, como é evidenciado pela despolarização do  $\Delta\psi$  dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e pela libertação de  $\text{Ca}^{2+}$ . A MPT induzida pela acitretina e pela isotretinoína ocorreu devido, provavelmente, à interação com o ANT, tendo em conta que os ligandos do ANT (ADP e ATP) inibiram a MPT, o que também está de acordo com os efeitos obtidos por titulação com o CAT. O facto da acitretina e da isotretinoína diminuírem o conteúdo de ANT pode não só explicar a indução da MPT, mas também a diminuição da capacidade fosforilativa mitocondrial induzida por estes retinoides, para concentrações até 5  $\mu\text{M}$ . Estes efeitos constituem um potencial mecanismo de morte celular por apoptose e necrose, e de toxicidade em células do fígado. Verificámos também que o TAM e o OHTAM inibiram a MPT induzida pela acitretina e pela isotretinoína, provavelmente por impedirem as mudanças conformacionais do ANT promovidas por estes dois retinoides. Estes resultados sugerem que o TAM e o OHTAM podem contribuir para diminuir a toxicidade induzida pela acitretina e pela isotretinoína. De referir também

que as associações do TAM ou do OHTAM (10 nmoles/mg proteína ou 10  $\mu\text{M}$ ) com a acitretina ou com a isotretinoína não induziram alterações significativas no sistema fosforilativo e no sistema transportador de elétrons, comparativamente aos retinoides individualmente, indicando que estes antiestrogénios não potenciam os efeitos toxicológicos da acitretina e da isotretinoína. No entanto, nas associações com o TAM foi observada uma estimulação do estado 4, que se deve, possivelmente, à permeabilização da IMM a prótons induzida pelo TAM, sugerindo que este antiestrogénio tem uma toxicidade superior ao OHTAM.

Por outro lado, verificou-se também que a acitretina (5  $\mu\text{M}$ ) e a isotretinoína (0,5  $\mu\text{M}$ ) associadas com o TAM ou com o OHTAM (5  $\mu\text{M}$ ) potenciaram sinergisticamente o efeito antiproliferativo de cada composto individualmente em linhas celulares de melanoma e de cancro da mama, com um efeito mais marcado na linha celular de melanoma. Contudo, o efeito antiproliferativo da acitretina ou da isotretinoína em associação com o TAM ou com o OHTAM na linha celular de melanoma, não ocorreu devido a mecanismos de morte celular, uma vez que o número de células não viáveis, os valores de LDH e o número de células apoptóticas, mantiveram os valores semelhantes às condições controlo. Estas associações induziram mecanismos de paragem do ciclo celular na fase G0/G1, sugerindo que estes efeitos antiproliferativos não se devem a efeitos mitocondriais, mas provavelmente a mecanismos dependentes dos RARs e dos ERs. De referir que as associações da acitretina e da isotretinoína com o OHTAM apresentaram um maior efeito antiproliferativo, do que com o TAM, o que sugere que as associações com o OHTAM poderão ter uma maior eficácia no tratamento do melanoma.

Relativamente aos estudos de citogenotoxicidade *in vitro* verificou-se que a acitretina e a isotretinoína em concentrações equivalente ou superiores às encontradas a nível sérico (1,2 – 20  $\mu\text{M}$ ) com doses terapêuticas, não apresentaram efeitos genotóxicos, como sugerem os valores da frequência de MN e os valores de TL e TM. Além disso, a associação da acitretina com os antiestrogénios diminuiu o potencial genotóxico do TAM, e em menor extensão o do OHTAM. Contudo, tanto a associação da acitretina com o TAM como com o OHTAM apresentaram um efeito citostático/citotóxico, e induziram um aumento de células apoptóticas e necróticas que se acentuou com a associação dos retinoides, particularmente com o TAM.

Os estudos de genotoxicidade *in vivo* também demonstraram que a acitretina (em monoterapia ou em associação com a NBUVB) ou a isotretinoína (em monoterapia), durante 12 semanas não induziram efeitos genotóxicos. No entanto, são necessários mais

estudos para esclarecer os efeitos genotóxicos da terapêutica com acitretina + PUVA e com isotretinoína + NBUVB.

Quando se analisaram os parâmetros bioquímicos dos doentes com psoríase *vulgaris* observou-se que a acitretina em monoterapia ou associada com a PUVA ao longo de 12 semanas de tratamento, não induziu toxicidade renal, tal como se pode observar pelos níveis de creatinina, ureia e ácido úrico, que eram semelhantes aos valores basais. Contudo, nos doentes tratados com acitretina + NBUVB verificou-se um aumento significativo nos níveis de creatinina, o que poderá ser indicativo de toxicidade renal.

Relativamente ao estudo dos parâmetros do metabolismo da glucose, não se observaram alterações significativas, após 12 semanas de terapêutica com acitretina em monoterapia ou associada com NBUVB ou com PUVA. No entanto, observou-se um aumento dos níveis de insulina, do índice HOMA-IR e uma diminuição dos valores QUICKI após 36 semanas de tratamento com acitretina, o que sugere uma diminuição da sensibilidade à insulina. Estas modificações foram reforçadas por um caso clínico que observámos de um doente com psoríase *vulgaris* que desenvolveu diabetes *mellitus* após 66 semanas de tratamento com acitretina. Assim, é possível que a acitretina num tratamento a curto prazo diminua a resistência à insulina, enquanto a longo prazo tenha um efeito contrário, aumentando a resistência à insulina.

Verificámos, ainda, que a acitretina em monoterapia ou associada com PUVA ao longo de 12 semanas, não induziu toxicidade hepática, como sugerem os valores de TGP, TGO,  $\gamma$ -GT e ALP, que eram semelhantes ao valor basal. Contudo, observaram-se valores significativamente aumentados de TGO e  $\gamma$ -GT, após 36 semanas de tratamento com acitretina, o que pode sugerir que a terapêutica prolongada com acitretina (24 ou 36 semanas), possa induzir toxicidade hepática. De referir, no entanto, que os níveis aumentados de TGO podem também ser devidos à disfunção muscular, uma vez que os níveis de CK também aumentaram, após 36 semanas de tratamento. Esta hipótese está de acordo com as dores musculares descritas pelos doentes, sugerindo que o tratamento da acitretina a longo prazo poderá induzir toxicidade muscular. No entanto, é de referir que, as lesões hepáticas, musculares e a resistência à insulina, podem ser uma consequência da diminuição da capacidade fosforilativa e da MPT induzida pela acitretina, como consequência da diminuição do conteúdo de ANT.

O estudo hematológico sugeriu que a terapêutica com acitretina poderá estimular a eritropoiese, uma vez que se observou um aumento significativo no valor de reticulócitos,

após 24 semanas de tratamento, o que pode estar relacionado com a redução do processo inflamatório.

No estudo bioquímico e hematológico dos doentes sob terapêutica com isotretinoína, verificou-se que, em monoterapia ou em associação com a NBUVB, este retinoide não induziu toxicidade renal, nem alterações no metabolismo da glucose a curto prazo; no entanto, a longo prazo induziu resistência à insulina, como sugere o aumento dos níveis de insulina, HOMA-IR e a diminuição do QUICKI. Verificou-se também um aumento nos valores de TGO, que pode dever-se a alterações da função muscular e hepatotoxicidade, como consequência das disfunções mitocondriais induzidas pela isotretinoína.

Por outro lado, a isotretinoína pode induzir lesões eritrocitárias, como evidencia a redução observada no número de GV, e as alterações oxidativas do perfil da proteína banda 3, associadas a um aumento do número de reticulócitos, que pode resultar de uma resposta fisiológica, por aumento dos níveis de EPO ou pela redução do processo inflamatório.

Em conclusão, este estudo demonstra que a acitretina ou a isotretinoína associadas com os antiestrogénios apresentam uma potencial aplicação na quimioprevenção do melanoma e do cancro da mama, por aumentarem sinergicamente o efeito antiproliferativo de cada composto individualmente; sendo a associação com o OHTAM a que tem uma maior eficácia no tratamento do melanoma. O uso de acitretina ou de isotretinoína associadas com o OHTAM poderá ser uma estratégia terapêutica eficaz por ultrapassar a toxicidade dos retinoides, sem, no entanto, apresentar efeitos genotóxicos e com menos efeitos toxicológicos comparativamente à associação com o TAM.

Por outro lado, os estudos em doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris* sugerem que a acitretina e a isotretinoína em monoterapia ou em associação com NBUVB ou com PUVA não induzem alterações significativas nos biomarcadores clínicos. Contudo, uma terapêutica prolongada com acitretina ou com isotretinoína poderá induzir toxicidade hepática, muscular e resistência à insulina, provavelmente como consequência das disfunções mitocondriais induzidas por estes retinoides.

## Perspetivas futuras

Este estudo permitiu fornecer informações sobre a base molecular subjacente aos efeitos farmacológicos e toxicológicos da acitretina e da isotretinoína individualmente ou em associação com os antiestrogénios na quimioprevenção do cancro; bem como a utilização clínica da acitretina e da isotretinoína em monoterapia ou em associação com a NBUVB ou com a PUVA no tratamento de doenças inflamatórias da pele, visando a sua utilização futura com uma maior eficácia e menor toxicidade do que os regimes terapêuticos utilizados nas doenças inflamatórias da pele, ou na quimioprevenção utilizados nas doenças neoplásicas.

Os resultados deste trabalho sugerem que a associação terapêutica da acitretina ou da isotretinoína com os antiestrogénios poderá constituir uma promissora associação na quimioprevenção de doenças neoplásicas, nomeadamente do cancro da mama e da pele, por potenciarem os efeitos antiproliferativos dos compostos individualmente; no entanto, não se sabe se estes efeitos antiproliferativos se devem a mecanismos dependentes dos ERs e dos RARs. Neste sentido, deveriam ser estudados os efeitos antiproliferativos destes compostos em diferentes linhas celulares de cancro da mama e melanoma com diferentes expressões dos vários subtipos e isoformas dos ERs e RARs.

Da avaliação dos parâmetros bioquímicos dos doentes com psoríase *vulgaris* e acne *vulgaris* tratados com acitretina ou isotretinoína, surge a importância do acompanhamento de doentes sob terapêutica com estes retinoides, de forma a evitar o desenvolvimento da toxicidade hepática, muscular e resistência à insulina.

Deste estudo emerge também a proposta de estudar o efeito dos retinoides na produção de EPO, determinando os níveis de EPO em doentes sob terapêutica da acitretina e da isotretinoína, e por último estudar os produtos de ativação leucocitária em doentes tratados com estes retinoides.





# **Capítulo VII**

## **Bibliografía**



- Alakhras, R. S., Stephanou, G., Demopoulos, N. A., Nikolaropoulos, S. S. (2011). Genotoxicity of all-trans retinoic acid (ATRA) and its steroidal analogue EA-4 in human lymphocytes and mouse cells in vitro. *Cancer Lett* 306 (1): 15-26.
- AlDosari, A., McDonald, J., Olson, B., Noblitt, T., Li, Y., Stookey, G. (1996). Influence of benzylisothiocyanate and 13-cis-retinoic acid on micronucleus formation induced by benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 352 (1-2): 1-7.
- Alexandrescu, D. T., Riordan, N. H., Ichim, T. E., Kauffman, C. L., Kabigting, F., Dutton, C. T., Dasanu, C. A. (2011). On the missing link between inflammation and cancer. *Dermatol Online J* 17 (1): 10.
- Amichai, B., Shemer, A., Grunwald, M. H. (2006). Low-dose isotretinoin in the treatment of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 54 (4): 644-646.
- Anforth, R., Blumetti, T. C., Mohd Affandi, A., Fernandez-Penas, P. (2012). Systemic retinoid therapy for chemoprevention of nonmelanoma skin cancer in a patient treated with vemurafenib. *J Clin Oncol* 30 (19): e165-167.
- Anstey, A., Hawk, J. L. (1997). Isotretinoin-PUVA in women with psoriasis. *Br J Dermatol* 136 (5): 798-799.
- Arce, F., Gatjens-Boniche, O., Vargas, E., Valverde, B., Diaz, C. (2005). Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2. *Cancer Lett* 229 (2): 271-281.
- Archier, E., Devaux, S., Castela, E., Gallini, A., Aubin, F., Le Maitre, M., Aractingi, S., Bachelez, H., Cribier, B., Joly, P., Jullien, D., Misery, L., Paul, C., Ortonne, J. P., Richard, M. A. (2012). Carcinogenic risks of psoralen UV-A therapy and narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26 (3): 22-31.
- Armstrong, J. L., Redfern, C. P., Veal, G. J. (2005). 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 69 (9): 1299-1306.
- Ballow, M., Wang, X., Xiang, S., Allen, C. (2003). Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol* 23 (1): 46-54.
- Balmer, J. E., Blomhoff, R. (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43 (11): 1773-1808.

## Bibliografia

- Bardon, S., Vignon, F., Derocq, D., Rochefort, H. (1984). The antiproliferative effect of tamoxifen in breast cancer cells: mediation by the estrogen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 35 (2-3): 89-96.
- Bastien, J., Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1-16.
- Bastos, J., Barros, H., Lunet, N. (2007). Breast cancer mortality trend in Portugal (1955-2002). *Acta Med Port* 20 (2): 139-144.
- Battershill, J. M., Burnett, K., Bull, S. (2008). Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis* 23 (6): 423-437.
- Baysal, V., Sahin, F., Erel, A., Oruk, S., Menevse, S. (2003). The effect of PUVA treatment on sister chromatid exchange (SCE) values in psoriasis vulgaris patients. *J Dermatolog Treat* 14 (1): 22-25.
- Beguerie, J. R., Xingzhong, J., Valdez, R. P. (2010). Tamoxifen vs. non-tamoxifen treatment for advanced melanoma: a meta-analysis. *Int J Dermatol* 49 (10): 1194-1202.
- Beland, F. A., McDaniel, L. P., Marques, M. M. (1999). Comparison of the DNA adducts formed by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen in vivo. *Carcinogenesis* 20 (3): 471-477.
- Benner, S. E., Lippman, S. M., Wargovich, M. J., Lee, J. J., Velasco, M., Martin, J. W., Toth, B. B., Hong, W. K. (1994). Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral pre-malignancy. *Int J Cancer* 59 (4): 457-459.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79 (4): 1127-1155.
- Bernardi, P., von Stockum, S. (2012). The permeability transition pore as a Ca<sup>2+</sup> release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium* 52 (1): 22-27.
- Berry, D. C., Noy, N. (2009). All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 29 (12): 3286-3296.
- Bianchi, B., Campolmi, P., Mavilia, L., Danesi, A., Rossi, R., Cappugi, P. (2003). Monochromatic excimer light (308 nm): an immunohistochemical study of cutaneous T cells and apoptosis-related molecules in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17 (4): 408-413.

- Blaner, W. S. (2001). Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45 (5): S129-135.
- Boehm, N., Samama, B., Cribier, B., Rochette-Egly, C. (2004). Retinoic-acid receptor beta expression in melanocytes. *Eur J Dermatol* 14 (1): 19-23.
- Boehncke, S., Thaci, D., Beschmann, H., Ludwig, R. J., Ackermann, H., Badenhoop, K., Boehncke, W. H. (2007). Psoriasis patients show signs of insulin resistance. *Br J Dermatol* 157 (6): 1249-1251.
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26 (1): 93-100.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfueller, S., Speit, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20 (4): 245-254.
- Brenner, C., Moulin, M. (2012). Physiological roles of the permeability transition pore. *Circ Res* 111 (9): 1237-1247.
- Brewster, A. M., Lee, J. J., Clayman, G. L., Clifford, J. L., Reyes, M. J., Zhou, X., Sabichi, A. L., Strom, S. S., Collins, R., Meyers, C. A., Lippman, S. M. (2007). Randomized trial of adjuvant 13-cis-retinoic acid and interferon alfa for patients with aggressive skin squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 25 (15): 1974-1978.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (4): C817-833.
- Brown, K. (2009). Is tamoxifen a genotoxic carcinogen in women? *Mutagenesis* 24 (5): 391-404.
- Brtko, J. (2007). Role of retinoids and their cognate nuclear receptors in breast cancer chemoprevention. *Cent Eur J Public Health* 15 (1): 3-6.
- Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H., Rochette-Egly, C. (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *Embo J* 28 (1): 34-47.
- Bushue, N., Wan, Y. J. (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (13): 1285-1298.

## Bibliografia

- Butler, W. B., Kelsey, W. H. (1988). Effects of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen on synchronized cultures of the human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res Treat* 11 (1): 37-43.
- Butler, W. B., Fontana, J. A. (1992). Responses to retinoic acid of tamoxifen-sensitive and -resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 52 (22): 6164-6167.
- Cabrera-Valladares, G., German, M. S., Matschinsky, F. M., Wang, J., Fernandez-Mejia, C. (1999). Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets. *Endocrinology* 140 (7): 3091-3096.
- Cardoso, C. M., Custodio, J. B., Almeida, L. M., Moreno, A. J. (2001). Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 176 (3): 145-152.
- Cardoso, C. M., Almeida, L. M., Custodio, J. B. (2002a). 4-Hydroxytamoxifen is a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition. *Mitochondrion* 1 (6): 485-495.
- Cardoso, C. M., Moreno, A. J., Almeida, L. M., Custodio, J. B. (2002b). 4-Hydroxytamoxifen induces slight uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation system in relation to the deleterious effects of tamoxifen. *Toxicology* 179 (3): 221-232.
- Cardoso, C. M., Moreno, A. J., Almeida, L. M., Custodio, J. B. (2003). Comparison of the changes in adenine nucleotides of rat liver mitochondria induced by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Toxicol In Vitro* 17 (5-6): 663-670.
- Cardoso, C. M., Almeida, L. M., Custodio, J. B. (2004). Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants. *Chem Biol Interact* 148 (3): 149-161.
- Cassano, N., Vestita, M., Panaro, M., Carbonara, M., Vena, G. A. (2011). Renal function in psoriasis patients. *Eur J Dermatol* 21 (2): 264-265.
- Catarino, C., Rebelo, I., Belo, L., Rocha-Pereira, P., Rocha, S., Bayer Castro, E., Patricio, B., Quintanilha, A., Santos-Silva, A. (2009). Erythrocyte changes in preeclampsia: relationship between maternal and cord blood erythrocyte damage. *J Perinat Med* 37 (1): 19-27.

- Chakravarti, N., Lotan, R., Diwan, A. H., Warneke, C. L., Johnson, M. M., Prieto, V. G. (2007). Decreased expression of retinoid receptors in melanoma: entailment in tumorigenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* 13 (16): 4817-4824.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10 (9): 940-954.
- Chance, B., Williams, G. R. (1956). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *J Biol Chem* 221 (1): 477-489.
- Chandraratna, R. A. (1998). Future trends: a new generation of retinoids. *J Am Acad Dermatol* 39 (4): S149-152.
- Chang, M. (2011). Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis. *BMB Rep* 44 (7): 423-434.
- Chapman, M. S. (2012). Vitamin a: history, current uses, and controversies. *Semin Cutan Med Surg* 31 (1): 11-16.
- Charlier, C., Chariot, A., Antoine, N., Merville, M. P., Gielen, J., Castronovo, V. (1995). Tamoxifen and its active metabolite inhibit growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 cells. *Biochem Pharmacol* 49 (3): 351-358.
- Chatterjee, S. J., McNulty, J., Pandey, S. (2011). Sensitization of human melanoma cells by tamoxifen to apoptosis induction by pancratistatin, a nongenotoxic natural compound. *Melanoma Res* 21 (1): 1-11.
- Chen, Y. J., Wu, C. Y., Chen, T. J., Shen, J. L., Chu, S. Y., Wang, C. B., Chang, Y. T. (2011). The risk of cancer in patients with psoriasis: a population-based cohort study in Taiwan. *J Am Acad Dermatol* 65 (1): 84-91.
- Cheng, C., Michaels, J., Scheinfeld, N. (2008). Alitretinoin: a comprehensive review. *Expert Opin Investig Drugs* 17 (3): 437-443.
- Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P., Stepien, G. (2011). Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1807 (6): 562-567.
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58 (3): 621-681.
- Christov, K. (2009). The novel RARbeta isoform (beta5) is a potential target of retinoids in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 9 (2): 142-147.

## Bibliografia

- Chroni, E., Monastirli, A., Tsambaos, D. (2010). Neuromuscular adverse effects associated with systemic retinoid dermatotherapy: monitoring and treatment algorithm for clinicians. *Drug Saf* 33 (1): 25-34.
- Clarke, R. B., Anderson, E., Howell, A. (2004). Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 15 (7): 316-323.
- Clifford, J. L., Petkovich, M., Chambon, P., Lotan, R. (1990). Modulation by retinoids of mRNA levels for nuclear retinoic acid receptors in murine melanoma cells. *Mol Endocrinol* 4 (10): 1546-1555.
- Coimbra, S., Oliveira, H., Reis, F., Belo, L., Rocha, S., Quintanilha, A., Figueiredo, A., Teixeira, F., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. (2009). C-reactive protein and leucocyte activation in psoriasis vulgaris according to severity and therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24 (7): 789-796.
- Coimbra, S., Oliveira, H., Reis, F., Belo, L., Carvalho, A., Figueiredo, A., Teixeira, F., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. (2010a). Health-related quality of life in Portuguese psoriatic patients: relation with Psoriasis Area and Severity Index and different types of classical psoriatic treatment. *J Dermatol* 38 (8): 816-819.
- Coimbra, S., Oliveira, H., Reis, F., Belo, L., Rocha, S., Quintanilha, A., Figueiredo, A., Teixeira, F., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. (2010b). Circulating adipokine levels in Portuguese patients with psoriasis vulgaris according to body mass index, severity and therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24 (12): 1386-1394.
- Coimbra, S., Oliveira, H., Reis, F., Belo, L., Rocha, S., Quintanilha, A., Figueiredo, A., Teixeira, F., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. (2010c). Interleukin (IL)-22, IL-17, IL-23, IL-8, vascular endothelial growth factor and tumour necrosis factor-alpha levels in patients with psoriasis before, during and after psoralen-ultraviolet A and narrowband ultraviolet B therapy. *Br J Dermatol* 163 (6): 1282-1290.
- Coimbra, S., Oliveira, H., Reis, F., Belo, L., Rocha, S., Quintanilha, A., Figueiredo, A., Teixeira, F., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. (2010d). Psoriasis therapy and cardiovascular risk factors: a 12-week follow-up study. *Am J Clin Dermatol* 11 (6): 423-432.
- Coimbra, S., Figueiredo, A., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. (2012a). The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *Int J Dermatol* 51 (4): 389-398.



- Coimbra, S., Oliveira, H., Reis, F., Belo, L., Rocha, S., Quintanilha, A., Figueiredo, A., Teixeira, F., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. (2012b). Erythroid disturbances before and after treatment of Portuguese psoriasis vulgaris patients: a cross-sectional and longitudinal study. *Am J Clin Dermatol* 13 (1): 37-47.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23 (3): 143-151.
- Conzen, S. D. (2008). Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol* 22 (10): 2215-2228.
- Corbetta, S., Angioni, R., Cattaneo, A., Beck-Peccoz, P., Spada, A. (2006). Effects of retinoid therapy on insulin sensitivity, lipid profile and circulating adipocytokines. *Eur J Endocrinol* 154 (1): 83-86.
- Costantini, P., Chernyak, B. V., Petronilli, V., Bernardi, P. (1996). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem* 271 (12): 6746-6751.
- Costantini, P., Colonna, R., Bernardi, P. (1998). Induction of the mitochondrial permeability transition by N-ethylmaleimide depends on secondary oxidation of critical thiol groups. Potentiation by copper-ortho-phenanthroline without dimerization of the adenine nucleotide translocase. *Biochim Biophys Acta* 1365 (3): 385-392.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 233-249.
- Cruz Silva, M. M., Madeira, V. M., Almeida, L. M., Custodio, J. B. (2000). Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochim Biophys Acta* 1464 (1): 49-61.
- Cruz Silva, M. M., Madeira, V. M., Almeida, L. M., Custodio, J. B. (2001). Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicol In Vitro* 15 (6): 615-622.
- Custodio, J. B., Almeida, L. M., Madeira, V. M. (1991). A reliable and rapid procedure to estimate drug partitioning in biomembranes. *Biochem Biophys Res Commun* 176 (3): 1079-1085.

## Bibliografia

- Custodio, J. B., Almeida, L. M., Madeira, V. M. (1993a). The active metabolite hydroxytamoxifen of the anticancer drug tamoxifen induces structural changes in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1153 (2): 308-314.
- Custodio, J. B., Almeida, L. M., Madeira, V. M. (1993b). The anticancer drug tamoxifen induces changes in the physical properties of model and native membranes. *Biochim Biophys Acta* 1150 (2): 123-129.
- Custodio, J. B., Dinis, T. C., Almeida, L. M., Madeira, V. M. (1994). Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxyl radical scavenging activity. *Biochem Pharmacol* 47 (11): 1989-1998.
- Custodio, J. B., Moreno, A. J., Wallace, K. B. (1998). Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by Ca<sup>2+</sup> and inorganic phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol* 152 (1): 10-17.
- Custodio, J. B., Cardoso, C. M., Almeida, L. M. (2002). Thiol protecting agents and antioxidants inhibit the mitochondrial permeability transition promoted by etoposide: implications in the prevention of etoposide-induced apoptosis. *Chem Biol Interact* 140 (2): 169-184.
- Czeczuga-Semeniuk, E., Wolczynski, S., Dzieciol, J., Dabrowska, M., Anchim, T., Tomaszewska, I. (2001). 13-cis retinoic acid and all-trans retinoic acid in the regulation of the proliferation and survival of human breast cancer cell line MCF-7. *Cell Mol Biol Lett* 6 (4): 925-939.
- Damodaran, S. E., Pradhan, S. C., Umamaheswaran, G., Kadambari, D., Reddy, K. S., Adithan, C. (2012). Genetic polymorphisms of CYP2D6 increase the risk for recurrence of breast cancer in patients receiving tamoxifen as an adjuvant therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 70 (1): 75-81.
- Danopoulou, I., Korfitis, C., Koliarakis, N., Trafalis, D. T. (2009). Rapid improvement of extensive non-melanoma skin cancers with combination of 13-cis-retinoic acid and radiotherapy: report of three cases. *J Buon* 14 (3): 515-517.
- Dawson, M. I., Xia, Z. (2012). The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim Biophys Acta* 1821 (1): 21-56.
- de Giorgi, V., Mavilia, C., Massi, D., Gozzini, A., Aragona, P., Tanini, A., Sestini, S., Paglierani, M., Boddi, V., Brandi, M. L., Lotti, T. (2009). Estrogen receptor expression in cutaneous melanoma: a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemical study. *Arch Dermatol* 145 (1): 30-36.

- de Giorgi, V., Gori, A., Grazzini, M., Rossari, S., Scarfi, F., Corciova, S., Verdelli, A., Lotti, T., Massi, D. (2011). Estrogens, estrogen receptors and melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 11 (5): 739-747.
- Decker, A., Graber, E. M. (2012). Over-the-counter Acne Treatments: A Review. *J Clin Aesthet Dermatol* 5 (5): 32-40.
- Demirpence, E., Balaguer, P., Trousse, F., Nicolas, J. C., Pons, M., Gagne, D. (1994). Antiestrogenic effects of all-trans-retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells occur at the estrogen response element level but through different molecular mechanisms. *Cancer Res* 54 (6): 1458-1464.
- Dervisoglu, E., Akturk, A. S., Yildiz, K., Kiran, R., Yilmaz, A. (2012). The spectrum of renal abnormalities in patients with psoriasis. *Int Urol Nephrol* 44 (2): 509-514.
- Detmer, S. A., Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (11): 870-879.
- Dias, N., Bailly, C. (2005). Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem Pharmacol* 70 (1): 1-12.
- Dodge, J. T., Mitchell, C., Hanahan, D. J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100: 119-130.
- Dogra, S., De, D. (2010). Narrowband ultraviolet B in the treatment of psoriasis: the journey so far! *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 76 (6): 652-661.
- Doisneau-Sixou, S. F., Sergio, C. M., Carroll, J. S., Hui, R., Musgrove, E. A., Sutherland, R. L. (2003). Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 10 (2): 179-186.
- Dolle, P. (2009). Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7: e006.
- Domm, S., Mrowietz, U. (2011). Combination therapy in the treatment of psoriasis. *J Dtsch Dermatol Ges* 9 (2): 94-98.
- Dorner, A., Schultheiss, H. P. (2007). Adenine nucleotide translocase in the focus of cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 17 (8): 284-290.
- Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H. P., Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1797 (6-7): 664-670.

## Bibliografia

- Dunn, L. K., Gaar, L. R., Yentzer, B. A., O'Neill, J. L., Feldman, S. R. (2011). Acitretin in dermatology: a review. *J Drugs Dermatol* 10 (7): 772-782.
- Duong, V., Rochette-Egly, C. (2011). The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochim Biophys Acta* 1812 (8): 1023-1031.
- Dykens, J. A., Will, Y. (2007). The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov Today* 12 (17-18): 777-785.
- Dzhagalov, I., Chambon, P., He, Y. W. (2007). Regulation of CD8+ T lymphocyte effector function and macrophage inflammatory cytokine production by retinoic acid receptor gamma. *J Immunol* 178 (4): 2113-2121.
- Echtay, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43 (10): 1351-1371.
- Elder, J. T., Fisher, G. J., Zhang, Q. Y., Eisen, D., Krust, A., Kastner, P., Chambon, P., Voorhees, J. J. (1991). Retinoic acid receptor gene expression in human skin. *J Invest Dermatol* 96 (4): 425-433.
- Elder, J. T., Astrom, A., Pettersson, U., Tavakkol, A., Krust, A., Kastner, P., Chambon, P., Voorhees, J. J. (1992). Retinoic acid receptors and binding proteins in human skin. *J Invest Dermatol* 98 (6): 36S-41S.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Aubrecht, J., Kleinjans, J. C., Ahr, H. J. (2009). Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol Lett* 186 (1): 36-44.
- Ellis, C. N., Krach, K. J. (2001). Uses and complications of isotretinoin therapy. *J Am Acad Dermatol* 45 (5): S150-157.
- Emri, G., Wenczl, E., Van Erp, P., Jans, J., Roza, L., Horkay, I., Schothorst, A. A. (2000). Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* 115 (3): 435-440.
- Erdei, E., Torres, S. M. (2010). A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 10 (11): 1811-1823.
- Evans, T. (2005). Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling. *Exp Hematol* 33 (9): 1055-1061.
- Fan, J., Eastham, L., Varney, M. E., Hall, A., Adkins, N. L., Chetel, L., Sollars, V. E., Georgel, P., Niles, R. M. (2010). Silencing and re-expression of retinoic acid receptor beta2 in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23 (3): 419-429.

- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect* 101 (3): 101-107.
- Fenech, M. (1998). Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci* 854: 23-36.
- Fenech, M., Crott, J., Turner, J., Brown, S. (1999). Necrosis, apoptosis, cytoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14 (6): 605-612.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455 (1-2): 81-95.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534 (1-2): 65-75.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600 (1-2): 58-66.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2 (5): 1084-1104.
- Fenech, M., Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26 (1): 43-49.
- Ferahbas, A., Donmez-Altuntas, H., Hamurcu, Z., Aktas, E., Utas, S. (2004). Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of narrow-band (311 nm TL01) UVB-treated patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 20 (2): 81-85.
- Figueiredo, A., Massa, A., Picoto, A., Soares, A. P., Basto, A. S., Lopes, C., Resende, C., Rebelo, C., Brandão, F. M., Pinto, G. M., Oliveira, H. S., Selores, M., Gonçalo, M., Bello, R. T. (2011a). Avaliação e tratamento do doente com acne - Parte I: Epidemiologia, etiopatogenia, clinica, classificação, impacto psicossocial, mitos e realidades, diagnóstico diferencial e estudos complementares. *Rev Port Clin Geral* 27: 59-65.

## Bibliografia

- Figueiredo, A., Massa, A., Picoto, A., Soares, A. P., Basto, A. S., Lopes, C., Resende, C., Rebelo, C., Brandão, F. M., Pinto, G. M., Oliveira, H. S., Selores, M., Gonçalo, M., Bello, R. T. (2011b). Avaliação e tratamento do doente com acne - Parte II: Tratamento tópico, sistémico e cirurgico, tratamento da acne na grávida, algoritmo terapêutico. *Rev Port Clin Geral* 27: 66-76.
- Fredriksson, T., Pettersson, U. (1978). Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 157 (4): 238-244.
- Frey, J. R., Peck, R., Bollag, W. (1991). Antiproliferative activity of retinoids, interferon alpha and their combination in five human transformed cell lines. *Cancer Lett* 57 (3): 223-227.
- Fujimura, S., Suzumiya, J., Yamada, Y., Kuroki, M., Ono, J. (2003). Downregulation of Bcl-xL and activation of caspases during retinoic acid-induced apoptosis in an adult T-cell leukemia cell line. *Hematol J* 4 (5): 328-335.
- Fulda, S., Galluzzi, L., Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9 (6): 447-464.
- Gallerne, C., Touat, Z., Chen, Z. X., Martel, C., Mayola, E., Sharaf el dein, O., Buron, N., Le Bras, M., Jacotot, E., Borgne-Sanchez, A., Lemoine, A., Lemaire, C., Pervaiz, S., Brenner, C. (2010). The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 42 (5): 623-629.
- Gazotti, P., Malmström, K., Crompton, M. (1979). Membrane biochemistry: a laboratory manual on transport and bioenergetics. *Springer-Verlag, New York*: 62-69.
- Georgala, S., Papassotiropoulos, I., Georgala, C., Demetriou, E., Schulpis, K. H. (2005). Isotretinoin therapy induces DNA oxidative damage. *Clin Chem Lab Med* 43 (11): 1178-1182.
- Ghoreschi, K., Weigert, C., Rocken, M. (2007). Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin Dermatol* 25 (6): 574-580.
- Ghosh, P., Chin, L. (2009). Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol* 4 (2): 131.
- Gianni, M., Ponzanelli, I., Mologni, L., Reichert, U., Rambaldi, A., Terao, M., Garattini, E. (2000). Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases. *Cell Death Differ* 7 (5): 447-460.

- Gisondi, P., Tessari, G., Conti, A., Piaserico, S., Schianchi, S., Peserico, A., Giannetti, A., Girolomoni, G. (2007). Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital-based case-control study. *Br J Dermatol* 157 (1): 68-73.
- Gisondi, P., Targher, G., Zoppini, G., Girolomoni, G. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease in patients with chronic plaque psoriasis. *J Hepatol* 51 (4): 758-764.
- Gniadecki, R., Assaf, C., Bagot, M., Dummer, R., Duvic, M., Knobler, R., Ranki, A., Schwandt, P., Whittaker, S. (2007). The optimal use of bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 157 (3): 433-440.
- Godden, D., Brennan, P. A., Milne, J. (2010). Update on melanoma: the present position. *Br J Oral Maxillofac Surg* 48 (8): 575-578.
- Goetz, M. P., Kamal, A., Ames, M. M. (2008). Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther* 83 (1): 160-166.
- Goldenstein-Schainberg, C., Favarato, M. H., Ranza, R. (2012). Current and relevant concepts in psoriatic arthritis. *Rev Bras Reumatol* 52 (1): 98-106.
- Goodfield, M. J., Cox, N. H., Bowser, A., McMillan, J. C., Millard, L. G., Simpson, N. B., Ormerod, A. D. (2010). Advice on the safe introduction and continued use of isotretinoin in acne in the U.K. 2010. *Br J Dermatol* 162 (6): 1172-1179.
- Gordy, C., Dzhagalov, I., He, Y. W. (2009). Regulation of CD8(+) T cell functions by RARgamma. *Semin Immunol* 21 (1): 2-7.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177 (2): 751-766.
- Gornicki, A. (2002). Domain structure of erythrocyte membranes in psoriasis: an EPR study. *J Dermatol Sci* 29 (3): 214-221.
- Grattagliano, I., de Bari, O., Bernardo, T. C., Oliveira, P. J., Wang, D. Q., Portincasa, P. (2012). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease-from origin to propagation. *Clin Biochem* 45 (9): 610-618.
- Grimm, S., Brdiczka, D. (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12 (5): 841-855.
- Gronhoj Larsen, F., Jakobsen, P., Gronhoj Larsen, C., Heidenheim, M., Held, E., Nielsen-Kudsk, F. (2009). The metabolism and pharmacokinetics of isotretinoin in patients with acne and rosacea are not influenced by ethanol. *Br J Dermatol* 161 (3): 664-670.

## Bibliografia

- Gudas, L. J. (2012). Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states. *Biochim Biophys Acta* 1821 (1): 213-221.
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A., Salter, J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* 567 (1): 96-102.
- Guruvayoorappan, C., Pradeep, C. R., Kuttan, G. (2008). 13-cis-retinoic acid induces apoptosis by modulating caspase-3, bcl-2, and p53 gene expression and regulates the activation of transcription factors in B16F-10 melanoma cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 27 (3): 197-207.
- Haase, V. H. (2010). Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 299 (1): F1-13.
- Haematology, I. C. f. S. i. (1984). ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). International Committee for Standardization in Haematology. *Br J Haematol* 57 (4): 707-710.
- Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y., Connern, C. P. (1997). Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 272 (6): 3346-3354.
- Hall, J. A., Cannons, J. L., Grainger, J. R., Dos Santos, L. M., Hand, T. W., Naik, S., Wohlfert, E. A., Chou, D. B., Oldenhove, G., Robinson, M., Grigg, M. E., Kastenmayer, R., Schwartzberg, P. L., Belkaid, Y. (2011a). Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. *Immunity* 34 (3): 435-447.
- Hall, J. A., Grainger, J. R., Spencer, S. P., Belkaid, Y. (2011b). The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 35 (1): 13-22.
- Hamurcu, Z., Demirtas, H., Ascioğlu, O., Donmez-Altuntas, H., Aktas, E. (2002). Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of PUVA treated patients. *Tohoku J Exp Med* 198 (1): 11-21.
- Hartmann, D., Forgo, I., Dubach, U. C., Hennes, U. (1992). Effect of acitretin on the response to an intravenous glucose tolerance test in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 42 (5): 523-528.
- Heliovaara, M. K., Remitz, A., Reitamo, S., Teppo, A. M., Karonen, S. L., Ebeling, P. (2007). 13-cis-Retinoic acid therapy induces insulin resistance, regulates inflammatory parameters, and paradoxically increases serum adiponectin concentration. *Metabolism* 56 (6): 786-791.



- Heller, A., Brockhoff, G., Goepferich, A. (2012). Targeting drugs to mitochondria. *Eur J Pharm Biopharm* 82 (1): 1-18.
- Howe, L. R. (2007). Retinoids and breast cancer prevention. *Clin Cancer Res* 13 (20): 5983-5987.
- Hua, S., Kittler, R., White, K. P. (2009). Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell* 137 (7): 1259-1271.
- IARC (1996). Some pharmaceutical drugs. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 66: 1-514.
- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A., Orsiere, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res* 658 (3): 215-233.
- ICH (2008). S2(R1) Guidelines: Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.
- Jeong, S. Y., Seol, D. W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 41 (1): 11-22.
- Ji, J., Shu, X., Sundquist, K., Sundquist, J., Hemminki, K. (2009). Cancer risk in hospitalised psoriasis patients: a follow-up study in Sweden. *Br J Cancer* 100 (9): 1499-1502.
- Johnson, R., Staiano-Coico, L., Austin, L., Cardinale, I., Nabeya-Tsukifuji, R., Krueger, J. G. (1996). PUVA treatment selectively induces a cell cycle block and subsequent apoptosis in human T-lymphocytes. *Photochem Photobiol* 63 (5): 566-571.
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A., Rodenburg, R. J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 35 (2): 211-225.
- Jose, C., Rossignol, R. (2013). Rationale for mitochondria-targeting strategies in cancer bioenergetic therapies. *Int J Biochem Cell Biol* 45 (1): 123-129.
- Kadokia, K. C., Barton, D. L., Loprinzi, C. L., Sloan, J. A., Otley, C. C., Diekmann, B. B., Novotny, P. J., Alberts, S. R., Limburg, P. J., Pittelkow, M. R. (2012). Randomized controlled trial of acitretin versus placebo in patients at high-risk for basal cell or squamous cell carcinoma of the skin (North Central Cancer Treatment Group Study 969251). *Cancer* 118 (8): 2128-2137.
- Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604 (2): 77-94.

## Bibliografia

- Kallio, A., Zheng, A., Dahllund, J., Heiskanen, K. M., Harkonen, P. (2005). Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 10 (6): 1395-1410.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., Kobatake, Y. (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membr Biol* 49 (2): 105-121.
- Karaman, A., Aliagaoglu, C., Pirim, I. (2008). Sister chromatid exchange analysis in patients with psoriasis. *Exp Dermatol* 17 (6): 524-529.
- Kargacin, M. E., Ali, Z., Ward, C. A., Pollock, N. S., Kargacin, G. J. (2000). Tamoxifen inhibits Ca<sup>2+</sup> uptake by the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch* 440 (4): 573-579.
- Kastner, P., Lawrence, H. J., Waltzinger, C., Ghyselinck, N. B., Chambon, P., Chan, S. (2001). Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood* 97 (5): 1314-1320.
- Katsambas, A. D., Stefanaki, C., Cunliffe, W. J. (2004). Guidelines for treating acne. *Clin Dermatol* 22 (5): 439-444.
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (7): 2402-2410.
- Katz, H. I., Waalen, J., Leach, E. E. (1999). Acitretin in psoriasis: an overview of adverse effects. *J Am Acad Dermatol* 41 (3): S7-S12.
- Kay, M. M., Goodman, S. R., Sorensen, K., Whitfield, C. F., Wong, P., Zaki, L., Rudloff, V. (1983). Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (6): 1631-1635.
- Kay, M. M. (1984). Localization of senescent cell antigen on band 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (18): 5753-5757.
- Kazanci, N., Severcan, F. (2007). Concentration dependent different action of tamoxifen on membrane fluidity. *Biosci Rep* 27 (4-5): 247-255.
- Keen, J. C., Davidson, N. E. (2003). The biology of breast carcinoma. *Cancer* 97 (3): 825-833.

- Keulers, R. A., de Roon, A. R., de Roode, S., Tates, A. D. (1998). The induction and analysis of micronuclei and cell killing by ultraviolet-B radiation in human peripheral blood lymphocytes. *Photochem Photobiol* 67 (4): 426-432.
- Kim, E. H., Koh, E. H., Park, J. Y., Lee, K. U. (2010a). Adenine nucleotide translocator as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Korean Diabetes J* 34 (3): 146-153.
- Kim, N., Thrash, B., Menter, A. (2010b). Comorbidities in psoriasis patients. *Semin Cutan Med Surg* 29 (1): 10-15.
- Kim, S. Y., Suzuki, N., Laxmi, Y. R., Umemoto, A., Matsuda, T., Shibutani, S. (2006). Antiestrogens and the formation of DNA damage in rats: a comparison. *Chem Res Toxicol* 19 (6): 852-858.
- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Nakamura, Y., Zembutsu, H. (2012). Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet* 27 (1): 122-131.
- Ko, J. M., Velez, N. F., Tsao, H. (2010). Pathways to melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 29 (4): 210-217.
- Koay, D. C., Zerillo, C., Narayan, M., Harris, L. N., DiGiovanna, M. P. (2010). Anti-tumor effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis by retinoid/trastuzumab combinations. *Breast Cancer Res* 12 (4): R62.
- Koistinen, H. A., Remitz, A., Gylling, H., Miettinen, T. A., Koivisto, V. A., Ebeling, P. (2001). Dyslipidemia and a reversible decrease in insulin sensitivity induced by therapy with 13-cis-retinoic acid. *Diabetes Metab Res Rev* 17 (5): 391-395.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47 (4): 333-343.
- Kraft, J., Freiman, A. (2011). Management of acne. *Cmaj* 183 (7): E430-435.
- Kramer, R. (1996). Structural and functional aspects of the phosphate carrier from mitochondria. *Kidney Int* 49 (4): 947-952.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87 (1): 99-163.

## Bibliografia

- Krskova-Tybitanclova, K., Macejova, D., Brtko, J., Baculikova, M., Krizanova, O., Zorad, S. (2008). Short term 13-cis-retinoic acid treatment at therapeutic doses elevates expression of leptin, GLUT4, PPARgamma and aP2 in rat adipose tissue. *J Physiol Pharmacol* 59 (4): 731-743.
- Krueger, G., Ellis, C. N. (2005). Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *J Am Acad Dermatol* 53 (1): S94-100.
- Kurian, A., Barankin, B. (2011). Current effective topical therapies in the management of psoriasis. *Skin Therapy Lett* 16 (1): 4-7.
- Labbe, G., Pessayre, D., Fromenty, B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* 22 (4): 335-353.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- Lawson, N. D., Berliner, N. (1999). Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. *Exp Hematol* 27 (9): 1355-1367.
- Layton, A. (2009). The use of isotretinoin in acne. *Dermatoendocrinol* 1 (3): 162-169.
- Lebwohl, M., Menter, A., Koo, J., Feldman, S. R. (2004). Combination therapy to treat moderate to severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 50 (3): 416-430.
- Lee, M. Y., Jung, C. H., Lee, K., Choi, Y. H., Hong, S., Cheong, J. (2002). Activating transcription factor-2 mediates transcriptional regulation of gluconeogenic gene PEPCCK by retinoic acid. *Diabetes* 51 (12): 3400-3407.
- Lee, Y. H., Pratley, R. E. (2005). The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 5 (1): 70-75.
- Leithead, J. A., Simpson, K. J., MacGilchrist, A. J. (2009). Fulminant hepatic failure following overdose of the vitamin A metabolite acitretin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21 (2): 230-232.
- Lemasters, J. J., Theruvath, T. P., Zhong, Z., Nieminen, A. L. (2009). Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1787 (11): 1395-1401.
- LeMotte, P. K., Keidel, S., Apfel, C. M. (1996). Characterization of synthetic retinoids with selectivity for retinoic acid or retinoid X nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1289 (2): 298-304.

- Lenaz, G., Genova, M. L. (2009). Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (10): 1750-1772.
- Lens, M. B., Reiman, T., Husain, A. F. (2003). Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. *Cancer* 98 (7): 1355-1361.
- Lester, J. (2007). Breast cancer in 2007: incidence, risk assessment, and risk reduction strategies. *Clin J Oncol Nurs* 11 (5): 619-622.
- Leung, A. W., Varanyuwatana, P., Halestrap, A. P. (2008). The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* 283 (39): 26312-26323.
- Liao, W., McNutt, M. A., Zhu, W. G. (2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48 (1): 46-53.
- Liby, K. T., Yore, M. M., Sporn, M. B. (2007). Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 7 (5): 357-369.
- Lima Ede, A., Lima Mde, A. (2011). Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol* 86 (6): 1151-1158.
- Lin, X. Y., He, C. D., Xiao, T., Jin, X., Chen, J., Wang, Y. K., Liu, M., Wang, K. B., Jiang, Y., Wei, H. C., Chen, H. D. (2009). Acitretin induces apoptosis through CD95 signalling pathway in human cutaneous squamous cell carcinoma cell line SCL-1. *J Cell Mol Med* 13 (9A): 2888-2898.
- Lister, R. K., Lecky, B. R., Lewis-Jones, M. S., Young, C. A. (1996). Acitretin-induced myopathy. *Br J Dermatol* 134 (5): 989-990.
- Liu, S., Ren, S., Howell, P., Fodstad, O., Riker, A. I. (2008). Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment Cell Melanoma Res* 21 (5): 545-558.
- Lizana, L., Konkoli, Z., Bauer, B., Jesorka, A., Orwar, O. (2009). Controlling chemistry by geometry in nanoscale systems. *Annu Rev Phys Chem* 60: 449-468.
- Low, P. S. (1991). Role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in initiating red cell removal. *Adv Exp Med Biol* 307: 173-183.

## Bibliografia

- Lutz, H. U., Bussolino, F., Flepp, R., Fasler, S., Stammli, P., Kazatchkine, M. D., Arese, P. (1987). Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (21): 7368-7372.
- Luzikov, V. N. (2009). Principles of control over formation of structures responsible for respiratory functions of mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* 74 (13): 1443-1456.
- Madeira, V. M. (1975). A rapid and ultrasensitive method to measure Ca<sup>2+</sup> movements across biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 64 (3): 870-876.
- Mak, R. K., Hundhausen, C., Nestle, F. O. (2009). Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr* 100 (2): 2-13.
- Makita, T., Hernandez-Hoyos, G., Chen, T. H., Wu, H., Rothenberg, E. V., Sucov, H. M. (2001). A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev* 15 (7): 889-901.
- Manicassamy, S., Pulendran, B. (2009). Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol* 21 (1): 22-27.
- Mao, C., Yang, Z. Y., He, B. F., Liu, S., Zhou, J. H., Luo, R. C., Chen, Q., Tang, J. L. (2012). Toremifene versus tamoxifen for advanced breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 7: CD008926.
- Marques, M. M., Beland, F. A. (1997). Identification of tamoxifen-DNA adducts formed by 4-hydroxytamoxifen quinone methide. *Carcinogenesis* 18 (10): 1949-1954.
- Masia, S., Alvarez, S., de Lera, A. R., Barettino, D. (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 21 (10): 2391-2402.
- Masini, A., Ceccarelli-Stanzani, D., Muscatello, U. (1984). An investigation on the effect of oligomycin on state-4 respiration in isolated rat-liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 767 (1): 130-137.
- Mateuca, R. A., Roelants, M., Iarmarcovai, G., Aka, P. V., Godderis, L., Tremp, A., Bonassi, S., Fenech, M., Berge-Lefranc, J. L., Kirsch-Volders, M. (2008). hOGG1(326), XRCC1(399) and XRCC3(241) polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Mutagenesis* 23 (1): 35-41.

- Matsumoto, T., Suzuki, N., Watanabe, H., Irie, M., Iwata, K., Anan, A., Nakane, H., Yoshikane, M., Nishizawa, S., Sohda, T., Sakisaka, S. (2004). Nonalcoholic steatohepatitis associated with psoriasis vulgaris. *J Gastroenterol* 39 (11): 1102-1105.
- Maza, A., Montaudie, H., Sbidian, E., Gallini, A., Aractingi, S., Aubin, F., Bachelez, H., Cribier, B., Joly, P., Jullien, D., Le Maitre, M., Misery, L., Richard, M. A., Ortonne, J. P., Paul, C. (2011). Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25 (2): 19-27.
- McKenna, D. J., McKeown, S. R., McKelvey-Martin, V. J. (2008). Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 23 (3): 183-190.
- McStay, G. P., Clarke, S. J., Halestrap, A. P. (2002). Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 367: 541-548.
- Miele, L., Vallone, S., Cefalo, C., La Torre, G., Di Stasi, C., Vecchio, F. M., D'Agostino, M., Gabrieli, M. L., Vero, V., Biolato, M., Pompili, M., Gasbarrini, G., Rapaccini, G., Amerio, P., De Simone, C., Grieco, A. (2009). Prevalence, characteristics and severity of non-alcoholic fatty liver disease in patients with chronic plaque psoriasis. *J Hepatol* 51 (4): 778-786.
- Misir Krpan, A., Ivankovic, S., Krajina, Z., Ivankovic, D., Stojkovic, R. (2012). Tamoxifen in trimodal therapy with cytotoxic drugs and hyperthermia in vivo significantly enhance therapeutic efficacy against B16-F10 melanoma. *Tumori* 98 (2): 257-263.
- Moller, P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98 (4): 336-345.
- Monfrecola, G., Baldo, A. (2009). Retinoids and phototherapy for psoriasis. *J Rheumatol Suppl* 83: 71-72.
- Moreira, P. I., Custodio, J. B., Oliveira, C. R., Santos, M. S. (2004). Hydroxytamoxifen protects against oxidative stress in brain mitochondria. *Biochem Pharmacol* 68 (1): 195-204.
- Moreira, P. I., Custodio, J. B., Oliveira, C. R., Santos, M. S. (2005). Brain mitochondrial injury induced by oxidative stress-related events is prevented by tamoxifen. *Neuropharmacology* 48 (3): 435-447.

## Bibliografia

- Moreira, P. I., Custodio, J., Moreno, A., Oliveira, C. R., Santos, M. S. (2006). Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. *J Biol Chem* 281 (15): 10143-10152.
- Mori, T., Martinez, S. R., O'Day, S. J., Morton, D. L., Umetani, N., Kitago, M., Tanemura, A., Nguyen, S. L., Tran, A. N., Wang, H. J., Hoon, D. S. (2006). Estrogen receptor-alpha methylation predicts melanoma progression. *Cancer Res* 66 (13): 6692-6698.
- Mortazavi, H., Khezri, S., Hosseini, H., Khezri, F., Vasigh, M. (2011). A single blind randomized clinical study: the efficacy of isotretinoin plus narrow band ultraviolet B in the treatment of psoriasis vulgaris. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 27 (3): 159-161.
- Mrowietz, U., Reich, K. (2009). Psoriasis--new insights into pathogenesis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 106 (1-2): 11-19.
- Mrowietz, U. (2012). Implementing treatment goals for successful long-term management of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26 (2): 12-20.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317 (5835): 256-260.
- Murphy, G., Reich, K. (2011). In touch with psoriasis: topical treatments and current guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25 (4): 3-8.
- Murphy, M., Kerr, P., Grant-Kels, J. M. (2007). The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 25 (6): 524-528.
- Naldi, L., Gambini, D. (2007). The clinical spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 25 (6): 510-518.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., Fox, J. L. (2010). Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49 (9): 978-986.
- Nelson, H. D., Zakher, B., Cantor, A., Fu, R., Griffin, J., O'Meara, E. S., Buist, D. S., Kerlikowske, K., van Ravesteyn, N. T., Trentham-Dietz, A., Mandelblatt, J. S., Miglioretti, D. L. (2012). Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 156 (9): 635-648.
- Newmeyer, D. D., Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112 (4): 481-490.



- Niizuma, H., Nakamura, Y., Ozaki, T., Nakanishi, H., Ohira, M., Isogai, E., Kageyama, H., Imaizumi, M., Nakagawara, A. (2006). Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* 25 (36): 5046-5055.
- Niu, X. W., Peng, Z. H., Feng, J., Ma, H. Q., Liu, C., Yuan, J. Y. (2005). Mechanism of retinoid receptors in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human melanoma cell line A375. *Chin Med J (Engl)* 118 (17): 1482-1486.
- Nolan, B. V., Yentzer, B. A., Feldman, S. R. (2010). A review of home phototherapy for psoriasis. *Dermatol Online J* 16 (2): 1.
- Norris, R. E., Minturn, J. E., Brodeur, G. M., Maris, J. M., Adamson, P. C. (2011). Preclinical evaluation of lestaurtinib (CEP-701) in combination with retinoids for neuroblastoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 68 (6): 1469-1475.
- Notario, B., Zamora, M., Vinas, O., Mampel, T. (2003). All-trans-retinoic acid binds to and inhibits adenine nucleotide translocase and induces mitochondrial permeability transition. *Mol Pharmacol* 63 (1): 224-231.
- Noy, N. (2010). Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu Rev Nutr* 30: 201-217.
- Nunes, C., Almeida, L., Laranjinha, J. (2008). 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) modulates the toxicity induced by nitric oxide in PC-12 cells via mitochondrial dysfunctioning. *Neurotoxicology* 29 (6): 998-1007.
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., Brandolin, G., Pebay-Peyroula, E. (2006). Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu Rev Biochem* 75: 713-741.
- O'Rourke, B. (2007). Mitochondrial ion channels. *Annu Rev Physiol* 69: 19-49.
- OECD (2010). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing.
- Okano, M., Masuda, S., Narita, H., Masushige, S., Kato, S., Imagawa, S., Sasaki, R. (1994). Retinoic acid up-regulates erythropoietin production in hepatoma cells and in vitamin A-depleted rats. *FEBS Lett* 349 (2): 229-233.
- Oliveira, P. J., Wallace, K. B. (2006). Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats--relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicology* 220 (2-3): 160-168.

## Bibliografia

- Ormerod, A. D., Campalani, E., Goodfield, M. J. D. (2010). British Association of Dermatologists guidelines on the efficacy and use of acitretin in dermatology. *British Journal of Dermatology* 162: 952–963.
- Osborne, C. K., Boldt, D. H., Clark, G. M., Trent, J. M. (1983). Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res* 43 (8): 3583-3585.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12 (5): 913-922.
- Otto, A. M., Paddenbergh, R., Schubert, S., Mannherz, H. G. (1996). Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. *J Cancer Res Clin Oncol* 122 (10): 603-612.
- Ozawa, M., Ferenczi, K., Kikuchi, T., Cardinale, I., Austin, L. M., Coven, T. R., Burack, L. H., Krueger, J. G. (1999). 312-nanometer ultraviolet B light (narrow-band UVB) induces apoptosis of T cells within psoriatic lesions. *J Exp Med* 189 (4): 711-718.
- Ozdemir, M., Engin, B., Baysal, I., Mevlitoglu, I. (2008). A randomized comparison of acitretin-narrow-band TL-01 phototherapy and acitretin-psoralen plus ultraviolet A for psoriasis. *Acta Derm Venereol* 88 (6): 589-593.
- Palmieri, F. (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochim Biophys Acta* 1777 (7-8): 564-578.
- Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A., Kortsaris, A. H. (1997). Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J Immunol Methods* 208 (2): 151-158.
- Pastuszka, M., Kaszuba, A. (2011). Acitretin, a systemic retinoid for the treatment of psoriasis— current state of knowledge. *Post Dermatol Alergol* 4: 285–292.
- Paules, R. S., Aubrecht, J., Corvi, R., Garthoff, B., Kleinjans, J. C. (2011). Moving forward in human cancer risk assessment. *Environ Health Perspect* 119 (6): 739-743.
- Pavese, P., Kuentz, F., Belleville, C., Rouge, P. E., Elsener, M. (1997). Renal impairment induced by isotretinoin. *Nephrol Dial Transplant* 12 (6): 1299.
- Pearce, D. J., Klinger, S., Ziel, K. K., Murad, E. J., Rowell, R., Feldman, S. R. (2006). Low-dose acitretin is associated with fewer adverse events than high-dose acitretin in the treatment of psoriasis. *Arch Dermatol* 142 (8): 1000-1004.

- Pebay-Peyroula, E., Brandolin, G. (2004). Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol* 14 (4): 420-425.
- Peixoto, P. M., Ryu, S. Y., Kinnally, K. W. (2010). Mitochondrial ion channels as therapeutic targets. *FEBS Lett* 584 (10): 2142-2152.
- Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M. A., Letteron, P., Moreau, R., Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* 44 (1): 34-87.
- Pietrzak, A., Michalak-Stoma, A., Chodorowska, G., Szepietowski, J. C. (2010). Lipid disturbances in psoriasis: an update. *Mediators Inflamm* 2010.
- Pili, R., Salumbides, B., Zhao, M., Altiok, S., Qian, D., Zwiebel, J., Carducci, M. A., Rudek, M. A. (2012). Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 106 (1): 77-84.
- Pino-Lagos, K., Benson, M. J., Noelle, R. J. (2008). Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 1143: 170-187.
- Pizzo, P., Drago, I., Filadi, R., Pozzan, T. (2012). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. *Pflugers Arch* 464 (1): 3-17.
- Poirier, M. C., Schild, L. J. (2003). The genotoxicity of tamoxifen: extent and consequences, Kona, Hawaii, January 23, 2003. *Mutagenesis* 18 (4): 395-399.
- Pradelli, L. A., Beneteau, M., Ricci, J. E. (2010). Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 67 (10): 1589-1597.
- Purdy, S., de Berker, D. (2006). Acne. *Bmj* 333 (7575): 949-953.
- Purton, L. E., Dworkin, S., Olsen, G. H., Walkley, C. R., Fabb, S. A., Collins, S. J., Chambon, P. (2006). RAR $\gamma$  is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *J Exp Med* 203 (5): 1283-1293.
- Rademaker, M. (2012). Isotretinoin: dose, duration and relapse. What does 30 years of usage tell us? *Australas J Dermatol*.
- Rajpara, A. N., O'Neill, J. L., Nolan, B. V., Yentzer, B. A., Feldman, S. R. (2010). Review of home phototherapy. *Dermatol Online J* 16 (12): 2.

## Bibliografia

- Ran, L., Tan, W., Tan, S., Zhang, R., Wang, W., Zeng, W. (2005). Effects of ATRA, acitretin and tazarotene on growth and apoptosis of Tca8113 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25 (4): 393-396.
- Rashmi, R., Rao, K. S., Basavaraj, K. H. (2009). A comprehensive review of biomarkers in psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 34 (6): 658-663.
- Rasola, A., Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12 (5): 815-833.
- Rasola, A., Sciacovelli, M., Pantic, B., Bernardi, P. (2010). Signal transduction to the permeability transition pore. *FEBS Lett* 584 (10): 1989-1996.
- Rasola, A., Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50 (3): 222-233.
- Reich, K. (2012). The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26 (2): 3-11.
- Ren, J., Peng, Z., Pan, M., Guo, B., Liu, Y., Wang, X. (2008). Comparison between synthetic retinoid CD437 and acitretin inhibiting melanoma A375 cell in vitro. *Journal of Nanjing Medical University* 22 (2): 87-91.
- Rickwood D., Wilson M.T. V.M., D.-U. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. in *Mitochondria: a practical approach Press Oxford*: 1-16.
- Rigobello, M. P., Scutari, G., Friso, A., Barzon, E., Artusi, S., Bindoli, A. (1999). Mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c induced by retinoic acids. *Biochem Pharmacol* 58 (4): 665-670.
- Rigopoulos, D., Larios, G., Katsambas, A. D. (2010). The role of isotretinoin in acne therapy: why not as first-line therapy? facts and controversies. *Clin Dermatol* 28 (1): 24-30.
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A., Teixeira, F. (2001). Dislipidemia and oxidative stress in mild and in severe psoriasis as a risk for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 303 (1-2): 33-39.
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A., Teixeira, F. (2004a). Erythrocyte damage in mild and severe psoriasis. *Br J Dermatol* 150 (2): 232-244.
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A., Teixeira, F. (2004b). The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol* 150 (5): 917-928.
- Roche (2008). Neotigason Information approved. *Roche*.

- Rochette-Egly, C., Germain, P. (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7: e005.
- Roenigk, H. H., Jr., Callen, J. P., Guzzo, C. A., Katz, H. I., Lowe, N., Madison, K., Nigra, T., Fiedler, V. C., Armstrong, R. B. (1999). Effects of acitretin on the liver. *J Am Acad Dermatol* 41 (4): 584-588.
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Holmes, K. A., Schmidt, D., Spyrou, C., Russell, R., Massie, C. E., Vowler, S. L., Eldridge, M., Carroll, J. S. (2010). Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Dev* 24 (2): 171-182.
- Ross, A. C., Zolfaghari, R. (2011). Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 31: 65-87.
- Rousseau, C., Pettersson, F., Couture, M. C., Paquin, A., Galipeau, J., Mader, S., Miller, W. H., Jr. (2003). The N-terminal of the estrogen receptor (ERalpha) mediates transcriptional cross-talk with the retinoic acid receptor in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86 (1): 1-14.
- Rubin, M., Fenig, E., Rosenauer, A., Menendez-Botet, C., Achkar, C., Bentel, J. M., Yahalom, J., Mendelsohn, J., Miller, W. H., Jr. (1994). 9-Cis retinoic acid inhibits growth of breast cancer cells and down-regulates estrogen receptor RNA and protein. *Cancer Res* 54 (24): 6549-6556.
- Russmann, S., Kullak-Ublick, G. A., Grattagliano, I. (2009). Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem* 16 (23): 3041-3053.
- Ryu, S. Y., Beutner, G., Dirksen, R. T., Kinnally, K. W., Sheu, S. S. (2010). Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca<sup>2+</sup> permeable channels. *FEBS Lett* 584 (10): 1948-1955.
- Sabichi, A. L., Xu, H., Fischer, S., Zou, C., Yang, X., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Lotan, R., Clifford, J. L. (2003). Retinoid receptor-dependent and independent biological activities of novel fenretinide analogues and metabolites. *Clin Cancer Res* 9 (12): 4606-4613.
- Samarut, E., Rochette-Egly, C. (2012). Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. *Mol Cell Endocrinol* 348 (2): 348-360.

## Bibliografia

- Sanford, K. K., Parshad, R., Price, F. M., Tarone, R. E., Kraemer, K. H. (1992). Retinoid protection against x-ray-induced chromatid damage in human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Invest* 90 (5): 2069-2074.
- Santos-Silva, A., Castro, E. M., Teixeira, N. A., Guerra, F. C., Quintanilha, A. (1995). Altered erythrocyte membrane band 3 profile as a marker in patients at risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 116 (2): 199-209.
- Santos-Silva, A., Rebelo, M. I., Castro, E. M., Belo, L., Guerra, A., Rego, C., Quintanilha, A. (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin Chim Acta* 306 (1-2): 119-126.
- Sarasin, A., Dessen, P. (2010). DNA repair pathways and human metastatic malignant melanoma. *Curr Mol Med* 10 (4): 413-418.
- Sardana, K., Garg, V. K. (2011). Low-dose isotretinoin in acne vulgaris: a critical review. *Br J Dermatol* 165 (3): 698-700.
- Sardas, S., Karahalil, B., Karakaya, A. E., Sasmaz, R. (1994). Mutagenic risk in psoriatic patients before and after 8-methoxypsoralen and long-wave ultraviolet radiation. *Mutat Res* 312 (2): 79-83.
- Sauvez, F., Drouin, D. S., Attia, M., Bertheux, H., Forster, R. (1999). Cutaneously applied 4-hydroxytamoxifen is not carcinogenic in female rats. *Carcinogenesis* 20 (5): 843-850.
- Scatena, R., Bottoni, P., Botta, G., Martorana, G. E., Giardina, B. (2007). The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. *Am J Physiol Cell Physiol* 293 (1): C12-21.
- Scatena, R. (2012). Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv Exp Med Biol* 942: 287-308.
- Schadendorf, D., Worm, M., Jurgovsky, K., Dippel, E., Michel, S., Charpentier, B., Bernardon, J., Reichert, U., Czarnetzki, B. (1994). Retinoic Acid receptor-gamma-selective retinoids exert antiproliferative effects on human-melanoma cell-growth in-vitro. *Int J Oncol* 5 (6): 1325-1331.
- Schmidt-Mende, J., Gogvadze, V., Hellstrom-Lindberg, E., Zhivotovsky, B. (2006). Early mitochondrial alterations in ATRA-induced cell death. *Cell Death Differ* 13 (1): 119-128.
- Schneider, L. A., Hinrichs, R., Scharffetter-Kochanek, K. (2008). Phototherapy and photochemotherapy. *Clin Dermatol* 26 (5): 464-476.

- Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N., Noy, N. (2007). Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129 (4): 723-733.
- Searovic, P., Alonso, M., Oses, C., Pereira-Flores, K., Velarde, V., Saez, C. G. (2009). Effect of tamoxifen and retinoic acid on bradykinin induced proliferation in MCF-7 cells. *J Cell Biochem* 106 (3): 473-481.
- Serafim, T. L., Oliveira, P. J., Sardao, V. A., Perkins, E., Parke, D., Holy, J. (2008). Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 61 (6): 1007-1018.
- Shao, W., Brown, M. (2004). Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* 6 (1): 39-52.
- Sharaf el dein, O., Mayola, E., Chopineau, J., Brenner, C. (2011). The adenine nucleotide translocase 2, a mitochondrial target for anticancer biotherapy. *Curr Drug Targets* 12 (6): 894-901.
- Shirakami, Y., Lee, S. A., Clugston, R. D., Blaner, W. S. (2012). Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim Biophys Acta* 1821 (1): 124-136.
- Shoshan-Barmatz, V., Ben-Hail, D. (2012). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion* 12 (1): 24-34.
- Shroot, B., Michel, S. (1997). Pharmacology and chemistry of adapalene. *J Am Acad Dermatol* 36 (6): S96-103.
- Siedlakowski, P., McLachlan-Burgess, A., Griffin, C., Tirumalai, S. S., McNulty, J., Pandey, S. (2008). Synergy of Pancratistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer Biol Ther* 7 (3): 376-384.
- Simeone, A. M., Tari, A. M. (2004). How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 61 (12): 1475-1484.
- Singh, G., Aneja, S. P. (2011). Cardiovascular comorbidity in psoriasis. *Indian J Dermatol* 56 (5): 553-556.
- Smith, D. J., Ng, H., Kluck, R. M., Nagley, P. (2008). The mitochondrial gateway to cell death. *IUBMB Life* 60 (6): 383-389.
- Smith, R. A., Hartley, R. C., Cocheme, H. M., Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 33 (6): 341-352.

## Bibliografia

- Soengas, M. S., Lowe, S. W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22 (20): 3138-3151.
- Soon, C., Ilchyshyn, A. (2005). Methotrexate toxicity induced by acute renal failure. *J R Soc Med* 98 (2): 83-84.
- Spanjaard, R. A., Ikeda, M., Lee, P. J., Charpentier, B., Chin, W. W., Eberlein, T. J. (1997). Specific activation of retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors reveals a unique role for RARgamma in induction of differentiation and apoptosis of S91 melanoma cells. *J Biol Chem* 272 (30): 18990-18999.
- Starkov, A. A. (2010). The molecular identity of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> sequestration system. *Febs J* 277 (18): 3652-3663.
- Stephanou, G., Andrianopoulos, C., Tyrakis, M., Konti, M., Demopoulos, N. A., Tsambaos, D. (2004). In vitro antigenotoxic potential of acitretin in human lymphocytes treated with the antineoplastic alkylating agent ASE (NSC-71964). *Toxicol In Vitro* 18 (5): 609-616.
- Stocchi, V., Cucchiarini, L., Magnani, M., Chiarantini, L., Palma, P., Crescentini, G. (1985). Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem* 146 (1): 118-124.
- Styles, J. A., Davies, A., Davies, R., White, I. N., Smith, L. L. (1997). Clastogenic and aneugenic effects of tamoxifen and some of its analogues in hepatocytes from dosed rats and in human lymphoblastoid cells transfected with human P450 cDNAs (MCL-5 cells). *Carcinogenesis* 18 (2): 303-313.
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 341 (3): 169-184.
- Suspiro, A., Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. *Toxicol Lett* 207 (1): 42-52.
- Sweeney, C. M., Tobin, A. M., Kirby, B. (2011). Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 303 (10): 691-705.
- Swift, C. B., Hays, J. L., Petty, W. J. (2008). Distinct functions of retinoic acid receptor beta isoforms: implications for targeted therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8 (1): 47-50.



- Szondy, Z., Reichert, U., Fesus, L. (1998). Retinoic acids regulate apoptosis of T lymphocytes through an interplay between RAR and RXR receptors. *Cell Death Differ* 5 (1): 4-10.
- Takahashi, H., Iizuka, H. (2012). Psoriasis and metabolic syndrome. *J Dermatol* 39 (3): 212-218.
- Tang, X. H., Gudas, L. J. (2011). Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol* 6: 345-364.
- Taylor, C. M., Blanchard, B., Zava, D. T. (1984). Estrogen receptor-mediated and cytotoxic effects of the antiestrogens tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Cancer Res* 44 (4): 1409-1414.
- Thatcher, J. E., Zelter, A., Isoherranen, N. (2010). The relative importance of CYP26A1 in hepatic clearance of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol* 80 (6): 903-912.
- Theodosiou, M., Laudet, V., Schubert, M. (2010). From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 67 (9): 1423-1445.
- Theodossiou, T. A., Yannakopoulou, K., Aggelidou, C., Hothersall, J. S. (2012). Tamoxifen subcellular localization; observation of cell-specific cytotoxicity enhancement by inhibition of mitochondrial ETC complexes I and III. *Photochem Photobiol* 88 (4): 1016-1022.
- Thomas, M., Sukhai, M. A., Kamel-Reid, S. (2012). An emerging role for retinoid X receptor alpha in malignant hematopoiesis. *Leuk Res* 36 (9): 1075-1081.
- Tice, R. R., Andrews, P. W., Hirai, O., Singh, N. P. (1991). The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol* 283: 157-164.
- Toma, S., Isnardi, L., Raffo, P., Dastoli, G., De Francisci, E., Riccardi, L., Palumbo, R., Bollag, W. (1997). Effects of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid on breast-cancer cell lines: growth inhibition and apoptosis induction. *Int J Cancer* 70 (5): 619-627.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9): 4350-4354.
- Trizna, Z., Hsu, T. C., Schantz, S. P., Lee, J. J., Hong, W. K. (1992). Anticlastogenic effects of 13-cis-retinoic acid in vitro. *Eur J Cancer* 29A (1): 137-140.

## Bibliografia

- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., Shimizu, S. (2006). Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1757 (9-10): 1297-1300.
- Tuchinda, C., Lim, H. W., Strickland, F. M., Guzman, E. A., Wong, H. K. (2007). Comparison of broadband UVB, narrowband UVB, broadband UVA and UVA1 on activation of apoptotic pathways in human peripheral blood mononuclear cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 23 (1): 2-9.
- Turner, R. C., Holman, R. R., Matthews, D., Hockaday, T. D., Peto, J. (1979). Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism* 28 (11): 1086-1096.
- Tzung, T. Y., Runger, T. M. (1998). Assessment of DNA damage induced by broadband and narrowband UVB in cultured lymphoblasts and keratinocytes using the comet assay. *Photochem Photobiol* 67 (6): 647-650.
- Ucak, S., Ekmekci, T. R., Basat, O., Koslu, A., Altuntas, Y. (2006). Comparison of various insulin sensitivity indices in psoriatic patients and their relationship with type of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20 (5): 517-522.
- van der Leede, B. J., Folkers, G. E., van den Brink, C. E., van der Saag, P. T., van der Burg, B. (1995). Retinoic acid receptor alpha 1 isoform is induced by estradiol and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 109 (1): 77-86.
- van Oers, J. A., de Leeuw, J., van Bommel, E. F. (2000). Nephrotic syndrome associated with isotretinoin. *Nephrol Dial Transplant* 15 (6): 923-924.
- Verdier-Sevrain, S., Bonte, F., Gilchrist, B. (2006). Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol* 15 (2): 83-94.
- Vignais, P. V. (1976). Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 456 (1): 1-38.
- Vijayalaxmi, K. K., Rai, S. P. (1996). Studies on the genotoxicity of tamoxifen citrate in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 368 (2): 109-114.
- von Thaler, A. K., Kamenisch, Y., Berneburg, M. (2010). The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Exp Dermatol* 19 (2): 81-88.
- Vuletic, A., Konjevic, G., Milanovic, D., Ruzdijic, S., Jurisic, V. (2010). Antiproliferative effect of 13-cis-retinoic acid is associated with granulocyte differentiation and decrease in cyclin B1 and Bcl-2 protein levels in G0/G1 arrested HL-60 cells. *Pathol Oncol Res* 16 (3): 393-401.

- Warren, R. B., Griffiths, C. E. (2008). Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. *Clin Dermatol* 26 (5): 438-447.
- Watanabe, T., Pratt, R. M. (1991). Influence of retinoids on sister chromatid exchanges and chromosomes in cultured human embryonic palatal mesenchymal cells. *Teratog Carcinog Mutagen* 11 (6): 297-304.
- Watts, C. K., Sweeney, K. J., Warlters, A., Musgrove, E. A., Sutherland, R. L. (1994). Antiestrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 31 (1): 95-105.
- Weller, E. M., Hain, J., Jung, T., Kinder, R., Kofferlein, M., Burkart, W., Nüsse, M. (1996). UV-B-induced cell cycle perturbations, micronucleus induction, and modulation by caffeine in human keratinocytes. *Int J Radiat Biol* 69 (3): 371-384.
- Wenk, K. S., Arrington, K. C., Ehrlich, A. (2011). Psoriasis and non-alcoholic fatty liver disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25 (4): 383-391.
- Wiegand, U. W., Chou, R. C. (1998). Pharmacokinetics of oral isotretinoin. *J Am Acad Dermatol* 39 (2): S8-12.
- Williams, H. C., Dellavalle, R. P., Garner, S. (2012). Acne vulgaris. *Lancet* 379 (9813): 361-372.
- Wolf, G. (2008). Retinoic acid as cause of cell proliferation or cell growth inhibition depending on activation of one of two different nuclear receptors. *Nutr Rev* 66 (1): 55-59.
- Wong, Z. W., Ellis, M. J. (2004). First-line endocrine treatment of breast cancer: aromatase inhibitor or antioestrogen? *Br J Cancer* 90 (1): 20-25.
- Wozniak, K., Kolacinska, A., Blasinska-Morawiec, M., Morawiec-Bajda, A., Morawiec, Z., Zadrozny, M., Blasiak, J. (2007). The DNA-damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. *Arch Toxicol* 81 (7): 519-527.
- Wu, J. H., Wilson, J. B., Wolfreys, A. M., Scott, A., Jones, N. J. (2009). Optimization of the comet assay for the sensitive detection of PUVA-induced DNA interstrand cross-links. *Mutagenesis* 24 (2): 173-181.
- Wu, K., DuPre, E., Kim, H., Tin, U. C., Bissonnette, R. P., Lamph, W. W., Brown, P. H. (2006). Receptor-selective retinoids inhibit the growth of normal and malignant breast cells by inducing G1 cell cycle blockade. *Breast Cancer Res Treat* 96 (2): 147-157.

## Bibliografia

- Yang, X., Phillips, D. L., Ferguson, A. T., Nelson, W. G., Herman, J. G., Davidson, N. E. (2001). Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 61 (19): 7025-7029.
- Yoo, E. S. (2011). Recent advances in the diagnosis and management of childhood acute promyelocytic leukemia. *Korean J Pediatr* 54 (3): 95-105.
- Zamora, M., Ortega, J. A., Alana, L., Vinas, O., Mampel, T. (2006). Apoptotic and anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid. Adenine nucleotide translocase sensitizes HeLa cells to all-trans retinoic acid. *Exp Cell Res* 312 (10): 1813-1819.
- Zhang, H., Rosdahl, I. (2004). Expression of p27 and MAPK proteins involved in all-trans retinoic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in matched primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 25 (5): 1241-1248.
- Zhou, S., Starkov, A., Froberg, M. K., Leino, R. L., Wallace, K. B. (2001). Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res* 61 (2): 771-777.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H. B., Wang, S., Sollott, S. J. (2009). Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 83 (2): 213-225.