



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Lúcia José Araújo Fernandes

**MECANISMOS DE AÇÃO DO PLASMA FRIO
ATMOSFÉRICO CONTRA O CANCRO DA
BEXIGA**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica,
com especialização em Imagem e Radiação, orientada pela Professora
Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e pela Professora Doutora
Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e apresentada ao Departamento de
Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021

Faculdade de Ciências e Tecnologias
da Universidade de Coimbra

MECANISMOS DE AÇÃO DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO CONTRA O CANCRO DA BEXIGA

Lúcia José Araújo Fernandes

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, com especialização em Imagem e Radiação, orientada pela Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

“We have a hunger of the mind which asks for knowledge of all around us, and the more we gain, the more is our desire; the more we see, the more we are capable of seeing.”

Maria Mitchell

Agradecimentos

Este trabalho experimental não teria sido possível apenas com o esforço individual, mas sim com a colaboração de toda uma equipa multidisciplinar. A todos, agradeço a ajuda, apoio e todo o conhecimento que me foi transmitido, permitindo a realização deste trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra por me ter acolhido no Instituto de Biofísica permitindo a realização desta dissertação. Agradeço pelo tempo despendido na correção deste documento, por todo o conhecimento transmitido e rigor científico.

À Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação, apoio, disponibilidade e dedicação ao longo deste trabalho experimental. Agradeço pela visão crítica e oportuna, paciência e partilha de conhecimento científico. Também agradeço a amizade, carinho e preocupação ao longo deste último ano.

Ao Dr. Edgar Tavares da Silva, médico do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por toda a disponibilidade, ajuda e conhecimentos transmitidos.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, particularmente ao Dr. Rui Oliveira e ao Paulo Teixeira pela disponibilidade, ajuda e dedicação na análise histológica.

À Doutora Mafalda Laranjo, pela disponibilidade constante, paciência e por todo o conhecimento transmitido e rigor científico.

Aos Mestres Ricardo Teixo, Inês Marques, Catarina Guilherme e Beatriz Serambeque por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, pelo apoio, disponibilidade constante e por toda a ajuda no trabalho laboratorial. Agradeço ao mestre Eurico Pereira, por me ter acolhido no grupo, pelos ensinamentos e paciência, e por toda a disponibilidade e ajuda ao longo deste trabalho experimental.

Agradeço às minhas colegas Ana e Gabriela pela amizade, carinho e por todos os momentos de descontração. Obrigada pelo apoio e motivação incondicional e por toda a ajuda ao longo deste trabalho experimental.

Agradeço à Beatriz Santos por todo o apoio, amizade e carinho ao longo deste último ano. Obrigada por estares sempre lá a ouvir todos os meus lamentos, dúvidas e inseguranças e por festejares comigo todas as pequenas vitórias. Também agradeço a companhia e ajuda durante as experiências, tornando tudo mais fácil. Um muito obrigada, de coração!

A todos os que me acompanharam durante o percurso académico, especialmente à Beatriz, Carolina, Joana, Leonie e Rita, por estarem sempre lá ao longo destes 5 anos, por toda a amizade, carinho e por me fazerem rir mesmo durante os piores momentos.

À Carolina Fernandes pela amizade e apoio incondicional, por me ouvires e apoiares durante os piores momentos. Agradeço por acreditares sempre em mim, mesmo quando eu não acredito, pela admiração e orgulho que sentes em mim.

À minha eterna amiga Joana Serrão pela amizade incondicional, por sempre acreditar em mim, por acompanhar-me e apoiar-me em cada passo, apesar da distância. Um muito obrigada, do fundo do coração!

Ao meu Rafael que é o primeiro a acreditar que eu sou capaz, por me encorajar e nunca me deixar desistir, pela presença nos bons e maus momentos. Agradeço toda a paciência, apoio e ajuda incansável e principalmente por todo o carinho e amor.

À minha Avó, por todo o amor ao longo dos anos, por ter cuidado de mim e por toda a exigência, disciplina e responsabilidade que me transmitiu.

Acima de tudo agradeço à minha Mãe pelo amor e apoio incondicional, por ser o meu porto-seguro! Obrigada por seres um exemplo de coragem, persistência, determinação, independência e resiliência. Só espero um dia ser metade da mulher que tu és. Agradeço por me encorajares, por sempre acreditares em mim e por nunca me deixares desistir dos meus sonhos. Não há palavras que façam jus ao que tu significas para mim. Lamento por todo o sofrimento, mas eu lutarei contigo até ao fim. Esta vitória é para ti!

Agradeço ao meu Pai, pelo carinho e apoio e porque sem ele nada disto seria possível.

Por fim, agradeço a mim mesma, pela resiliência, persistência, responsabilidade e coragem que demonstrei ao longo do meu percurso académico. Por nunca ter desistido apesar de todos os obstáculos, por ser pragmática e encontrar sempre uma solução para os problemas.

Resumo

Mundialmente, o cancro da bexiga é o 10º tumor com maior incidência e o 13º com maior mortalidade. Os medicamentos atualmente disponíveis para uso clínico não têm a eficácia desejada e apresentam efeitos secundários. O Plasma Frio Atmosférico (PFA) é um gás parcialmente ionizado, produzido a uma temperatura abaixo dos 40°C. O PFA pode ser aplicado diretamente ou indiretamente através de um meio à base de água primeiramente exposto ao PFA e depois colocado em contacto com células ou tecidos, o meio ativado por PFA (MAP). Acredita-se que os mecanismos de ação do MAP provenham das espécies reativas de oxigénio e nitrogénio que se formam durante a interação do jato de PFA com o meio e das que se formam no meio.

O principal objetivo deste trabalho experimental foi avaliar o potencial terapêutico dos meios ativados por Plasma Frio Atmosférico contra o cancro da bexiga.

Para este trabalho foi utilizado um dispositivo eletrónico capaz de gerar uma descarga de alta tensão para produzir PFA. Avaliou-se o potencial citotóxico do tratamento com os MAPs em diferentes linhas celulares de cancro da bexiga: TCCSUP (grau IV) e HT1376 (grau III). Numa fase inicial, expuseram-se vários meios (água destilada, água ultra-pura, PBS e NaCl 0,9%) ao PFA, durante diversos tempos de exposição (30, 60, 90, 120, 180 e 240 segundos) e, posteriormente, transferiram-se para as células. O efeito destes meios foi avaliado pela medição da atividade metabólica e do conteúdo proteico, após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os ensaios subsequentes foram realizados apenas com o NaCl 0,9%, para o tempo de tratamento de 24 horas e tempos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA de 30, 60 e 120 segundos. Diversos ensaios de citotoxicidade foram realizados para averiguar o efeito do NaCl 0,9% ativado por PFA como o perfil de morte celular e alterações no ciclo celular. Sabendo-se de antemão pelo descrito na literatura que a produção de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio é o mecanismo de ação mais provável que mediará a ação indireta do PFA, procedeu-se à medição da produção de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio, no NaCl 0,9% ativado por PFA na ausência de células, assim como, a nível intracelular.

Numa perspetiva translacional, foram realizados estudos *ex vivo* para avaliação do efeito do NaCl 0,9% ativado por PFA em amostras de tumor da bexiga. As amostras foram recebidas, expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60, 120 e 180 segundos. Após 24, 48 e 72 horas o efeito do tratamento foi avaliado através de análise histológica utilizando coloração com hematoxilina-eosina e imuno-histoquímica para avaliar a expressão de Ki67 e caspase-3.

Relativamente aos estudos *in vitro*, o tratamento com MAPs induziu diminuição da atividade metabólica. A linha celular TCCSUP demonstrou ser mais sensível ao tratamento. A diminuição da proliferação das células de cancro da bexiga é mais acentuada utilizando NaCl 0,9% ativado por PFA do que utilizando o tratamento direto com PFA. O NaCl 0,9% ativado por PFA diminuiu a viabilidade celular e provocou um aumento da morte celular por apoptose tardia e necrose. Foi observado um bloqueio do ciclo celular na fase S, nas duas linhas celulares, e um bloqueio na fase G2/M na linha celular HT1376, o que pode indicar diminuição da síntese de DNA e/ou lesões no DNA. Em relação à produção de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio no NaCl 0,9% ativado por PFA, na ausência de células, houve um aumento significativo do nível das mesmas com apenas 30 segundos de exposição. Quanto ao conteúdo intracelular das espécies reativas, os resultados revelam um aumento do radical superóxido e óxido nítrico na linha celular TCCSUP, indicando que estas espécies podem desempenhar um papel importante no mecanismo de ação do NaCl 0,9% ativado por PFA. Em relação aos

estudos *ex vivo*, após tratamento observou-se aumento da necrose e redução da coesão celular.

Portanto, os resultados obtidos sustentaram a aplicabilidade clínica do NaCl 0,9% ativado por PFA, visto que o seu efeito foi notório não só num modelo bidimensional mais simples, mas também num modelo 3D mais complexo. Estes resultados reforçam a necessidade de mais estudos, principalmente a avaliação da seletividade do tratamento, utilizando células normais da bexiga. Por fim, tendo em consideração que a utilização de NaCl 0,9% para irrigação da bexiga após resseção transuretral da bexiga é uma prática comum na clínica, a substituição do NaCl 0,9% por NaCl 0,9% ativado por PFA pode representar uma abordagem terapêutica promissora no tratamento adjuvante do cancro da bexiga.

Palavras-Chave: Plasma Frio Atmosférico; Meios ativados por Plasma Frio Atmosférico; Cancro da bexiga; Morte celular; Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio

Abstract

Worldwide, Bladder cancer is the 10th tumor with the highest incidence and the 13th with the highest mortality. Drugs currently available for clinical use do not have the desired efficacy and show side effects. Cold atmospheric Plasma (CAP) is a partially ionized gas, produced at a temperature below 40°C. CAP can be applied directly or indirectly through a water-based media first exposed to CAP and then placed into contact with cells or tissues, the CAP-activated media (PAM). It is believed that the mechanisms of action of PAM come from the reactive species of oxygen and nitrogen formed during the interaction of the jet of CAP with the media and formed after secondary reactions of those.

The main objective of this experimental work was to evaluate the therapeutic potential of CAP-activated media against bladder cancer.

For this work an electronic device capable of generating a high voltage discharge was used to produce CAP. The cytotoxic potential of treatment with PAM was evaluated in different cell lines of bladder cancer: TCCSUP (grade IV) and HT1376 (grade III). In an initial phase, several media (distilled water, ultra-pure water, PBS and NaCl 0,9%) were exposed to CAP, during different exposure times (30, 60, 90, 120, 180 and 240 seconds) and, subsequently, transferred to the cells. The effect of these media was evaluated by measuring metabolic activity and protein content after 24, 48 and 72 hours of treatment. The subsequent tests were carried out only with NaCl 0,9%, for a treatment time of 24 hours and exposure times of NaCl 0,9% to CAP of 30, 60 and 120 seconds. Several cytotoxicity assays were carried out to investigate the effect of NaCl 0,9% activated by CAP as the cell viability and death profile, and alterations in the cell cycle. Knowing in advance from what has been described in the literature that the production of reactive oxygen and nitrogen species is the most likely mechanism of action that will mediate the indirect action of the CAP, the production of reactive oxygen and nitrogen species was measured in NaCl 0,9% activated by CAP in the absence of cells and at intracellular level.

From a translational perspective, *ex vivo* studies were carried out to evaluate the effect of NaCl 0,9% activated by CAP in bladder tumor samples. The samples were received, exposed to NaCl 0,9% activated by CAP for 60, 120 and 180 seconds. After 24, 48 and 72 hours the treatment effect was evaluated by histological analysis using hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry to assess the expression of Ki67 and caspase-3.

Regarding *in vitro* studies, treatment with PAM induced a decrease in metabolic activity. TCCSUP cell line has been shown to be more sensitive to treatment. The decrease in proliferation of bladder cancer cells is more pronounced using NaCl 0,9% activated by CAP than using direct treatment with CAP. CAP-activated NaCl 0,9% decreased cell viability and caused an increase in cell death by late apoptosis and necrosis. A cell cycle arrest in S phase was observed in both cell lines, and additionally a blockage in G2/M phase in HT1376 cell line, which may indicate decreased DNA synthesis and/or DNA damage. Regarding the production of reactive oxygen and nitrogen species in NaCl 0,9% activated by CAP, in the absence of cells, there was a significant increase in those levels with only 30 seconds of exposure. As for the intracellular content of the reactive species, the results revealed an increase in superoxide and nitric oxide radicals in TCCSUP cell line, indicating that these species may play an important role in the mechanism of action of NaCl 0,9% activated by CAP. Regarding the *ex vivo* studies, after treatment there was an increase in necrosis and a reduction in cell cohesion.

Therefore, the results obtained support the clinical applicability of NaCl 0,9% activated by CAP, since its effect was notable not only in a simpler two-dimensional model, but also in a more complex 3D model. These results reinforce the need for further studies, especially the evaluation of treatment selectivity, using normal bladder cells. Finally, considering that the use of NaCl 0,9% for bladder irrigation after transurethral resection of the bladder is a common clinical practice, the replacement of NaCl 0,9% by NaCl 0,9% activated by CAP may represent a promising therapeutic approach in the adjuvant treatment of bladder cancer.

Keywords: Cold Atmospheric Plasma; Cold Atmospheric Plasma-activated Media; Bladder Cancer; Cell death; Reactive oxygen and nitrogen species

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract.....	IX
Índice	XI
Índice de Figuras	XIV
Índice de Tabelas	XVII
Lista de Abreviaturas.....	XIX
I. Introdução.....	23
1. Cancro da Bexiga.....	27
1.1.A Bexiga.....	27
1.2. Epidemiologia	28
1.3. Fatores de Risco	30
1.4. Diagnóstico e Estadiamento	31
1.5. Tratamento	34
1.5.1 Falta de eficácia do tratamento	35
2. Plasma Frio Atmosférico	36
2.1. Plasma	36
2.2. Produção de plasma.....	37
2.3. Aplicação direta e indireta do Plasma Frio Atmosférico	38
2.4. Plasma Frio Atmosférico em oncologia	39
2.4.1. Seletividade do Plasma Frio Atmosférico	40
2.4.2. Mecanismos de ação do Plasma Frio Atmosférico.....	40
2.5. Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico	42
2.5.1 Mecanismos de ação dos Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico ..	43
2.5.2 Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico contra o cancro da bexiga .	45
II. Objetivos.....	47
III. Materiais e métodos.....	51
1. Estudos <i>in vitro</i>	53
1.1 Culturas Celulares	53
1.2 Dispositivo de Plasma Frio Atmosférico	53
1.3 Tratamento com Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico.....	54
1.4 Proliferação celular	57

1.4.1 Ensaio de MTT	57
1.4.2 Ensaio de SRB	58
1.5 Viabilidade e perfil de morte celular	58
1.5.1. Morfologia celular	59
1.6 Ciclo Celular	60
1.7 Potencial da membrana mitocondrial	60
1.8 Espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio.....	61
1.8.1 Avaliação de RONS no NaCl 0,9% ativado por PFA	62
1.8.2 Avaliação do conteúdo intracelular de peróxidos.....	63
1.8.3 Avaliação do conteúdo intracelular de radical superóxido.....	63
1.8.4 Avaliação do conteúdo intracelular de óxido nítrico.....	64
2. Estudos <i>ex vivo</i>	65
2.1 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico aplicado a amostras de tumor	65
2.1.2 Análise histológica	65
2.1.3 Western Blot.....	66
3. Análise estatística	67
IV. Resultados ¹	69
1. Estudos <i>in vitro</i>	71
1.1. Meios ativados por Plasma Frio Atmosférico diminuem a atividade metabólica	71
1.1.1 Água destilada	71
1.1.2 Água ultra-pura.....	72
1.1.3 PBS	74
1.1.4 NaCl 0,9%	76
1.1.5 Comparação entre os 4 meios.....	79
1.2 Meios ativados por Plasma Frio Atmosférico diminuem o conteúdo proteico .	80
1.2.1 PBS	80
1.2.2 NaCl 0,9%	82
1.3 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico diminui a viabilidade celular	84
1.4 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações no ciclo celular.....	88
1.5 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico altera o potencial de membrana mitocondrial.....	89

1.6 Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio no NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico	90
1.7 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações no conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio	91
1.7.1 NaCl 0,9% não ativado por Plasma Frio Atmosférico não afeta o conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio	91
1.7.2 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações nas RONS na linha celular TCCSUP.....	92
1.7.3 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações nas RONS na linha celular HT1376.....	93
2. Estudos <i>ex vivo</i>	94
2.1 Análise histológica	94
2.2 <i>Western blot</i>	99
V. Discussão	101
1. Estudos <i>in vitro</i>	103
2. Estudos <i>ex vivo</i>	112
VI. Conclusão e perspectivas futuras	115
Bibliografia.....	119
Anexo I.....	135

Índice de Figuras

Figura 1 – Hallmarks do cancro.....	26
Figura 2 – Parede da Bexiga.....	28
Figura 3 – Representação esquemática da incidência e da mortalidade do cancro a nível mundial.....	29
Figura 4 – Representação esquemática da prevalência do cancro a nível mundial.....	29
Figura 5 – Quatro estados da matéria.....	36
Figura 6 – Aplicação do Plasma Frio Atmosférico.....	39
Figura 7 – Formação de ROS e RNS.....	43
Figura 8 – Ilustração da formação dos constituintes ativos do plasma.....	44
Figura 9 – Esquema ilustrativo do tratamento com MAP.....	55
Figura 10 – Esquema ilustrativo do tratamento com MAP durante 1 hora.....	56
Figura 11 – A água destilada diminuiu a atividade metabólica da linha celular TCCSUP.....	72
Figura 12 – A água ultra-pura diminui a atividade metabólica da linha celular TCCSUP.....	73
Figura 13 – Diminuição da atividade metabólica por efeito da adição de PBS não ativado por PFA às células a) TCCSUP e b) HT1376.....	74
Figura 14 – O PBS diminui a atividade metabólica da linha celular a) TCCSUP e b) HT1376.....	75
Figura 15 – Diminuição da atividade metabólica por efeito da adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células a)TCCSUP e b)HT1376.....	76
Figura 16 – O NaCl 0,9% diminui a atividade metabólica nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376.....	77
Figura 17 – O NaCl 0,9% ativado por PFA durante 1 hora diminui a atividade metabólica nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376.....	78
Figura 18 – a) A AD, AUP, PBS e NaCl 0,9% foram capazes de diminuir a atividade metabólica da linha celular TCCSUP e b) o PBS e NaCl 0,9% foram capazes de diminuir a atividade metabólica da linha celular HT1376.....	79
Figura 19 – Diminuição do conteúdo proteico por efeito da adição de PBS não ativado por PFA às células a) TCCSUP e b) HT1376.....	80
Figura 20 – O PBS diminui o conteúdo proteico nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376.....	81
Figura 21 – Diminuição do conteúdo proteico por efeito da adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células a) TCCSUP e b) HT1376.....	82
Figura 22 – O NaCl 0,9% diminui o conteúdo proteico das linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376.....	83
Figura 23 – O NaCl 0,9% ativado por PFA diminuiu a viabilidade das linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376.....	85
Figura 24 – Análise morfológica da linha celular TCCSUP.....	86
Figura 25 – Análise morfológica da linha celular HT1376.....	87
Figura 26 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provoca alterações no ciclo celular das linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376.....	88
Figura 27 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provocou alterações no potencial da membrana mitocondrial nas linhas celulares TCCSUP e HT1376.....	89

Figura 28 – RONS presentes no NaCl 0,9% ativado por PFA a) imediatamente após ativação por PFA e b) 2 horas após a ativação por PFA.	90
Figura 29 – Efeito da adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células, na produção intracelular de RONS nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. ..	91
Figura 30 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provocou alterações nas RONS na linha celular TCCSUP.	92
Figura 31 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provocou alterações nas RONS na linha celular HT1376.....	93
Figura 32 – Análise histológica das amostras tratadas com NaCl 0,9% ativado por PFA, coradas com H&E.....	97
Figura 33 – Imagens representativas de membranas com marcação da actina.. ...	99

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação TNM do cancro da bexiga.....	32
Tabela 2 – Análise histológica de cada uma das amostras expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA.....	95
Tabela 3 – Análise da expressão de Ki67 e de caspase-3 por imuno-histoquímica após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA.....	98

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Fórmulas químicas

AD	Água destilada
AUP	Água ultra-pura
AV	Anexina V
BCG	Imunoterapia com <i>bacilo Calmette-Guérin</i>
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2 protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
DAF-FM	<i>4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein</i>
DAF-FM diacetate	<i>4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate</i>
DBD	Dispositivo de barreira dielétrica
DCF	<i>2',7'-dichlorofluorescein</i>
DCFDiOxyQ	<i>dichlorodihydrofluorescein DiOxyQ</i>
DCFH	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein</i>
DCFH₂-DA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DMEM	Meio de cultura celular <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>
e⁻	Elétron
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fe²⁺	Ferro II
Fe³⁺	Ferro III
H&E	Coloração hematoxilina-eosina
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HNO₃	Ácido nítrico
HT1376	Linha celular de cancro da bexiga (grau III)
IP	Iodeto de propídeo
JC-1	<i>5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolocarboxyanine iodide</i>
KCL	Cloreto de potássio

KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
Ki67	Marcador de proliferação Ki67
M	Moléculas de gás neutro
M*	Moléculas excitadas
M⁺	Moléculas ionizadas
MAP	Meio ativado por Plasma Frio Atmosférico
MAPs	Meios ativados por Plasma Frio Atmosférico
MIBC	Cancro da bexiga músculo-invasivo (do inglês <i>muscle-invasive bladder cancer</i>)
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
Na₂HPO₄.2H₂O	Hidrogenofosfato dissódico dihidratado
NaCl 0,9%	Soro fisiológico
NaOH	Hidróxido de sódio
NMIBC	Cancro da bexiga não músculo-invasivo (do inglês <i>non-muscle invasive bladder cancer</i>)
NO•	Óxido nítrico
NO₂	Nitrato
NO₂•	Dióxido de nitrogénio
NO₃	Nitrito
O	Oxigénio atómico
O₂	Oxigénio
O₃	Ozono
O₂^{-•}	Radical Superóxido
¹O₂	Oxigénio singlete
OH•	Radical hidroxilo
OH⁻	Anião hidróxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinítrico
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PKMYT1	<i>Protein Kinase, Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1</i>
PFA	Plasma Frio Atmosférico
RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RNS	Espécies reativas de nitrogénio

RONs	Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio
ROO•	Radical peroxil
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
TBST-BSA	TBST (do inglês <i>tris-buffered saline tween-20</i>) e BSA (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
TCCSUP	Linha celular de cancro da bexiga (grau IV)
TNM	Sistema TNM (tumor, nódulo, metástase)
Tris.NaOH	Tris (hidroximetil) aminometano com hidróxido de sódio
Trizma base	Tris (hidroximetil) aminometano
TURBT	Ressecção transuretral do tumor da bexiga (do inglês <i>transurethral resection bladder tumor</i>)
UV	Radiação ultravioleta

I. Introdução

O cancro é um conceito geral que abrange diversas doenças que possuem características em comum. Mundialmente, o cancro afeta milhões de pessoas sendo uma das doenças mais letais. Também possui uma elevada capacidade de mudança, adaptação e instabilidade genética que, conseqüentemente, fornece uma infinidade de fenótipos metabólicos. Esta diversidade metabólica explica a dificuldade em descobrir terapias eficazes para a maioria dos cancros (Nabi e Le, 2018). Além do mais, o envelhecimento e a exposição a agentes mutagénicos favorecem a acumulação de mutações, o que leva a um maior risco para o seu desenvolvimento (Pelosi, Castelli e Testa, 2019).

Sabe-se que as células normais podem evoluir para um estado neoplásico, processo em que adquirem diversas características, os chamados *hallmarks* do cancro [Figura 1]. Estas características possibilitam que as células tumorais incipientes se transformem em tumorigénicas e, por fim, em malignas. Por sua vez, os tumores não são só células tumorais em proliferação descontrolada, mas sim tecidos complexos compostos por diferentes tipos de células que interagem entre si formando o microambiente tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011).

A homeostase é mantida pela regulação da sobrevivência, da proliferação, da diferenciação e da morte celular. As células tumorais desobedecem às restrições e podem agrupar-se em uma única massa, formando um tumor. A aquisição de características moleculares e morfológicas de malignidade com escape aos mecanismos de controlo fazem com que um tumor maligno tenha a capacidade de invadir tecidos circundantes e de se disseminar por via hematogénica ou linfática, formando tumores secundários, as metástases, em locais distantes do tumor primário. Alguns dos processos principais da metastização são: neoangiogénese tumoral, desagregação de células do tumor primário, invasão e migração das células pela membrana basal e matriz extracelular ao redor do epitélio tumoral e consecutiva invasão da membrana basal do endotélio dos vasos sanguíneos locais (Ganguly *et al.*, 2013).

A incidência global do cancro apresenta uma estimativa de 18,1 milhões de indivíduos diagnosticados a cada ano, com cerca de 9,6 milhões de mortes. Cerca de 8% de todos os diagnósticos e 17% dos óbitos associados a cancro são em idosos com idade superior ou igual a 85 anos, pelo que a idade é um fator de risco preponderante. Além do mais, é esperado que em 2030, 70% dos cancros sejam diagnosticados em adultos com mais de 65 anos. Posto isto, o cancro representa um enorme fardo clínico, social e económico, motivos que tornam imprescindível o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Ferlay *et al.*, 2020; Kadambi *et al.*, 2020; Mattiuzzi e Lippi, 2019; Rashkin *et al.*, 2020).

MECANISMOS DE AÇÃO DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO CONTRA O CANCRO DA BEXIGA

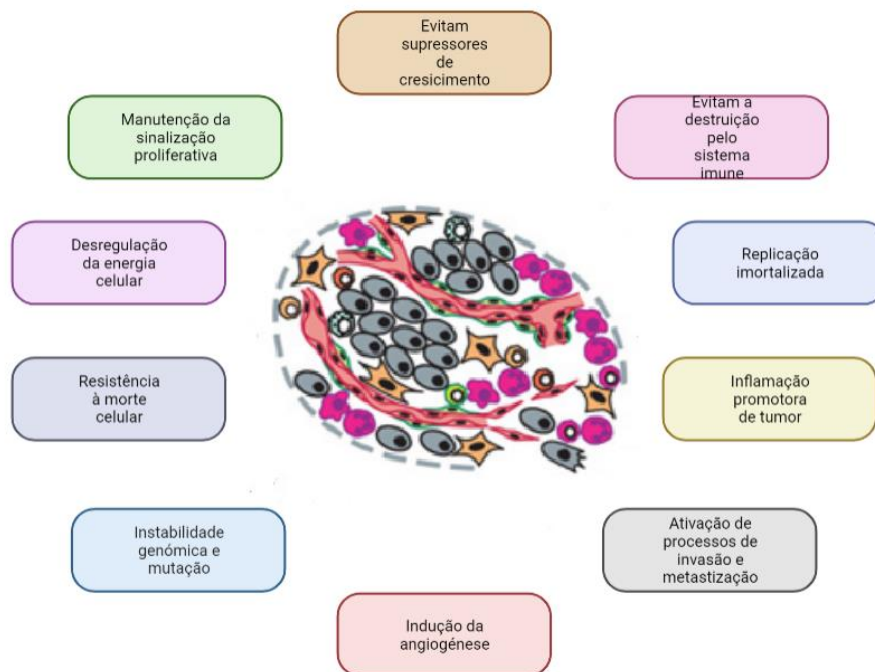


Figura 1 – *Hallmarks* do cancro. Diversas características e capacidades que permitem a evolução progressiva de uma célula normal para um estado neoplásico. Adaptado de (Hanahan e Weinberg, 2011).

1. Cancro da Bexiga

1.1. A Bexiga

A bexiga está localizada na cavidade pélvica sendo um órgão oco musculomembranoso (Ajalloueian *et al.*, 2018). As suas funções essenciais incluem o armazenamento e esvaziamento de grandes volumes de urina. Ambos os processos são modulados pela interação entre diversos tipos de células nas camadas da parede da bexiga e comandados pelo sistema nervoso central (Fry e McCloskey, 2019; Fry e Vahabi, 2016).

De forma a conseguir suportar as fases de armazenamento e esvaziamento cíclicas, a parede da bexiga [Figura 2] é estruturada em camadas, a mucosa com a respetiva lâmina própria, a muscular com fibras musculares com diferentes orientações, bem como a serosa ou adventícia que a reveste externamente. A camada mucosa é constituída por uma epitélio de transição chamado urotélio, que é a camada mais interna e voltada para o lúmen; O urotélio assenta na lâmina própria, que é uma camada de tecido conjuntivo submucoso; a camada muscular é constituída por fibras musculares lisas orientadas longitudinal e circularmente constituindo o músculo detrusor; a camada adventícia, constituída por tecido conjuntivo, cobre a superfície externa da bexiga com exceção da porção superior que é revestida pelo peritoneu que constitui a camada serosa (Ajalloueian *et al.*, 2018; Fry e McCloskey, 2019; Merrill *et al.*, 2016).

O urotélio é a camada mais complexa da parede da bexiga e proporciona funções sensoriais e protetoras. É um epitélio especializado constituído por três camadas: uma camada de células basais; uma camada de células intermediárias; e uma camada superficial composta por células denominadas “guarda-chuva”. Estas últimas são capazes de limitar o deslocamento do soluto e da água, e por isso servem como barreira entre a urina e os tecidos subjacentes (Ajalloueian *et al.*, 2018; Fry e McCloskey, 2019; Fry e Vahabi, 2016; Merrill *et al.*, 2016).

A lâmina própria é composta por colagénio (tipos I e III) em forma de feixe e por uma rede de fibras de elastina. Também inclui um denso plexo capilar (tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e tecido nervoso), que sustenta o abastecimento vascular do urotélio (Ajalloueian *et al.*, 2018).

O músculo detrusor compreende 60 a 70% da parede normal da bexiga, sendo formado por camada interna, média e externa. A maior parte da camada muscular é composta por feixes de células musculares denominadas fascículos, as quais são circundadas e interligadas por tecido conjuntivo (Ajalloueian *et al.*, 2018; Merrill *et al.*, 2016).

A camada serosa tem o papel de proteger o tecido subjacente, sendo um reflexo do peritoneu visceral, que cobre as superfícies externas superior e lateral da parede da bexiga. O restante da parede da bexiga é protegida por uma adventícia, que se funde com outros órgãos do pavimento pélvico (Fry e McCloskey, 2019; Merrill *et al.*, 2016).

O tipo mais comum de cancro da bexiga é o cancro urotelial, também chamado de carcinoma de células de transição. Este tumor maligno inicia-se nas células uroteliais que revestem o interior da bexiga, tal como revestem outras partes do trato urinário, como os ureteres e a uretra. Uma explicação possível para o facto do cancro urotelial ser dos mais comuns é porque as células uroteliais que revestem a bexiga e o aparelho urinário são

expostas, constantemente, a agentes potencialmente carcinogênicos. Os câncros da bexiga não uroteliais incluem: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células pequenas e tumores de histologia mista (DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Kim e Chammas, 2009; Saginala *et al.*, 2020).

Portanto, a maioria dos câncros iniciam-se no urotélio e podem progredir alcançando outras camadas da parede da bexiga. Com o passar do tempo, o cancro pode crescer para fora da bexiga e invadir estruturas próximas, ou disseminar à distância. Os locais de metastização mais comuns incluem os gânglios linfáticos, osso, pulmão, fígado e peritoneu. Os tipos de cancro que afetam o urotélio ou a lâmina própria têm a denominação de cancro da bexiga não músculo-invasivo (NMIBC, do inglês *non-muscle-invasive bladder cancer*), enquanto que os que invadem a camada muscular, têm o nome de cancro da bexiga músculo-invasivo (MIBC, do inglês *muscle-invasive bladder cancer*) (DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Kim e Chammas, 2009).

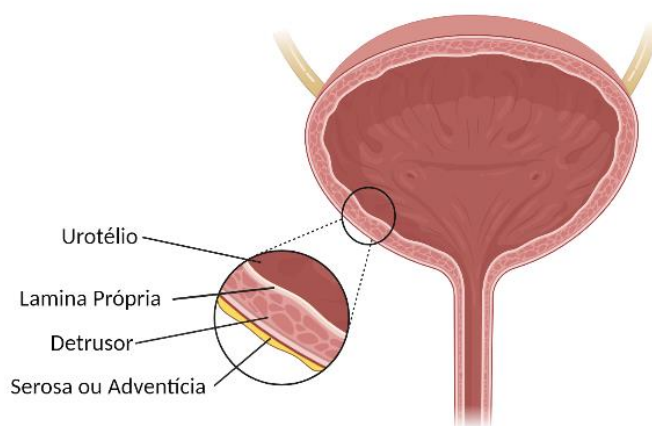


Figura 2 – Parede da Bexiga. A parede da bexiga inclui o urotélio, a lâmina própria, a camada muscular e a camada serosa ou adventícia. Created with Biorender.com.

1.2. Epidemiologia

Globalmente, o cancro da bexiga é o décimo tumor com maior incidência e o décimo terceiro mais mortal [Figura 3]. Para além disso, é o cancro do trato urinário mais prevalente, e no geral, o sétimo cancro mais prevalente [Figura 4], sendo responsável por cerca de 3% dos diagnósticos mundiais de cancro e por aproximadamente 150 000 mortes por ano em todo o mundo. A sua incidência tem vindo a aumentar cada vez mais em países desenvolvidos, ao passo que a mortalidade diminuiu, devido a uma melhoria na prevenção, diagnóstico precoce e tratamento (Aghaalikhani *et al.*, 2019; Ferlay *et al.*, 2020; Piao *et al.*, 2018; Saginala *et al.*, 2020).

De acordo com uma projeção feita pelo *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow*, uma ferramenta que prevê a incidência e a mortalidade do cancro em todo o mundo até 2040, com base nas estimativas de 2020, prevê-se um aumento da incidência de cancro da bexiga de 72,8% e um aumento da mortalidade de 86,6% (Ferlay *et al.*, 2020).

Estimated number of incident cases and deaths worldwide, both sexes, all ages

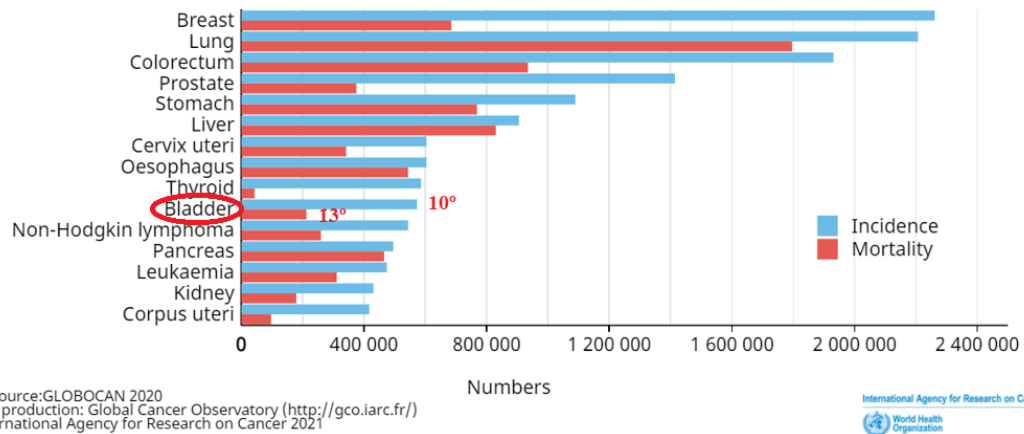


Figura 3 – Representação esquemática da incidência e da mortalidade do cancro a nível mundial. O cancro da bexiga ocupa a décima posição na incidência e a décima terceira na mortalidade. Adaptado de (GLOBOCAN,2020).

Estimated number of prevalent cases (5-year) worldwide, both sexes, all ages

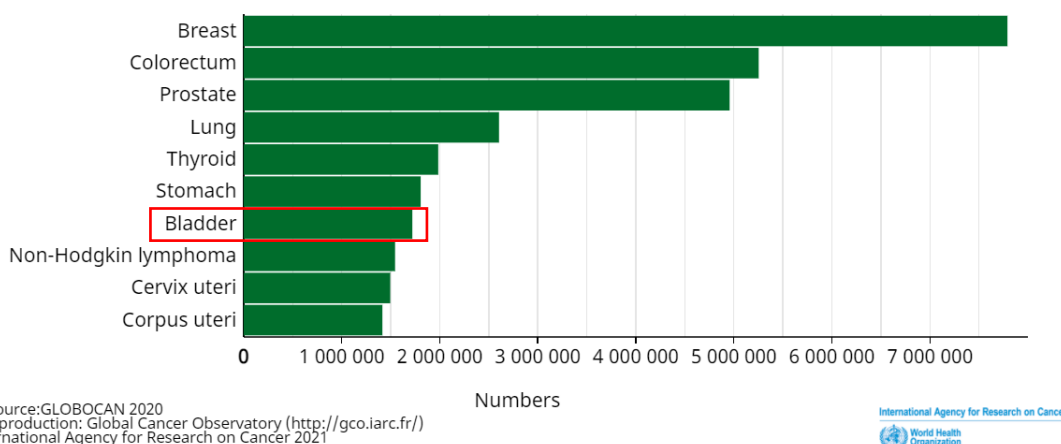


Figura 4 – Representação esquemática da prevalência do cancro a nível mundial. O cancro da bexiga é o sétimo mais prevalente. Adaptado de (GLOBOCAN,2020).

1.3. Fatores de Risco

Existem vários fatores de risco para o cancro da bexiga, nomeadamente: idade, sexo, raça, tabagismo, exposição ocupacional a determinados químicos, infeção crónica da bexiga, radiação pélvica, uso de certos medicamentos e história pessoal ou familiar de cancro da bexiga (Pelucchi *et al.*, 2006; Scélo e Brennan, 2007).

O cancro da bexiga é uma doença, essencialmente, de adultos mais velhos, isto é, a média de diagnóstico encontra-se entre os 65 a 70 anos de idade (Saginala *et al.*, 2020).

Este cancro é o sexto mais comum em homens, ocorrendo quatro vezes mais em homens que em mulheres (DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Oeyen *et al.*, 2019; Pelucchi *et al.*, 2006). Esta discrepância pode dever-se ao diferente consumo de tabaco, facto que pode também justificar o aumento da incidência nas mulheres nos países desenvolvidos. Para além disso, pode dever-se igualmente às diferenças na exposição ocupacional a determinados químicos (Saginala *et al.*, 2020).

O tabaco é responsável por cerca de 50 a 65% dos casos, tornando-o o fator de risco mais importante. O cancro da bexiga é a segunda neoplasia mais associada ao consumo de tabaco, depois do cancro do pulmão. Sabe-se que os fumos do tabaco contêm agentes mutagénicos, e como a função da bexiga é armazenar urina, há tempo suficiente para os agentes carcinogénicos na urina danificarem a bexiga. Além do mais, como esta doença costuma aparecer em idade avançada, há um período de latência desde o início do tabagismo até ao diagnóstico (Kim e Chammas, 2009; Pelucchi *et al.*, 2006; Saginala *et al.*, 2020; Scélo e Brennan, 2007).

A exposição ocupacional a alguns produtos químicos, especificamente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e hidrocarbonetos clorados, é responsável por 10 a 20% dos casos. Este tipo de exposição acontece, maioritariamente, em indústrias que processam tintas, corantes, metais e derivados de petróleo. Outras indústrias implicadas em um maior risco compreendem bombeiros, cabeleireiros e agricultores que usem fungicidas. Ainda, a esquistossomose baseada na infeção pelo parasita trematódeo provoca cancro da bexiga, sendo a causa mais habitual desta doença em regiões da África e do Médio Oriente (Babjuk *et al.*, 2019; Kim e Chammas, 2009; Pelucchi *et al.*, 2006; Saginala *et al.*, 2020; Scélo e Brennan, 2007).

Indivíduos com infeções crónicas do aparelho urinário, uso crónico de cateteres urinários e cálculos na bexiga exibem um risco maior para cancro da bexiga. Doentes tratados com radiação pélvica também estão associados a uma maior incidência. Por fim, doentes tratados com quimioterapia, especificamente ciclofosfamida, demonstram um risco quatro a nove vezes maior de desenvolver este cancro (Kim e Chammas, 2009; Pelucchi *et al.*, 2006).

Portanto, o cancro da bexiga é um candidato a estratégias de prevenção, pois 81% dos casos são atribuídos a fatores de risco conhecidos, enquanto 7% são atribuídos a mutações hereditárias. Logo, é possível diminuir o risco de cancro da bexiga por meio de: cessação do tabagismo, uso de práticas de segurança no local de trabalho, perda de peso, exercício físico e prevenção da esquistossomose pela desinfeção da água (Pelucchi *et al.*, 2006; Saginala *et al.*, 2020; Scélo e Brennan, 2007).

1.4. Diagnóstico e Estadiamento

Em primeiro lugar, a avaliação de um doente com suspeita de cancro da bexiga baseia-se na cistoscopia, avaliação da função renal e exames de imagem do trato urinário superior, preferencialmente urografia por tomografia computadorizada. A classificação e o estadiamento final do cancro da bexiga baseia-se nas informações histopatológicas resultantes dos fragmentos da ressecção transuretral do tumor (Alfred Witjes *et al.*, 2017; Babjuk *et al.*, 2019; DeGeorge, Holt e Hodges, 2017).

Para além de distinguir NMIBC e MIBC é crucial compreender o estadiamento e o grau da doença. A classificação é determinada pelo sistema TNM (tumor, nódulo (gânglio), metástase) que identifica o tumor primário (T), a disseminação para os gânglios linfáticos (N) e se há ou não metástases à distância (M) [Tabela 1]. O NMIBC compreende os estádios de Ta a T1, sendo que estes correspondem a tumores papilares confinados à mucosa e invadindo a lâmina própria. Os tumores de elevado grau confinados à mucosa, cis (do inglês, *Carcinoma in situ*), são classificados como Tis. Este tipo de tumor pode ser classificado de acordo com a sua expressão clínica: primário (cis isolado sem tumores papilares anteriores ou concomitantes e sem cis anterior), secundário (cis detetado durante o acompanhamento de doentes com um tumor prévio que não era cis) e concorrente (cis na presença de qualquer outro tumor urotelial na bexiga). O MIBC compreende os estádios de T2 a T4 (Alfred Witjes *et al.*, 2017; Babjuk *et al.*, 2019; Kim e Chammas, 2009).

Tabela 1 – Classificação TNM do cancro da bexiga. O TNM é um sistema internacional de classificação de tumores malignos desenvolvido pelo UICC (do inglês, *Union for International Cancer Control*). Baseado em (Babjuk et al., 2019).

T - Tumor Primário
TX - Tumor primário não pode ser avaliado
T0 - Não há evidências de tumor primário
Ta - Carcinoma papilar não invasivo
Tis - Carcinoma <i>in situ</i>
T1 - Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2 - Tumor invade o músculo
T2a - Tumor invade a musculatura superficial
T2b - Tumor invade a musculatura profunda
T3 - Tumor invade tecido perivesical
T3a - Microscopicamente
T3b - Macroscopicamente (massa extravesical)
T4 - Tumor invade qualquer uma das estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal
T4a - Tumor invade estroma da próstata, vesículas seminais, útero ou vagina
T4b - Tumor invade parede pélvica ou parede abdominal
N - Gânglios linfáticos regionais
NX - Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
N0 - Ausência de metástases nos gânglios linfáticos regionais
N1 - Metástase em um único gânglio linfático na cavidade pélvica
N2 - Metástase em múltiplos gânglios linfáticos regionais na cavidade pélvica
N3 - Metástase em gânglios linfáticos ilíacos comuns
M - Metástases à distância
M0 - Sem metástase à distância
M1 - Metástases à distância
M1a - Gânglios linfáticos não regionais
M1b - Outras metástases à distância

O sintoma mais comum de cancro da bexiga é a hematúria indolor, que ocorre em 80% dos doentes. Contudo, os sinais e sintomas desta doença não são específicos, pelo que é fundamental descartar o diagnóstico de outras doenças do aparelho urinário em qualquer indivíduo com hematúria. Também, se o tumor estiver próximo ao colo da bexiga ou da uretra pode haver sintomas obstrutivos, como fluxo de urina reduzido ou intermitente e sensação de micção incompleta. Por último, os sintomas associados ao cancro da bexiga invasivo abrangem: dor no flanco, retenção urinária, edema de membros inferiores, perda de peso e dor óssea (Crawford, 2008; DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Kim e Chammas, 2009).

Posto isto, dois dos métodos de diagnóstico utilizados são a citologia da urina e a cistoscopia. A citologia urinária é um procedimento de baixo custo, não invasivo, onde a urina é examinada para pesquisa de células tumorais. Apresenta sensibilidade média de 44%, tem particularmente elevada sensibilidade para tumores de elevado grau, mas baixa sensibilidade para tumores de baixo grau. Uma citologia positiva pode indicar um tumor urotelial em qualquer sítio do aparelho urinário, enquanto negativa não exclui a presença de um tumor. Desta forma, a citologia urinária é capaz de auxiliar no diagnóstico inicial e pode ser usada como exame de vigilância em doentes com cancro da bexiga (Babjuk *et al.*, 2019; Kim e Chammas, 2009; Oeyen *et al.*, 2019).

A cistoscopia é um método eficiente, mas invasivo, sendo que a eficiência do exame depende do operador. De uma forma geral, tem sensibilidade de 62 a 84% e especificidade de 43 a 98%, dependendo do tipo, estágio e grau do tumor. Após este exame o indivíduo pode sentir efeitos secundários incluindo dor durante a micção, aumento da frequência da micção, hematúria visível e infeção (Babjuk *et al.*, 2019; Oeyen *et al.*, 2019). Se for encontrado um tumor na bexiga é preciso efetuar uma biópsia da bexiga, através de uma ressecção transuretral do tumor da bexiga (TURBT, do inglês *transurethral resection bladder tumor*). A TURBT fornece informações histopatológicas essenciais, necessárias para o diagnóstico definitivo, classificação do tumor, e também para a cirurgia de remoção do tumor (Babjuk *et al.*, 2019; DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Kim e Chammas, 2009).

1.5. Tratamento

Os doentes com cancro da bexiga enfrentam inúmeros desafios. A função geral e o bem-estar, bem como os domínios específicos da função urinária, intestinal e sexual podem ser afetados. Além disso, as elevadas taxas de recorrência e de progressão da doença impõem um dos maiores custos por pessoa de todos os tipos de cancro existentes (Sanli *et al.*, 2017).

Para o NMIBC, o tratamento convencional é TURBT seguida por instilação imediata de *bacille Calmette-Guerin* (BCG) ou quimioterapia intravesical com mitomicina C. O objetivo da terapia de instilação intravesical é prevenir a implantação do tumor após a ressecção e eliminar a doença residual. A decisão de quimioterapia ou imunoterapia com BCG é baseada no risco de progressão e de recorrência local. Para tumores de baixo risco (Ta de baixo grau) é realizada TURBT com instilação imediata de quimioterapia. Em doentes com tumores não invasivos do músculo de alto risco (Ta e T1 de elevado grau) o tratamento consiste em TURBT e BCG intravesical a iniciar dentro de 2 a 6 semanas após o primeiro tratamento, seguido por BCG de manutenção durante 1 até 3 anos (DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Felsenstein e Theodorescu, 2018; Jordan e Meeks, 2019; Mertens *et al.*, 2014; Redelman-Sidi, Glickman e Bochner, 2014; Sanli *et al.*, 2017). As opções de tratamento para NMIBC permite que os doentes mantenham a bexiga, contudo correm o risco de recorrência e de progressão para MIBC. Devido à elevada taxa de recorrência, os doentes requerem vigilância com exames cistoscópicos e imunoterapia intravesical com BCG ou quimioterapia com mitomicina C, para prevenir ou retardar a progressão do tumor. Em caso de recorrência do tumor, pode ser tratado com cirurgia transuretral e terapia intravesical (Kim e Chammas, 2009; Mertens *et al.*, 2014).

Os doentes com MIBC têm pior prognóstico devido ao desenvolvimento de doença metastática em 50% dos casos. Desta forma, são necessários tratamentos mais agressivos, como cistectomia radical, seguida por quimioterapia e/ou radioterapia (Felsenstein e Theodorescu, 2018; Sanli *et al.*, 2017). Os tumores de bexiga que invadem o músculo são normalmente tratados com cistectomia radical com dissecação dos gânglios linfáticos, precedida de quimioterapia neoadjuvante (Sanli *et al.*, 2017). As taxas de sobrevida aos cinco anos com a cistectomia isolada são apenas de 50%, sendo que a quimioterapia neoadjuvante com cisplatina pode melhorar a sobrevida, especialmente em doentes com alto risco de progressão ou de recorrência. A radioterapia de feixe externo também pode ser utilizada para preservação da bexiga ou cuidados paliativos, em indivíduos que não são candidatos a cistectomia (Bellmunt *et al.*, 2014; DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Kim e Chammas, 2009).

Relativamente ao cancro da bexiga não ressecável ou tumor metastático, a quimioterapia é o tratamento de eleição. Atualmente existem dois tratamentos disponíveis baseados na cisplatina, que estão associados a um tempo médio de sobrevida de 14 meses (DeGeorge, Holt e Hodges, 2017). A radioterapia de feixe externo também pode ser utilizada para o tratamento da doença metastática (Felsenstein e Theodorescu, 2018; Saginala *et al.*, 2020; Sanli *et al.*, 2017).

1.5.1 Falta de eficácia do tratamento

Os tratamentos atualmente disponíveis apresentam efeitos adversos e falta de eficácia. Em relação à cistectomia radical, a cirurgia traz implicações substanciais na qualidade de vida, causando efeitos secundários ao remover toda a bexiga e os gânglios linfáticos próximos. Nos homens a próstata e as vesículas seminais são também removidas, na mulher são retirados os ovários, trompas de Falópio, útero, colo do útero e uma pequena parte da vagina. Para além disso, após a cistectomia radical e a dissecação dos gânglios linfáticos, o desvio urinário é necessário para redirecionar o fluxo de urina de sua via normal (Kim e Chammas, 2009; Sanli *et al.*, 2017).

Visto que o cancro da bexiga é um tipo de cancro altamente imunogénico, imunoterapias destinadas a estimular o sistema imunológico têm sido usadas para tratamento. A imunoterapia com BCG é considerada o tratamento intravesical mais eficaz. No entanto, em aproximadamente 40% dos doentes o tumor recorre, e 60 a 70% dos doentes não respondem a uma repetição do BCG (Piao *et al.*, 2018; Redelman-Sidi, Glickman e Bochner, 2014; Steinberg, Thomas e Nepple, 2016). Alguns dos efeitos secundários mais comuns associados a esta terapia são febre, dores, fadiga e polaquiúria (Mertens *et al.*, 2014; Redelman-Sidi, Glickman and Bochner, 2014). Associados à quimioterapia e à radioterapia alguns dos efeitos adversos mais habituais incluem cardiocitotoxicidade, nefrotoxicidade, mielossupressão, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, mucosite e alopecia (Liu *et al.*, 2021).

Portanto, novas terapias contra o cancro da bexiga deverão incluir abordagens que permitam evitar os efeitos adversos comumente vistos na cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (Tanaka *et al.*, 2016).

2. Plasma Frio Atmosférico

2.1. Plasma

Existem quatro estados fundamentais da matéria: sólido, líquido, gasoso e plasma. O plasma, quarto estado da matéria, foi descoberto em 1879 por *William Crookes*, cuja investigação lhe permitiu concluir que 99% do universo observável está no estado de plasma (Nokhandani *et al.*, 2015; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

De uma forma geral, a energia térmica aumenta quando as matérias se transformam, sequencialmente, de sólidas em líquidas, em gasosas e em plasma [Figura 5]. Posto isto, no estado sólido os elementos estão fortemente acoplados, e quando a temperatura é superior à sua energia de ligação ocorre a quebra das ligações cristalinas e passa ao estado líquido. Em seguida, quando a energia térmica é da ordem da energia de ligação e as interações entre as partículas são fracas, as moléculas dissociam-se nos seus átomos constituintes e eletricamente neutros. Finalmente, ao aquecer o gás as ligações atômicas são quebradas e uma fração significativa dos átomos é dissociada em partículas carregadas positiva e negativamente, de forma a criar um gás ionizado, o plasma. O estado plasma difere do estado gasoso, pois o plasma é bom condutor de eletricidade e é afetado por campos magnéticos. Assim, o plasma é, em média, um gás ionizado, neutro, composto por íões carregados positivamente, elétrons e partículas neutras (Callen, 2003; Kong, 2006; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

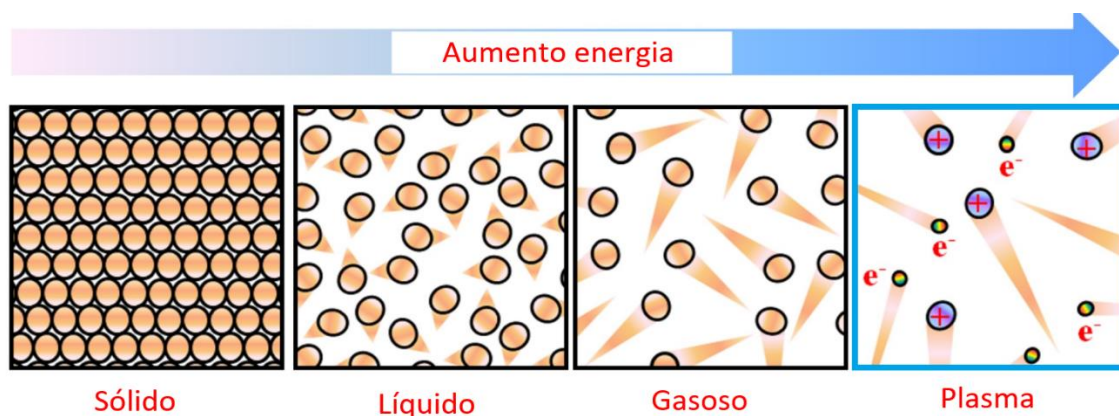


Figura 5 – Quatro estados da matéria. Ilustração do aumento da energia térmica nos quatro estados fundamentais da matéria. Adaptado de (Yan, Sherman e Keidar, 2017).

De modo geral, o plasma pode ser dividido em dois tipos: plasma térmico e plasma frio. O plasma térmico é composto por elétrons e partículas pesadas em equilíbrio termodinâmico, isto é, a temperatura dos elétrons é igual ou aproximadamente igual à temperatura das partículas pesadas (Nokhandani *et al.*, 2015). A temperatura do plasma é determinada pela temperatura das partículas pesadas, por causa da enorme diferença de massas entre elétrons e partículas pesadas. Em relação ao plasma frio, a temperatura das

partículas pesadas é muito mais baixa do que a dos elétrons. Portanto o plasma frio pode ter uma temperatura inferior a 40°C no ponto de aplicação. O desenvolvimento do plasma frio a uma temperatura inferior a 40°C e produzido à pressão normal, chama-se Plasma Frio Atmosférico (PFA) (Gay-Mimbrera *et al.*, 2016; Isbary *et al.*, 2013; Yan, Sherman e Keidar, 2017)

Assim, o PFA é um gás reativo, parcialmente ionizado, neutro que contém uma mistura de agentes ativos biológicos e físicos. É constituído por iões carregados positivamente, elétrons, partículas neutras e espécies reativas (Braný *et al.*, 2020; Semmler *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2018). O PFA tem potencial para aplicações clínicas sem prejudicar o tecido, devido à sua temperatura relativamente perto da temperatura ambiente (Gümbel *et al.*, 2017; Semmler *et al.*, 2020; YOON *et al.*, 2019).

O PFA tem vindo a receber atenção como uma ferramenta terapêutica emergente devido ao seu comportamento biofísico único, incluindo a capacidade de gerar quantidades consideráveis de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio (RONS). Evidências de trabalhos recentes sugerem que a maior parte da atividade do plasma vem da produção destas espécies reativas. Experiências *in vitro* e *in vivo* asseguram que a tecnologia do plasma tem grande potencial para ser usada, no futuro, como um tratamento para o cancro (Mitra *et al.*, 2019).

2.2. Produção de plasma

O plasma é produzido pela aplicação de energia a um gás, com o intuito de reorganizar a estrutura eletrónica das espécies e formar espécies reativas e iões. Essa energia pode ser energia térmica, energia transportada por corrente elétrica ou radiação eletromagnética. Geralmente o plasma é produzido a partir de energia elétrica, de modo que o campo elétrico gerado transmite energia para os elétrons do gás, energia essa que é transmitida às espécies neutras por meio de colisões. Essas colisões podem ser: 1) elásticas, ou seja não alteram a energia interna das espécies neutras, contudo aumentam ligeiramente a sua energia cinética; ou 2) podem ser inelásticas, se as colisões forem suficientemente energéticas sendo capazes de modificar a estrutura eletrónica da espécie neutra, o que resulta na criação de espécies excitadas ou iões (Tendero *et al.*, 2006).

Os dispositivos de PFA clinicamente usados e testados experimentalmente são divididos com base na forma como os objetos biológicos são tratados, em três categorias principais: de descarga direta, de descarga indireta e os híbridos (Braný *et al.*, 2020; Keidar, 2015). Vários gases, como hélio, árgon, nitrogénio e ar, bem como energia, calor, eletricidade e energia luminosa são usados para produzir e manter o plasma (Nokhandani *et al.*, 2015).

O dispositivo de descarga direta mais utilizado é o de barreira dielétrica (DBD), que pode gerar o plasma diretamente no ar e tende a gerar um plasma curto, mas amplo, produzindo altas concentrações de RONS. A descarga direta ocorre entre um eletrodo de alta tensão e um eletrodo subjacente. Os eletrodos podem ser ambos ou individualmente cobertos por uma camada dielétrica e entre eles há um gás ionizado para a produção de plasma (Braný *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2009; Nokhandani *et al.*, 2015). Nesta situação, o tecido ou células vivas podem funcionar como um dos eletrodos e ser uma parte ativa da descarga. Assim sendo, uma fração de corrente flui pelo tecido vivo na forma de uma

pequena corrente de condução, a qual é normalmente limitada para minimizar os efeitos térmicos e a estimulação elétrica dos músculos. Por fim, devido às suas características, dispositivos de descarga direta são mais adequados para um tratamento mais intenso em uma grande área de amostra (Isbary *et al.*, 2013; Keidar, 2015; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

A descarga indireta é gerada por dispositivos chamados *plasma jets*, *plasma pens* ou *plasma torches*, que possuem diferentes tamanhos. Esses dispositivos dispõem de dois eletrodos que produzem uma descarga de plasma entre eles, do qual o gás portador direciona a descarga de plasma. A alteração do gás permite a obtenção de RONS diferentes. Nestes dispositivos a descarga não afeta o objeto entre os dois eletrodos, mas prossegue na direção do fluxo de gás. Isso possibilita a que o objeto alvo seja localizado fora do dispositivo e a área afetada seja ajustável, contudo, são produzidas menores quantidades de RONS e a descarga é mais difícil de controlar. Ao contrário dos dispositivos DBD, estes não produzem corrente elétrica. Logo, dispositivos de descarga indireta são mais adequados para tratar, suavemente, uma pequena área em uma amostra ou para aplicações endoscópicas (Babaeva e Naidis, 2018; Braný *et al.*, 2020; Isbary *et al.*, 2013; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

Por fim, os dispositivos de plasma híbrido combinam os princípios da descarga direta com a indireta, mas são utilizados apenas ao nível experimental. Esses dispositivos criam uma descarga combinando micro descargas em um eletrodo de malha ligado à terra. Há uma descarga uniforme e nenhum efeito sobre o objeto entre os dois eletrodos, sendo que o dispositivo é relativamente fácil de controlar. No entanto, esses dispositivos têm suscetibilidade ligeiramente maior ao desgaste de componentes e subsequente deterioração (Braný *et al.*, 2020; Keidar, 2015).

2.3. Aplicação direta e indireta do Plasma Frio Atmosférico

A aplicação do PFA é relativamente fácil pois este pode ser formado a partir de um dispositivo portátil, o que possibilita um acesso mais fácil às células e tecidos. Os custos de fabricação destes dispositivos são relativamente baixos, portanto dispositivos acessíveis, eficientes e mais baratos podem reduzir o fardo financeiro imposto ao orçamento da saúde pelos tratamentos atualmente disponíveis (Braný *et al.*, 2020).

A aplicação do PFA pode ser realizada de forma direta ou indireta [Figura 6]. É importante salientar que a descrição feita na secção anterior diz respeito à produção do plasma, enquanto que esta secção descreve os métodos de aplicação do plasma. Por um lado, na aplicação direta as linhas celulares, modelos animais ou tecidos humanos são expostas a descargas de PFA. Por outro lado, na aplicação indireta são utilizados meios de base aquosa previamente ativados por PFA, os quais são posteriormente usados no cultivo de células, ou injeção em animais ou indivíduos (Braný *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2018). Após o tratamento do meio com PFA, este é enriquecido com uma variedade de RONS (Kaushik *et al.*, 2018).

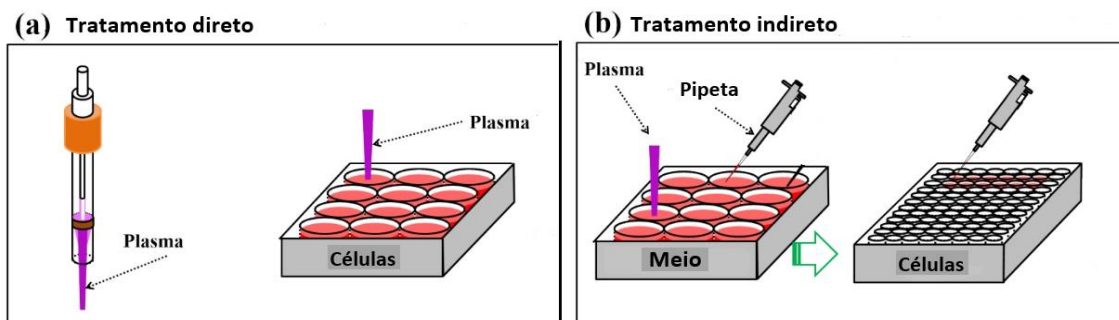


Figura 6 – Aplicação do Plasma Frio Atmosférico. a) Tratamento direto em que as células sofrem descarga direta do PFA. b) Tratamento indireto em que o meio é previamente ativado por PFA e posteriormente transferido para as células. Adaptado de (Yan, Sherman e Keidar, 2017).

2.4. Plasma Frio Atmosférico em oncologia

Na última década surgiu um novo campo inovador chamado medicina de plasma, o qual associa a física do plasma, às ciências da vida e à medicina clínica. Estudos atuais têm demonstrando que o PFA pode exercer efeitos benéficos ao ser aplicado em determinadas patologias, com toxicidade mínima nos tecidos normais. Além disso, há evidências clínicas das aplicações do PFA na regeneração de tecidos, feridas e desinfecção de pele (Gay-Mimbrera *et al.*, 2016).

Posto isto, diversos estudos têm demonstrado a capacidade do PFA induzir morte celular em células tumorais com o tratamento direto, como no cancro do pulmão (Hirst *et al.*, 2015), cancro dos ossos (Canal *et al.*, 2017), cancro da pele (Zucker *et al.*, 2012), cancro da mama (Mirpour *et al.*, 2014), cancro da cabeça e pescoço (Guerrero-Preston *et al.*, 2014), cancro do fígado (Smolková *et al.*, 2019), cancro do pâncreas (LIEDTKE *et al.*, 2018), cancro oral (Kang *et al.*, 2017) e cancro da bexiga (Mohades, Barekzi e Laroussi, 2014). Estudos desenvolvidos no Instituto de Biofísica da FMUC demonstraram a eficácia do tratamento com PFA contra o cancro da bexiga, retinoblastoma, melanoma, osteossarcoma, cancro da mama, cancro do endométrio, cancro da próstata e cancro das vias biliares (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Silva-Teixeira *et al.*, 2021; Tavares-da-Silva *et al.*, 2021)

Em relação ao tratamento indireto, isto é, com recurso aos meios ativados por PFA (MAPs), que surgiu recentemente, também já existem algumas evidências das suas possíveis aplicações em Oncologia, como no cancro da mama (Nagaya *et al.*, 2019), cancro da pele (Wang *et al.*, 2019), cancro do ovário (Koensgen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Nakamura *et al.*, 2017), cancro colorretal (Freund *et al.*, 2019; Grisetti *et al.*, 2019), cancro do pâncreas (Liedtke *et al.*, 2017; Loenhout, Van *et al.*, 2019; Sato *et al.*, 2018) e cancro do pulmão (Adachi *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2020). Para além disto, um estudo desenvolvido pelo Instituto de Biofísica da FMUC demonstrou a eficácia do MAP contra o retinoblastoma (Silva-Teixeira *et al.*, 2021).

2.4.1. Seletividade do Plasma Frio Atmosférico

Segundo a literatura, o PFA induz seletivamente morte celular nas células tumorais, poupando as células saudáveis. O efeito mais observado associado ao tratamento com PFA está relacionado com as RONS, as quais têm a capacidade de lesar, irreversivelmente, proteínas chave e DNA e RNA. Sabe-se que células tumorais, devido ao seu metabolismo aberrante, produzem maiores quantidades de RONS. Logo, o nível de stresse oxidativo das células tumorais está perto do limite em que ocorre a morte celular. Deste modo, a diferença entre o nível de stresse oxidativo entre uma célula normal e uma célula tumoral é um dos fatores que possibilita a seletividade do tratamento com o PFA (Keidar, 2015; Semmler *et al.*, 2020; YOON *et al.*, 2019).

Para danificar as células tumorais é necessário que as RONS penetrem na membrana celular. A maioria das RONS produzidas pela descarga de PFA são moléculas polares ou carregadas, logo a difusão transmembranar deve ser facilitada por proteínas membranares específicas. Recentemente, alguns estudos demonstraram que as aquaporinas facilitam o transporte passivo do peróxido de hidrogénio através da membrana celular. As aquaporinas foram inicialmente identificadas como canais passivos de água localizados na membrana celular, no entanto, nas últimas décadas foi demonstrado que a difusão de muitas outras moléculas é facilitada pelas aquaporinas. De forma a sustentar o crescimento, a proliferação e o metabolismo das células tumorais, estas expressam mais aquaporinas, em comparação com as células saudáveis. Consequentemente, há um aumento significativamente maior de RONS nas células tumorais do que nas normais, logo há uma maior probabilidade de as células tumorais morrerem pelo tratamento com o PFA (Liedtke *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2015).

2.4.2. Mecanismos de ação do Plasma Frio Atmosférico

Os mecanismos de ação do PFA têm vindo a ser explorados, contudo, é clara a existência de alguma controvérsia em relação aos mecanismos de interação célula-plasma (Keidar *et al.*, 2011). Em relação às RONS ainda não é claro quais as espécies que contribuem, principalmente, para a morte das células tumorais (Griseti, Merbahi e Golzio, 2020; Semmler *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2015).

Uma descarga de PFA origina radiação ultravioleta, calor, corrente elétrica e indução de RONS. Especificamente, os radicais hidroxilo e oxido nítrico são normalmente formados pelas interações plasma-ar, enquanto nitritos, nitratos e peróxido de hidrogénio, espécies com tempos de vida mais longos, são formados por interações líquido-plasma. O efeito da radiação ultravioleta, calor e campo eletromagnético está ainda em esclarecimento. Tanto quanto é possível afirmar com os dados conhecidos, a resposta celular observada no tratamento é muito provavelmente devido às diversas espécies reativas formadas (Braný *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2015; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

Segundo a literatura, como consequência do tratamento com PFA, pode ser induzida senescência ou morte celular por apoptose, necrose ou autofagia, sendo que o processo induzido depende do tempo de exposição ao PFA. Tratamentos relativamente

curtos induzem senescência, especialmente quando a maioria das células do tecido está em fase proliferativa, enquanto tratamentos mais longos alteram o ciclo celular induzindo apoptose ou necrose. As células têm a capacidade de enviar sinais para células vizinhas que não foram lesadas como consequência do stresse oxidativo, influenciando moléculas sinalizadoras. Deste modo, a apoptose pode ocorrer em células vizinhas sem estas terem sido irradiadas diretamente (Gay-Mimbrera *et al.*, 2016; Semmler *et al.*, 2020).

A senescência é uma paragem irreversível do crescimento celular, evitando que as células envelhecidas ou anormais se reproduzam, prevenindo o desenvolvimento de tumores (Arndt *et al.*, 2013).

A apoptose ou morte celular programada é um processo fundamental para o desenvolvimento normal, diferenciação e senescência de organismos. Este processo ocorre em células danificadas, velhas ou não funcionais, e envolve um conjunto de eventos bioquímicos que levam a mudanças na morfologia e comportamento das células. Diversos sinais intracelulares e extracelulares induzidos pelo stresse oxidativo convergem nas mitocôndrias, promovendo a libertação de fatores pró-apoptóticos. A indução da apoptose é regulada pela família de proteínas BCL-2, por posterior ativação da cascata de caspases. As mitocôndrias são reguladoras chave da cascata de caspases, por meio de ativação da caspase-9 e depois da caspase-3, denominada de via intrínseca da apoptose. Além da cascata pela via mitocondrial, a indução de apoptose pode ser desencadeada por estímulos extrínsecos, por meio de recetores de morte, denominada a via extrínseca da apoptose, que leva à ativação das caspases-8 ou -10 e também da -3. A ativação das caspases resulta na permeabilização da membrana celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, levando à destruição da célula (Ahn *et al.*, 2011; Arndt *et al.*, 2013; Braný *et al.*, 2020; Gay-Mimbrera *et al.*, 2016; Nikolettópoulou *et al.*, 2013; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

Normalmente, a necrose é seguida por reações inflamatórias e é um tipo de morte celular caracterizada pelo edema dos organelos, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, a rutura da membrana plasmática e, conseqüentemente, por lise celular. Acredita-se que esta morte celular ocorre em resposta a danos, mas não durante o desenvolvimento normal (Nikolettópoulou *et al.*, 2013).

A autofagia é um mecanismo em que ocorre a incorporação, de material citoplasmático e organelos intracelulares, dentro de vesículas denominadas de autofagossomas. De seguida, o autofagossoma funde-se com um lisossoma formando um autolisossoma, onde ocorre degradação do material fagocitado. A autofagia tem uma função citoprotetora mas também pode promover a morte celular durante o desenvolvimento normal ou doença (Nikolettópoulou *et al.*, 2013).

Além disso, o tratamento com PFA a nível celular inclui o desprendimento das células da matriz extracelular e a diminuição da velocidade de migração das células. A nível subcelular diminui a expressão de várias integrinas. As integrinas são moléculas de adesão, que se encontram à superfície das células e que desempenham um papel crucial na transformação maligna, inibição da apoptose e na capacidade de metastização (Keidar *et al.*, 2011; Semmler *et al.*, 2020). As integrinas, expressas em células tumorais, auxiliam na progressão e na metástase do tumor, aumentando a migração, a invasão, a proliferação e a sobrevivência das células tumorais. Estas moléculas ligam-se aos componentes da matriz extracelular fornecendo a tração necessária para a mobilidade e para a invasão celular. Para além disso, as integrinas têm a capacidade de iniciar a apoptose ou aumentar a sobrevivência celular. Se por um lado, as integrinas, no estado ligado, podem transmitir sinais de sobrevivência, por outro as integrinas no estado não ligado podem promover cascatas pró-apoptóticas (Desgrosellier e Cheresch, 2010).

2.5. Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico

Recentemente, os MAPs surgiram como uma nova modalidade do tratamento com plasma, envolvendo terapia indireta, que pode ser mais viável do que a terapia direta (Nakamura *et al.*, 2017; Saadati *et al.*, 2018). Para que se possa usar esta modalidade de tratamento é necessário desenvolver um modo eficaz de produção e o estudo do efeito de MAPs que possam ser administrados a humanos em segurança e que induzam efeitos locais e não sistêmicos (Liedtke *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2018).

O tratamento direto com PFA de células ou tecidos cancerígenos possui algumas desvantagens, como a transferência de plasma para o corpo, principalmente em tumores profundos, e a necessidade de uma fonte de plasma padronizada, o que pode torná-lo complicado para o tratamento de alguns órgãos. Apresenta também um problema de penetração tissular pobre, limitando a sua aplicação na terapia do cancro, principalmente se existirem metástases disseminadas, o que se apresenta como um impedimento para a adoção desta abordagem (Lee *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2016; Saadati *et al.*, 2018). Também, manifesta um problema quando o dispositivo que produz o plasma frio não é portátil (Yan *et al.*, 2016).

Os MAPs incluem meios de cultura de células, água ou soluções fisiológicas, como a solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) e o soro fisiológico (NaCl 0,9%) (Griseti *et al.*, 2019). Os meios com composições simples são mais adequadas para investigação dos mecanismos que desempenham um papel importante na atividade anti tumoral, porque não são dependentes da linha celular como os meios de cultura (Boxem, Van *et al.*, 2017; Kaushik *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2016). Logo, há um interesse crescente em investigar soluções fisiológicas e estáveis, de forma a existir um melhor controlo sobre as RONS produzidas após a exposição ao PFA (Griseti, Merbahi e Golzio, 2020).

O uso de MAP ainda está em fase inicial de desenvolvimento e os efeitos nas células são mal compreendidos. Mesmo assim, além de mostrar ser citotóxico contra células tumorais, estudos mostram que a citotoxicidade pode ser conservada por longos períodos de armazenamento a -80°C , e até 4°C , o que significa que o meio pode ser preparado anteriormente e usado mais tarde, oferecendo uma enorme vantagem para aplicações biomédicas no contexto clínico (Griseti *et al.*, 2019; Kaushik *et al.*, 2018).

Os MAPs têm diversas vantagens em relação à quimioterapia e à radioterapia. Como agentes terapêuticos, os MAPs podem ser produzidos em segurança e com baixo custo (Nguyen *et al.*, 2016). São capazes de evitar quaisquer efeitos da radiação ultravioleta e da temperatura, têm potencial para vir a permitir um tratamento uniforme e em determinado momento, podem ser produzidas antecipadamente e ser armazenadas de forma estável sob condições de temperatura adequadas (Chauvin *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). O tratamento direto implica que o tratamento seja realizado em contexto de cirurgia, de forma a permitir a irradiação da zona de interesse. Além disso, implica a presença de um dispositivo de produção de PFA presente no local da cirurgia. Enquanto o tratamento indireto apresenta a vantagem de poder ser injetado diretamente nos tecidos tumorais, como um medicamento, e com toxicidade mínima em tecidos normais (Adachi *et al.*, 2016; Chauvin *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2017).

2.5.1 Mecanismos de ação dos Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico

Os MAPs são relativamente recentes, pelo que os mecanismos que estão por detrás da sua ação ainda são mal compreendidos, principalmente a química do PFA em meios líquidos. Acredita-se que o principal mecanismo de ação está relacionado com as RONS, e, conseqüentemente, os mecanismos que estas desencadeiam (Liedtke *et al.*, 2017).

Diferentes espécies radiculares foram identificadas em meios tratados com PFA, onde a escolha do meio a irradiar adiciona variabilidade (Boehm *et al.*, 2018). A maioria dos MAPs apresentam RONS, mas em diferentes concentrações (Chauvin *et al.*, 2019). Sendo assim, são necessários mais esforços para encontrar as condições operacionais ideais para o tratamento de meios com PFA e otimização da sua aplicação (Boxem, Van *et al.*, 2017).

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas contendo um ou mais pares de elétrons desemparelhados em orbitais atômicas ou moleculares, o que lhes confere um grau elevado de reatividade química (Valko *et al.*, 2007).

As RONS são um grupo de radicais altamente reativos e moléculas não radicais que contêm oxigénio e nitrogénio. Geralmente, as espécies reativas de oxigénio (ROS) incluem o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\bullet}). As espécies reativas de nitrogénio (RNS) referem-se ao óxido nítrico (NO^{\bullet}), ao peroxinitrito ($ONOO^-$) e ao dióxido de nitrogénio (NO_2^{\bullet}) (Al-Shehri, 2021; Koskenkorva-Frank *et al.*, 2013). Ainda que reativas, as RONS possuem uma semi-vida biológica curta e, por isso possuem uma ação a nível celular de carácter transitório. A Figura 7 apresenta algumas das reações de formação das RONS. A formação do radical hidroxilo, altamente reativo, também pode ocorrer devido à presença de metais descompartimentalizados através das reações de *Fenton* (eq.1) e *Haber-Weiss* (eq.2) (Valko *et al.*, 2007).

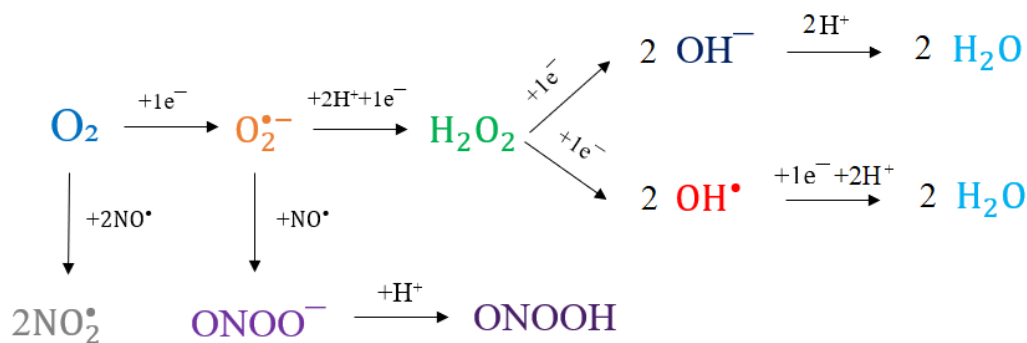
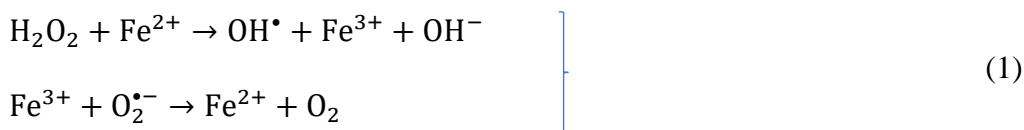


Figura 7 – Formação de ROS e RNS. Estão representadas as principais RONS e algumas das reações que podem ocorrer entre elas.



Quando o PFA interage com o meio, as RONS são dissolvidas na solução aquosa (Yan *et al.*, 2016). As moléculas de gás neutro (M) podem sofrer excitação (M*) ou ionização (M+) ao colidirem com elétrons energéticos (e⁻) produzidos pela descarga. Paralelamente, também há o efeito da radiação UV e dos campos elétricos. As espécies reativas primárias, como o OH[•], o NO[•], o O₂^{•-}, o oxigénio atómico (O), o oxigénio singleto (¹O₂) e o nitrogénio excitado (N*) são produzidos diretamente na região da descarga, devido à interação entre elétrons e as moléculas do gás. Estas espécies têm vida relativamente curta e, por isso, são convertidas em espécies de vida longa como o H₂O₂, o nitrato (NO₂), o nitrito (NO₃) e o ozono (O₃). Assim, as espécies formadas na fase gasosa dissolvem-se no meio líquido produzindo ainda, ácido nítrico (HNO₃), peroxinitrito (ONOO⁻) e ácido peroxinítrico (ONOOH) [Figura 8]. Desta forma, os MAPs apresentam reatividade elevada, e é devido à longa vida útil dos principais constituintes que o meio pode ser conservado por vários dias (Adachi *et al.*, 2016; Kaushik *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016).

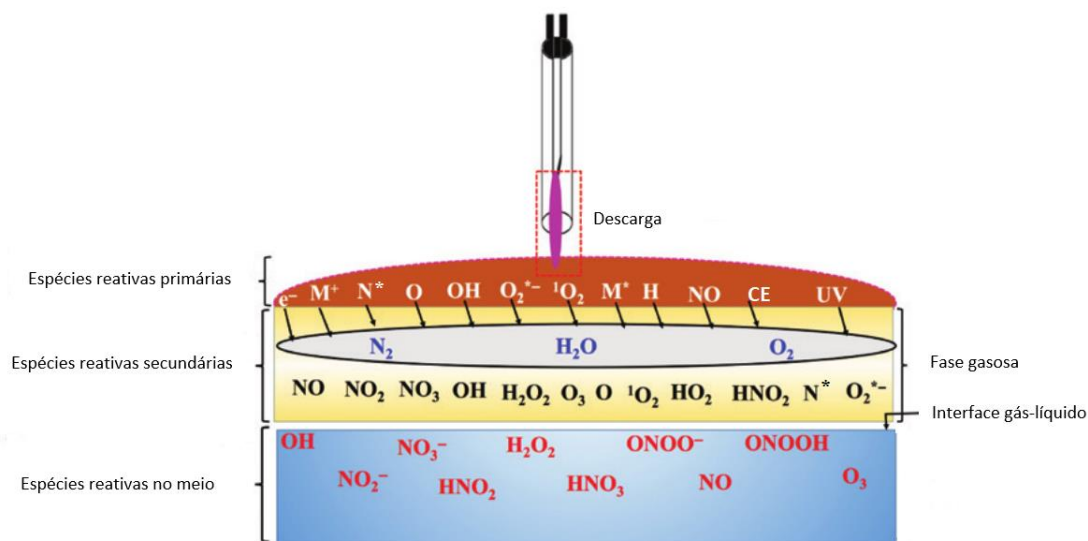


Figura 8 – Ilustração da formação dos constituintes ativos do plasma. A descarga de PFA produz espécies reativas primárias devido à interação entre elétrons e as moléculas do gás, bem como CE (campo elétrico) e UV (do inglês, ultraviolet). Na fase gasosa, as espécies reativas primárias são convertidas em espécies reativas secundárias. As espécies formadas na fase gasosa dissolvem-se no meio produzindo, ainda, outras espécies reativas. Adaptado de (Kaushik et al., 2018).

O impacto das RONS no ciclo celular depende do tipo e da concentração e pode ter consequências que vão desde a paragem transitória do crescimento celular até à morte celular permanente (Lee *et al.*, 2019). As espécies reativas, presentes nos MAPs, interagem com a superfície celular e entram na célula através da membrana celular, o que pode levar à disfunção mitocondrial, paragem do ciclo celular, sinalização celular alterada, fragmentação de DNA, ativação de caspases e apoptose (Boehm *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2016; Saadati *et al.*, 2018). Estas RONS estão também relacionadas com a prevenção do aparecimento de metástases, pois o tratamento com MAP reduz a migração, invasão e adesão das células tumorais (Kaushik *et al.*, 2018; Nakamura *et al.*, 2017).

Para além disto, as espécies reativas no meio podem influenciar a superfície celular, induzindo mudanças biológicas, como alteração da expressão genética, provocando alterações morfológicas celulares e morte celular (Nakamura *et al.*, 2017). O H_2O_2 (1 ms) pode induzir danos no DNA, causar paragem do ciclo celular e desencadear apoptose (Boehm *et al.*, 2018). O NO^\bullet (0,1-2 s) é capaz de penetrar nas membranas das células e organelos, e bloquear a cadeia de transportes de eletrões na mitocôndria, o que leva ao aumento de RONS e, em última instância, desencadeia a apoptose ao lesar as mitocôndrias. Este também reage com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ (2-4 μs) gerado na mitocôndria para formar ONOO^- (<10 ms), que ataca quase todas as macromoléculas importantes nas células (Yan *et al.*, 2014). O OH^\bullet (1 ns) apresenta alta reatividade com componentes celulares, tem a capacidade de reagir com todos os componentes do DNA causando a sua fragmentação e, consequentemente, morte celular (Adachi *et al.*, 2016; Chauvin *et al.*, 2017; Ferrer-Sueta e Radi, 2009; Thomas, 2015).

2.5.2 Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico contra o cancro da bexiga

Existem evidências atuais da aplicação dos MAPs no cancro da bexiga, utilizando solução salina (Zhang *et al.*, 2021) e meio de cultura celular (Mohades *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2021).

O tratamento com MAP pode ser mais viável que o tratamento direto no cancro da bexiga, visto que a bexiga é um órgão oco, o que permite estar direta e completamente exposta a líquidos citotóxicos. Este tipo de tratamento é barato, rápido, capaz de reter a sua atividade por longos períodos de armazenamento, o que possibilita a utilização do meio, sem ter de recorrer aos dispositivos de produção de PFA.

No tratamento, do cancro da bexiga, especialmente para NMIBC o método preferencial é o cirúrgico com ressecção transuretral. Após a cirurgia é efetuada a irrigação da bexiga para retirar as células tumorais que se libertaram durante o procedimento e evitar a sua reimplantação na parede da bexiga, prevenindo a recorrência e a progressão local do tumor. Essa irrigação muitas vezes é efetuada com água esterilizada ou soluções salinas (Lenis *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019). Por este motivo, os MAPs, preferencialmente soluções simples e utilizadas na prática clínica, podem ser usados na irrigação da bexiga, funcionando como um tratamento intravesical e sem efeitos adversos, devido à sua capacidade de danificar tecidos tumorais, mas não afetar os tecidos saudáveis.

II. Objetivos

Os tratamentos existentes atualmente para o cancro da bexiga estão associados a efeitos adversos consideráveis para além de não serem totalmente eficazes. Além disso, um dos desafios mais significativos é a falta de seletividade contra as células tumorais.

Anteriormente, no Instituto de Biofísica da FMUC foram realizados vários trabalhos experimentais com o PFA promissores (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Ferreira, 2019; Lopes, 2018; Oliveira, 2019; Pereira, 2020; Silva-Teixeira *et al.*, 2021; Tavares-da-Silva *et al.*, 2021; Teixeira, 2017). Foram efetuados estudos experimentais contra o retinoblastoma, melanoma, osteossarcoma, cancro da mama, cancro do endométrio, cancro da próstata e cancro das vias biliares (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Silva-Teixeira *et al.*, 2021). Especificamente, foram realizados ensaios para determinar a eficácia do tratamento direto com PFA no tratamento do cancro da bexiga. Esse trabalho demonstrou que o tratamento com PFA diminui a proliferação e a viabilidade celulares, provoca despolarização mitocondrial e aumenta a morte celular por apoptose e por necrose (Pereira, 2020; Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). De forma a dar continuidade a esse estudo, pretendeu-se averiguar a eficácia dos MAPs contra o cancro da bexiga, dado o impacto da aplicabilidade clínica dos MAPs já anteriormente referido.

Assim, o objetivo fundamental deste trabalho experimental é investigar, *in vitro* e *ex vivo*, o potencial terapêutico dos MAPs, como também elucidar os possíveis mecanismos de ação deste tipo de tratamento, em linhas celulares do cancro da bexiga, abrindo caminho para futuras pesquisas e aplicações clínicas.

Como objetivos específicos pretendeu-se analisar o potencial citotóxico do tratamento com MAP em diferentes linhas celulares de cancro da bexiga, através da determinação da atividade metabólica e do conteúdo proteico. Posteriormente, pretendeu-se clarificar os possíveis mecanismos de ação dos MAPs nas células de cancro da bexiga. Para tal, foram realizados vários ensaios, destacando-se a avaliação da viabilidade celular e do perfil de morte celular, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial e avaliação do conteúdo intracelular de RONS. Por fim, ao longo deste projeto, foi possível a execução de estudos *ex vivo* em amostras de tumor da bexiga, com o intuito de avaliar os efeitos do MAP num tecido mais próximo da realidade e muito mais complexo, do que ocorre *in vitro*.

III. Materiais e métodos

1. Estudos *in vitro*

1.1 Culturas Celulares

Para este trabalho experimental foram utilizadas duas linhas celulares humanas de carcinoma da bexiga, pertencentes a diferentes estádios da doença e com distintas características moleculares, a linha celular TCCSUP (ATCC®HTB-5™) isolada de um carcinoma urotelial de grau IV e a linha celular HT1376 (ATCC®CRL-1472™) isolada de um carcinoma de grau III. Estas linhas celulares foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC®) e foram mantidas em condições ótimas de crescimento celular (5% CO₂ e 37°C).

Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648) suplementado com 1% de antibiótico (Sigma, A5955) e 0,25 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360). Na linha celular TCCSUP, o meio utilizado foi enriquecido com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Sigma, F7524), ao passo que na linha celular HT1376 o meio utilizado foi enriquecido com 10% de FBS.

De forma a poder realizar os ensaios *in vitro* e tratando-se de culturas aderentes, as linhas celulares foram destacadas dos frascos de cultura, com recurso a um agente de dissociação, o *TrypLE™ Express* (Gibco, 12605-028). Depois da sua adição, as células foram incubadas a 5% CO₂ e 37°C, entre 5 a 10 minutos. De seguida, a suspensão celular foi inativada com o respetivo meio de cultura. Após inativação, determinou-se a concentração celular pelo método de exclusão do azul tripano, o qual permite a contagem de células de uma amostra da suspensão celular, depois de corada com azul de tripano (Sigma, 302643). De forma a proceder à contagem das células foi utilizada uma câmara de *neubauer* e um microscópio ótico invertido (Motic AE31) com ampliação de 100 vezes.

1.2 Dispositivo de Plasma Frio Atmosférico

No Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foi elaborado um dispositivo apto à produção de PFA (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Oliveira, 2019; Silva-Teixeira *et al.*, 2021; Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). É um dispositivo de corrente contínua que produz uma descarga de alta voltagem, através de uma agulha esterilizada com 40 mm de comprimento e 0,9 mm de raio (*Microlance 3, Becton Dickinson*, EUA). Esta agulha funciona como o elétrodo que produz o PFA através do ar e é colocada a 2 mm acima da superfície do meio. Ainda existe uma segunda agulha que se encontra submersa no meio, a qual funciona como segundo elétrodo, e que está ligado à terra. O dispositivo em questão foi desenvolvido para produzir uma descarga elétrica entre a ponta da agulha e as placas de 24 poços, onde o meio é colocado. Desta forma, o meio atua como área-alvo, bem como segundo elétrodo, possibilitando a

formação do PFA. A intensidade da corrente elétrica registada na agulha, em circuito fechado, foi de $33 \pm 1 \mu\text{A}$, a tensão calculada foi cerca de $4000 \pm 121 \text{ Volts (V)}$ e a frequência de pulsos foi de $1000 \pm 10 \text{ Hz}$, sendo que cada pulso teve $1,0 \pm 0,1 \text{ ms}$ de duração. Este dispositivo encontra-se em fase de submissão de patente (Tavares-da-Silva *et al.*, 2021).

1.3 Tratamento com Meios Ativados por Plasma Frio Atmosférico

O tratamento com MAP consiste na exposição prévia do meio ao jato de PFA, durante diversos tempos. Como MAP testaram-se quatro meios: água destilada (AD), água ultrapura (AUP), tampão fosfato (PBS: NaCl 0,9% 137 mM [Sigma, S7653], KCl 2,7 mM [Sigma, P9333], $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM [Sigma, S5011] e KH_2PO_4 2mM [Sigma, P0662], a pH 7,4) e soro fisiológico (NaCl 0,9%). Ao período de tempo ao qual os meios estão expostos ao PFA denominar-se-á doravante por “tempo de exposição”. Posteriormente, os MAPs foram transferidos para as placas de cultura celular que contêm as células previamente semeadas [Figura 9]. Ao período de tempo entre a transferência do MAP para as células até à avaliação de algum parâmetro a nível celular ou molecular denominar-se-á doravante por “tratamento”.

Em primeiro lugar, foi necessário fazer uma seleção do meio a estudar. Para tal, foi avaliada a atividade metabólica por ensaio de MTT após tratamento com água destilada, água ultrapura, PBS ou NaCl 0,9% ativados por PFA, e foi avaliado o conteúdo proteico pelo ensaio de SRB (do inglês, *sulforhodamine B*) após tratamento com PBS ou NaCl 0,9% ativados por PFA. A atividade metabólica e o conteúdo proteico foram avaliados 24, 48 e 72 horas após o tratamento, de forma a estimar a proliferação celular. Visto que o NaCl 0,9% é utilizado na prática clínica para a irrigação da bexiga e este mostrou resultados bastante promissores no *screening* feito inicialmente, decidiu-se prosseguir com o NaCl 0,9% para os ensaios subsequentes.

Ao explorar a literatura sobre MAPs verificou-se a adoção de duas abordagens possíveis para colocar o MAP em contacto com as células. Assim sendo, pretendeu-se explorar ambas as abordagens no tratamento com MAP, com o intuito de avaliar qual seria a mais eficaz. A primeira abordagem teve como base o protocolo descrito por Almeida-Ferreira *et al.*, e Silva-Teixeira *et al.*, em que o MAP é transferido diretamente para a placa com as células previamente semeadas [Figura 9] (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Silva-Teixeira *et al.*, 2021). Esta abordagem permite manter o meio de cultura das células. A segunda abordagem teve como base o protocolo descrito por Sato *et al.*, Tanaka *et al.*, e Wang *et al.*, neste caso, foi retirado o meio de cultura da placa com as células semeadas, em seguida foi colocado o MAP e incubou-se a placa durante 1 hora (Sato *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Posteriormente, o MAP foi descartado e foi colocado meio de cultura novo, sendo realizado o ensaio de MTT após 24 horas [Figura 10]. Como MAP foi utilizado o NaCl 0,9%. Uma vez que a bexiga é um órgão oco, é possível manter um líquido em contacto com a bexiga por um período de tempo, sendo este líquido expelido mais tarde. Por este motivo, também é de interesse estudar a segunda abordagem.

Para os ensaios subsequentes foi utilizada a primeira abordagem [Figura 9].

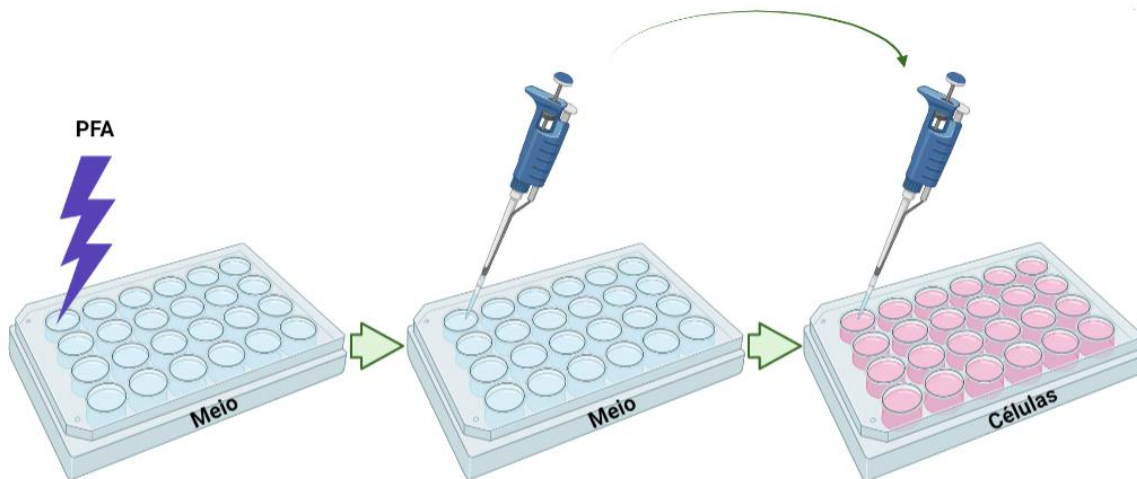


Figura 9 – Esquema ilustrativo do tratamento com MAP. Em primeiro lugar é realizada a ativação do meio (água destilada, água ultra-pura, PBS ou NaCl 0,9%) com diferentes tempos de exposição ao PFA. Em segundo lugar, o MAP é transferido para a placa com as células semeadas. Created with BioRender.com

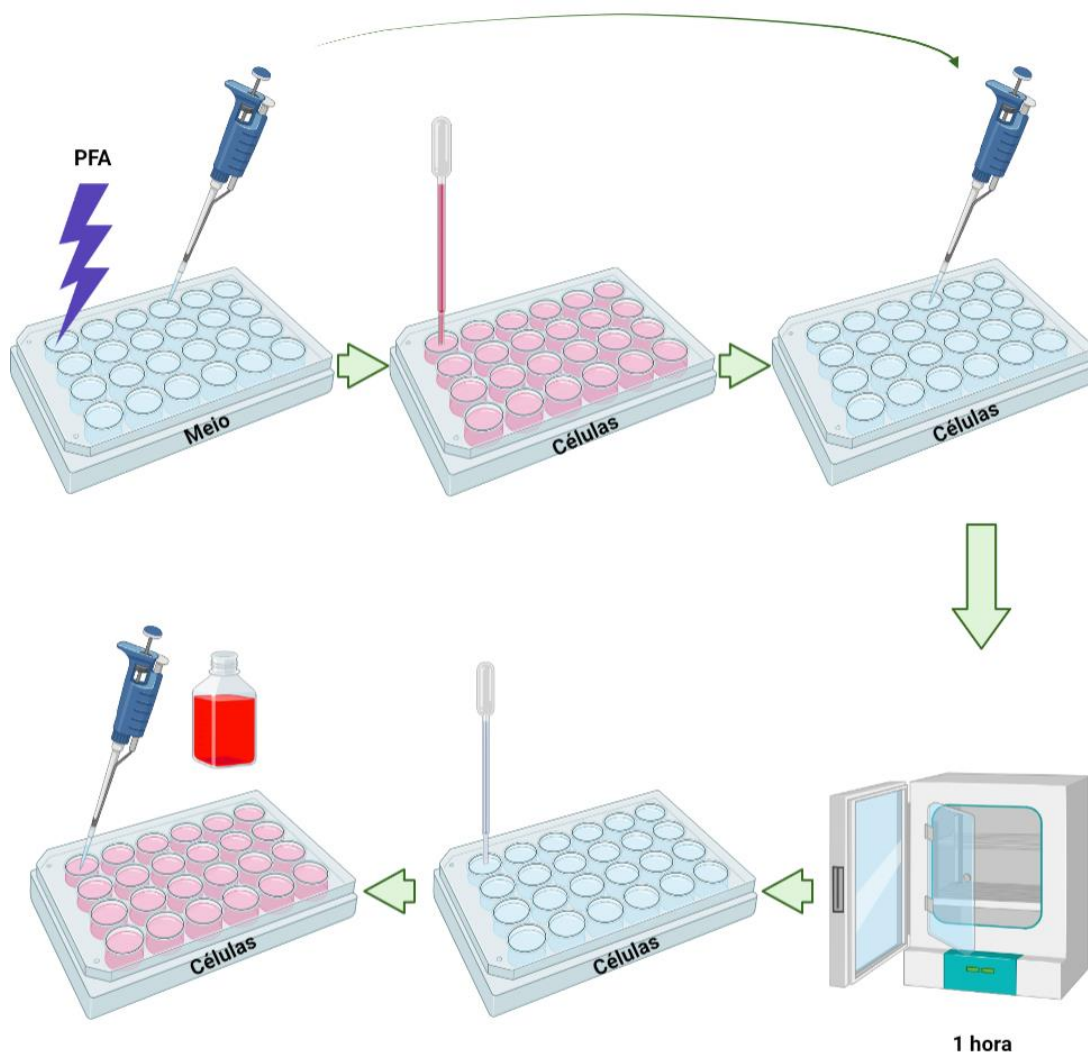


Figura 10 – Esquema ilustrativo do tratamento com MAP durante 1 hora. Em primeiro lugar é realizada a ativação do meio com diferentes tempos de exposição ao PFA. Em segundo lugar, o meio de cultura das células é removido e é adicionado o MAP, o qual fica durante 1 hora em contacto com as células. Por fim, o MAP é descartado e é adicionado meio de cultura novo às células. Created with BioRender.com

1.4 Proliferação celular

De forma a melhor compreender os efeitos do MAP na proliferação celular das duas linhas celulares utilizadas, foram executados os ensaios de MTT e de SRB, 24, 48 e 72 horas após tratamento. Para tal, as linhas celulares foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços, num volume de 500 μ L/poço, com a concentração de 100 000 células/mL. No dia seguinte, foi colocado meio (água destilada, água ultra-pura, PBS ou NaCl 0,9%) num volume de 500 μ L/poço numa placa de 24 poços, o meio foi ativado com PFA durante 30, 60, 120, 180 e 240 segundos. Posteriormente, esse meio foi transferido para as placas de cultura celular que continham as células semeadas [Figura 9]. Ainda, o esquema final da placa continha dois controlos: um controlo denominado “controlo_células” (C_cell) somente com células semeadas e o seu respetivo meio de cultura, e um segundo controlo denominado “controlo_meio” (C_meio) com células semeadas e o seu respetivo meio de cultura mais 500 μ L de meio (água destilada, água ultra-pura, PBS ou NaCl 0,9%) não ativado por PFA.

1.4.1 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*) foi realizado para avaliar o efeito dos MAPs na atividade metabólica das células. O MTT é reduzido na presença de enzimas desidrogenases localizadas nas mitocôndrias viáveis, as quais são capazes de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar um produto insolúvel em água e de cor violeta, o formazano. A quantidade de cristais de formazano é proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983; Pascua-Maestro *et al.*, 2018).

O meio de cultura celular foi removido e as células lavadas com PBS. Foram adicionados 300 μ L/poço de uma solução de MTT (Appllichem, A2231-0005) na concentração de 0,5 mg/mL, pH 7,4 e as células foram incubadas durante um período mínimo de 2 horas no escuro, a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 300 μ L de isopropanol (Sigma, 278475) com 40 mM de ácido clorídrico fumante a 37% (Merck Milipore, 100317) e as placas deixadas em agitação durante, pelo menos, 30 minutos. Por fim, a absorvância foi medida nos comprimentos de onda 570 e 620 nm num espectrofotómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader PerkinElmer®).

Os resultados do ensaio de MTT são apresentados como a percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_meio, e como a atividade metabólica do C_meio normalizado ao C_cell.

1.4.2 Ensaio de SRB

O conteúdo proteico foi avaliado através do ensaio de SRB. O SRB é um corante rosa de aminoxantina com dois grupos sulfônicos que se ligam a resíduos de aminoácidos básicos, sob condições ácidas moderadas, e se dissociam em condições básicas. Quanto maior o conteúdo proteico, maior a quantidade de SRB ligado e, conseqüentemente, maior a absorvância (Houghton *et al.*, 2007; Vichai e Kirtikara, 2006).

O meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS. Depois, procedeu-se à fixação das células com uma solução de ácido acético a 1% (Sigma, 109088) em metanol (Sigma, 322415) durante 1 hora e a 4°C. Posteriormente, descartou-se a solução de fixação e deixaram-se as placas a secar. Após secagem, adicionaram-se 300 µL de SRB a 0,4% (Sigma, S9012) dissolvido em 1% de ácido acético, e as células foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora. Por fim, as placas foram lavadas com água corrente para eliminar o excesso de corante não ligado, e adicionou-se uma solução de Tris.NaOH na concentração de 10 mM e com pH 10, constituída por trizma base (Sigma, T1503), e NaOH. O último passo foi a leitura da absorvância a 540 nm com um filtro de referência de 690 nm num espectrofotômetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®).

Os resultados do ensaio de SRB são apresentados como a percentagem de conteúdo proteico normalizada ao C_meio, e como o conteúdo proteico do C_meio normalizado ao C_cell.

1.5 Viabilidade e perfil de morte celular

De forma a analisar a viabilidade e o perfil de morte celular depois do tratamento das duas linhas celulares com NaCl 0,9% ativado por PFA, procedeu-se à dupla marcação com anexina V (AV) marcada com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (IP). Sabe-se que em células apoptóticas a membrana plasmática inverte-se, perdendo simetria e expondo à superfície da célula, resíduos de fosfatidilserina. Por sua vez, a AV liga-se à fosfatidilserina e marca as células apoptóticas, enquanto o IP se intercala no DNA em células que têm a integridade da membrana plasmática comprometida, as células necróticas. A utilização da dupla marcação permite discriminar 4 populações de células: vivas (células marcadas negativamente com AV e com IP), apoptose inicial (células marcadas positivamente com AV e negativamente com IP), apoptose tardia/necrose (células marcadas positivamente com AV e com IP) e necrose (células marcadas negativamente com AV e positivamente com IP) (Mariotti *et al.*, 2017; Vermes *et al.*, 1995).

Para estudar a viabilidade e o perfil de morte celular foi realizada citometria de fluxo. Para este ensaio as linhas celulares foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços na concentração de 200 000 células/mL num volume de 500 µL/poço. Após 24 horas, as células foram expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA [Figura 9]. O NaCl 0,9% foi previamente exposto ao PFA durante 30, 60 e 120 segundos; os tempos de exposição foram selecionados tendo em conta os resultados dos ensaios de MTT e SRB. Por fim, após tratamento durante 24 horas foi realizada a citometria de fluxo.

Após 24 horas de tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, as células foram destacadas e 300 000 células de cada condição foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Na linha celular TCCSUP foram utilizados 100 µL de tampão de ligação (0,01 M de HEPES [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl 0,9% e 0,25 mM de CaCl₂ [Sigma, C4901]), 2,5 µL de AV-FITC (Immunostep, ANXVKF) e 1 µL de IP (Immunostep, ANXVKF). Na linha celular HT1376 foram utilizados 50 µL de tampão de ligação, 1,25 µL de AV-FITC (Immunostep, ANXVKF) e 0,5 µL de IP (Immunostep, ANXVKF). As células foram incubadas a 37°C durante 15 minutos, na ausência de luz. Por fim, nas linhas celulares TCCSUP e HT1376 adicionaram-se 400 µL e 200 µL de tampão de ligação, respectivamente, e a análise foi realizada num citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson), utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm e comprimentos de onda de emissão de 533 e de 640 nm para a AV-FITC e para o IP, respectivamente.

Os dados obtidos são apresentados como a percentagem de células em cada uma das subpopulações: células viáveis (V), células em apoptose inicial (A), células em apoptose tardia/necrose (A/N) e células em necrose (N).

1.5.1. Morfologia celular

A análise das características morfológicas das células permite a avaliação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento com o NaCl 0,9% ativado por PFA. Para tal, foi utilizada a técnica de *May-Grünwald-Giemsa*, por microscopia ótica, através de esfregaços de células e coloração dos mesmos com os corantes *May-Grünwald* e *Giemsa* (Silva *et al.*, 2020).

Para obtenção do NaCl 0,9% ativado por PFA, este foi previamente exposto ao PFA durante 30, 60 e 120 segundos [Figura 9] e transferido para placas de 24 poços com 100 000 células/poço. Após 24 horas de tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, as células foram destacadas e 200 000 células de cada condição foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com PBS e novamente centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. As células obtidas foram ressuspensas em 50 µL de FBS, de forma a melhorar a sua adesão à lâmina. De seguida procedeu-se à realização dos esfregaços em lâminas (Normax) e deixaram-se as lâminas a secar durante, pelo menos, 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram fixadas durante 5 minutos em metanol. De seguida, procedeu-se à coloração com a solução de *May-Grünwald* (Merck Millipore, 101424) durante 4 minutos e, de seguida, com solução de *Giemsa* (Merck Millipore, 109204) a 5% em PBS, durante 15 minutos. Por fim, os esfregaços foram lavados com PBS e deixados a secar ao ar. Posteriormente, para observação das lâminas e obtenção das fotografias foi utilizado o microscópio ótico Nikon Eclipse Ni equipado com Nikon Digital Camera DS-Fi2.

Para cada linha celular os resultados são apresentados de forma qualitativa, com 3 fotografias representativas para cada condição.

1.6 Ciclo Celular

Para avaliar as alterações induzidas no ciclo celular pelo NaCl 0,9% ativado por PFA foi utilizada a citometria de fluxo através da marcação com IP. O IP é um composto capaz de se ligar estequiometricamente a ácidos nucleicos e, por isso, se quisermos estudar a interação com DNA é necessário remover o RNA de forma enzimática, usando RNase. Este procedimento permitirá obter uma marcação específica para o DNA. Assim sendo, o IP liga-se ao DNA presente nas células o que separa as várias populações em cada uma das fases do ciclo celular. Portanto, é possível identificar a fase do ciclo celular tendo em conta a quantidade de DNA; sendo que as células na fase pré-G0/G1, chamado de pico apoptótico, apresentam menor quantidade de DNA, as células que estão na fase S possuem mais DNA do que as células em fase G0/G1 e as células que estão em fase G2/M possuem o dobro do conteúdo de DNA que as células na fase G0/G1 (Riccardi e Nicoletti, 2006).

Para estudar as alterações induzidas no ciclo celular as linhas celulares foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços na concentração de 200 000 células/mL num volume de 500 μ L/poço. Após 24 horas, as células foram expostas a NaCl 0,9% ativado por PFA [Figura 9]. O NaCl 0,9% foi previamente exposto ao PFA durante 30, 60 e 120 segundos, tempos de exposição selecionados tendo em conta os resultados dos ensaios de MTT e de SRB. Por fim, após tratamento de 24 horas foi realizada a citometria de fluxo.

Após 24 horas de tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA as células foram destacadas e 300 000 células de cada condição foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. As células foram lavadas com PBS, novamente centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Nas linhas celulares TCCSUP e HT1376 fixaram-se as células com 200 μ L ou 100 μ L de etanol (Sigma, 1.08543) a 70% em agitação, respetivamente, e as células foram incubadas a 4°C durante 30 minutos. De seguida, as células foram lavadas com PBS e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Por fim, ao *pellet* resultante foi adicionado 200 μ L ou 100 μ L de uma solução de IP/RNase (Immunostep, PI/RNase) para as linhas celulares TCCSUP ou HT1376, respetivamente, as quais foram incubadas no escuro, durante 15 minutos. A análise foi executada num citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson), usando os comprimentos de excitação e de emissão de 488 e de 640 nm, respetivamente.

Os resultados são apresentados como a percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações: pré-G0/G1, G0/G1, S e G2/M.

1.7 Potencial da membrana mitocondrial

Para avaliar o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi utilizada a citometria de fluxo através da marcação com JC-1 (do inglês, *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide*). O JC-1 é um corante catiónico, que, dependendo do $\Delta\Psi_m$, pode formar agregados (A) ou monómeros (M). Com o aumento do $\Delta\Psi_m$ formam-se agregados de JC-1 que emitem fluorescência com comprimento de onda correspondente ao vermelho. Com a diminuição do $\Delta\Psi_m$ formam-

se monómeros de JC-1 que emitem fluorescência com o comprimento de onda correspondente ao verde. Deste modo, a relação entre a fluorescência vermelho/verde (agregados/monómeros) é independente da forma, densidade ou tamanho mitocondrial e fornece uma estimativa do $\Delta\Psi_m$. Quanto menor for essa proporção, menor é o $\Delta\Psi_m$, o que se correlaciona com a presença de disfunção mitocondrial (Elefantova *et al.*, 2018).

Para estudar o potencial de membrana mitocondrial foi realizada citometria de fluxo. Para este ensaio as linhas celulares foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços com a concentração de 200 000 células/mL e num volume de 500 μ L/poço. Após 24 horas, as células foram expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA [Figura 9]. O NaCl 0,9% tinha sido previamente exposto ao PFA durante 30, 60 e 120 segundos. Por fim, após tratamento de 24 horas foi realizada a citometria de fluxo.

Após 24 horas de tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA as células foram destacadas e 300 000 células de cada condição foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. As células foram lavadas com PBS, novamente centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Nas linhas celulares TCCSUP e HT1376 foi adicionado 1 mL ou 0,5 mL de PBS, respetivamente, e 5 μ g ou 2,5 μ g da sonda JC-1 (Sigma, T4069), respetivamente. As células foram incubadas a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições. Por fim, foi adicionado 400 μ L ou 200 μ L de PBS nas linhas celulares TCCSUP e HT1376, respetivamente. A análise foi realizada no citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson), utilizando como comprimentos de onda de emissão 590 nm para os agregados e 530 nm para os monómeros.

Os resultados são apresentados como a variação da razão das intensidades de fluorescência de agregados/monómeros (A/M), normalizada ao C_meio.

1.8 Espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio

A regulação do stresse oxidativo é um fator fundamental na resposta à terapia e ao desenvolvimento do tumor. Sabe-se que o estado *redox* das células tumorais difere do das células normais e que níveis elevados de RONS provocam danos às células (Gorrini, Harris e Mak, 2013).

As RONS foram avaliadas na ausência e na presença de células. Na primeira abordagem, as RONS foram avaliadas diretamente no NaCl 0,9%, após ativação por PFA na ausência de células. Na segunda, avaliou-se o conteúdo intracelular de RONS após incubação das células com o NaCl 0,9% ativado por PFA.

De modo a avaliar a presença total de espécies reativas no NaCl 0,9% ativado por PFA, foi avaliada a produção de RONS no NaCl 0,9%. Para tal, foi distribuído NaCl 0,9% num volume de 500 μ L/poço em placas de 24 poços. Depois procedeu-se à irradiação durante 30, 60, 120 e 180 segundos. Imediatamente após a irradiação, 250 μ L do NaCl 0,9% ativado por PFA foram imediatamente transferidos para *eppendorfs* e armazenados a -80°C durante 3 meses ou 3 dias. Também foi realizada outra abordagem, em que após a irradiação as placas foram incubadas a 37°C durante 2 horas, em seguida 250 μ L do NaCl 0,9% ativado por PFA foram transferidos para *eppendorfs* e armazenados a -80°C durante 4 dias. Posteriormente, foi utilizado o kit *OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay*

Kit (Cell Biolabs) para medição das RONS produzidas como consequência da irradiação e na ausência de células.

Também foi avaliado o conteúdo intracelular das RONS nas duas linhas celulares de cancro de bexiga, de forma a investigar as alterações causadas no ambiente redox das células, pela exposição ao NaCl 0,9% ativado por PFA. Para tal, as células foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços, na concentração de 200 000 células/mL, num volume de 500 µL/poço. Após 24 horas, as células foram expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA, o qual foi previamente exposto ao PFA durante 30, 60 e 120 segundos. Por fim, as sondas DCFH₂-DA, DHE e DAF-FM *Diacetate* foram utilizadas para avaliar o conteúdo intracelular de peróxidos, de radical superóxido e de óxido nítrico, respetivamente, 2 horas após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA.

1.8.1 Avaliação de RONS no NaCl 0,9% ativado por PFA

Para avaliar a quantidade de RONS no NaCl 0,9% ativado por PFA, foi utilizado o Kit *OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit* (Cell Biolabs). Este ensaio baseia-se na sonda DCFH₂DiOxyQ (do inglês, *dichlorodihydrofluorescein DiOxyQ*) que é preparada com um reagente de remoção e estabilizada na forma DCFH (do inglês, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein*) altamente reativa. As RONS podem reagir com o DCFH que é oxidado formando o composto altamente fluorescente DCF (do inglês, *2',7'-dichlorofluorescein*). Este ensaio permite detetar a presença de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), de radical peróxido (ROO[•]), de óxido nítrico (NO[•]) e de peroxinitrito (ONOO⁻). A intensidade da fluorescência é proporcional ao nível relativo de RONS na amostra (Olejnik *et al.*, 2020; Warowicka *et al.*, 2020).

Para este ensaio, o NaCl 0,9% foi exposto ao PFA durante 30, 60, 120 e 180 segundos. Estes tempos foram selecionados de forma a abranger os tempos de irradiação do NaCl 0,9% utilizados nas células, bem como os tempos utilizados nas amostras de tumor. Antes de proceder ao protocolo foi necessário preparar todos os reagentes. A solução estabilizadora 1X foi preparada a partir da diluição de 1:10 da solução stock estabilizadora 10X em água ultrapura. A solução catalisadora 1X foi preparada a partir da diluição de 1:250 da solução stock catalisadora 250X em PBS. Inicialmente, para a preparação da solução DCF foi necessário diluir a solução stock DCFDiOxyQ de 1:5 em reagente primário, homogeneizar no vórtex e incubar 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, essa solução foi diluída em solução estabilizadora 1X. Após a preparação das soluções supramencionadas, em primeiro lugar foram colocados 50 µL de amostra em cada poço de uma placa de cor preta de 96 poços (Thermo Scientific, M330089) adequada para estudos de fluorescência, à qual foram adicionados 50 µL de catalisador em cada poço e a placa foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL da solução DCF a cada poço, e incubou-se à temperatura ambiente e protegida da luz, por 30 minutos. Por fim, a leitura foi realizada num espectrofotómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®) com comprimentos de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 530 nm.

Os resultados são apresentados como o nível relativo de RONS, normalizado ao controlo.

1.8.2 Avaliação do conteúdo intracelular de peróxidos

Para avaliar a quantidade intracelular de peróxidos foi utilizada a sonda não fluorescente DCFH₂-DA (do inglês, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Este composto lipofílico atravessa a membrana celular, onde sofre desacetilação por esterases intracelulares, resultando no composto DCFH (do inglês, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein*). Este produto sofre oxidação na presença de peróxido, formando o DCF (do inglês, *2',7'-dichlorofluorescein*), que emite fluorescência (Afri, Frimer e Cohen, 2004; Kim e Xue, 2020).

Após 2 horas de tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, 200 000 células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Depois, as células foram lavadas com PBS e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Posteriormente foram adicionados 200 µL de PBS e 0,2 µL da sonda DCFH₂-DA (Invitrogen, D-399) às células, e estas foram incubadas a 37°C durante 45 minutos, no escuro. Por último, foram adicionados 2 mL de PBS a cada tubo, as células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL de PBS, o qual foi transferido para uma placa preta de 96 poços adequada para estudos de fluorescência. A leitura foi feita num espectrofotômetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®) com comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 528 nm.

Os resultados são apresentados como níveis de peróxidos intracelulares normalizados ao C_meio, e como níveis de peróxidos intracelulares do C_meio normalizado ao C_cell.

1.8.3 Avaliação do conteúdo intracelular de radical superóxido

Para avaliar a quantidade intracelular do radical superóxido foi utilizada a sonda DHE (do inglês, *dihydroethidium*). Esta sonda fluorescente é conhecida por ser a sonda mais específica para a detecção do radical superóxido. Tem a capacidade de se difundir passivamente pela membrana celular, sendo oxidada pelo radical superóxido com formação de *2-hydroxyethidium*. Este produto é intercalado no DNA e exibe fluorescência vermelha (Wojtala *et al.*, 2014).

Após 2 horas de tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, 200 000 células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Depois, as células foram lavadas com PBS e novamente centrifugadas nas mesmas condições. De seguida foram adicionados 200 µL de PBS e 1 µL da sonda DHE (Sigma, D7008) às células, e incubadas a 37°C durante 15 minutos, no escuro. Depois foram adicionados 2 mL de PBS, as células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e, por último, foram adicionados 200 µL de PBS, o qual foi transferido para uma placa preta de 96 poços adequada para estudos de fluorescência. A leitura foi feita num espectrofotômetro

(EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®) com comprimentos de onda de excitação de 530 nm e de emissão de 645 nm.

Os resultados são apresentados como níveis de radical superóxido intracelular normalizado ao C_meio, e como níveis de radical superóxido intracelular do C_meio normalizado ao C_cell.

1.8.4 Avaliação do conteúdo intracelular de óxido nítrico

De forma a quantificar o conteúdo intracelular de óxido nítrico foi usada a sonda DAF-FM *Diacetate* (do inglês, *4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate*). Esta sonda tem a capacidade de atravessar a membrana celular sendo desacetilada por enzimas esterases intracelulares formando o composto não fluorescente DAF-FM (do inglês, *4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein*). Somente após a interação deste composto com o óxido nítrico é que há emissão de fluorescência (Balcerczyk, Soszynski e Bartosz, 2005).

Após 2 horas de tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, 200 000 células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Depois as células foram lavadas com PBS, novamente centrifugadas nas mesmas condições e foram adicionados 200 µL de PBS. Posteriormente, foram adicionados 0,2 µL da sonda DAF-FM *Diacetate* (Sigma, D2321) às células, estas foram incubadas a 37°C durante 1 hora, no escuro. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de PBS, as células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, foi descartado o sobrenadante, adicionados 200 µL de PBS e foram incubadas mais 15 minutos, com o intuito de permitir a desesterificação completa dos diacetatos intracelulares. Por fim, o conteúdo foi transferido para uma placa preta de 96 poços, adequada para estudos de fluorescência. A leitura foi feita num espectrofotômetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®) com comprimentos de onda de excitação de 495 nm e de emissão de 515 nm.

Os resultados são apresentados como níveis de óxido nítrico intracelular normalizado ao C_meio, e como níveis de óxido nítrico do C_meio normalizado ao C_cell.

2. Estudos *ex vivo*

2.1 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico aplicado a amostras de tumor

Ao longo deste projeto foi possível receber amostras de tumor da bexiga provenientes do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, após aprovação para a recolha destas amostras pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra [Anexo I]. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os doentes envolvidos. As amostras de tumor da bexiga correspondiam a fragmentos de tumores vesicais em peças de resseção transuretral e de cistectomia, colhidos logo após a extração da peça operatória do doente.

2.1.2 Análise histológica

Cada uma das amostras foi dividida em 12 partes iguais com cerca de 0,5 cm de diâmetro e colocadas em placas de cultura celular de 24 poços não aderentes, com 500 µL/poço de meio de cultura celular DMEM suplementado com 10% de FBS. As 12 amostras foram submetidas ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, sendo estabelecidas quatro condições de tratamento: controlo (NaCl 0,9% não ativado por PFA), NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos, NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos e NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos. Para cada condição o ensaio foi realizado em triplicado. Após 24 horas do tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, uma amostra de cada um dos quatro grupos foi fixada em formol (VWR Chemicals, 90240) a 10%. O mesmo processo foi repetido 48 e 72 horas após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Em seguida, essas amostras foram enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Posteriormente, as amostras foram incluídas em parafina e foram realizados cortes histológicos de 4 µm de espessura que foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) a fim de observação microscópica para avaliação de possíveis alterações e anormalidades estruturais do tecido e das células.

Na plataforma *Ventana Marker Platform Bench Mark ULTRA IHC/ISH*, a caracterização imuno-histoquímica foi realizada para testar a expressão de Ki67 e de caspase-3, usando um dispositivo de deteção multimérico indireto à base de biotina, livre de biotina – *Optiview DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA)*, os anticorpos anti-Ki67 (Invitrogen, 14-5698-82) e anti-caspase-3 (Invitrogen, 700182) foram usados com temperatura otimizada de 36°C. A marcação para Ki67 foi avaliada de acordo com a percentagem de células tumorais com marcação nuclear. A coloração da caspase-3 foi avaliada de maneira semiquantitativa para determinar se estava ausente, ou estava presente de forma ligeira, moderada ou extrema.

2.1.3 Western Blot

O *western blot* é um método de detecção de proteínas que pode analisar um homogeneizado de tecido ou um extrato celular. Para tal fim, a técnica utiliza 3 elementos: 1) a separação por peso molecular; 2) a transferência para suporte sólido; e 3) a marcação da proteína alvo utilizando um anticorpo primário e outro secundário adequado para visualização (Mahmood e Yang, 2012).

Cada uma das amostras foi dividida em 12 partes iguais com cerca de 0,5 cm de diâmetro e colocadas em placas de cultura celular de 24 poços não aderentes, com 500 µL/poço de meio de cultura celular DMEM suplementado com 10% de FBS. As 12 amostras foram submetidas ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, sendo estabelecidas quatro condições de tratamento: controlo (NaCl 0,9% não ativado por PFA), NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos, NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos e NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos. Após 48 horas do tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA foi realizada a preparação dos extratos de proteína.

Para a preparação dos extratos de proteína, em primeiro lugar, cada amostra foi lavada duas vezes com PBS, transferida para um *potter* e foram adicionados 200 µL de solução de lise RIPA (do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*) composta por 150 mM de NaCl 0,9%, 50 mM de trizma base (Sigma, T1503), 5 mM de ácido tetracético etileno glicol (Sigma, E4378), 1% de Triton®X-100 (Merck, K34979403), 0,5% de desoxicolato de sódio e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecil sulfate*; Sigma, 436143), suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (*cOmplete-Mini*, Roche, 11836153001), de acordo com as indicações do fornecedor e 1 mM de DTT (Sigma, D9779). De seguida, as amostras foram homogeneizadas no *potter* durante 5 a 20 minutos, dependendo do tamanho da amostra, e o lisado foi colocado no respetivo *ependorf*. As amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 30% durante 15 segundos, com recurso a um sonicador *VibraCell* (modelo VC50, Sonic and Materials Inc., EUA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14000 xG e os sobrenadantes foram transferidos para novos *ependoffs*, devidamente identificados, que foram guardados a -80°C.

Para a determinação da quantidade da proteína total utilizou-se o método de BCA (Pierce, *BCA™ protein assay kit*). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante, composta por 60 mM de trizma base, 2% de SDS, 10% de glicerol (Sigma, G2025), 5% de 2-mercaptoetanol (Merck, 444203) e 0,01% de azul de bromofenol.

Para a realização da eletroforese polimerizaram-se géis de acrilamida (Nzytech, MB15601) na concentração de 13% para separação das proteínas com vista à detecção da caspase-3, caspase-8 e caspase-9. Os géis de acrilamida foram colocados na tina de eletroforese com um tampão apropriado constituído por 25 mM de trizma base, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS, com ajuste do pH a 8,3 (Bio-Rad, 161-0772). As amostras foram colocadas nos géis de acrilamida bem como o padrão de pesos moleculares (Nzytech, MB09002). A eletroforese decorreu durante 10 minutos a 80 V seguida de 1 hora e 30 minutos a 160 V.

Para a eletrotransferência foi utilizado o *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-rad, 1705150). Os géis foram colocados em contacto direto com membrana de PVDF (do inglês, *polyvinylidene difluoride*; Bio-rad, 1620260) previamente ativadas em metanol. A

reação ocorreu a 2,5 A, 25 V durante 10 minutos para a caspase-3 e a 1,5 A, 25 V durante 10 minutos para a caspase-8 e caspase-9. Para verificação da transferência da proteína foi utilizada coloração com *PageBlue* (Thermo Scientific, 24620)

Após a eletrotransferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de TBST-BSA (TBST, do inglês *tris-buffered saline tween-20* e BSA, do inglês *bovine serum albumin*) a 4%, constituída por 20 mM de trizma base, 0,137 mM de NaCl 0,9% e 0,1% de Tween 20 (Acros Organics, 233360010) com 5% de BSA (Nzytech, MB04602), à temperatura ambiente. Aproximadamente 30 minutos depois incubaram-se as membranas durante a noite com os anticorpos primários anti-caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-86052), anti-caspase-8 (Santa Cruz Biotechnology, sc-81656) e anti-caspase-9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8355), diluídos na proporção de 1:100 em solução de TBST-BSA, sob agitação constante e a 4°C. No dia seguinte efetuaram-se lavagens com TBST a 1% e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário apropriado, *goat anti-mouse* (GE Healthcare, RPN5781) para a caspase-3 e caspase-8, ou *goat anti-rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2007) para a caspase-9, diluídos de 1:12 000 em solução de TBST-BSA a 4%, à temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos e sob agitação constante. Após sucessivas lavagens, as membranas foram depois incubadas com o substrato enzimático (*ECF Western Blotting Reagent*, GE Healthcare, RPN5785) durante 5 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000). De forma a permitir a normalização de cada condição à quantidade de proteína, as membranas foram seguidamente incubadas com o anticorpo anti-actina (Sigma, A5441) diluído de 1:12 000, e a imunodeteção feita de forma semelhante ao já descrito. Para o processamento das imagens obtidas foi utilizado o *Fiji software*.

3. Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 7.00 para Windows (*GraphPad Software, La Jolla California* EUA. O teste de normalidade *D'Agostino-Pearson* foi usado para averiguar se as variáveis quantitativas tinham distribuição normal. Testes paramétricos foram usados no caso de distribuição normal; caso contrário foram usados testes não paramétricos. A deteção de *outliers* foi realizada pelo método ROUT com Q de 10%. A Análise de Variância (ANOVA) de um fator (no caso de distribuição normal) ou o teste de *Kruskal-Wallis* (caso contrário) foram utilizados para comparar as diferentes classes de tempos de exposição. A fim de realizar comparações múltiplas foi aplicado o teste de *Dunnnett* para comparar cada média dos tempos de exposição com a média do grupo controlo_meio. O teste de *Tukey* foi aplicado para comparar cada média dos tempos de exposição com a média do grupo controlo_meio e para comparar todas as médias de todos os grupos entre si (caso distribuição normal) ou utilizando o teste de *Dunn's* (caso contrário). O teste ANOVA de dois fatores foi usado com o teste de *Tukey* para comparações múltiplas, de forma a comparar os vários tempos após o tratamento com MAP, levando em consideração os diferentes tempos de exposição. Para comparar as médias do controlo_células com o controlo_meio foi utilizado o teste *Sidak's*. Para todas as comparações, o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

IV. Resultados¹

¹Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em coautoria com o Dr. Edgar Tavares da Silva.

1. Estudos in vitro

1.1. Meios ativados por Plasma Frio Atmosférico diminuem a atividade metabólica

Numa primeira fase foi efetuado o ensaio de MTT usando vários meios diferentes e com vários tempos de exposição do meio ao PFA, de forma a testar várias opções possíveis. Para tal, foram testados os seguintes meios na linha celular TCCSUP: água destilada, água ultra-pura, PBS e NaCl 0,9%. Como o PBS e o NaCl 0,9% apresentaram os melhores resultados, foram selecionados alguns tempos de exposição e estes meios foram também testados na linha celular HT1376. Todavia, como a utilização do NaCl 0,9% para a irrigação da bexiga após TURBT é um procedimento comum na prática clínica, decidiu-se continuar os ensaios subsequentes com o NaCl 0,9%.

1.1.1 Água destilada

A água destilada ativada por PFA diminuiu a atividade metabólica da linha celular TCCSUP, dependendo do tempo de exposição e do tempo após tratamento com água destilada ativada por PFA [Figura 11b].

De forma a estudar o efeito da adição de água destilada nas células foi adicionada água destilada não ativada por PFA às células, o controlo_meio (C_meio), sendo comparado com o controlo_células (C_cell) que possui células com o seu respetivo meio de cultura celular [Figura 11a]. Confrontando os resultados entre os controlos, observou-se diminuição estatisticamente significativa logo no ensaio das 24 horas ($p=0,0060$). Também ocorreu diminuição estatisticamente significativa no ensaio das 48 horas ($p=0,0003$) e das 72 horas ($p<0,0001$).

Comparando os resultados dos diversos tempos de exposição com o C_meio e o tempo após o tratamento [Figura 11b], quanto maior o tempo de exposição e o tempo após tratamento, menor a atividade metabólica. Observou-se diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica logo no ensaio das 24 horas, com tempo de exposição igual ($p=0,0014$) ou superior ($p<0,0001$) a 30 segundos. Para além disso, com tempo de exposição de 60 segundos a atividade metabólica decresceu para $41,3\pm 8,5\%$ e com tempo de exposição igual ou superior a 120 segundos, a atividade metabólica decresceu drasticamente para valores abaixo de 3% ($p<0,0001$). No ensaio das 48 horas observou-se diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos ($p<0,0001$). Com tempo de exposição de 60 segundos a atividade metabólica decresceu para $43,0\pm 2,7\%$, e com tempo de exposição superior a 120 segundos decresceu para valores abaixo de 15% ($p<0,0001$). De igual modo, no ensaio das 72 horas houve diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica para tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos ($p<0,0001$). Com

tempo de exposição de apenas 30 segundos a atividade metabólica decresceu para $48,2 \pm 6,6\%$ e com tempo de exposição igual ou superior a 120 segundos decresceu para valores inferiores a 2% ($p < 0,0001$).

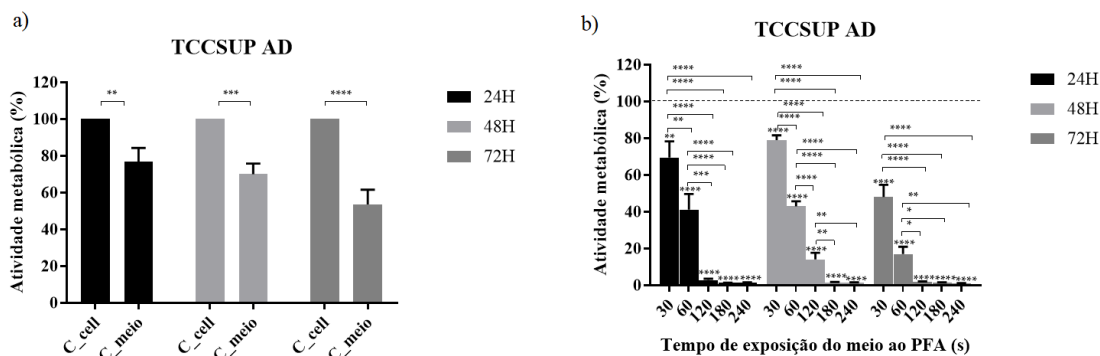


Figura 11 – A água destilada diminuiu a atividade metabólica da linha celular TCCSUP. a) Diminuição da atividade metabólica por efeito da adição de água destilada não ativada por PFA às células, C_meio, em comparação com o C_cell (apenas com o volume de meio correspondente). Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica do C_meio normalizada ao C_cell. b) diminuição da atividade metabólica dependendo do tempo de exposição da água destilada ao PFA e do tempo após o tratamento. O ensaio de MTT foi realizado 24, 48 e 72 horas após tratamento com água destilada ativada por PFA. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_meio de, pelo menos, 4 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.1.2 Água ultra-pura

A água ultrapura ativada por PFA diminuiu a atividade metabólica da linha celular TCCSUP, dependendo do tempo de exposição e do tempo após tratamento com água ultrapura ativada por PFA [Figura 12b].

Para estudar o efeito da adição de água ultrapura nas células foi adicionado água ultrapura não ativada por PFA ao meio de cultura presente nas células, e comparou-se com a atividade metabólica das células apenas com meio de cultura [Figura 12a]. Relativamente aos resultados entre os controlos, observou-se diminuição estatisticamente significativa no ensaio das 48 horas ($p = 0,0035$) e das 72 horas ($p < 0,0001$).

Confrontando os diversos tempos de exposição com o C_meio e o tempo após o tratamento [Figura 12b], quanto maior o tempo de exposição e o tempo após tratamento, menor a atividade metabólica. Observou-se diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica logo no ensaio das 24 horas com tempo de exposição igual ou

superior a 60 segundos ($p < 0,0001$), além disso, com um tempo de exposição de 120 segundos, a atividade metabólica decresceu para $6,0 \pm 0,9\%$ ($p < 0,0001$). No ensaio das 48 horas verificou-se diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos ($p < 0,0001$). Com tempo de exposição de 60 segundos a atividade metabólica decresceu para $40,9 \pm 4,6\%$ sendo que este valor decresceu para valores abaixo de 5% com tempo de exposição de 120 segundos ($p < 0,0001$). De igual modo, no ensaio das 72 horas com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos a atividade metabólica decresceu para valores inferiores a 50% ($p < 0,0001$) e com tempo de exposição igual ou superior a 120 segundos decresceu para valores inferiores a 2% ($p < 0,0001$).

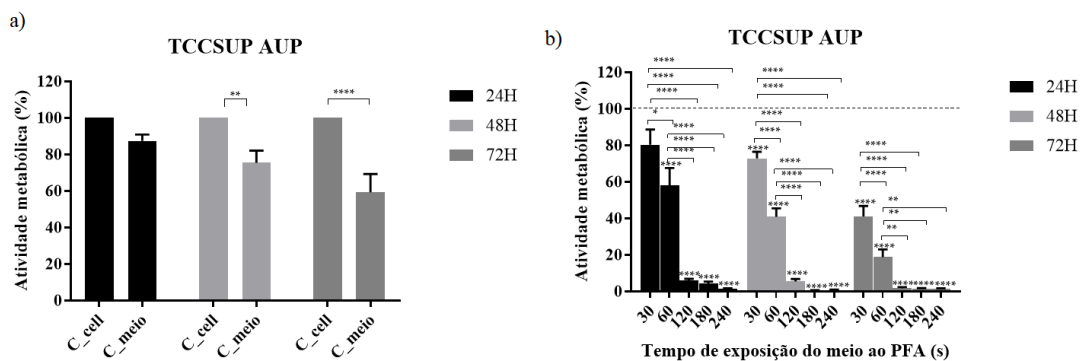


Figura 12 – A água ultra-pura diminui a atividade metabólica da linha celular TCCSUP. a) Diminuição da atividade metabólica por efeito da adição de água ultra-pura não ativada por PFA às células, C_meio, em comparação com o C_cell. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica do C_meio normalizada ao C_cell. b) diminuição da atividade metabólica dependendo do tempo de exposição da água ultra-pura ao PFA e do tempo após o tratamento. O ensaio de MTT foi realizado 24, 48 e 72 horas após tratamento com água ultra-pura ativada por PFA. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_meio de, pelo menos, 4 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.1.3 PBS

O PBS ativado por PFA diminuiu a atividade metabólica das linhas celulares TCCSUP [Figura 14a] e HT1376 [Figura 14b], dependendo do tempo de exposição e do tempo após tratamento com PBS ativado por PFA.

De modo a estudar o efeito da adição de PBS nas células foi adicionado PBS não ativado por PFA ao meio de cultura presente nas células, e comparou-se com a atividade metabólica das células apenas com meio de cultura [Figura 13]. Relativamente aos resultados entre os controlos na linha celular TCCSUP [Figura 13a] observou-se diminuição estatisticamente significativa no ensaio das 24 horas ($p=0,0032$), das 48 horas ($p<0,0001$) e das 72 horas ($p<0,0001$). Comparando os resultados entre os controlos na linha celular HT1376 [Figura 13b], há diminuição estatisticamente significativa no ensaio das 48 horas ($p=0,0097$) e das 72 horas ($p<0,0001$).

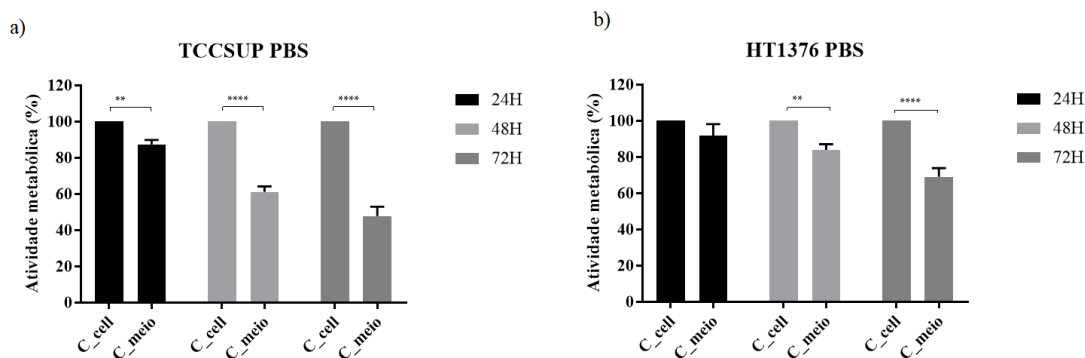


Figura 13 – Diminuição da atividade metabólica por efeito da adição de PBS não ativado por PFA às células a) TCCSUP e b) HT1376. O ensaio de MTT foi realizado 24, 48 e 72 horas após a adição de PBS não ativado por PFA. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_cell de, pelo menos, 2 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual ** reflete $p\leq 0,01$, *** reflete $p\leq 0,001$ e **** reflete $p\leq 0,0001$.

Comparando os resultados dos diversos tempos de exposição com o C_meio e o tempo após o tratamento, na linha celular TCCSUP [Figura 14a] houve diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica logo no ensaio das 24 horas com tempo de exposição do PBS ao PFA igual ou superior a 30 segundos ($p<0,0001$). Com um tempo de exposição igual ou superior a 120 segundos a atividade metabólica decresceu para valores inferiores a 2% ($p<0,0001$). Na linha celular HT1376 [Figura 14b] não houve efeitos estatisticamente significativos.

No ensaio das 48 horas, nas células TCCSUP [Figura 14a], houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos ($p<0,0001$) decrescendo para $61,5\pm 3,2\%$. A atividade metabólica decresceu para valores inferiores a 10% ($p<0,0001$) com tempo de exposição igual ou superior a 60 segundos. Em relação à linha celular HT1376 [Figura 14b], verificou-se diminuição estatisticamente significativa com exposição do PBS ao PFA durante 30 segundos ($p=0,0227$) e 120 segundos ($p=0,0002$).

Por fim, no ensaio das 72 horas, nas células TCCSUP [Figura 13a], de igual modo houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos, decrescendo para valores inferiores a 40% ($p < 0,0001$). Nas células HT1376 [Figura 14b] com tempo de exposição de 120 segundos foi possível verificar decréscimo da atividade metabólica para valores próximos de 40% ($p < 0,0001$).

A linha celular TCCSUP demonstrou maior sensibilidade ao tratamento com PBS ativado por PFA, visto que, 24 horas após tratamento e tempo de exposição de 60 segundos, a sua atividade metabólica reduziu em mais de 50%, e com tempo de exposição superior a 60 segundos a sua atividade metabólica diminuiu para valores próximos de 1% [Figura 14a]. Enquanto, na linha celular HT1376 a atividade metabólica reduziu em mais de 50% somente após 72 horas de tratamento e com tempo de exposição de 120 segundos [Figura 14b].

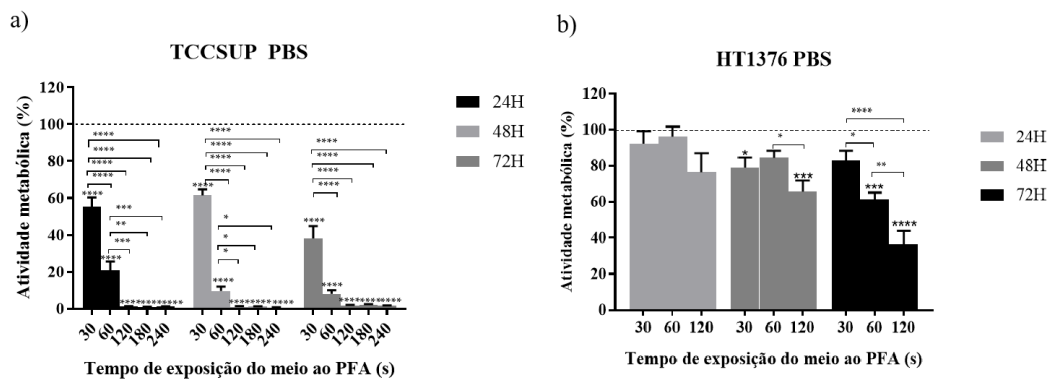


Figura 14 – O PBS diminui a atividade metabólica da linha celular a) TCCSUP e b) HT1376. A diminuição da atividade metabólica dependendo do tempo de exposição do PBS ao PFA e do tempo após o tratamento. O ensaio de MTT foi realizado 24, 48 e 72 horas após tratamento com PBS ativado por PFA. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_meio de, pelo menos, 2 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.1.4 NaCl 0,9%

O NaCl 0,9% ativado por PFA diminuiu a atividade metabólica das linhas celulares TCCSUP [Figura 16a] e HT1376 [Figura 16b], dependendo do tempo de exposição e do tempo após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA.

Em primeiro lugar foi estudado o efeito da adição de NaCl 0,9% nas células, para tal foi adicionado NaCl 0,9% não ativado por PFA ao meio de cultura presente nas células, e comparou-se com a atividade metabólica das células apenas com meio de cultura [Figura 15]. Relativamente aos resultados entre os controlos na linha celular TCCSUP [Figura 15a] observou-se diminuição estatisticamente significativa no ensaio das 48 horas ($p=0,0014$) e das 72 horas ($p=0,0020$). Comparando os resultados entre os controlos na linha celular HT1376 [Figura 15b], houve diminuição estatisticamente significativa no ensaio das 24 horas ($p<0,0001$), das 48 horas ($p<0,0001$) e das 72 horas ($p=0,0012$).

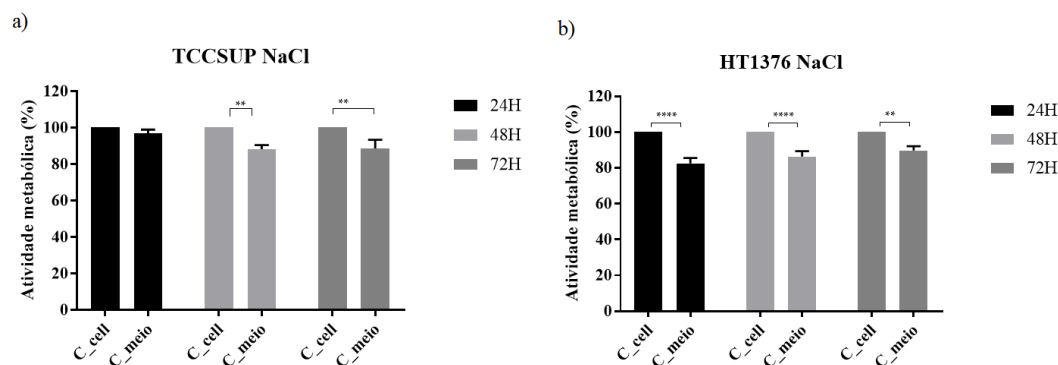


Figura 15 – Diminuição da atividade metabólica por efeito da adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células a)TCCSUP e b)HT1376. O ensaio de MTT foi realizado 24, 48 e 72 horas após a adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_cell de, pelo menos, 6 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual ** reflete $p\leq 0,01$, *** reflete $p\leq 0,001$ e **** reflete $p\leq 0,0001$.

Comparando os resultados dos diversos tempos de exposição com o C_meio e o tempo após o tratamento, na linha celular TCCSUP [Figura 16a] houve diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica logo no ensaio das 24 horas com exposição do NaCl 0,9% ao PFA, igual ou superior a 30 segundos ($p<0,0001$). Com tempo de exposição superior a 60 segundos a atividade metabólica decresceu para valores abaixo dos 40% ($p<0,0001$) e com tempo de exposição de 120 segundos decresceu drasticamente para $6,7\pm 1,3\%$. Em relação à linha celular HT1376 [Figura 16b], verificou-se diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 60 segundos ($p<0,0001$).

No ensaio das 48 horas, nas células TCCSUP [Figura 16a], com tempo de exposição de apenas 30 segundos, a atividade metabólica decresceu para $48,3\pm 4,8\%$ sendo que com 120 segundos ou mais atingiu valores inferiores a 4% ($p<0,0001$). Nas células HT1376 [Figura 16b] só foram atingidos valores de atividade metabólica

inferiores a 50% com tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA de 120 segundos ($p < 0,0001$).

Por fim, no ensaio das 72 horas, nas células TCCSUP [Figura 16a] logo com tempo de exposição de 30 segundos foram atingidos valores de atividade metabólica inferiores a 30% ($p < 0,0001$), sendo que com 120 segundos este valor diminuiu para cerca de 1% ($p < 0,0001$). Na linha celular HT1376 [Figura 16b], houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos ($p < 0,0001$). Neste caso, a atividade metabólica só atingiu valores inferiores a 50% com tempo de exposição de 60 segundos ($p < 0,0001$).

A linha celular TCCSUP demonstrou maior sensibilidade ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, uma vez que com 24 horas após tratamento e tempo de exposição de 60 segundos, a sua atividade metabólica reduziu em mais de 60%, e com tempo de exposição superior a 120 segundos a sua atividade metabólica diminuiu para valores próximos de 2%. Enquanto, na linha celular HT1376 a atividade metabólica reduziu em mais de 50% somente após 48 horas de tratamento e com tempo de exposição de 120 segundos.

Com base dos resultados de MTT obtidos e previamente descritos, para a realização dos restantes ensaios foram seleccionados os tempos de exposição do meio ao PFA de 30, 60 e 120 segundos.

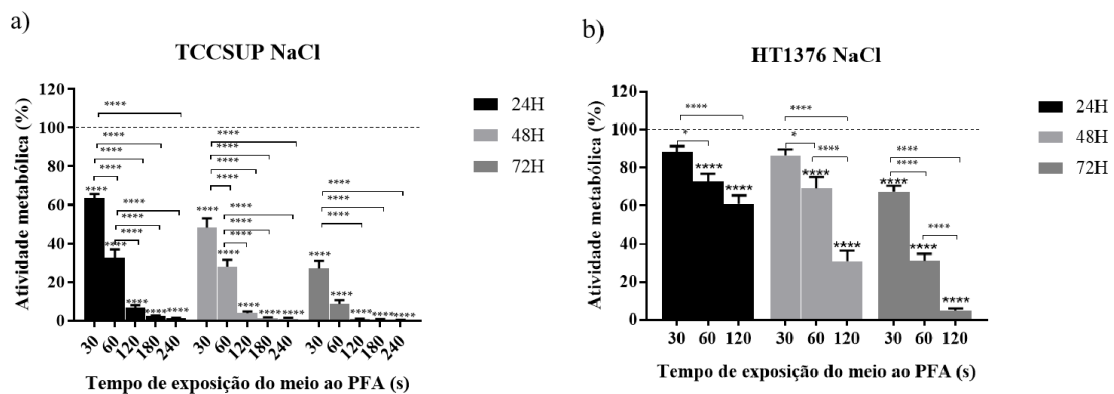


Figura 16 – O NaCl 0,9% diminui a atividade metabólica nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. A diminuição da atividade metabólica dependendo do tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA e do tempo após o tratamento. O ensaio de MTT foi realizado 24, 48 e 72 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_meio de, pelo menos, 6 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

Relativamente à abordagem alternativa em que o NaCl 0,9% ativado por PFA ficou em contacto com as células durante 1 hora, observou-se que nas células TCCSUP [Figura 17a] houve um decréscimo da atividade metabólica em mais de 50% logo com tempo de exposição de 30 segundos ($p < 0,0001$). Enquanto, nas células HT1376 [Figura 17b] ocorreu um decréscimo da atividade metabólica superior a 50% com tempo de exposição superior a 60 segundos ($p < 0,0001$).

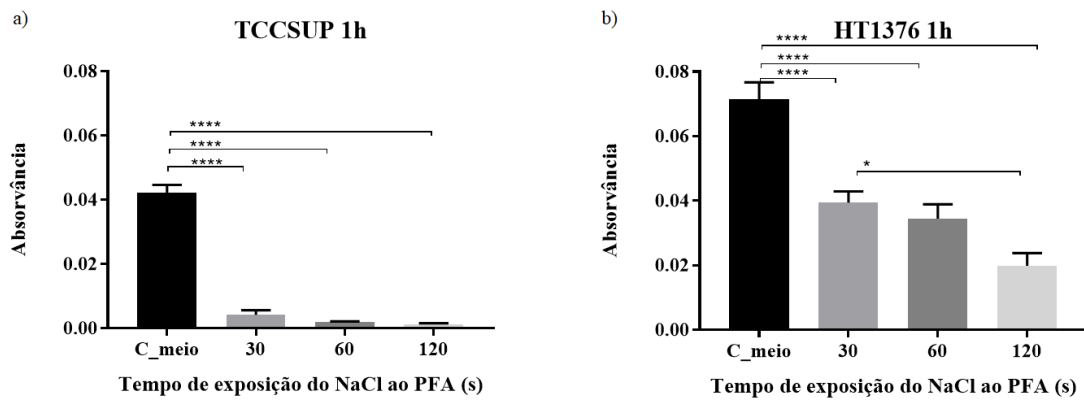


Figura 17 – O NaCl 0,9% ativado por PFA durante 1 hora diminui a atividade metabólica nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. Diminuição da atividade metabólica depende do tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA e do tempo após o tratamento. O ensaio de MTT foi realizado 24 horas após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 1 hora. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão, da absorvância normalizada ao C_meio, de pelo menos, 4 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.1.5 Comparação entre os 4 meios

Os 4 meios testados, nomeadamente AD, AUP, PBS e NaCl 0,9% foram capazes de diminuir a atividade metabólica na linha celular TCCSUP [Figura 18a]. Por um lado, com tempo de exposição do meio ao PFA de 30 segundos, a AUP foi a que apresentou maior percentagem de atividade metabólica $80,5 \pm 28,7\%$ ($p=0,0470$). Por outro lado, com tempo de exposição de 30 segundos a atividade metabólica, utilizando PBS, decresceu para $55,3 \pm 23,3$ ($p < 0,0001$) alcançando o valor mais baixo de atividade metabólica para esta condição. Para tempo de exposição de 120 segundos a diminuição da atividade metabólica foi cerca de 1% para todos os 4 meios ($p < 0,0001$). Relativamente à diminuição da atividade metabólica mais acentuada, no geral, observou-se que o NaCl 0,9% e o PBS apresentaram os decréscimos mais acentuados na linha celular TCCSUP.

O NaCl 0,9% e o PBS foram capazes de diminuir a atividade metabólica na linha celular HT1376 [Figura 18b]. Verificou-se que somente o NaCl 0,9% ativado por PFA foi capaz de decréscimos estatisticamente significativos da atividade metabólica na linha celular HT1376. Com 120 segundos de tempo de exposição a atividade metabólica decresceu para $61,0 \pm 19$ ($p < 0,0001$).

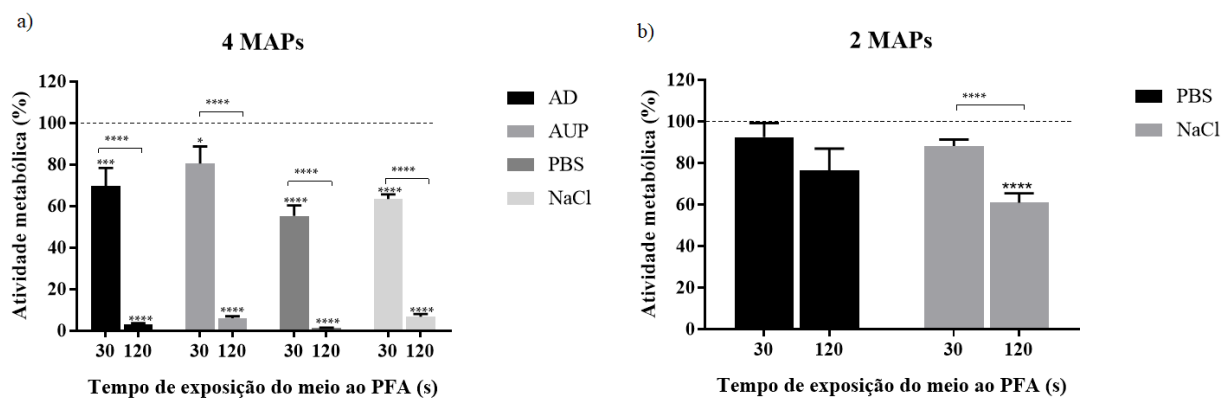


Figura 18 – a) A AD, AUP, PBS e NaCl 0,9% foram capazes de diminuir a atividade metabólica da linha celular TCCSUP e b) o PBS e NaCl 0,9% foram capazes de diminuir a atividade metabólica da linha celular HT1376. Esta imagem representa o ensaio de MTT às 24 horas, após tratamento com AD, AUP, PBS e NaCl 0,9% ativados por PFA durante 30 e 120 segundos. Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao C_meio de, pelo menos, 2 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.2 Meios ativados por Plasma Frio Atmosférico diminuem o conteúdo proteico

1.2.1 PBS

O PBS ativado por PFA diminuiu o conteúdo proteico das linhas celulares TCCSUP [Figura 20a] e HT1376 [Figura 20b], dependendo do tempo de exposição e do tempo após tratamento com PBS ativado por PFA.

Em primeiro lugar foi estudado o efeito da adição de PBS nas células, para tal foi adicionado PBS não ativado por PFA ao meio de cultura presente nas células e comparou-se com o conteúdo proteico das células apenas com meio de cultura [Figura 19]. Relativamente à linha celular TCCSUP [Figura 19a] observou-se uma diminuição estatisticamente significativa logo no ensaio das 24 horas ($p < 0,0001$). Na linha celular HT1376 [Figura 19b], no ensaio das 24 horas, ocorreu diminuição estatisticamente significativa ($p = 0,0019$), contudo, os maiores decréscimos do conteúdo proteico ocorreram 48 e 72 horas após tratamento ($p < 0,0001$).

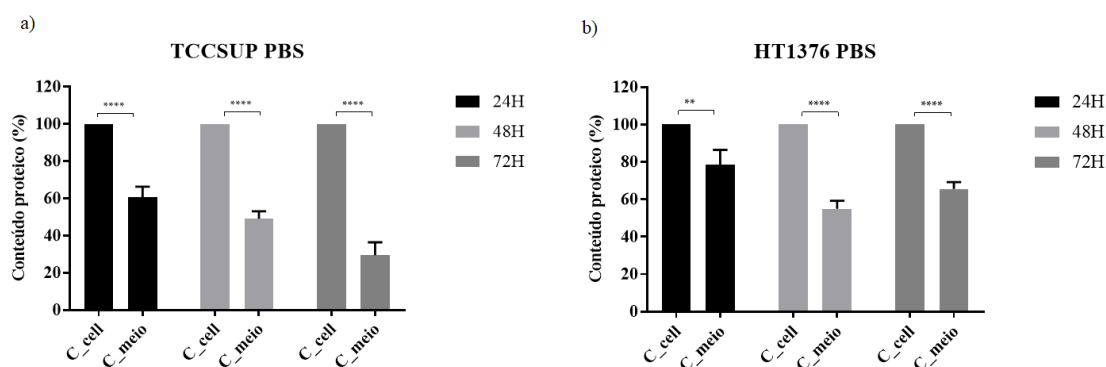


Figura 19 – Diminuição do conteúdo proteico por efeito da adição de PBS não ativado por PFA às células a) TCCSUP e b) HT1376. O ensaio de SRB foi realizado 24, 48 e 72 horas após a adição de PBS não ativado por PFA. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão, da percentagem de conteúdo proteico normalizado ao C_cell de, pelo menos, 2 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

Comparando os resultados dos diversos tempos de exposição com o C_meio e o tempo após o tratamento, na linha celular TCCSUP [Figura 20a], às 24 horas houve diminuição estatisticamente significativa para os tempos de exposição igual ou superior a 30 segundos ($p < 0,0001$), sendo que o conteúdo proteico atingiu o valor de $52,8 \pm 3,2\%$. Com tempo de exposição de 120 segundos o conteúdo proteico decresceu drasticamente para $5,2 \pm 0,4\%$. Na linha celular HT1376 [Figura 20b] ocorreu diminuição estatisticamente significativa para tempos de exposição igual ($p = 0,0009$) ou superior ($p < 0,0001$) a 60 segundos, tendo-se verificando que o conteúdo proteico decresceu para $49,4 \pm 5,4$ com tempo de exposição de 120 segundos ($p < 0,0001$).

No ensaio das 48 horas, na linha celular TCCSUP [Figura 20a], da mesma forma, verificou-se diminuição estatisticamente significativa para tempos de exposição igual ou superior a 30 segundos atingindo valores próximos de 50% ($p < 0,0001$). Na linha celular HT1376 [Figura 20b], só houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição de 120 segundos ($p = 0,0401$).

Por fim, no ensaio das 72 horas, na linha celular TCCSUP [Figura 20a], de igual modo, houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos atingindo valores inferiores a 50% ($p < 0,0001$). Na linha celular HT1376 [Figura 20b], houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição de 30 segundos ($p = 0,0416$), contudo o decréscimo do conteúdo proteico para valores inferiores a 50% só ocorreu com tempo de exposição de 120 segundos ($p < 0,0001$).

Novamente, a linha celular TCCSUP demonstrou maior sensibilidade ao tratamento com PBS ativado por PFA, pois atingiu valores de conteúdo proteico inferiores a 50% logo no ensaio das 24 horas e com tempo de exposição de 30 segundos ($p < 0,0001$), enquanto a linha celular HT1376 só atingiu esses valores com tempo de exposição de 120 segundos ($p < 0,0001$). Portanto, estes resultados corroboraram os resultados do MTT.

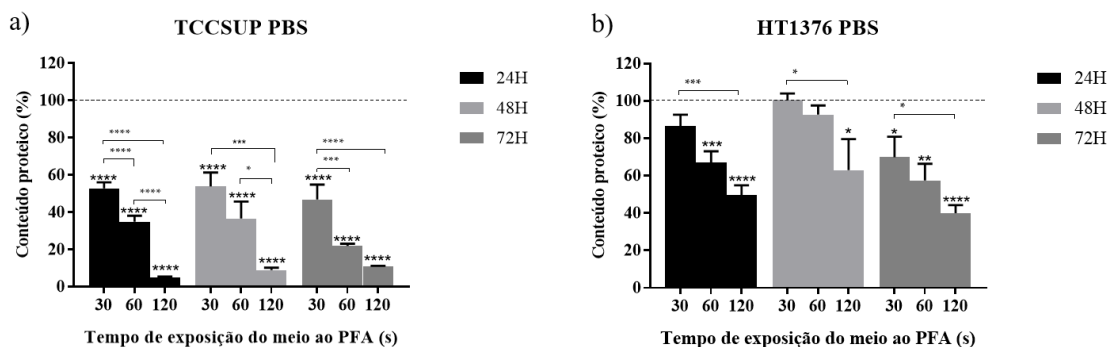


Figura 20 – O PBS diminui o conteúdo proteico nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. Diminuição do conteúdo proteico dependendo do tempo de exposição do meio ao PFA e do tempo após o tratamento. O ensaio de SRB foi realizado 24, 48 e 72 horas após tratamento com PBS ativado por PFA. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão, da percentagem de conteúdo proteico normalizado ao C_meio de, pelo menos, 2 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.2.2 NaCl 0,9%

O NaCl 0,9% ativado por PFA diminuiu o conteúdo proteico das linhas celulares TCCSUP [Figura 22a] e HT1376 [Figura 22b], dependendo do tempo de exposição e do tempo após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA.

Em primeiro lugar foi estudado o efeito da adição de NaCl 0,9% nas células, para tal adicionou-se NaCl 0,9% não ativado por PFA ao meio de cultura presente nas células, e comparou-se com o conteúdo proteico das células apenas com meio de cultura [Figura 21]. Relativamente à linha celular TCCSUP [Figura 21a] observou-se uma diminuição estatisticamente significativa logo no ensaio das 24 horas ($p < 0,0001$) e que se manteve no ensaio das 48 e das 72 horas. De forma semelhante, na linha celular HT1376 [Figura 21b] no ensaio das 24 horas ocorreu diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) que se manteve tanto no ensaio das 48 horas como no das 72 horas.

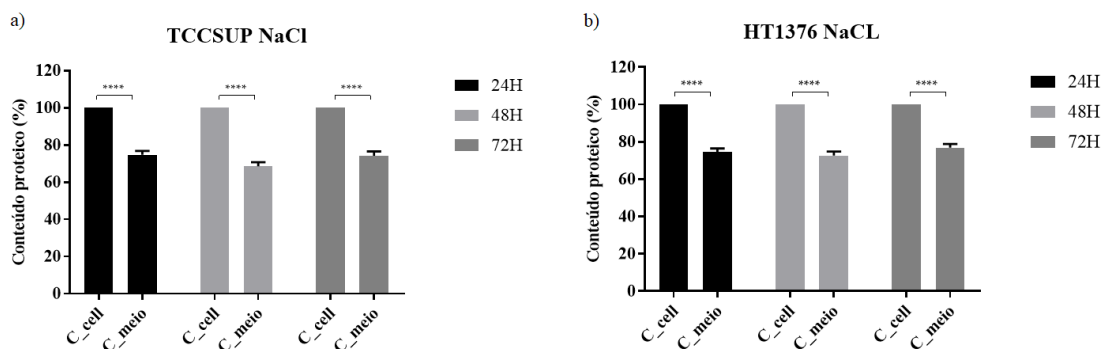


Figura 21 – Diminuição do conteúdo proteico por efeito da adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células a) TCCSUP e b) HT1376. O ensaio de SRB foi realizado 24, 48 e 72 horas após a adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão, da percentagem de conteúdo proteico normalizada ao C_cell, de pelo menos, 6 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão retratadas com *, do qual **** reflete $p \leq 0,0001$.

Comparando os resultados dos diversos tempos de exposição com o C_meio e o tempo após o tratamento, na linha celular TCCSUP [Figura 22a], no ensaio das 24 horas, houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos ($p < 0,0001$), sendo que o conteúdo proteico decresceu para $42,0 \pm 2,3\%$. Com o tempo de exposição de 120 segundos o conteúdo proteico decresceu drasticamente para $6,2 \pm 0,8\%$. Na linha celular HT1376 [Figura 22b] ocorreu diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ($p = 0,0088$) ou superior ($p < 0,0001$) a 30 segundos, tendo-se verificado que o conteúdo proteico decresceu para $60,16 \pm 3,37$ com tempo de exposição de 120 segundos ($p < 0,0001$).

Relativamente ao ensaio das 48 horas, na linha celular TCCSUP [Figura 22a], da mesma forma, houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos, atingindo valores inferiores a 40% ($p < 0,0001$). Na linha celular HT1376 [Figura 22b], houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ($p = 0,0006$) ou superior ($p < 0,0001$) a 30 segundos. No entanto, o

conteúdo proteico só decresceu para valores próximos de 50% com tempo de exposição de 60 segundos ($p < 0,0001$).

Por fim, no ensaio das 72 horas acentuou-se o efeito inibitório em ambas as linhas celulares. Na linha celular TCCSUP [Figura 22a] houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos atingindo valor próximo de 20% ($p < 0,0001$). Na linha celular HT1376 [Figura 22b] houve diminuição estatisticamente significativa com tempo de exposição igual ou superior a 30 segundos, com valor de conteúdo proteico de $55,0 \pm 5,0\%$ ($p < 0,0001$).

Novamente, a linha celular TCCSUP demonstrou maior sensibilidade ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, pois atingiu valores de conteúdo proteico inferiores a 40% logo no ensaio das 24 horas e com tempo de exposição de 30 segundos ($p < 0,0001$), enquanto a linha celular HT1376 só atingiu valores próximos de 50% no ensaio das 48 horas e com tempo de exposição de 60 segundos ($p < 0,0001$). Portanto, estes resultados corroboraram os resultados do MTT.

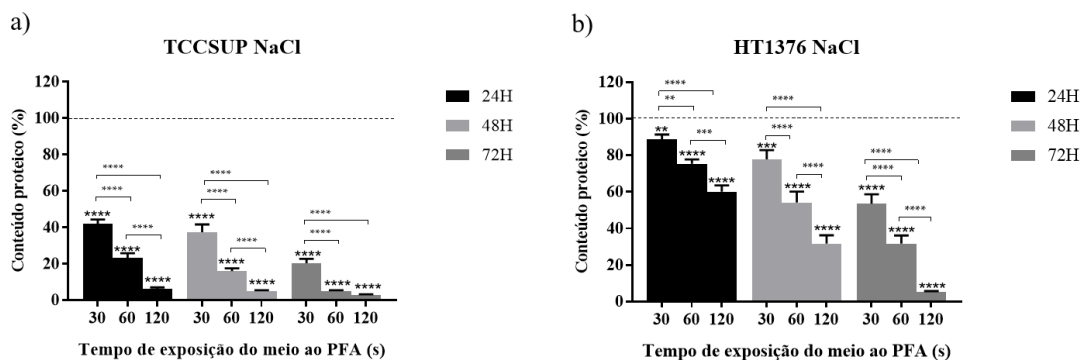


Figura 22 – O NaCl 0,9% diminui o conteúdo proteico das linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. Diminuição do conteúdo proteico dependendo do tempo de exposição do meio ao PFA e do tempo após o tratamento. O ensaio de SRB foi realizado 24, 48 e 72 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão, da percentagem de conteúdo proteico normalizada ao C_meio de, pelo menos, 6 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão retratadas com *, do qual ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.3 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico diminui a viabilidade celular

A viabilidade e o perfil de morte celular das linhas celulares TCCSUP [Figura 23a] e HT1376 [Figura 23b] foram avaliados utilizando a técnica de citometria de fluxo com a dupla marcação com AV e IP, 24 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Ambas as linhas celulares foram expostas a NaCl 0,9% ativado por PFA durante 30, 60 e 120 segundos. De forma a complementar os resultados da citometria de fluxo foi realizada a análise morfológica das linhas celulares TCCSUP [Figura 24] e HT1376 [Figura 25] com recurso à coloração *May-Grünwald Giemsa*. Ambas as linhas celulares foram expostas a NaCl 0,9% ativado por PFA durante 30, 60 e 120 segundos e a análise morfológica foi realizada 24 horas após o tratamento.

A viabilidade celular diminuiu à medida que o tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA aumentou. Para simplificação, daqui em diante o C_meio (controlo com células semeadas e o seu respetivo meio de cultura associado a 500 µL de NaCl 0,9% não ativado por PFA) corresponde ao controlo. Comparando os resultados dos diversos tempos de exposição com o controlo, na linha celular TCCSUP [Figura 23a] houve diminuição estatisticamente significativa para tempos de exposição de 60 segundos ou 120 segundos ($p < 0,0001$). No controlo a viabilidade celular foi de $58,4 \pm 4,0$ e a apoptose teve um valor de $21,6 \pm 3,0$. Pela análise morfológica [Figura 24] verificou-se a existência de algumas células com características apoptóticas, nomeadamente a formação de *blebs*, o que está em conformidade com os resultados da citometria de fluxo.

Na linha celular TCCSUP [Figura 23a], a diminuição da viabilidade celular foi acompanhada por um aumento da morte celular por apoptose tardia. Comparando os resultados dos vários tempos de exposição com o controlo, houve aumento estatisticamente significativo da população de células em apoptose tardia para tempos de exposição de 60 segundos ou 120 segundos ($p < 0,0001$), sendo que com 120 segundos aumentou de $10,6 \pm 1,2$ para $55,2 \pm 2,0\%$. Na análise morfológica [Figura 24], 30 segundos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA, induziram um aumento do número de células com características morfológicas de apoptose, nomeadamente com *blebs*, o que corroborou a tendência para o aumento da apoptose tardia, nesta condição. Com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos houve diminuição da densidade celular, fragmentação nuclear e aumento de células com características de necrose, especificamente com perda da integridade da membrana celular, lise celular e decorrente extravasamento do citoplasma. Por fim, com NaCl 0,9% ativado durante 120 segundos, observou-se diminuição da densidade celular, fragmentação nuclear compatível com morte por apoptose e alterações morfológicas compatíveis com a morte por necrose, onde há células com núcleo evidenciado e com citoplasma muito claro, lise celular e extravasamento do citoplasma. Assim sendo, a análise morfológica comprovou os resultados da citometria de fluxo, em que houve aumento de células em apoptose tardia e uma tendência para aumento de células em necrose.

Na linha celular HT1376 [Figura 23b] houve diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular com tempo de exposição de 60 segundos ($p = 0,0303$) ou 120 segundos ($p = 0,0031$) acompanhada por uma tendência para aumento da apoptose, e de necrose em relação ao controlo. A análise morfológica [Figura 25] da condição controlo revelou algumas células com fragmentação nuclear, o que está de acordo com a viabilidade celular mais baixa na citometria de fluxo ($71,0 \pm 2,1$). Para a condição de 30 segundos, observaram-se algumas células com características morfológicas de necrose,

como extravasamento do citoplasma, e células com características morfológicas de apoptose, como a fragmentação nuclear. Na condição de 60 segundos, notou-se formação de *blebs*, vacuolização citoplasmática, condensação da cromatina, e lise celular com consequente extravasamento do citoplasma. Por fim, com NaCl 0,9% ativado durante 120 segundos, observou-se diminuição da densidade celular e alterações morfológicas compatíveis com a morte por apoptose devido à formação de *blebs*, vacuolização citoplasmática e fragmentação nuclear.

Uma vez mais, a linha celular TCCSUP demonstrou maior sensibilidade para o tratamento pois o decréscimo da viabilidade celular, observado com o tempo de exposição de 60 segundos, foi maior ($-29,4 \pm 3,2\%$) do que o decréscimo observado com 120 segundos na linha celular HT1376 ($-9,5 \pm 0,3\%$).

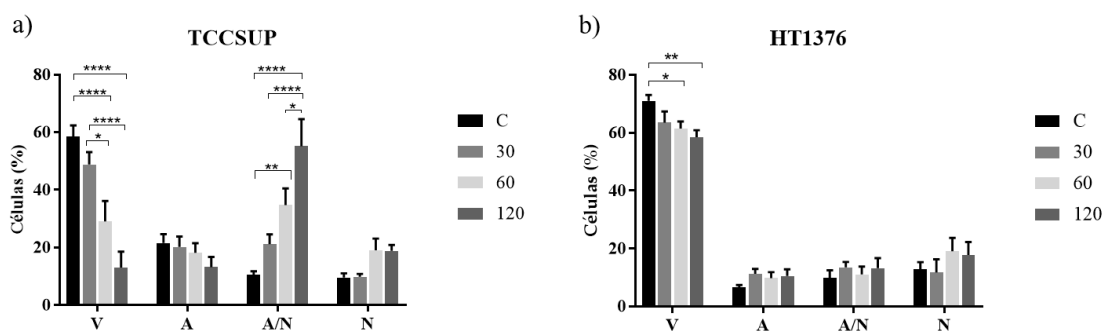


Figura 23 – O NaCl 0,9% ativado por PFA diminuiu a viabilidade das linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. A viabilidade e o perfil de morte celular foram avaliados por citometria de fluxo, 24 horas após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão de, pelo menos, 4 experiências independentes, da percentagem de células viáveis (V), células em apoptose inicial (A), células em apoptose/necrose (A/N) e células em necrose (N). As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, ** reflete $p \leq 0,01$, e **** reflete $p \leq 0,0001$.

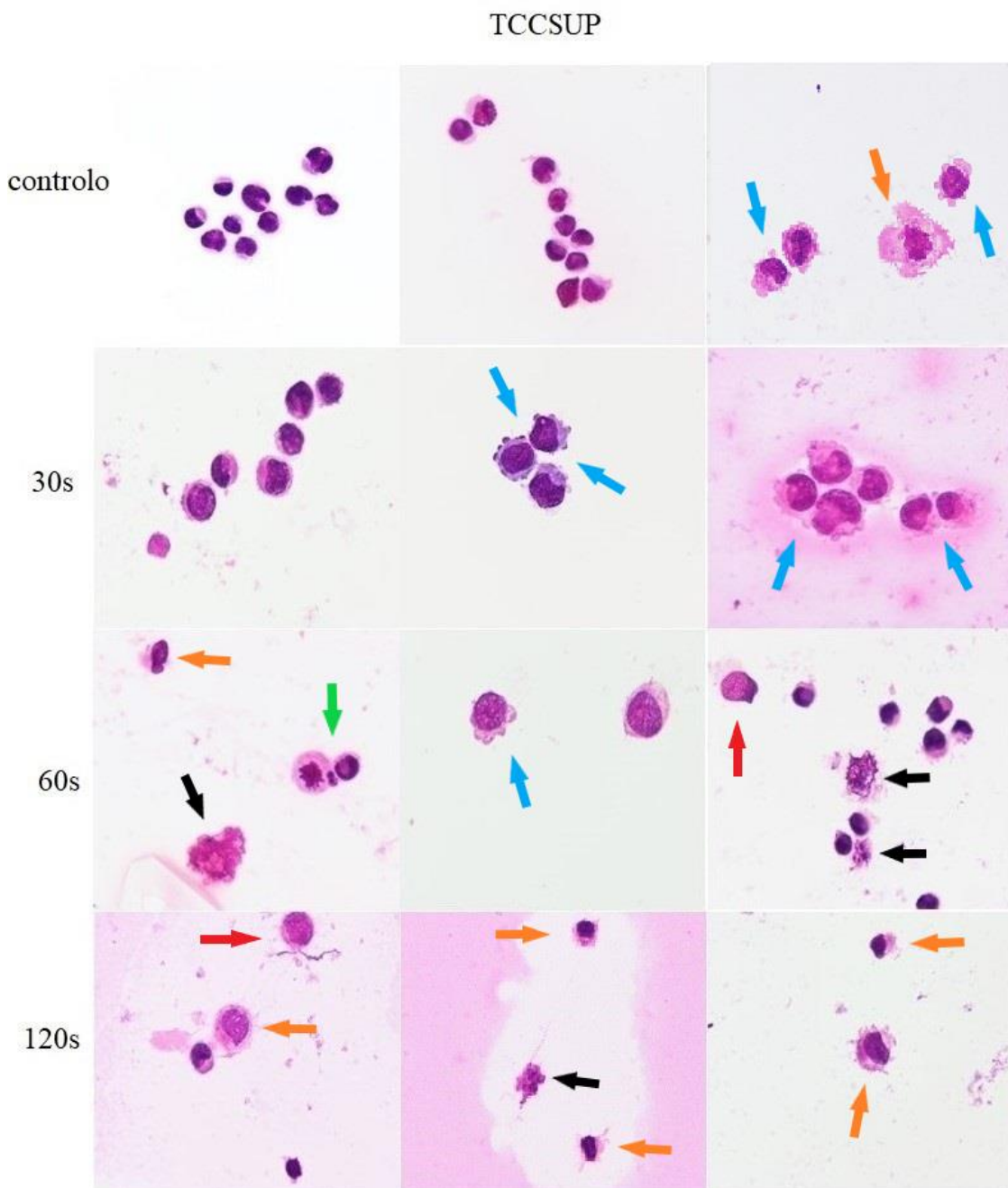


Figura 24 – Análise morfológica da linha celular TCCSUP. As imagens representativas foram obtidas após coloração May-Grünwald-Giemsa e refletem os resultados obtidos com NaCl 0,9% não ativado por PFA (controle), NaCl 0,9% ativado por PFA durante 30 segundos, 60 segundos ou 120 segundos. As imagens foram obtidas com ampliação de 50x. **Setas azuis** correspondem aos blebs (marcador de apoptose), **setas verdes** à condensação de cromatina (marcador de apoptose), **setas vermelhas** a fragmentação nuclear (marcador de apoptose), **setas laranjas** ao extravasamento do citoplasma (marcador necrótico) e **setas pretas** a células necróticas.

HT1376

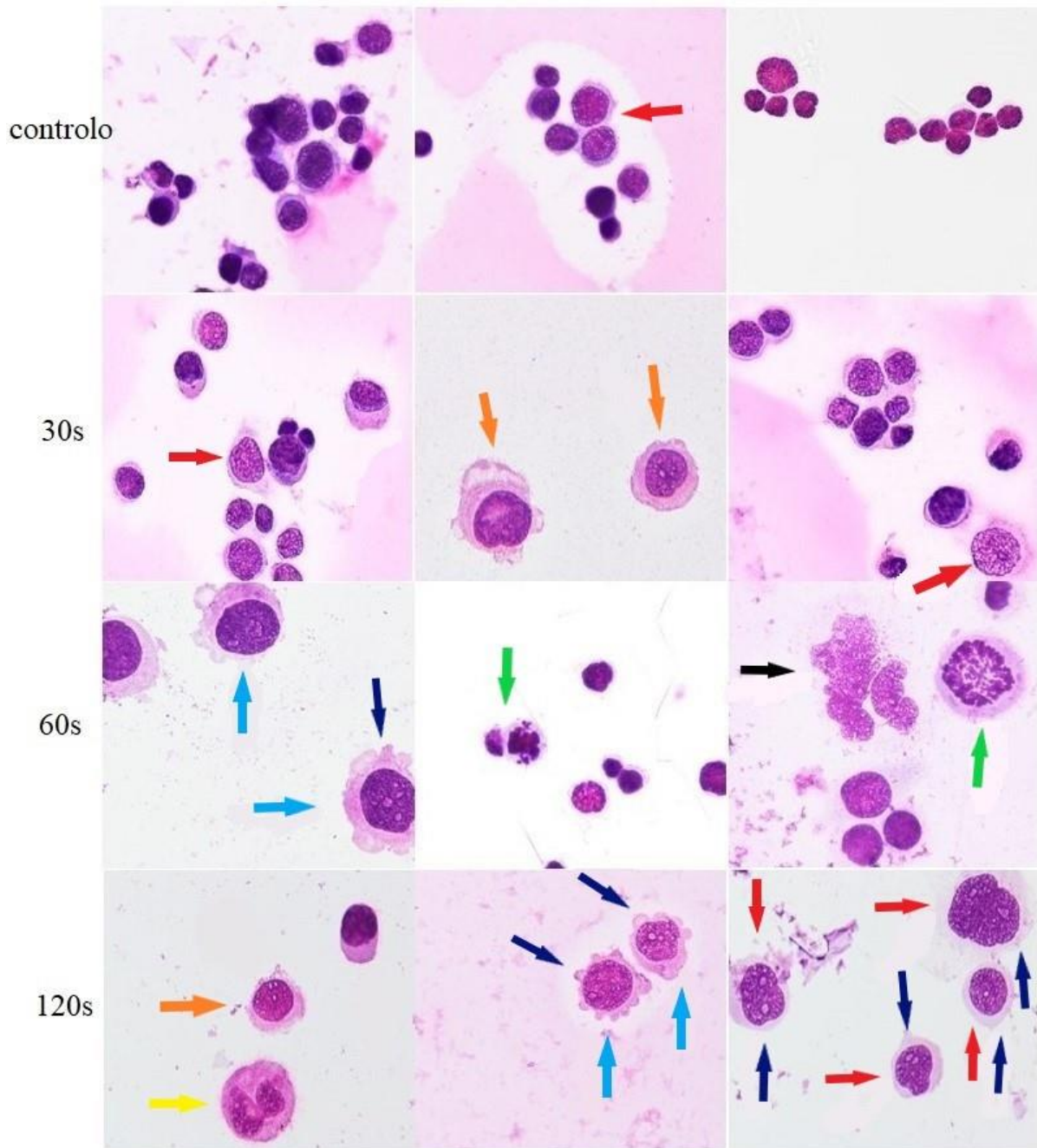


Figura 25 – Análise morfológica da linha celular HT1376. As imagens representativas foram obtidas após coloração *May-Grünwald-Giemsa* e refletem os resultados obtidos com NaCl 0,9% não ativado por PFA (controle), NaCl 0,9% ativado por PFA durante 30 segundos, 60 segundos e 120 segundos. As imagens foram obtidas com ampliação de 50x. **Setas azuis** correspondem aos blebs (marcador de apoptose), **setas verdes** à condensação de cromatina (marcador de apoptose), **setas vermelhas** a fragmentação nuclear (marcador de apoptose), **setas laranjas** ao extravasamento do citoplasma (marcador necrótico), **setas pretas** a células necróticas, **setas azuis escuras** a vacuolização citoplasmática (marcador de apoptose) e **seta amarela** a células binucleadas.

1.4 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações no ciclo celular

A progressão do ciclo celular nas duas linhas celulares foi determinada 24 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Para tal, foi utilizada a citometria de fluxo com recurso à marcação com IP. Ambas as linhas celulares foram expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA durante 30, 60 e 120 segundos.

A análise do ciclo celular demonstrou um bloqueio na fase S em ambas as linhas celulares. Na linha celular TCCSUP [Figura 26a] observou-se um aumento estatisticamente significativo do número de células na fase S com tempo de exposição de 60 segundos ($p < 0,0001$), relativamente ao controlo. Além disso, com tempo de exposição de 120 segundos, observou-se uma tendência para aumento do pico apoptótico pré-G0/G1. Na linha celular HT1376 [Figura 26b] verificou-se aumento estatisticamente significativo de células em fase S com tempos de exposição de 60 ou de 120 segundos ($p < 0,0001$), relativamente ao controlo.

Na linha celular HT1376 [Figura 26b] verificou-se ainda um aumento estatisticamente significativo do número de células na fase G2/M, em relação ao controlo, com tempo de exposição de 30 segundos ($p < 0,0001$), de 60 segundos ($p = 0,0014$) e de 120 segundos ($p = 0,0121$).

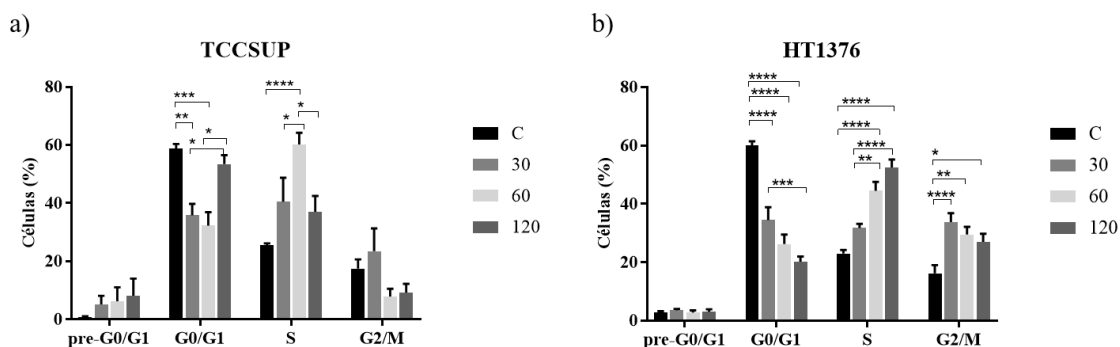


Figura 26 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provoca alterações no ciclo celular das linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo, 24 horas após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão de, pelo menos 4 experiências independentes, da percentagem de células identificadas em cada fase: pré-G0/G1, G0/G1, S e G2/M. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição representadas com *, do qual * reflete $p \leq 0,05$, ** reflete $p \leq 0,01$, *** reflete $p \leq 0,001$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.5 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico altera o potencial de membrana mitocondrial

De forma a estudar a influência do NaCl 0,9% ativado por PFA na função mitocondrial, foram determinados os seus efeitos no $\Delta\psi_m$, 24 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA e em ambas as linhas celulares. Para tal, foi utilizada a citometria de fluxo com recurso à marcação com a sonda JC-1. Ambas as linhas celulares foram expostas a NaCl 0,9% ativado por PFA durante 30, 60 e 120 segundos. O $\Delta\psi_m$ é menor, quanto menor for a razão agregados/monómeros, o que indica disfunção mitocondrial (Bortner e Cidlowski, 1999; Yao *et al.*, 2008).

Embora não existam alterações estatisticamente significativas em nenhuma das linhas celulares [Figura 27], observou-se uma tendência para a diminuição do $\Delta\psi_m$ com o aumento do tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA, em ambas as linhas celulares.

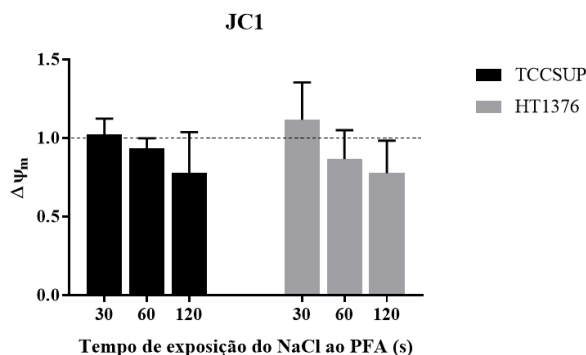


Figura 27 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provocou alterações no potencial da membrana mitocondrial nas linhas celulares TCCSUP e HT1376. O potencial da membrana mitocondrial foi avaliado através de citometria de fluxo, 24 horas após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por plasma. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da razão agregados/monómeros (A/M) normalizada ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes.

1.6 Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio no NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico

De forma a avaliar a quantidade de RONS no NaCl 0,9% ativado por PFA, foi utilizado o Kit *OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit*. Este ensaio foi realizado apenas utilizando NaCl 0,9% não ativado por PFA e NaCl 0,9% ativado por PFA, na ausência de células.

Como demonstrado na Figura 28a, comparando as diferentes condições com o controlo, concluiu-se que a ativação com PFA provocou aumentos estatisticamente significativos no nível relativo de RONS presentes no NaCl 0,9% ($p < 0,0001$). No entanto, não se observaram alterações nos níveis relativos de RONS entre os diferentes tempos de exposição. Com 30 e 180 segundos de ativação, o nível relativo de RONS é $9,0 \pm 1,0$ e $9,7 \pm 0,6$, respetivamente.

Na Figura 28b, comparando as diversas condições com o controlo verificou-se que o NaCl 0,9% ativado por PFA produziu aumentos estatisticamente significativos no nível relativo de RONS presentes no NaCl 0,9% após 2 horas de incubação ($p < 0,0001$). Neste caso, verificaram-se diminuições estatisticamente significativas do nível relativo de RONS com 180 segundos de ativação comparativamente ao tempo de 30 segundos ($p = 0,0005$). Também houve diminuição estatisticamente significativa com 180 segundos de ativação comparativamente a 60 segundos ($p = 0,0054$). Em comparação com o controlo, com tempo de ativação de 30 segundos, o nível relativo de RONS foi de $3,8 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$), com 120 segundos foi de $3,6 \pm 0,2$ ($p = 0,005$) e com 180 segundos de $3,4 \pm 0,2$ ($p = 0,0054$). Comparando os níveis relativos de RONS, imediatamente após ativação com os níveis relativos de RONS após 2 horas da ativação com PFA, verificou-se que 30 segundos de ativação e imediatamente após a ativação o nível relativo de RONS foi de $9,0 \pm 2,1$ enquanto que para 2 horas após a ativação o valor foi de $3,8 \pm 0,1$. Mais do dobro do nível relativo de RONS imediatamente após ativação comparativamente a 2 horas após a ativação foi observado em todos os diferentes tempos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA.

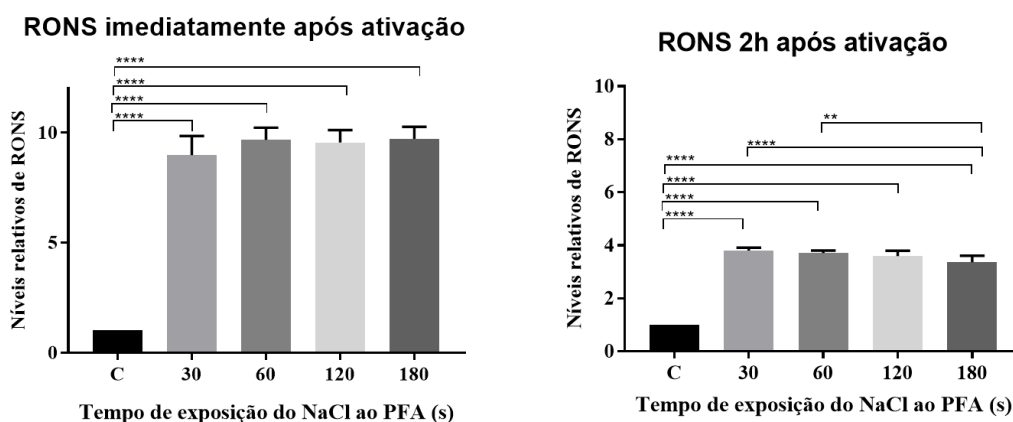


Figura 28 – RONS presentes no NaCl 0,9% ativado por PFA a) imediatamente após ativação por PFA e b) 2 horas após a ativação por PFA. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão dos níveis relativos de RONS normalizados ao controlo de 2 experiências independentes realizadas em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os

tempos de exposição estão representadas com *, em que ** reflete $p \leq 0,01$ e **** reflete $p \leq 0,0001$.

1.7 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações no conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio

De forma a estudar as alterações induzidas pelo NaCl 0,9% ativado por PFA no conteúdo intracelular de RONS, ambas as linhas celulares foram expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA durante 30, 60 e 120 segundos. A avaliação do conteúdo intracelular de peróxidos, radical superóxido e óxido nítrico foi realizada 2 horas após o tratamento.

1.7.1 NaCl 0,9% não ativado por Plasma Frio Atmosférico não afeta o conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio

Em primeiro lugar, foi avaliado o efeito da adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células com o seu respetivo meio de cultura, TCCSUP [Figura 29a] e HT1376 [Figura 29b]. Nas duas linhas celulares, não se observaram alterações estatisticamente significativas, o que indica que o conteúdo intracelular de RONS não sofreu alteração pela adição de NaCl 0,9% sozinho.

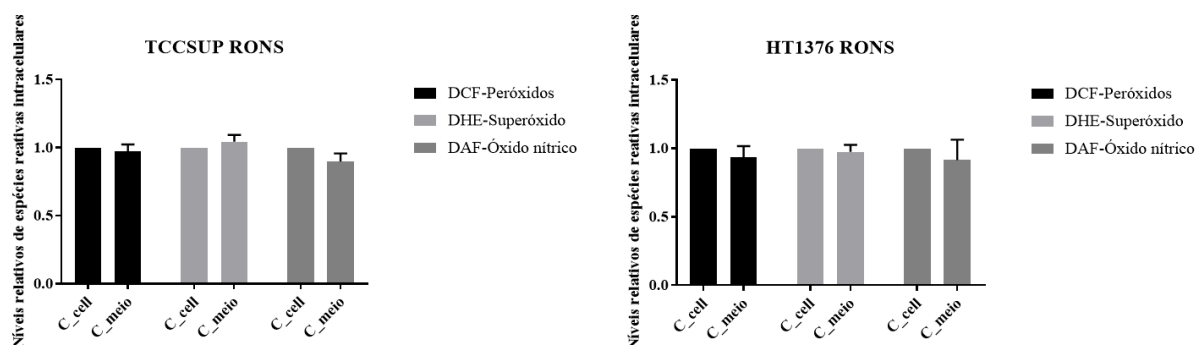


Figura 29 – Efeito da adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células, na produção intracelular de RONS nas linhas celulares a) TCCSUP e b) HT1376. O conteúdo intracelular de RONS foi avaliado por fluorescência 2 horas após a adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células com o respetivo meio de cultura. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média dos níveis relativos de espécies reativas intracelulares normalizados ao C_meio de, pelo menos 4 experiências independentes em triplicado.

1.7.2 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações nas RONS na linha celular TCCSUP

Como demonstrado na Figura 30, o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA não induziu alterações no conteúdo intracelular de peróxidos na linha celular TCCSUP, visto que não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e os tempos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA.

Em relação ao radical superóxido, observaram-se aumentos estatisticamente significativos em relação ao controlo. Com o tempo de exposição de 60 segundos o nível relativo do conteúdo intracelular de radical superóxido aumentou para $1,4 \pm 0,5$ ($p=0,0021$). Para 120 segundos o conteúdo de radical superóxido aumentou para $1,5 \pm 0,4$ ($p=0,0006$). Neste caso, quanto maior o tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA maior o conteúdo intracelular de radical superóxido.

Relativamente ao óxido nítrico, observou-se uma tendência para aumento do nível relativo do conteúdo intracelular para os vários tempos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA, em relação ao controlo. Mais especificamente, houve aumento estatisticamente significativo do nível relativo do conteúdo intracelular de óxido nítrico para $1,5 \pm 0,8$ com tempo de exposição de 60 segundos ($p=0,0111$).

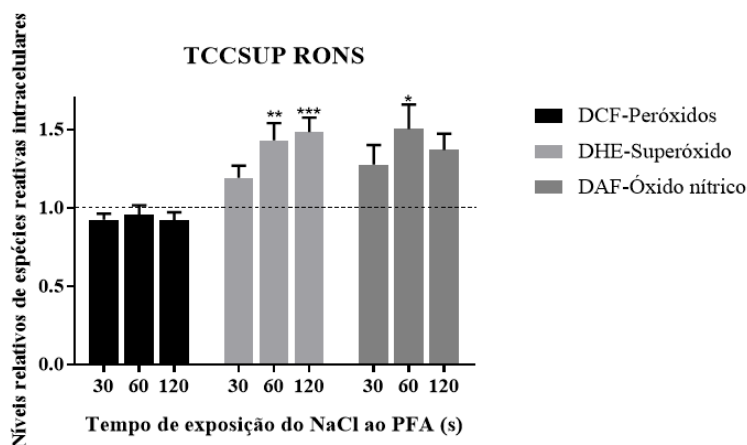


Figura 30 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provocou alterações nas RONS na linha celular TCCSUP. O conteúdo intracelular de peróxidos, radical superóxido e óxido nítrico foi avaliado por fluorescência 2 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão dos níveis relativos de espécies reativas intracelulares normalizados ao controlo de, pelo menos 6 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p < 0,005$, ** reflete $p \leq 0,01$ e *** reflete $p \leq 0,001$.

1.7.3 NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induz alterações nas RONS na linha celular HT1376

Na linha celular HT1376 [Figura 31] observaram-se diminuições estatisticamente significativas do nível relativo do conteúdo intracelular de peróxidos para $0,8 \pm 0,1$ com tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA de 60 segundos ($p=0,0275$) em comparação com o controlo. Para a condição de 120 segundos observa-se a mesma diminuição que ocorreu na condição de 60 segundos descrita anteriormente.

O tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA não induziu alterações no conteúdo intracelular de radical superóxido, visto que não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e os diferentes tempos de exposição.

Em relação ao óxido nítrico não houve alterações estatisticamente significativas no conteúdo intracelular de óxido nítrico na linha celular HT1376. Contudo, observou-se uma tendência para o aumento do nível relativo do conteúdo intracelular de óxido nítrico com tempo de exposição de 60 segundos.

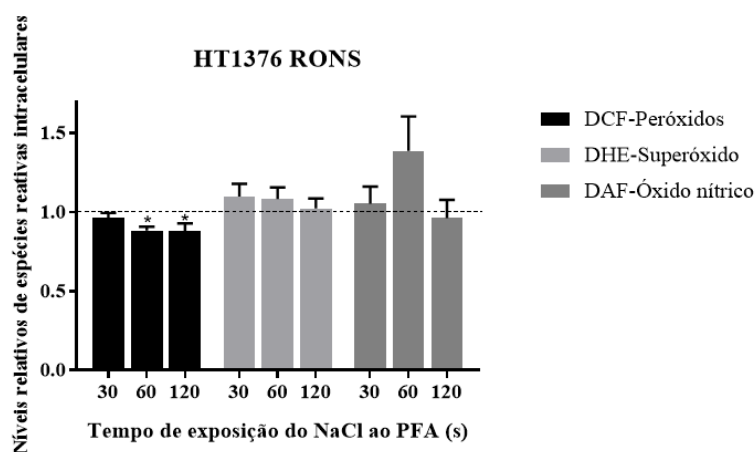


Figura 31 – O NaCl 0,9% ativado por PFA provocou alterações nas RONS na linha celular HT1376. O conteúdo intracelular de peróxidos, radical superóxido e óxido nítrico foi avaliado por fluorescência 2 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão dos níveis relativos de espécies reativas intracelulares normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição estão representadas com *, do qual * reflete $p < 0,005$.

2. Estudos *ex vivo*

2.1 Análise histológica

Para a execução dos estudos *ex vivo*, foram recebidas amostras de tumor de três doentes com cancro da bexiga: doente A, doente B e doente C. De cada amostra inicial resultaram 12 amostras, com aproximadamente o mesmo volume e que foram divididas em quatro grupos, de acordo com o tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA: controlo (adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA), amostras com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60, 120 ou 180 segundos. 24, 48 e 72 horas após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, uma amostra de cada um dos grupos foi sujeita ao procedimento descrito na secção materiais e métodos. Posteriormente, a análise histológica de todas as amostras foi realizada por um anatomopatologista experiente. Além disso, a análise histológica da expressão de ki67 e de caspase-3 foi avaliada por imuno-histoquímica.

A análise histológica de cada uma das amostras submetidas ao NaCl 0,9% ativado por PFA apresentou um aumento das células em necrose e redução da coesão celular [Tabela 2] após o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, num tumor que geralmente apresenta padrão sólido/trabecular/insular. A Figura 33 apresenta as imagens histológicas representativas de cada condição experimental.

Tabela 2 – Análise histológica de cada uma das amostras expostas ao NaCl 0,9% ativado por PFA. As alterações observadas nas amostras pelo tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA são apresentadas, nomeadamente necrose e redução da coesão celular.

	24 horas	48 horas	72 horas
Controlo-Doente A	Sem necrose	Necrose e redução da coesão celular	Necrose e redução da coesão celular
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos-Doente A	Sem necrose	Necrose e redução da coesão celular	X
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos-Doente A	Necrose e redução da coesão celular	Sem necrose	Redução da coesão celular
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos-Doente A	Redução da coesão celular	X	Com necrose
Controlo-Doente B	Com necrose	Com necrose	Com necrose
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos-Doente B	Sem necrose	X	Com necrose
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos-Doente B	Com necrose	Com necrose	Com necrose
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos-Doente B	Sem necrose	X	Com necrose
Controlo-Doente C	Sem necrose	Sem necrose	Com necrose
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos-Doente C	Com necrose	Com necrose	Sem necrose
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos-Doente C	Sem necrose	Com necrose	Com necrose
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos-Doente C	Com necrose	Com necrose	Com necrose

X: Corte histológico sem células tumorais

MECANISMOS DE AÇÃO DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO CONTRA O CANCRO DA BEXIGA

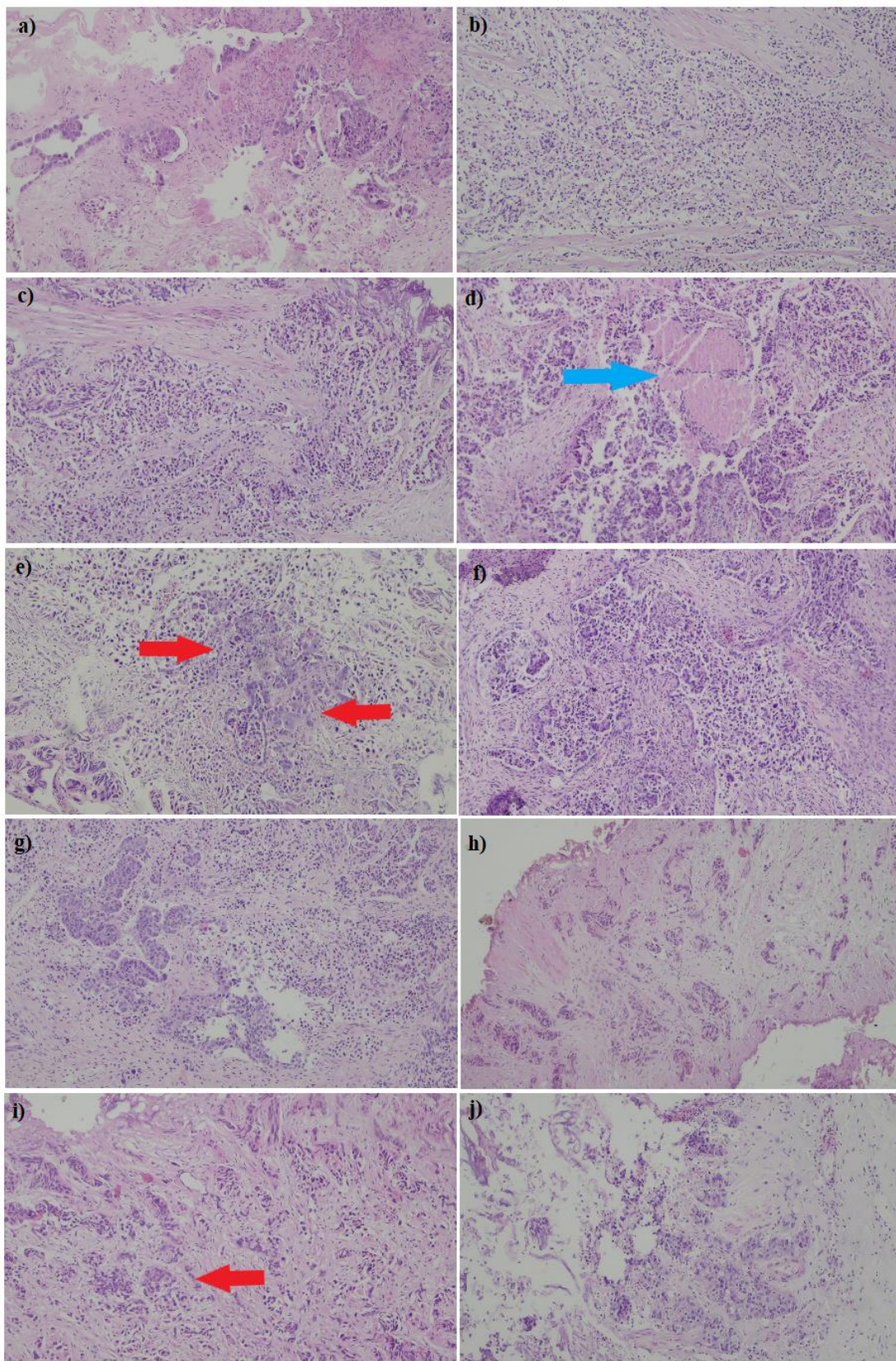


Figura 32 – Análise histológica das amostras tratadas com NaCl 0,9% ativado por PFA, coradas com H&E. É apresentada uma imagem representativa de cada um dos grupos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA e do tempo após tratamento. **a)** Controlo: neoplasia de padrão sólido e trabecular, sem áreas de necrose (ampliação 100x); **b)** Amostra analisada 24 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos: células tumorais sem necrose (ampliação 100x); **c)** Amostra analisada 24 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos: células tumorais sem necrose (ampliação 100x); **d)** Amostra analisada 24 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos: maior foco de necrose (**seta azul**) (ampliação 100x); **e)** Amostra analisada 48 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos: lesão com áreas com redução da coesão celular e necrose (**seta vermelha**) (ampliação 100x); **f)** Amostra analisada 48 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos: redução da coesão celular mais evidente, bem como necrose (100x); **g)** Amostra analisada 48 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos: com necrose (ampliação 100x); **h)** Amostra analisada 72 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos: células tumorais sem necrose (ampliação 100x); **i)** Amostra analisada 72 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos: lesão com áreas com redução da coesão celular e necrose (ampliação 100x); **j)** Amostra analisada 72 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos: tumor com focos de necrose (ampliação 100x).

Os resultados da expressão de Ki67 e da caspase-3 são apresentados na Tabela 3. A análise da expressão de Ki67 não revelou inequivocamente que o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA tivesse diminuído a sua expressão. Da mesma forma, a análise da expressão de caspase-3 não revelou claramente que o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA tivesse aumentado a sua expressão.

Tabela 3 – Análise da expressão de Ki67 e de caspase-3 por imuno-histoquímica após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA. A marcação para Ki67 foi avaliada de acordo com a percentagem de células tumorais com marcação nuclear e a marcação para caspase-3 foi avaliada de modo semiquantitativo em ausente (-), ligeira (+), moderada (++) ou severa (+++).

	24 horas		48 horas		72 horas	
	Ki67	Caspase-3	Ki67	Caspase-3	Ki67	Caspase-3
Controlo-Doente A	0%	+++	0%	-	<2%	+++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos-Doente A	0%	+++	5%	+++	Não avaliável	Não avaliável
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos-Doente A	0%	-	5-10%	+++	<2%	+++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos-Doente A	<2%	+++	Não avaliável	Não avaliável	<5%	+++
Controlo-Doente B	<2%	+	5%	+	5%	+++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos-Doente B	<5%	++	Não avaliável	Não avaliável	<5%	+++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos-Doente B	40-50%	+++	<2%	+++	<5%	+++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos-Doente B	40-50%	+++	Não avaliável	Não avaliável	5%	+++
Controlo-Doente C	<5%	++	<2%	+	<2%	+++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60 segundos-Doente C	<5%	+	<2%	+++	<2%	+++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 120 segundos-Doente C	15%	+++	5%	+++	20%	++
NaCl 0,9% ativado por PFA durante 180 segundos-Doente C	40%	+++	5-10%	+++	40%	++

2.2 Western blot

Para a realização do *western blot*, foram recebidas amostras de tumor de 5 doentes com cancro da bexiga: doente D, doente E, doente F, doente G e doente H. De cada amostra inicial resultaram 12 amostras que foram divididas em quatro grupos, de acordo com o tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA: controlo (adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA), amostras com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60, 120 ou 180 segundos. 48 horas após tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA, as amostras foram submetidas ao procedimento descrito na secção materiais e métodos. Infelizmente, a realização do *western blot* falhou em produzir resultados relevantes, devido a problemas associados às amostras, nomeadamente a degradação da actina das amostras representada na Figura 33.

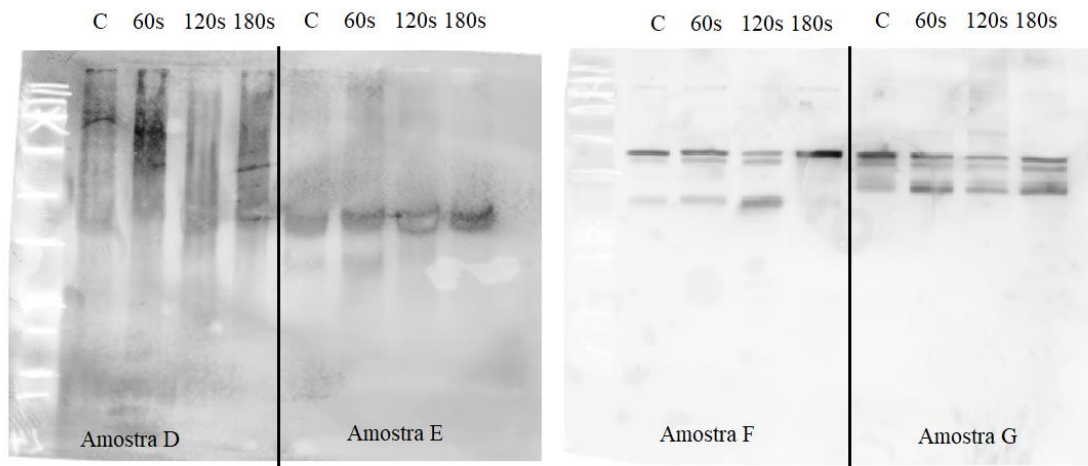


Figura 33 – Imagens representativas de membranas com marcação da actina. Estão representadas membranas com marcação da actina das amostras D, E, F e G. Os respetivos grupos de acordo com o tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA estão representados: C (adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA), amostras com NaCl 0,9% ativado por PFA durante 60, 120 ou 180 segundos.

V. Discussão

Neste trabalho foi possível a realização de estudos *in vitro* e *ex vivo*. Para os estudos *in vitro* foram utilizadas duas linhas celulares do cancro da bexiga, a TCCSUP e a HT1376. Foram realizados ensaios de proliferação celular, perfil de morte celular, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial e avaliação de RONS. Para os estudos *ex vivo* foram obtidas amostras de tumor do cancro da bexiga, que correspondiam a fragmentos de tumores vesicais em peças de resseção transuretral e de cistectomia, colhidos logo após a extração da peça operatória do doente. Com estas amostras foi realizada análise histológica, imuno-histoquímica e *western blot*.

1. Estudos *in vitro*

Como referido anteriormente, diversos estudos demonstraram que os MAPs são capazes de induzir efeitos anti-tumorais em vários tipos de cancro, como no cancro do colo do útero (Boehm *et al.*, 2016, 2018; Li *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2016), no cancro da mama (Nagaya *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2016; Tanaka *et al.*, 2016), no cancro do endométrio (Yoshikawa *et al.*, 2020), no cancro do ovário (Koensgen *et al.*, 2017; Nakamura *et al.*, 2017), no cancro do pulmão (Adachi *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2020), no cancro do pâncreas (Liedtke *et al.*, 2017; Loenhout, Van *et al.*, 2019; Sato *et al.*, 2018), no cancro da pele (Saadati *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019), no cancro oral (Shi *et al.*, 2017), no cancro colorretal (Chauvin *et al.*, 2019; Freund *et al.*, 2019; Grisetti *et al.*, 2019; Grisetti, Merbahi e Golzio, 2020), no carcinoma hepatocelular (Li *et al.*, 2021), no glioblastoma (Boehm *et al.*, 2018; Boxem, Van *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Shaw *et al.*, 2021; Tanaka *et al.*, 2016), no osteossarcoma (Nguyen *et al.*, 2016), no retinoblastoma (Silva-Teixeira *et al.*, 2021) e na leucemia (Bekeschus *et al.*, 2017).

No cancro da bexiga, Wang *et al.* demonstraram diminuição da viabilidade celular, aumento dos níveis de ROS e indução de morte celular por apoptose, utilizando meio de cultura ativado por PFA na linha celular 5637 (Wang *et al.*, 2021). Fukuhara *et al.* demonstraram indução de morte celular por apoptose, utilizando meio de cultura ativado por PFA na linha celular 253JB-V (Fukuhara *et al.*, 2021). Mohades *et al.* demonstraram diminuição da viabilidade celular e indução de morte celular por apoptose após tratamento com meio de cultura ativado por PFA, mas apenas numa linha celular, a SCaBER (Mohades, Barekzi e Laroussi, 2014). Esta linha celular é representativa do cancro da bexiga de células escamosas, a qual representa apenas 2-5% dos tumores da bexiga (Martin *et al.*, 2016). Contudo, existe pouca informação sobre os MAPs aplicados ao cancro da bexiga, principalmente com a utilização de meios com composição simples, os quais são mais adequados para utilização clínica, em vez de meios de cultura. Os meios de cultura são dependentes da linha celular, diferem nas suas composições, possuem componentes orgânicos que influenciam a produção de RONS e podem atuar como *scavengers* das RONS, prejudicando o efeito do meio de cultura ativado por PFA. Sendo assim, a utilização de meios de cultura para o tratamento indireto apresenta desvantagens e adiciona variabilidade ao invés de fornecer um meio padronizado. Assim, é fundamental a utilização de meios de base aquosa, com composição simples e conhecida, que possam ser utilizados em humanos de forma segura.

O nosso trabalho experimental contribui para um maior conhecimento sobre os MAPs para o tratamento do cancro da bexiga, demonstrando os seus efeitos em duas

linhas celulares diferentes de carcinoma urotelial humano e em amostras humanas de tumor da bexiga.

O protocolo de ativação adotado [Figura 9] implica a adição do meio ativado por PFA às células, levando a uma diluição do meio de cultura, o qual é responsável pela nutrição das células. Com o intuito de avaliar se a adição do meio não ativado por PFA às células (C_meio) provocou alterações significativas na sua atividade metabólica, realizou-se o ensaio de MTT. Dessa forma, testou-se um C_cell correspondente a células semeadas com o seu respetivo meio de cultura, e um C_meio correspondente a células semeadas com o seu respetivo meio de cultura mais adição do meio não ativado por PFA. O ensaio de MTT apenas deteta células viáveis metabolicamente ativas, pois requer atividade metabólica celular para converter o tetrazólio em formazano (Vichai e Kirtikara, 2006). Em primeiro lugar, observou-se diminuição da atividade metabólica com a adição de água destilada não ativada por PFA [Figura 11a] e água ultrapura não ativada por PFA [Figura 12a]. Isto ocorre porque a água não é isotónica com o meio intracelular pelo que se estabelecem correntes osmóticas para o interior da célula provocando lise celular. Em segundo lugar, a adição de PBS não ativado por PFA [Figura 13] também provocou alterações significativas em ambas as linhas celulares, com diminuições mais acentuadas à medida que o tempo de tratamento aumentou. A adição de PBS não ativado por PFA às células gera *shear stress* (Chen *et al.*, 2017; Shive, Hasan e Anderson, 1999) e, conseqüentemente, as células perdem aderência e viabilidade. Além disso, as células tornam-se cada vez mais sensíveis ao *shear stress* à medida que o tempo de tratamento aumenta (Chen *et al.*, 2017). Por último, a adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células [Figura 15] foi o que provocou decréscimos menos acentuados e um equilíbrio da percentagem de atividade metabólica à medida que o tempo de tratamento aumentou em ambas as linhas celulares.

Paralelamente, esta validação dos controlos foi feita com recurso a uma técnica complementar de avaliação de citotoxicidade, o ensaio de SRB. O princípio deste método relaciona-se com a massa celular, pois o SRB liga-se estequiometricamente indicando alterações do conteúdo proteico total (Vichai e Kirtikara, 2006). Em primeiro lugar, a adição de PBS não ativado por PFA às células [Figura 19] provocou diminuições estatisticamente significativas no conteúdo proteico em ambas as linhas celulares. De igual modo ao ensaio de MTT, a percentagem de conteúdo proteico diminuiu cada vez mais à medida que o tempo de incubação aumentou, atingindo os valores mais baixos às 72 horas. Em segundo lugar, a adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células [Figura 21] provocou diminuições estatisticamente significativas no conteúdo proteico em ambas as linhas celulares, contudo, não dependentes do tempo de tratamento.

Os resultados de SRB corroboraram os resultados do MTT, na medida em que as duas técnicas mostraram que a adição dos meios não ativados por PFA induziu diminuições estatisticamente significativas na atividade metabólica e no conteúdo proteico. A adição de qualquer um dos quatro meios dilui o meio de cultura, alterando a intensidade da difusão dos nutrientes, e fazendo com que os nutrientes necessários para o crescimento celular deixem de estar disponíveis. Conseqüentemente, tanto a atividade metabólica como o conteúdo proteico decrescem. É de salientar que foi de extrema importância realizar esta validação com os dois controlos, o C_cell e o C_meio, de forma a poder contornar a diminuição da atividade metabólica ou conteúdo proteico pela adição do meio não ativado por PFA. Sendo assim, todos os ensaios de MTT e de SRB realizados com a adição dos meios ativados por PFA ao meio de cultura foram normalizados ao C_meio, correspondente ao controlo ao qual é adicionado igual volume do respetivo meio não ativado por PFA.

Feita a validação dos controlos, procedeu-se ao tratamento das células com os meios ativados por PFA. Para tal utilizaram-se dois protocolos de ativação (ver Figuras 9 e 10). Um dos protocolos de ativação e tratamento testado incluiu uma abordagem com incubação das células com NaCl 0,9% ativado por PFA durante apenas 1 hora e na ausência de meio de cultura [Figura 10]. Esta abordagem foi testada na tentativa de evitar a diluição do meio de cultura pela adição de igual volume dos meios ativados. Contudo, após realização do ensaio MTT, verificou-se que esta abordagem não foi bem-sucedida, pois as absorvâncias nos controlos foram baixas, o que levou à perda de sensibilidade do ensaio. Isto pode ter ocorrido devido a problemas inerentes à técnica utilizada, nomeadamente a aspiração do meio, seguida pela adição de NaCl 0,9% ativado por PFA durante 1 hora que, por si só, provoca a perda de aderência das células. Após o período de incubação de 1 hora, o NaCl 0,9% foi aspirado, levando consigo as células que perderam aderência e, por fim, foi adicionado meio de cultura novo. A perda de uma quantidade significativa de células, leva à redução do número de células nos poços em comparação com o número de células previamente semeado, o que justifica as absorvâncias baixas observadas nos controlos o que introduziu um viés experimental. Por esta razão, esta abordagem foi abandonada.

Com recurso ao protocolo de ativação descrito na Figura 9, procedeu-se ao tratamento das células com os quatro meios ativados por PFA, durante tempos de exposição crescentes e tempos de tratamento crescentes. Os resultados de MTT mostraram que houve diminuição da atividade metabólica para todos os quatro meios testados. Em relação à água destilada e à água ultrapura verificaram-se diminuições da atividade metabólica mais acentuadas à medida que o tempo de exposição da água ao PFA e o tempo de tratamento aumentaram. Li *et al* também utilizaram água ultrapura ativada por PFA e demonstraram diminuição da atividade metabólica (Li *et al.*, 2017). O PBS [Figura14] e o NaCl 0,9% [Figura 16] ativados por PFA demonstraram comportamentos semelhantes em ambas as linhas celulares com redução da atividade metabólica dependendo do tempo de tratamento e do tempo de exposição do meio ao PFA. Loenhout, Van *et al.* demonstraram que o PBS ativado por PFA diminuiu a viabilidade celular em linhas celulares do cancro do pâncreas, e Boehm *et al.* demonstraram diminuição da atividade metabólica em linhas celulares do cancro do colo do útero (Boehm *et al.*, 2016; Loenhout, Van *et al.*, 2019). Wang *et al.* demonstraram diminuição da atividade metabólica numa linha celular de cancro da pele, utilizando PBS ativado por PFA e DMEM ativado por PFA. Entre estes dois meios ativados por PFA não foram observadas diferenças relevantes na atividade metabólica da linha celular, pelo que ambos foram eficazes na inibição da mesma (Wang *et al.*, 2019). Em relação ao NaCl 0,9%, Freund *et al.* revelaram diminuição da atividade metabólica com a utilização de NaCl 0,9% ativado por PFA contra o cancro do cólon, e Zhang *et al.* realizaram estudos *in vitro* e *ex vivo* demonstrando diminuição da viabilidade celular utilizando NaCl 0,9% ativado por PFA contra células e/ou tecidos de cancro da bexiga músculo-invasivo (Freund *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Em contraste com os meios de base aquosa, diversos autores relataram diminuição da atividade metabólica utilizando meios de cultura ativados por PFA. Nguyen *et al.* utilizaram meios de cultura ativados por PFA demonstrando diminuição da atividade metabólica. Contudo, comparando a diminuição da atividade metabólica utilizando meios de cultura ativados por PFA durante 5 min, com os resultados obtidos com os 4 meios testados neste estudo, a diminuição foi mais acentuada ao utilizar meios de base aquosa (Nguyen *et al.*, 2016). Estudos prévios desenvolvidos no nosso Instituto utilizaram tratamento direto com PFA e meio de cultura ativado por PFA e demonstraram diminuição da viabilidade celular. Todavia, a

diminuição da atividade metabólica observada com os 4 meios de base aquosa testados foi maior do que a observada com o tratamento direto (Silva-Teixeira *et al.*, 2021).

Confrontando os resultados obtidos com os quatro meios testados, após 24 horas de tratamento, na linha celular TCCSUP [Figura 18a] observaram-se diminuições estatisticamente significativas com os quatro meios. Observou-se ainda que os decréscimos mais acentuados ocorreram logo aos 30 segundos de exposição ao PFA para o NaCl 0,9% e para o PBS. Na linha celular HT1376 [Figura 18b] foram testados o PBS e o NaCl 0,9%, sendo que o NaCl 0,9% demonstrou maior decréscimo da atividade metabólica. Assim, tendo em consideração ambas as linhas celulares, o NaCl 0,9% induziu maior decréscimo da atividade metabólica.

Tendo em conta que o NaCl 0,9% e o PBS foram os meios com resultados mais promissores, estes foram também testados com recurso a uma técnica complementar de avaliação de citotoxicidade, o ensaio de SRB. De uma forma geral, verificou-se que o tratamento com NaCl 0,9% ou com PBS, ativados por PFA, induziu diminuição do conteúdo proteico celular. No que diz respeito ao PBS ativado por PFA [Figura 20], verificaram-se diminuições estatisticamente significativas no conteúdo proteico dependentes do tempo de exposição do PBS ao PFA e do tempo de tratamento. Em relação ao NaCl 0,9% ativado por PFA [Figura 22], o conteúdo proteico diminuiu significativamente à medida que o tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA aumentou e com maiores tempos de tratamento. Silva-Teixeira *et al.* demonstraram diminuição do conteúdo proteico utilizando meio de cultura ativado por PFA, em linhas celulares de retinoblastoma, no entanto, a diminuição do conteúdo proteico é menos acentuada do que utilizando meios de base aquosa (Silva-Teixeira *et al.*, 2021).

Por fim, os ensaios de MTT e o de SRB permitiram concluir que o tratamento com MAPs reduziu consideravelmente a proliferação celular, de forma dependente do meio utilizado, do tempo de exposição desse ao PFA e do tempo de tratamento. Quanto maior o tempo de exposição do meio ao PFA maior é o decréscimo da atividade metabólica e do conteúdo proteico. Além disso, os resultados dos ensaios de MTT e de SRB sugerem uma maior sensibilidade à terapia pela linha celular de maior grau (TCCSUP). O mesmo foi observado por Tavares-da-Silva *et al.* utilizando tratamento direto em linhas celulares do cancro da bexiga. O tratamento direto demonstrou diminuição da atividade metabólica e do conteúdo proteico à medida que os tempos de exposição e de tratamento aumentaram. Comparando os resultados de Tavares-da-Silva *et al.* com os resultados dos 4 meios de base aquosa testados, verificámos que os meios de base aquosa apresentam diminuições estatisticamente significativas mais acentuadas, quer da atividade metabólica quer do conteúdo proteico (Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). Logo, o tratamento indireto com utilização de meios ativados por PFA apresentaram melhores resultados do que o tratamento direto, contra o cancro da bexiga. Além disso, para determinar o tempo ideal em que o meio tem que ser exposto ao PFA para atingir a máxima eficácia, é necessário ter em conta o tipo de tumor e o seu grau.

Tendo por base os resultados obtidos nos ensaios de MTT e de SRB, o NaCl 0,9% foi o meio ativado por PFA mais promissor. Para além disso, numa perspetiva translacional, a utilização do NaCl 0,9% para a irrigação da bexiga após TURBT é um procedimento comum na prática clínica, pelo que a adaptação deste procedimento usando NaCl 0,9% ativado por PFA poderá vir a ter um impacto clínico significativo no sucesso da cirurgia no contexto da diminuição das recidivas. Por estas razões, os ensaios subsequentes foram realizados apenas com NaCl 0,9% ativado por PFA, e para o tempo de tratamento de 24 horas.

Vários autores relataram que o tratamento com MAPs é capaz de induzir apoptose ou necrose (Chauvin *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2016; Utsumi *et al.*, 2016), senescência (Freund *et al.*, 2019) ou autofagia (Griseti *et al.*, 2019) de maneira dependente do tempo de exposição do meio ao PFA. O tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA aplicado às linhas celulares do cancro da bexiga provocou diminuição da viabilidade celular e induziu morte celular por apoptose e necrose.

Para a linha celular TCCSUP, quanto maior o tempo de exposição menor a viabilidade e maiores as populações de células em apoptose tardia e em necrose [Figura 23a]. A morfologia celular [Figura 24] permitiu observar que, para tempos de exposição menores, houve evidências de apoptose, nomeadamente *blebs*, o que indica que a morte celular ocorre mesmo com tempos de exposição mais curtos. Com tempos de exposição maiores, verificou-se um aumento da apoptose, com evidência de *blebs*, fragmentação nuclear e condensação da cromatina, mas também de necrose, com evidências de extravasamento do citoplasma e de células necróticas. Através da morfologia celular também foi possível observar alguma morte celular por apoptose, evidência de *blebs* e necrose, evidência de extravasamento do citoplasma, nos controlos. Tal acontecimento corrobora os resultados da citometria de fluxo relativos à viabilidade celular mais baixa nos controlos.

Para a linha celular HT1376 observou-se uma diminuição da viabilidade celular à medida que o tempo de exposição aumentou [Figura 23b], facto que foi corroborado na análise da morfologia celular [Figura 25] com a evidência de apoptose e de necrose, dependentes do tempo de exposição. Mesmo com tempos de exposição mais curtos houve evidências de morte celular por necrose devido à evidência de extravasamento do citoplasma, e de morte celular por apoptose, devido à evidência de fragmentação nuclear. Para os tempos de exposição de 60 segundos e de 120 segundos observou-se morte celular por apoptose com evidência de *blebs*, vacuolização do citoplasma, fragmentação nuclear e condensação da cromatina. Também houve morte por necrose, com evidência de extravasamento do citoplasma e células necróticas.

Portanto, de uma forma geral para as duas linhas celulares, o NaCl 0,9% ativado por PFA durante tempos de exposição mais curtos induziu essencialmente morte celular por apoptose, enquanto que para tempos de exposição mais longos se verificou, adicionalmente, morte celular por necrose. A apoptose é uma morte celular programada e controlada. Em contrapartida, a necrose é um tipo de morte celular não controlada, que provoca a rotura da membrana plasmática e consequente lise celular, desencadeando um processo inflamatório. Todavia, há evidências de que algumas formas de necrose podem ocorrer de forma altamente regulada e de maneira geneticamente controlada, despertando um maior interesse por este tipo de morte celular (Berghe *et al.*, 2014; Nikolettou *et al.*, 2013; Virard *et al.*, 2015). A indução de morte celular utilizando meios ativado por PFA já foi descrita por alguns autores. Wang *et al.* demonstraram indução de apoptose, quer com PBS ativado por PFA, quer com DMEM ativado por PFA, não havendo grandes discrepâncias entre os diferentes meios (Wang *et al.*, 2019). Estudos realizados previamente no Instituto de Biofísica demonstraram que o tratamento direto com PFA é capaz de diminuir a viabilidade celular e de induzir morte celular por apoptose e por necrose, nas mesmas linhas celulares de cancro da bexiga usadas no nosso trabalho. O aumento da apoptose e da necrose foi observado à medida que o tempo de exposição aumentou e em ambas as linhas celulares (Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). Utilizando NaCl 0,9% ativado por PFA na linha celular TCCSUP observou-se diminuição da viabilidade celular e aumento significativo da apoptose tardia. Enquanto que, na linha celular HT1376 houve uma diminuição da viabilidade celular. Confrontando os resultados da citometria

de fluxo do tratamento direto com o NaCl 0,9% ativado por PFA, constata-se que o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA induziu, preferencialmente, morte celular por apoptose e necrose.

O tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA induziu alterações no ciclo celular em ambas as linhas celulares. Observou-se, principalmente, bloqueio do ciclo celular na fase S nas duas linhas celulares e bloqueio na fase G2/M na linha celular HT1376. Tavares-da-Silva *et al.*, demonstraram que o tratamento direto com PFA, em linhas celulares do cancro da bexiga, induz, igualmente, bloqueio do ciclo celular na fase S (Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). Ainda relativamente ao tratamento direto, Silva-Teixeira *et al.*, observaram de igual modo, um aumento da população de células na fase S, comparativamente ao controlo, e um aumento da população de células na fase G2/M foi observada para determinados tempos de exposição ao PFA (Silva-Teixeira *et al.*, 2021). O bloqueio do ciclo celular na fase S indica a capacidade do NaCl 0,9% ativado por PFA diminuir a síntese de DNA e/ou induzir lesões no DNA, como quebras de uma única cadeia e quebras nas duas cadeias. Estas lesões provocam fragmentação do DNA, a qual evita que as células passem da fase de replicação do DNA e/ou tornando-a mais lenta (Semmler *et al.*, 2020). O bloqueio do ciclo celular na fase G2/M pode ser explicado devido à presença de *checkpoints* nesta fase, que evitam o início da mitose de células que sofreram danos no DNA durante a fase G2 ou que possuíam danos não reparados que ocorreram nas fases S ou G1 (Silva-Teixeira *et al.*, 2021). É de salientar que a linha celular TCCSUP apresentou um perfil diferente após 120 segundos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA, nomeadamente o aparecimento de um pico apoptótico, aumento da população de células em fase G0/G1 e, conseqüentemente, diminuição da população de células em fase S e G2/M. Isto pode ter ocorrido pois, com tempo de exposição de 120 segundos, apenas 13% das células estavam viáveis, o que reflete o perfil do ciclo celular. Os ensaios de MTT e de SRB demonstraram diminuição da proliferação celular. Associado a esta diminuição seria de prever um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, fazendo com que as células não progredissem no ciclo celular. No entanto, sabe-se que ambas as linhas celulares utilizadas apresentam mutações nos genes *RBI* e *TP53*, de acordo com o COSMIC (catálogo de mutações somáticas no cancro, do inglês *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* [https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/]) e com a ATCC (do inglês *American Type Culture Collection* [<https://www.atcc.org/-/media/resources/brochures/cell-lines-by-gene-mutation/>]). As proteínas codificadas pelos genes *RBI* e *TP53* estão envolvidas nas principais vias de sinalização que regulam a fase G1, interferindo na decisão sobre se a célula entra ou não na fase S (Duronio e Xiong, 2013). A presença de mutações nos genes que codificam estas proteínas pode levar à ativação aberrante de CDKs (cinases dependentes de ciclina, do inglês *Cyclin-dependent kinases*) e a falhas na ativação de *checkpoints* do ciclo celular (Otto e Sicinski, 2017). Mutações nos genes *RBI* e *TP53* em ambas as linhas celulares pode explicar o porquê de não existir um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 e as células progredirem para a fase S. Além destas mutações, a linha celular TCCSUP também possui mutações no gene *PKMYT1*, de acordo com o COSMIC, enquanto a linha celular HT1376 não possui mutações neste gene. Este gene codifica a proteína MYT1, a qual é capaz de fosforilar a CDK1. A fosforilação da proteína CDK1 é um mecanismo regulador da verificação de danos no DNA. A presença de alterações na proteína CDK1 pode desencadear falhas na ativação de *checkpoints*, nomeadamente o *checkpoint* da fase G2/M (Chow e Poon, 2013). Este pode ser um motivo pelo qual as duas linhas celulares em estudo apresentam bloqueios do ciclo celular em fases diferentes em resposta ao mesmo

tratamento, justificando o bloqueio na fase G2/M observado na linha celular HT1376 mas não na linha celular TCCSUP.

Segundo a literatura, o tratamento com MAPs induz despolarização da membrana mitocondrial, logo induz morte celular por apoptose mediada pela mitocôndria (Nguyen *et al.*, 2016). Uma tendência para a diminuição do potencial de membrana mitocondrial foi observada em ambas as linhas celulares de cancro da bexiga. Estes resultados indicam que o tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA induziu morte celular por apoptose mediada pela mitocôndria. A morte celular por apoptose mediada pela mitocôndria, isto é, via intrínseca, está relacionada com a ativação das caspase-3 e da caspase-9. De forma a complementar esta informação seria de interesse realizar um ensaio para detetar e avaliar a expressão das caspases como, por exemplo, o *western blot*.

Diversos autores têm descrito as RONS como um dos principais mecanismos de ação do tratamento com MAPs (Chauvin *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2020; Grisetti, Merbahi e Golzio, 2020). De forma a entender se a ativação com PFA efetivamente aumenta a produção de RONS, foram analisadas as RONS presentes no NaCl 0,9% ativado por PFA comparativamente ao controlo (NaCl 0,9% não ativado por PFA) na ausência de células.

Imediatamente após a ativação do NaCl 0,9%, observou-se que com o tempo de exposição ao PFA de apenas 30 segundos, o nível relativo de RONS aumentou quase 10 vezes em relação ao controlo. No entanto, não se verificaram alterações nos níveis relativos de RONS com o aumento do tempo de exposição [Figura 28a]. Seria de esperar que com o aumento do tempo de exposição houvesse um maior nível relativo de RONS, pois maior tempo de exposição maior quantidade de RONS dissolvidas no NaCl 0,9% ativado por PFA. No entanto, observa-se uma tendência para o equilíbrio, não havendo grandes alterações à medida que o tempo de exposição aumenta. A sonda utilizada para este ensaio apenas reage com o peróxido de hidrogénio, radical peroxil, óxido nítrico e radical peroxinitrito. Uma possível explicação para tal acontecimento é o facto de que à medida que o tempo de exposição aumenta pode haver a produção de outras espécies reativas, que não as detetadas pela sonda. Assim sendo, são necessários mais ensaios para quantificar outras RONS que possam estar presentes no NaCl 0,9% ativado por PFA e quantificá-las.

Os níveis relativos de RONS no NaCl 0,9% ativado por PFA e na ausência de células também foram medidos após 2 horas de incubação [Figura 28b]. Neste caso, observou-se um aumento significativo do nível de RONS, logo com tempo de exposição de 30 segundos, o qual se manteve com os outros tempos de exposição. Contudo, à medida que aumenta o tempo de exposição, verificou-se um ligeiro decréscimo do nível relativo de RONS. Isto pode indicar que, com tempo de exposição maior, a conversão entre espécies reativas resulta em espécies mais estáveis, tais como o ozono, o ácido nítrico, ou o ácido nitroso, as quais não são detetadas pela análise feita.

Por fim, comparando os níveis relativos de RONS das amostras de NaCl 0,9% guardadas imediatamente após ativação com os das amostras guardadas 2 horas após ativação, verificou-se aproximadamente o dobro do nível relativo de RONS no NaCl 0,9% ativado por PFA guardado imediatamente. Novamente, isto pode ser devido à conversão entre espécies reativas que ocorreram durante as 2 horas de incubação, de modo que as espécies reativas reagem de forma a tornarem-se em espécies mais estáveis. Sendo assim, o nível relativo de RONS após 2 horas de incubação é cerca de 2 vezes menor, pois as espécies reativas presentes imediatamente após a ativação podem ter reagido e produzido espécies mais estáveis, não detetáveis pelo kit utilizado.

No nosso trabalho experimental também foi avaliado o conteúdo intracelular de algumas RONS, em ambas as linhas celulares, de forma a entender quais desempenham

um papel fundamental no mecanismo de ação do NaCl 0,9% ativado por PFA. Numa primeira fase foi testado se a adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células provoca alterações no conteúdo intracelular de RONS, nas duas linhas celulares de cancro da bexiga. Comparando o C_cell com C_meio verificou-se que não ocorreram alterações significativas, sendo que o nível de conteúdo intracelular de peróxidos, radical superóxido e óxido nítrico permanece aproximadamente igual entre os controlos. Logo, a adição de NaCl 0,9% não ativado por PFA às células não provoca quaisquer alterações no conteúdo intracelular de RONS.

Em segundo lugar foi analisado o conteúdo intracelular de peróxidos, radical superóxido e óxido nítrico com vários tempos de exposição do NaCl 0,9% ao PFA. Na linha celular TCCSUP verificou-se que o conteúdo intracelular de peróxidos permaneceu aproximadamente igual. A sonda utilizada para este ensaio não é específica para o peróxido de hidrogénio, detetando várias espécies oxidantes (Afri, Frimer e Cohen, 2004). O equilíbrio de peróxidos observado pode ser explicado pela conversão de peróxidos, nomeadamente o peróxido de hidrogénio, noutras espécies mais reativas como o radical hidroxilo, ou até pela sua destoxificação por defesas antioxidantes (Trachootham, Alexandre e Huang, 2009). Em relação ao radical superóxido, foi observado um aumento do conteúdo intracelular de radical superóxido. Este aumento também foi observado aquando da utilização do tratamento direto com o PFA (Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). Os resultados demonstram que o radical superóxido pode desempenhar um papel importante no mecanismo de ação do NaCl 0,9% ativado por PFA. O conteúdo intracelular de óxido nítrico aumentou nesta linha celular para todos os tempos de exposição, tendo o maior aumento com tempo de exposição de 60 segundos. Como referido acima, o óxido nítrico pode estar envolvido na formação do radical peroxinitrito e, para além disso, pode ter efeitos anti-tumorais por si só. O óxido nítrico é uma espécie com elevada capacidade de reação com outras moléculas. Contudo, os mecanismos pelos quais o óxido nítrico executa os seus efeitos citotóxicos não são completamente claros (Semmler *et al.*, 2020). Além disso, os radicais de óxido nítrico apresentam baixa solubilidade, tornando a sua solubilização um problema (Silva-Teixeira *et al.*, 2021). Alguns autores também verificaram um aumento do conteúdo intracelular de óxido nítrico, utilizando meios de cultura ativadas por PFA (Li *et al.*, 2021, 2017; Silva-Teixeira *et al.*, 2021).

Na linha celular HT1376 o conteúdo intracelular de peróxidos diminuiu dependendo do tempo de exposição. Essa diminuição também foi observada por Tavares-da-Silva *et al.*, utilizando o tratamento direto com PFA (Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). Contrariamente, outros autores relataram um aumento do conteúdo intracelular de peróxidos utilizando MAPs (Boehm *et al.*, 2016, 2018). Um possível motivo para a diminuição de peróxidos foi descrito anteriormente para a linha celular TCCSUP. Relativamente ao radical superóxido, o nível relativo permaneceu aproximadamente igual. O equilíbrio observado pode ser explicado pelo facto do radical superóxido poder ser convertido em peróxido de hidrogénio ou poder reagir com o óxido nítrico e formar o radical peroxinitrito. Este é um poderoso oxidante com capacidade de induzir danos na membrana, fragmentação do DNA, peroxidação lipídica, libertação do citocromo C e, consequentemente, apoptose e necrose (Hrabarova, Juranek e Soltes, 2011; Trachootham, Alexandre e Huang, 2009). Nesta linha celular, no que diz respeito ao óxido nítrico, só houve aumento com tempo de exposição de 60 segundos. É de salientar que a fluorescência da DAF-FM, a sonda utilizada para avaliar o conteúdo intracelular de óxido nítrico, pode diminuir ou aumentar na presença de uma fonte de óxido nítrico e um superóxido ou peróxido de hidrogénio. Por este motivo pode estimar tendenciosamente a

produção de óxido nítrico (Balcerczyk, Soszynski e Bartosz, 2005). Isto pode ter ocorrido pois observou-se a presença de radical superóxido no ensaio realizado na linha celular TCCSUP e a presença de peróxidos na linha celular HT1376. Por fim, os mecanismos de ação relativos às RONS podem diferir de linha celular para linha celular, isto é, os efeitos são diferentes de acordo com o grau e estágio do tumor.

Para além das RONS avaliadas neste trabalho experimental também é importante avaliar o conteúdo intracelular de outras RONS, como o radical peroxinitrito e o radical hidroxilo, os quais podem ser detetados por fluorescência. Como referido anteriormente, o radical peroxinitrito pode danificar componentes celulares levando à morte celular por apoptose e por necrose (Zhou *et al.*, 2018). O radical hidroxilo é uma das espécies reativas mais prejudiciais, sendo capaz de reagir com biomoléculas e tem a capacidade de reagir com todos os componentes do DNA provocando danos (Adachi *et al.*, 2016). Estes factos tornam imprescindível a medição destas espécies após tratamento com o NaCl 0,9% ativado por PFA, com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre o seu mecanismo de ação.

O stresse oxidativo é um desequilíbrio entre espécies reativas e espécies antioxidantes. Por este motivo é também importante avaliar defesas antioxidantes, como a GSH, que é uma defesa antioxidante não enzimática responsável pela destoxificação do peróxido de hidrogénio, e a superóxido dismutase (SOD) que é responsável pela conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogénio (Mailloux, 2018). Ao avaliar as defesas antioxidantes poderemos compreender de que modo o stresse oxidativo é o mediador do efeito antitumoral do NaCl 0,9% ativado por PFA. É crucial avaliar ainda outras RONS que podem estar presentes no NaCl 0,9% ativado por PFA para entender quais chegam às células e quais desempenham um papel fundamental no mecanismo de ação extra e intracelular do NaCl 0,9% ativado por PFA.

2. Estudos *ex vivo*

A avaliação histológica das amostras de tumor submetidas ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA demonstrou um tumor normalmente de padrão sólido/trabecular/insular. Comparativamente ao controlo observou-se um aumento da necrose e da redução da coesão celular. Os estudos *in vitro* também evidenciaram um aumento da necrose à medida que o tempo de exposição do NaCl 0,9% ao PFA aumentou. Os tempos de exposição utilizados nos estudos *ex vivo* foram superiores aos utilizados nos estudos *in vitro*, o que pode justificar a presença de necrose como consequência de um estímulo oxidativo mais intenso.

Em relação à análise imuno-histoquímica para avaliar a expressão de Ki67, observou-se que os valores diferiram bastante de amostra para amostra, devido à heterogeneidade das mesmas. A expressão de Ki67 está associada à proliferação celular e crescimento do tumor, o que justifica o seu valor mais elevado em algumas amostras (Li *et al.*, 2015). Relativamente à expressão de caspase-3, não houve inequivocamente um aumento desta proteína. Algumas das amostras foram classificadas como não avaliáveis devido à dificuldade na marcação com o anticorpo nas amostras. Para além disso, as amostras, na altura da análise, revelavam artefactos, os quais podem estar associados ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA ou com os tempos de fixação. De forma a ter resultados reprodutíveis e otimizar as amostras é necessário rever, no futuro, todo o protocolo efetuado desde a remoção da amostra por TURBT até a sua análise final. Portanto, estes resultados são preliminares e devem ser realizados novos ensaios para verificar a sua validade e reprodutibilidade.

Estes artefactos podem ser devidos ao tratamento com o NaCl 0,9% ativado por PFA, que é capaz de causar fragmentação da amostra de tumor. Também, os artefactos podem estar relacionados com os tempos de fixação em formol até à análise da amostra ser efetivamente realizada. Futuramente, são precisos novos ensaios de modo a otimizar as amostras e assegurar a validade e reprodutibilidade dos resultados. A otimização das amostras pode ser efetuada através da diminuição do tempo desde que a amostra é colhida até que é submetida ao tratamento, evitando armazenamento da amostra durante muito tempo e da diminuição dos tempos de fixação o máximo possível. É de salientar que o tempo entre a colheita da amostra e a submissão ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por PFA diferiu de amostra para amostra, podendo justificar a heterogeneidade das marcações.

O *western blot* foi executado para avaliação da expressão das caspases-3, -8 e -9. A ausência de dados relativamente ao *western blot* deveu-se a limitações experimentais que impediram a obtenção de resultados em tempo útil. Estas limitações incluíram o transporte e armazenamento das amostras de tumor, a fragmentação causada pela adição do NaCl 0,9% ativado por PFA e problemas na extração de proteína dos tumores. Em primeiro lugar, as amostras são colhidas e guardadas em soro fisiológico e a maioria, quando chegam ao laboratório, encontravam-se desfeitas e desintegradas em várias amostras mais pequenas. Adicionalmente, o tempo entre a colheita da amostra no bloco operatório e a ativação no laboratório não foi possível de manter constante, tendo algumas ficado *overnight* em soro fisiológico a 4°C. Em segundo lugar, quer a adição do NaCl 0,9% não ativado por PFA, quer a adição do NaCl 0,9% ativado por PFA causaram alguma fragmentação das amostras. Uma outra possível explicação para os impedimentos encontrados ao longo desta técnica é a existência de problemas associados à técnica de extração de proteína dos tumores. Durante a realização dos extratos foi utilizado um

falcon com gelo de forma a manter a amostra no gelo durante todo o processo. Contudo, o tempo de homogeneização não foi o mesmo devido à heterogeneidade das amostras, tendo algumas amostras ficado a homogeneizar no *potter* durante 5 minutos, enquanto outras durante 20 minutos. Devido à quantidade de amostras, o processo de extração tornou-se longo, demorando um mínimo de 2 horas. Para resolver este problema poderíamos diminuir o número de amostras que podem chegar no mesmo dia, tendo em conta o tempo necessário para fazer a extração de proteína. É de extrema importância tentar manter as amostras no gelo durante todo o processo de extração de proteína, e diminuir ao máximo mudanças repentinas de temperatura. Por fim, por meio da coloração com *PageBlue* verificou-se que a proteína dos extratos das amostras de tumor estava degradada, o que impediu a realização do *western blot* com sucesso. A degradação da proteína foi ainda verificada na marcação com actina e, conseqüentemente, a marcação das caspases com recurso aos anticorpos adequados também não foi eficaz. Futuramente, para ser possível a realização de *western blot* com amostras de tumor de doentes é fundamental a revisão de todos os protocolos utilizados e, mais importante, um maior cuidado nas amostras que chegam ao laboratório, através da máxima padronização das condições em que estas são armazenadas e transportadas, e o cuidado de manter as amostras o máximo de tempo possível no gelo.

VI. Conclusão e perspectivas futuras

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico contra o cancro da bexiga, como também clarificar os seus possíveis mecanismos de ação. Ao longo deste trabalho foram apresentados os resultados obtidos *in vitro* e *ex vivo* que realçaram o potencial terapêutico do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico e também esclareceram alguns dos possíveis mecanismos de atuação do tratamento em células do cancro da bexiga.

O tratamento com os quatro meios ativados por Plasma Frio Atmosférico testados reduziu significativamente a proliferação celular através da redução da atividade metabólica e do conteúdo proteico, de forma dependente do tempo de exposição do meio ao Plasma Frio Atmosférico e do tempo de tratamento com os meios ativados por Plasma Frio Atmosférico. A diminuição da proliferação celular foi observada em ambas as linhas celulares, contudo, a linha celular de maior grau (TCCSUP) demonstrou uma maior sensibilidade ao tratamento com meios ativados por Plasma Frio Atmosférico. Entre os quatro meios testados o NaCl 0,9% apresentou os melhores resultados e considerando que na prática clínica, a utilização do NaCl 0,9% para a irrigação da bexiga após ressecção transuretral da bexiga é um procedimento comum, a adaptação deste procedimento usando NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico poderá vir a ter um impacto clínico importante. Em relação ao tratamento direto em comparação com o tratamento indireto com o NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico, este demonstrou melhores resultados na diminuição da proliferação celular.

Para os restantes ensaios foi utilizado o NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico, o qual foi capaz de diminuir a viabilidade celular nas células de cancro da bexiga de forma dependente do tempo de exposição do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico. Em relação ao perfil de morte celular, de uma forma geral, o NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico induziu morte celular principalmente por apoptose, para tempos de exposição mais curtos e por necrose para tempos de exposição mais longos do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico. Quanto ao ciclo celular, observou-se um bloqueio do ciclo celular na fase S em ambas as linhas celulares e, adicionalmente, um bloqueio na fase G2/M na linha celular HT1376. Esta diferença pode estar relacionada com o *background* genético das duas linhas celulares. Para além disso, foi observada despolarização da membrana mitocondrial para maiores tempos de exposição do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico, em ambas as linhas celulares. Aparentemente, o mecanismo de ação do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico provoca morte celular preferencialmente por apoptose e necrose, sendo o perfil de morte dependente do tempo de exposição do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico e, possivelmente, dependente do estímulo oxidativo induzido.

A ativação do NaCl 0,9% com Plasma Frio Atmosférico foi capaz de aumentar significativamente o nível relativo de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio presentes no NaCl 0,9%, na ausência de células. Esse aumento do nível relativo de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio ocorreu imediatamente após ativação, no entanto, decresceu 2 horas após a ativação, ainda assim permanecendo quatro vezes mais elevado comparativamente ao controlo não irradiado.

Para compreender que espécies reativas de oxigénio e nitrogénio estarão envolvidas no mecanismo de ação do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico, algumas destas espécies reativas foram avaliadas. Em primeiro lugar verificou-se que a adição de NaCl 0,9% não ativado por Plasma Frio Atmosférico não tem efeitos no conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio em ambas as linhas celulares. Em segundo lugar avaliou-se o efeito induzido pelo NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico nos níveis intracelulares de espécies oxidantes. Na linha celular

TCCSUP o conteúdo intracelular de peróxido permaneceu aproximadamente igual. O radical superóxido sofreu um aumento significativo à medida que o tempo exposição do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico aumentou. O conteúdo intracelular de óxido nítrico aumentou mesmo com tempos de exposição mais curtos. Na linha celular HT1376, o conteúdo intracelular de peróxidos diminuiu ligeiramente, dependendo do tempo de exposição do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico. Em relação ao radical superóxido não houve alterações significativas. Por fim, o conteúdo intracelular de óxido nítrico sofreu um aumento com tempo de exposição de 60 segundos do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico. Portanto, o radical superóxido e o óxido nítrico podem desempenhar um papel crucial no mecanismo de ação do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico.

No que diz respeito à avaliação histológica das amostras de tumor submetidas ao NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico, verificou-se que o tratamento induziu necrose e redução da coesão celular, em comparação com o controlo.

Portanto, este trabalho experimental permitiu compreender melhor os efeitos do tratamento com NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico em duas linhas celulares do cancro da bexiga com diferentes características moleculares e pertencentes a diferentes estádios da doença. Adicionalmente, foi demonstrada a maior sensibilidade da linha celular de maior grau ao tratamento com NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico. Para o NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico ser utilizado no futuro como abordagem terapêutica para o cancro da bexiga é de extrema importância ter em conta o tipo de tumor e o seu grau, para determinar o tempo ideal de exposição do NaCl 0,9% ao Plasma Frio Atmosférico, de forma a atingir máxima eficácia.

Em estudos futuros é importante avaliar os efeitos do tratamento com NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico em células normais da bexiga, com o intuito de averiguar o efeito seletivo do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico no cancro da bexiga. Também é necessário averiguar mais a fundo quais os mecanismos de morte celular predominantes. Para além do ensaio efetuado para medição das espécies reativas de oxigénio e nitrogénio no NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico, na ausência de células, é necessário investigar e quantificar outras espécies reativas de oxigénio e nitrogénio que podem estar dissolvidas no NaCl 0,9% após ativação com Plasma Frio Atmosférico. Isto poderá dar a indicação de quais espécies reativas de oxigénio e nitrogénio são fundamentais no mecanismo de ação do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico. Em relação ao conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio também é preciso avaliar outras espécies reativas e também estudar defesas antioxidantes. Um conhecimento mais detalhado sobre os mecanismos de ação do NaCl 0,9% ativado por Plasma Frio Atmosférico permitirá a otimização desta terapia, de forma a potenciar a sua atividade anti-tumoral. Finalmente, considerando a complexidade tumoral e com base nos dados observados, modelos 3D são fundamentais para acompanhar o crescimento do tumor e os seus efeitos secundários num modelo mais complexo e aproximado da realidade. A cultura celular 3D é um ambiente artificial que consegue recriar um sistema fisiológico, permitindo a investigação de questões complexas. Todos estes estudos são importantes para o avanço na abordagem clínica.

Bibliografia

- ADACHI, Tetsuo *et al.* - Iron stimulates plasma-activated medium-induced A549 cell injury. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 20928. doi: 10.1038/srep20928.
- AFRI, Michal; FRIMER, Aryeh A.; COHEN, Yael - Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. **Chemistry and Physics of Lipids**. ISSN 00093084. 131:1 (2004) 123–133. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2004.04.006.
- AGHAALIKHANI, Nazi *et al.* - Cancer stem cells as a therapeutic target in bladder cancer. **Journal of Cellular Physiology**. ISSN 00219541. 234:4 (2019) 3197–3206. doi: 10.1002/jcp.26916.
- AHN, Hak Jun *et al.* - Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals. **PLoS ONE**. ISSN 1932-6203. 6:11 (2011) e28154. doi: 10.1371/journal.pone.0028154.
- AJALLOUEIAN, Fatemeh *et al.* - Bladder biomechanics and the use of scaffolds for regenerative medicine in the urinary bladder. **Nature Reviews Urology**. ISSN 1759-4812. 15:3 (2018) 155–174. doi: 10.1038/nrurol.2018.5.
- AL-SHEHRI, Saad S. - Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. **Biochimie**. ISSN 61831638. 181:2021) 52–64. doi: 10.1016/j.biochi.2020.11.022.
- ALFRED WITJES, J. *et al.* - Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. **European Urology**. ISSN 03022838. 71:3 (2017) 462–475. doi: 10.1016/j.eururo.2016.06.020.
- ALMEIDA-FERREIRA, Catarina *et al.* - Open-air cold plasma device leads to selective tumor cell cytotoxicity. **Applied Sciences (Switzerland)**. ISSN 20763417. 11:9 (2021). doi: 10.3390/app11094171.
- ARNDT, Stephanie *et al.* - Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. **Experimental Dermatology**. ISSN 09066705. 22:4 (2013) 284–289. doi: 10.1111/exd.12127.
- BABAEVA, Natalia Yu; NAIDIS, George V. - Modeling of Plasmas for Biomedicine. **Trends in Biotechnology**. ISSN 01677799. 36:6 (2018) 603–614. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.06.017.
- BABJUK, Marko *et al.* - European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. **European Urology**. ISSN 03022838. 76:5 (2019) 639–657. doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.016.
- BALCERCZYK, Aneta; SOSZYNSKI, Mirosław; BARTOSZ, Grzegorz - On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**. ISSN 08915849. 39:3 (2005) 327–335. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.017.
- BEKESCHUS, Sander *et al.* - Oxygen atoms are critical in rendering THP-1 leukaemia

cells susceptible to cold physical plasma-induced apoptosis. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 7:1 (2017) 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-03131-y.

BELLMUNT, J. *et al.* - Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. ISSN 09237534. 25:June (2014) iii40–iii48. doi: 10.1093/annonc/mdu223.

BERGHE, Tom Vanden *et al.* - Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. ISSN 14710072. 15:2 (2014) 135–147. doi: 10.1038/nrm3737.

BOEHM, Daniela *et al.* - Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 6:February (2016) 1–14. doi: 10.1038/srep21464.

BOEHM, Daniela *et al.* - Hydrogen Peroxide and Beyond-the Potential of High-voltage Plasma-activated Liquids Against Cancerous Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. ISSN 18715206. 18:6 (2018) 815–823. doi: 10.2174/1871520617666170801110517.

BORTNER, Carl D.; CIDLOWSKI, John A. - Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 00219258. 274:31 (1999) 21953–21962. doi: 10.1074/jbc.274.31.21953.

BOXEM, Wilma VAN *et al.* - Anti-cancer capacity of plasma-treated PBS: effect of chemical composition on cancer cell cytotoxicity. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 7:1 (2017) 16478. doi: 10.1038/s41598-017-16758-8.

BRANÝ, Dušan *et al.* - Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 21:8 (2020) 2932. doi: 10.3390/ijms21082932.

CALLEN, James D. - **Fundamentals of Plasma Physics**. [S.l.] : University of Wisconsin; 2003, 2003

CANAL, Cristina *et al.* - Plasma-induced selectivity in bone cancer cells death. **Free Radical Biology and Medicine**. ISSN 08915849. 110:2017) 72–80. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.023.

CHAUVIN, Julie *et al.* - Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 7:1 (2017) 4562. doi: 10.1038/s41598-017-04650-4.

CHAUVIN, Julie *et al.* - Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 9:1 (2019) 4866. doi: 10.1038/s41598-019-41408-6.

CHEN, Aaron *et al.* - Effects of diluents on cell culture viability measured by automated cell counter. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 12:3 (2017) 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0173375.

CHEN, Zhitong *et al.* - A novel micro cold atmospheric plasma device for glioblastoma both in vitro and in vivo. **Cancers**. ISSN 20726694. 9:6 (2017) 1–16. doi: 10.3390/cancers9060061.

CHENG, Yi-Jing *et al.* - Plasma-activated medium as adjuvant therapy for lung cancer with malignant pleural effusion. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 10:1 (2020) 18154. doi: 10.1038/s41598-020-75214-2.

CHOW, J. P. H.; POON, R. Y. C. - The CDK1 inhibitory kinase MYT1 in DNA damage checkpoint recovery. **Oncogene**. ISSN 09509232. 32:40 (2013) 4778–4788. doi: 10.1038/onc.2012.504.

CHUNG, Thai-Hoa *et al.* - Cell Electroporation Enhancement by Non-Thermal-Plasma-Treated PBS. **Cancers**. ISSN 2072-6694. 12:1 (2020) 219. doi: 10.3390/cancers12010219.

CRAWFORD, James M. - The origins of bladder cancer. **Laboratory Investigation**. . ISSN 0023-6837. 88:7 (2008) 686–693. doi: 10.1038/labinvest.2008.48.

DEGEORGE, Katharine C.; HOLT, Harry R.; HODGES, Stephanie C. - Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. **American family physician**. ISSN 1532-0650. 96:8 (2017) 507–514.

DESGROSELLIER, Jay S.; CHERESH, David A. - Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**. ISSN 1474175X. 10:1 (2010) 9–22. doi: 10.1038/nrc2748.

DURONIO, Robert J.; XIONG, Yue - Signaling pathways that control cell proliferation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. ISSN 19430264. 5:3 (2013) 1–12. doi: 10.1101/cshperspect.a008904.

ELEFANTOVA, Katarina *et al.* - Detection of the Mitochondrial Membrane Potential by the Cationic Dye JC-1 in L1210 Cells with Massive Overexpression of the Plasma Membrane ABCB1 Drug Transporter. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 19:7 (2018) 1985. doi: 10.3390/ijms19071985.

FELSENSTEIN, Kenneth M.; THEODORESCU, Dan - Precision medicine for urothelial bladder cancer: update on tumour genomics and immunotherapy. **Nature Reviews Urology**. ISSN 1759-4812. 15:2 (2018) 92–111. doi: 10.1038/nrurol.2017.179.

FERLAY J, ERVIK M, LAM F, COLOMBET M, MERY L, PIÑEROS M, ZNAOR A, SOERJOMATARAM I, Bray F. - **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [Em linha], atual. 2020. [Consult. 26 jul. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://gco.iarc.fr/today/about>.

FERREIRA, Catarina Alexandra Almeida - **Plasma Frio Atmosférico Como Alternativa Terapêutica No Cancro Da Mama** [Em linha]. [S.l.] : Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2019 Disponível em WWW:<URL:http://hdl.handle.net/10316/88213>.

FERRER-SUETA, Gerardo; RADI, Rafael - Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics,

diffusion, and radicals. **ACS Chemical Biology**. ISSN 15548929. 4:3 (2009) 161–177. doi: 10.1021/cb800279q.

FREUND, Eric *et al.* - Physical plasma-treated saline promotes an immunogenic phenotype in CT26 colon cancer cells in vitro and in vivo. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 9:1 (2019) 634. doi: 10.1038/s41598-018-37169-3.

FRY, Christopher H.; MCCLOSKEY, Karen D. - Spontaneous Activity and the Urinary Bladder. Em **Advances in Experimental Medicine and Biology** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-5895-1_5>. ISBN 9789811358951v. 1124. p. 121–147.

FRY, Christopher H.; VAHABI, Bahareh - The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. ISSN 17427835. 119:1 (2016) 57–62. doi: 10.1111/bcpt.12626.

FUKUHARA, Hideo *et al.* - Low-temperature Plasma Jet Activated Media Induces Apoptosis in Bladder Cancer Cells via the Cytochrome c/caspase 3 Pathway. 2021) 1–20.

GANGULY, Kirat Kumar *et al.* - Integrins and metastasis. **Cell Adhesion and Migration**. ISSN 19336926. 7:3 (2013) 251–261. doi: 10.4161/cam.23840.

GAY-MIMBRERA, Jesús *et al.* - Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. **Advances in Therapy**. ISSN 0741-238X. 33:6 (2016) 894–909. doi: 10.1007/s12325-016-0338-1.

GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. - Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 1474-1776. 12:12 (2013) 931–947. doi: 10.1038/nrd4002.

GRISETI, Elena *et al.* - Pulsed Electric Field Treatment Enhances the Cytotoxicity of Plasma-Activated Liquids in a Three-Dimensional Human Colorectal Cancer Cell Model. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 9:1 (2019) 7583. doi: 10.1038/s41598-019-44087-5.

GRISETI, Elena; MERBAHI, Nofel; GOLZIO, Muriel - Anti-Cancer Potential of Two Plasma-Activated Liquids: Implication of Long-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Cancers**. ISSN 2072-6694. 12:3 (2020) 721. doi: 10.3390/cancers12030721.

GUERRERO-PRESTON, RAFAEL *et al.* - Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. **International Journal of Molecular Medicine**. ISSN 1107-3756. 34:4 (2014) 941–946. doi: 10.3892/ijmm.2014.1849.

GÜMBEL, Denis *et al.* - Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Osteosarcoma. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 18:9 (2017) 2004. doi: 10.3390/ijms18092004.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. - Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**. ISSN 00928674. 144:5 (2011) 646–674. doi:

10.1016/j.cell.2011.02.013.

HIRST, A. M. *et al.* - Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. **British Journal of Cancer**. ISSN 0007-0920. 112:9 (2015) 1536–1545. doi: 10.1038/bjc.2015.113.

HOUGHTON, Peter *et al.* - The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**. ISSN 10462023. 42:4 (2007) 377–387. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.003.

HRABAROVA, Eva; JURANEK, Ivo; SOLTES, Ladislav - Pro-oxidative effect of peroxyxynitrite regarding biological systems: A special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. **General Physiology and Biophysics**. ISSN 02315882. 30:3 (2011) 223–228. doi: 10.4149/gpb_2011_03_223.

ISBARY, Georg *et al.* - Cold atmospheric plasma devices for medical issues. **Expert Review of Medical Devices**. ISSN 1743-4440. 10:3 (2013) 367–377. doi: 10.1586/erd.13.4.

JORDAN, Brian; MEEKS, Joshua J. - T1 bladder cancer: current considerations for diagnosis and management. **Nature Reviews Urology**. ISSN 1759-4812. 16:1 (2019) 23–34. doi: 10.1038/s41585-018-0105-y.

KADAMBI, Sindhuja *et al.* - Older adults with cancer and their caregivers — current landscape and future directions for clinical care. **Nature Reviews Clinical Oncology**. ISSN 1759-4774. 17:12 (2020) 742–755. doi: 10.1038/s41571-020-0421-z.

KANG, Sung Un *et al.* - Comparative Effects of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma on Migration and Invasion in Oral Squamous Cell Cancer, by Gas Type. **Yonsei Medical Journal**. ISSN 0513-5796. 58:2 (2017) 272. doi: 10.3349/ymj.2017.58.2.272.

KAUSHIK, Nagendra Kumar *et al.* - Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. **Biological Chemistry**. ISSN 1437-4315. 400:1 (2018) 39–62. doi: 10.1515/hsz-2018-0226.

KEIDAR, M. *et al.* - Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. **British Journal of Cancer**. ISSN 0007-0920. 105:9 (2011) 1295–1301. doi: 10.1038/bjc.2011.386.

KEIDAR, Michael - Plasma for cancer treatment. **Plasma Sources Science and Technology**. ISSN 0963-0252. 24:3 (2015) 033001. doi: 10.1088/0963-0252/24/3/033001.

KIM, Fernando J.; CHAMMAS, Mario F. - Bladder Cancer. Em **Abernathy's Surgical Secrets** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier, 2009 Disponível em WWW:<URL:https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323057110000975>. ISBN 9780323057110v. 42. p. 464–466.

KIM, Hyeoncheol; XUE, Xiang - Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. **Journal of**

Visualized Experiments. ISSN 1940-087X. 2020:160 (2020) 1–5. doi: 10.3791/60682.

KOENSGEN, Dominique *et al.* - Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth – A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy. **Anticancer Research.** ISSN 02507005. 37:12 (2017) 6739–6744. doi: 10.21873/anticanres.12133.

KONG, M. G. *et al.* - Plasma medicine: an introductory review. **New Journal of Physics.** ISSN 1367-2630. 11:11 (2009) 115012. doi: 10.1088/1367-2630/11/11/115012.

KONG, Peter - Atmospheric-pressure plasma process and applications. **2006 TMS Fall Extraction and Processing Division: Sohn International Symposium.** 6:2006) 493–506.

KOSKENKORVA-FRANK, Taija S. *et al.* - The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. **Free Radical Biology and Medicine.** ISSN 18734596. 65:2013) 1174–1194. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.001.

LEE, Jin-Woo *et al.* - On–off switching of cell cycle and melanogenesis regulation of melanocytes by non-thermal atmospheric pressure plasma-activated medium. **Scientific Reports.** ISSN 2045-2322. 9:1 (2019) 13400. doi: 10.1038/s41598-019-50041-2.

LENIS, Andrew T. *et al.* - Continuous saline bladder irrigation for two hours following transurethral resection of bladder tumors in patients with non-muscle invasive bladder cancer does not prevent recurrence or progression compared with intravesical Mitomycin-C. **BMC Urology.** ISSN 1471-2490. 18:1 (2018) 93. doi: 10.1186/s12894-018-0408-6.

LI, Lian Tao *et al.* - Predic Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). **Molecular Medicine Reports.** ISSN 17913004. 11:3 (2015) 1566–1572. doi: 10.3892/mmr.2014.2914.

LI, Yan *et al.* - Cold atmospheric pressure plasma-activated medium induces selective cell death in human hepatocellular carcinoma cells independently of singlet oxygen, hydrogen peroxide, nitric oxide and nitrite/nitrate. **International Journal of Molecular Sciences.** ISSN 14220067. 22:11 (2021). doi: 10.3390/ijms22115548.

LI, Ying *et al.* - Effects of atmospheric-pressure non-thermal bio-compatible plasma and plasma activated nitric oxide water on cervical cancer cells. **Scientific Reports.** ISSN 20452322. 7:November 2016 (2017) 1–9. doi: 10.1038/srep45781.

LIEDTKE, Kim Rouven *et al.* - Non-thermal plasma-treated solution demonstrates antitumor activity against pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. **Scientific Reports.** ISSN 2045-2322. 7:1 (2017) 8319. doi: 10.1038/s41598-017-08560-3.

LIEDTKE, KIM ROUVEN *et al.* - Cold Physical Plasma Selectively Elicits Apoptosis in Murine Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Ovo. **Anticancer Research.** ISSN 0250-7005. 38:10 (2018) 5655–5663. doi: 10.21873/anticanres.12901.

- LIU, D. X. *et al.* - Aqueous reactive species induced by a surface air discharge: Heterogeneous mass transfer and liquid chemistry pathways. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 23737. doi: 10.1038/srep23737.
- LIU, Yong Qiang *et al.* - Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. **Phytomedicine**. ISSN 1618095X. 80:March 2020 (2021) 153402. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153402.
- LOENHOUT, Jinthe VAN *et al.* - Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of Pancreatic Cancer Cells. **Cancers**. ISSN 2072-6694. 11:10 (2019) 1597. doi: 10.3390/cancers11101597.
- LOPES, Beatriz Pinheiro - **Cold Atmospheric Plasma in the treatment of Retinoblastoma** [Em linha]. [S.l.] : Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2018 Disponível em WWW:<URL:http://hdl.handle.net/10316/86186>.
- MAHMOOD, Tahrin; YANG, Ping Chang - Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**. ISSN 22501541. 4:9 (2012) 429–434. doi: 10.4103/1947-2714.100998.
- MAILLOUX, Ryan J. - Mitochondrial antioxidants and the maintenance of cellular hydrogen peroxide levels. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. ISSN 19420994. 2018:1 (2018). doi: 10.1155/2018/7857251.
- MARIOTTI, Sabrina *et al.* - A method permissive to fixation and permeabilization for the multiparametric analysis of apoptotic and necrotic cell phenotype by flow cytometry. **Cytometry Part A**. ISSN 15524922. 91:11 (2017) 1115–1124. doi: 10.1002/cyto.a.23268.
- MARTIN, Jeremy W. *et al.* - Squamous cell carcinoma of the urinary bladder: Systematic review of clinical characteristics and therapeutic approaches. **Arab Journal of Urology**. ISSN 20905998. 14:3 (2016) 183–191. doi: 10.1016/j.aju.2016.07.001.
- MATTIUZZI, Camilla; LIPPI, Giuseppe - Current Cancer Epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**. ISSN 2210-6014. 9:4 (2019) 217. doi: 10.2991/jegh.k.191008.001.
- MERRILL, Liana *et al.* - Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder. **Nature Reviews Urology**. ISSN 1759-4812. 13:4 (2016) 193–204. doi: 10.1038/nrurol.2016.13.
- MERTENS, Laura S. *et al.* - Landmarks in non-muscle-invasive bladder cancer. **Nature Reviews Urology**. ISSN 1759-4812. 11:8 (2014) 476–480. doi: 10.1038/nrurol.2014.130.
- MIRPOUR, Shahriar *et al.* - The Selective Characterization of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma Jet on Treatment of Human Breast Cancer and Normal Cells. **IEEE Transactions on Plasma Science**. ISSN 0093-3813. 42:2 (2014) 315–322. doi: 10.1109/TPS.2013.2291860.

MITRA, Sarmistha *et al.* - Impact of ROS Generated by Chemical, Physical, and Plasma Techniques on Cancer Attenuation. **Cancers**. ISSN 2072-6694. 11:7 (2019) 1030. doi: 10.3390/cancers11071030.

MOHADES, S. *et al.* - Evaluation of the effects of a plasma activated medium on cancer cells. **Physics of Plasmas**. ISSN 10897674. 22:12 (2015) 1–6. doi: 10.1063/1.4933367.

MOHADES, Soheila; BAREKZI, Nazir; LAROUSSE, Mounir - Efficacy of Low Temperature Plasma against SCaBER Cancer Cells. **Plasma Processes and Polymers**. ISSN 16128850. 11:12 (2014) 1150–1155. doi: 10.1002/ppap.201400108.

MOSMANN, Tim - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**. ISSN 0022-1759. 65:1–2 (1983) 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NABI, Karim; LE, Anne - The Intratumoral Heterogeneity of Cancer Metabolism. Em **Advances in Experimental Medicine and Biology** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29946781/>. ISBN 9783319777368v. 1063. p. 131–145.

NAGAYA, Misaki *et al.* - Inhibition of NAMPT markedly enhances plasma-activated medium-induced cell death in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. ISSN 00039861. 676:September (2019) 108155. doi: 10.1016/j.abb.2019.108155.

NAKAMURA, Kae *et al.* - Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 7:1 (2017) 6085. doi: 10.1038/s41598-017-05620-6.

NGUYEN, Ngoc Hoan *et al.* - Anti-cancer efficacy of nonthermal plasma dissolved in a liquid, liquid plasma in heterogeneous cancer cells. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 29020. doi: 10.1038/srep29020.

NIKOLETOPOULOU, Vassiliki *et al.* - Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**. ISSN 01674889. 1833:12 (2013) 3448–3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.

NOKHANDANI, Akram Mohammadi *et al.* - A Review of New Method of Cold Plasma in Cancer Treatment. **Scholars Academic Journal of Bioscience**. 3:February (2015) 222–230.

OEYEN, Eline *et al.* - Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 20:4 (2019) 821. doi: 10.3390/ijms20040821.

OLEJNIK, Agnieszka *et al.* - Ameliorating effect of klotho protein on rat heart during i/r injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. ISSN 19420994. 2020:2020). doi: 10.1155/2020/6427284.

OLIVEIRA, Ana Sofia Cartaxo Pinto - **Automatizing the Application of Cold Atmospheric Plasma in Tumor Cells** [Em linha]. [S.l.] : Dissertação de mestrado,

Universidade de Coimbra, 2019 Disponível em WWW:<URL:http://hdl.handle.net/10316/87925>.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr - Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. ISSN 14741768. 17:2 (2017) 93–115. doi: 10.1038/nrc.2016.138.

PASCUA-MAESTRO, Raquel *et al.* - The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. **Acta Histochemica**. ISSN 00651281. 120:3 (2018) 179–186. doi: 10.1016/j.acthis.2018.01.006.

PELOSI, Elvira; CASTELLI, Germana; TESTA, Ugo - Understanding mechanisms of cancer initiation and development supports the need for an implementation of primary and secondary cancer prevention. **Annali dell’Istituto Superiore di Sanita**. ISSN 23848553. 55:4 (2019) 371–379. doi: 10.4415/ANN_19_04_11.

PELUCCHI, Claudio *et al.* - Mechanisms of Disease: the epidemiology of bladder cancer. **Nature Clinical Practice Urology**. ISSN 1743-4270. 3:6 (2006) 327–340. doi: 10.1038/ncpuro0510.

PEREIRA, Eurico José Gonçalves - **Plasma Frio Atmosférico no Tratamento do Cancro da Bexiga**. [S.l.] : Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2020

PIAO, Xuan-Mei *et al.* - Unmasking molecular profiles of bladder cancer. **Investigative and Clinical Urology**. ISSN 2466-0493. 59:2 (2018) 72. doi: 10.4111/icu.2018.59.2.72.

RASHKIN, Sara R. *et al.* - Pan-cancer study detects genetic risk variants and shared genetic basis in two large cohorts. **Nature Communications**. ISSN 2041-1723. 11:1 (2020) 4423. doi: 10.1038/s41467-020-18246-6.

REDELMAN-SIDI, Gil; GLICKMAN, Michael S.; BOCHNER, Bernard H. - The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. **Nature Reviews Urology**. ISSN 1759-4812. 11:3 (2014) 153–162. doi: 10.1038/nrurol.2014.15.

RICCARDI, Carlo; NICOLETTI, Ildo - Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**. ISSN 1754-2189. 1:3 (2006) 1458–1461. doi: 10.1038/nprot.2006.238.

SAADATI, Fariba *et al.* - Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 8:1 (2018) 7689. doi: 10.1038/s41598-018-25990-9.

SAGINALA, Kalyan *et al.* - Epidemiology of Bladder Cancer. **Medical Sciences**. ISSN 2076-3271. 8:1 (2020) 15. doi: 10.3390/medsci8010015.

SANLI, Oner *et al.* - Bladder cancer. **Nature Reviews Disease Primers**. ISSN 2056-676X. 3:1 (2017) 17022. doi: 10.1038/nrdp.2017.22.

SATO, Yusuke *et al.* - Effect of Plasma-Activated Lactated Ringer’s Solution on Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Annals of Surgical Oncology**. ISSN 1068-9265. 25:1 (2018) 299–307. doi: 10.1245/s10434-017-6239-y.

SCÉLO, Ghislaine; BRENNAN, Paul - The epidemiology of bladder and kidney cancer. **Nature Clinical Practice Urology**. ISSN 1743-4270. 4:4 (2007) 205–217. doi: 10.1038/ncpuro0760.

SCHNEIDER, Christin *et al.* - Cold atmospheric plasma causes a calcium influx in melanoma cells triggering CAP-induced senescence. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 8:1 (2018) 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-28443-5.

SEMMLER, Marie Luise *et al.* - Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. **Cancers**. ISSN 2072-6694. 12:2 (2020) 269. doi: 10.3390/cancers12020269.

SHAW, Priyanka *et al.* - Cold atmospheric plasma increases temozolomide sensitivity of three-dimensional glioblastoma spheroids via oxidative stress-mediated dna damage. **Cancers**. ISSN 20726694. 13:8 (2021). doi: 10.3390/cancers13081780.

SHI, Lei *et al.* - Gene expression profiling and functional analysis reveals that p53 pathway-related gene expression is highly activated in cancer cells treated by cold atmospheric plasma-activated medium. **PeerJ**. ISSN 2167-8359. 5:8 (2017) e3751. doi: 10.7717/peerj.3751.

SHIVE, Matthew S.; HASAN, Sakeena M.; ANDERSON, James M. - Shear stress effects on bacterial adhesion, leukocyte adhesion, and leukocyte oxidative capacity on a polyetherurethane. **Journal of Biomedical Materials Research**. ISSN 00219304. 46:4 (1999) 511–519. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<511::AID-JBM9>3.0.CO;2-M.

SILVA-TEIXEIRA, Rafael *et al.* - Plasma activated media and direct exposition can selectively ablate retinoblastoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**. ISSN 18734596. 171:May (2021) 302–313. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.027.

SILVA, Valdenizia R. *et al.* - *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) Rhizome Essential Oil Causes Cell Cycle Arrest in the G2/M Phase and Cell Death in HepG2 Cells and Inhibits the Development of Tumors in a Xenograft Model. **Molecules**. 25:2687 (2020).

SMOLKOVÁ, Barbora *et al.* - Non-Thermal Plasma, as a New Physicochemical Source, to Induce Redox Imbalance and Subsequent Cell Death in Liver Cancer Cell Lines. **Cellular Physiology and Biochemistry**. ISSN 10158987. 52:1 (2019) 119–140. doi: 10.33594/000000009.

STEINBERG, Ryan L.; THOMAS, Lewis J.; NEPPLE, Kenneth G. - Intravesical and alternative bladder-preservation therapies in the management of non-muscle-invasive bladder cancer unresponsive to bacillus Calmette-Guérin. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. ISSN 18732496. 34:6 (2016) 279–289. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.12.004.

TANAKA, Hiromasa *et al.* - Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 36282. doi: 10.1038/srep36282.

TAVARES-DA-SILVA, Edgar *et al.* - Cold Atmospheric Plasma, a Novel Approach

against Bladder Cancer, with Higher Sensitivity for the High-Grade Cell Line. **Biology**. ISSN 2079-7737. 10:1 (2021) 41. doi: 10.3390/biology10010041.

TEIXEIRA, Rafael Eduardo Da Silva - **Targeting cancer with cold atmospheric plasma** [Em linha]. [S.l.] : Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2017 Disponível em WWW:<URL:http://hdl.handle.net/10316/82236>.

TENDERO, Claire *et al.* - Atmospheric pressure plasmas: A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. ISSN 05848547. 61:1 (2006) 2–30. doi: 10.1016/j.sab.2005.10.003.

THOMAS, Douglas D. - Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. **Redox Biology**. ISSN 22132317. 5:2015) 225–233. doi: 10.1016/j.redox.2015.05.002.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn; ALEXANDRE, Jerome; HUANG, Peng - Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms : a radical therapeutic approach ? **Nature Publishing Group**. ISSN 1474-1776. 8:7 (2009) 579–591. doi: 10.1038/nrd2803.

UTSUMI, Fumi *et al.* - Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non- Thermal plasma- Activated medium. **Oncology Reports**. . ISSN 17912431. 35:6 (2016) 3169–3177. doi: 10.3892/or.2016.4726.

VALKO, Marian *et al.* - Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. ISSN 13572725. 39:1 (2007) 44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

VERMES, István *et al.* - A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**. ISSN 00221759. 184:1 (1995) 39–51. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-I.

VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim - Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**. . ISSN 1754-2189. 1:3 (2006) 1112–1116. doi: 10.1038/nprot.2006.179.

VIRARD, François *et al.* - Cold atmospheric plasma induces a predominantly necrotic cell death via the microenvironment. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 10:8 (2015) 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0133120.

WANG, Liyun *et al.* - The inhibition effect of cold atmospheric plasma-activated media in cutaneous squamous carcinoma cells. **Future Oncology**. ISSN 1479-6694. 15:5 (2019) 495–505. doi: 10.2217/fon-2018-0419.

WANG, Peiyu *et al.* - Epithelial-to-mesenchymal transition enhances cancer cell sensitivity to cytotoxic effects of cold atmospheric plasmas in breast and bladder cancer systems. **Cancers**. ISSN 20726694. 13:12 (2021). doi: 10.3390/cancers13122889.

WAROWICKA, Alicja *et al.* - Alternations in mitochondrial genome in carcinogenesis of HPV positive cervix. **Experimental and Molecular Pathology**. ISSN 10960945. 117:June (2020) 104530. doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104530.

WOJTALA, Aleksandra *et al.* - Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. Em **Methods in Enzymology** [Em linha]. 1. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2014 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3>. ISBN 9780124166189v. 542. p. 243–262.

XU, Dehui *et al.* - In Situ OH Generation from O₂⁻ and H₂O₂ Plays a Critical Role in Plasma-Induced Cell Death. **PLOS ONE**. ISSN 1932-6203. 10:6 (2015) e0128205. doi: 10.1371/journal.pone.0128205.

YAN, Dayun *et al.* - Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. **Applied Physics Letters**. ISSN 0003-6951. 105:22 (2014) 224101. doi: 10.1063/1.4902875.

YAN, Dayun *et al.* - Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review). **Biointerphases**. ISSN 1934-8630. 10:4 (2015) 040801. doi: 10.1116/1.4938020.

YAN, Dayun *et al.* - Stabilizing the cold plasma-stimulated medium by regulating medium's composition. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 26016. doi: 10.1038/srep26016.

YAN, Dayun *et al.* - The Cell Activation Phenomena in the Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 8:1 (2018) 15418. doi: 10.1038/s41598-018-33914-w.

YAN, Dayun; SHERMAN, Jonathan H.; KEIDAR, Michael - Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. **Oncotarget**. ISSN 1949-2553. 8:9 (2017) 15977–15995. doi: 10.18632/oncotarget.13304.

YAO, Jincheng *et al.* - Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. ISSN 09186158. 31:4 (2008) 592–597. doi: 10.1248/bpb.31.592.

YOON, YONGDAE *et al.* - Cold Atmospheric Plasma Induces HMGB1 Expression in Cancer Cells. **Anticancer Research**. ISSN 0250-7005. 39:5 (2019) 2405–2413. doi: 10.21873/anticancer.13358.

YOSHIKAWA, Nobuhisa *et al.* - Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 10:1 (2020) 1614. doi: 10.1038/s41598-020-58667-3.

ZHANG, Hao *et al.* - The antitumor effects of plasma-activated saline on muscle-invasive bladder cancer cells in vitro and in vivo demonstrate its feasibility as a potential therapeutic approach. **Cancers**. ISSN 20726694. 13:5 (2021) 1–14. doi: 10.3390/cancers13051042.

ZHOU, Renwu *et al.* - Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxyxynitrite. **Green Chemistry**. ISSN 1463-9262. 20:23 (2018) 5276–5284. doi: 10.1039/C8GC02800A.

ZHOU, Zhongbao *et al.* - Meta-analysis of efficacy and safety of continuous saline

bladder irrigation compared with intravesical chemotherapy after transurethral resection of bladder tumors. **World Journal of Urology**. ISSN 0724-4983. 37:6 (2019) 1075–1084. doi: 10.1007/s00345-019-02628-7.

ZUCKER, Shoshanna N. *et al.* - Preferential induction of apoptotic cell death in melanoma cells as compared with normal keratinocytes using a non-thermal plasma torch. **Cancer Biology & Therapy**. ISSN 1538-4047. 13:13 (2012) 1299–1306. doi: 10.4161/cbt.21787.

Anexo I



FMUC. FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Refª 008-CE-2018

Data 26/2/2018

C/conhecimento ao aluno

Exmo. Senhor

Presidente do Conselho Científico da FMUC

Assunto: Projeto de Investigação no âmbito do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde (refª CE-008/2018)

Candidato(a): Edgar Miguel Calvo Loureiro Tavares da Silva

Título do Projeto: *"Terapêuticas baseadas em plasma frio atmosférico para o carcinoma da bexiga"*.

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projeto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve:

"Parecer favorável não se excluindo, no entanto, a necessidade de submissão à Comissão de Ética, caso exista, da(s) Instituição(ões) onde será realizado o Projeto".

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos,

O Presidente,

Prof. Doutor João Manuel Pedroso de Lima

HC

SERVÍCIOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG • COMISSÃO DE ÉTICA

Pólo das Ciências da Saúde • Unidade Central

Azinhaga de Santa Comba, Celar, 3000-354 COIMBRA • PORTUGAL

Tel.: +351 239 857 708 (Ext. 542708) | Fax: +351 239 823 236

E-mail: comissaetica@fmed.uc.pt | www.fmed.uc.pt