

III. Material e Métodos

Nas últimas décadas tem-se assistido a um interesse por parte da comunidade científica na aplicação da terapia fotodinâmica com acção terapêutica na doença oncológica. Entre os fotossensibilizadores actualmente em uso clínico, o temoporfin ou mTHPC, considerado de segunda geração é o mais bem sucedido. No entanto, este composto é muito diferente das porfirinas naturais, o que pode constituir um obstáculo à sua eliminação. As tetraarilporfirinas são compostos muito estudados nos quais é fácil introduzir substituintes que determinem e adaptem o carácter lipofílico/hidrofílico da molécula, assim como outras características fotoquímicas e fotofísicas.

As diarilporfirinas, com substituintes apenas em duas posições metilénicas, podem mostrar-se vantajosas, quer por possibilitarem uma melhor eliminação pelo organismo, quer por permitirem potencialmente uma melhor captação celular devido a serem moléculas menos volumosas e terem menor peso molecular.

Estudos recentes mostraram que a introdução de halogéneos nestas estruturas, designada por efeito do átomo pesado, aumenta a sua capacidade de produção de oxigénio singlete, ampliando a citotóxicidade destes compostos.

Tendo sido um dos objectivos deste trabalho a comparação do efeito citotóxico de uma tetraarilporfirina halogenada com bromo e sua diarilporfirina correspondente, a 5,10,15,20-*tetrakis*(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina e a 5,15-*bis*(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina, respectivamente, começou-se por sintetizar os compostos. Para tal tivemos a inestimável colaboração do Grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Após a síntese pretendeu-se estudar o efeito citotóxico numa linha celular humana de adenocarcinoma colo-rectal, aprofundando o seu efeito directo ao nível da viabilidade celular e indirecto ao nível de stress oxidativo. Para concretização dos objectivos estipulados, procedeu-se à realização dos estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*

descritos de seguida.

1. Estudos de química

Antes da sua utilização os solventes foram purificados recorrendo a métodos padrão. O diclorometano foi seco sobre CaH_2 e destilado. O clorofórmio foi neutralizado com alumina activa neutra. O pirrol foi destilado antes de ser utilizado. Para a cromatografia em coluna foi utilizada sílica-gel 60 (0,035=0,070mm) da Fluka. O 3-hidroxibenzaldeído (Sigma-Aldrich) foi recristalizado em água. O 2-bromo-5-hidroxibenzaldeído foi preparado através da bromação em ácido acético, tal como descrito (Beja *et al.*, 2000). O 9,10-dimetilantraceno (DMA; Sigma-Aldrich) foi utilizado sem purificação adicional.

1.1. Síntese de 5,10,15,20-tetrakis(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina (TBr4HPP)

A 500ml de diclorometano, sob atmosfera de azoto, adicionou-se 1,0g de 2-bromo-5-hidroxibenzaldeído (5,0mmol) e 0,34ml de pirrol (5,9mmol). Posteriormente, adicionou-se uma gota de etanol, seguida de 10 μl de trifluoroeterato de boro. Deixou-se a reagir durante a noite. Parou-se reacção pela adição de 0,025 ml de trietilamina. Adicionaram-se cerca de 60ml de ácido acético e 2ml de peróxido de hidrogénio (30%), e concentrou-se a solução até se atingir um volume de 150 a 200ml sob vácuo. Em seguida, a solução manteve-se a 40°C, durante 0,5 a 1 hora sob agitação até oxidação completa. O ácido acético foi extraído cuidadosamente com água, e a solução

orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido, e o resíduo foi submetido a análise cromatográfica em sílica-gel com diclorometano/acetato de etilo (2:1) e 2% de trietilamina como fase móvel. Obtiveram-se 120mg de 5,10,15,20-*tetrakis*(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina 10%, que foi recristalizada em acetato de etilo/hexano dando origem a cristais roxos.

1.2. Síntese de 5,15-*bis*(2-bromo-3-hydroxyfenil)porfirina (BBr2HPP)

Num balão de fundo redondo de 1ℓ com 650ml de diclorometano, adicionou-se 50mg de dipirrimetano (3,4mmol) e 82mg de 2-bromo-5-hidroxibenzaldeído (4,1mmol). Agitou-se a solução durante 20 minutos, à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto, sendo adicionado posteriormente 0,26ml de ácido trifluoracético 3,5mmol. A mistura foi deixada em repouso durante a noite para maximizar o rendimento da reacção. Posteriormente, foi neutralizada com trietilamina, sendo depois adicionado 1,17g DDQ (5,1mmol). Após duas horas, evaporou-se a solução até secar e a porfirina foi purificada por cromatografia de flash seca (CH₂Cl₂/AcOEt, 9/1). Obtiveram-se 240mg de um sólido violeta (11%).

1.3. Análise dos compostos sintetizados

Após estes procedimentos, os sensibilizadores sintetizados foram caracterizados de modo a estabelecer a sua estrutura química e algumas das suas propriedades fotoquímicas.

A determinação quantitativa dos elementos carbono, hidrogénio e nitrogénio foi efectuada por análise elementar num analisador Finsons Instruments EA-1108 CHNS-O.

Os espectros de ressonância magnética nuclear protónica (RMN ^1H) foram obtidos recorrendo a espectrómetro Bruker AMX de 300MHz e um Bruker Advance II de 400MHz. O padrão interno utilizado foi o tetrametilsilano (TMS).

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro Thermo-Finnigan LCQ Advantage com ionização por electrospray (ESI), em que a solução da amostra é injectada directamente no aparelho.

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram registados num espectrofotómetro Hitachi U-2001 e num Shimadzu UV-2100.

Os espectros de fluorescência foram obtidos num espectrofotómetro Spex Fluorolog 3.

1.4. Medição do rendimento quântico de oxigénio singleto

Utilizou-se a foto-oxidação do DMA para determinar o rendimento quântico da formação de oxigénio singleto dos sensibilizadores, utilizando a fotólise no estado estacionário. Um mililitro de solução de DMA, $1 \times 10^{-4}\text{M}$, e 2ml de solução sensibilizadores com absorvância igual a 417nm foram misturados numa célula de quartzo com um caminho de 1cm. A amostra foi saturada em ar e mantida sob agitação magnética, de forma a obter irradiação uniforme em toda a amostra. A irradiação foi realizada recorrendo a uma lâmpada de halogéneo de 50 watts, a radiação infravermelha foi filtrada recorrendo a um filtro de água de 5cm, e filtros de comprimentos de onda

adequados (400 a 600nm) foram seleccionados para filtrar a radiação visível. Os espectros de absorção de DMA e da solução de sensibilizador correspondem à sobreposição dos espectros dos componentes em separado. A foto-oxidação do DMA foi acompanhada pela diminuição da absorvância a 375nm em etanol. Todas as soluções foram utilizadas imediatamente após a preparação.

Os rendimentos quânticos do oxigénio singlete para os sensibilizadores foram obtidos através da relação entre os declives da região linear do gráfico semi-logarítmico para o decaimento da absorção do DMA ($\ln A_0/A$) *versus* tempo, obtido através dos mínimos quadrados quando medidos através dos de soluções sensibilizadoras e soluções referência em condições semelhantes. Os desvios padrão dos dados de cinética, utilizando diferentes amostras preparadas foi inferior a 10%.

2. Estudos *in vitro*

Após a síntese de ambos os sensibilizadores e para de testar o seu potencial como agentes citostáticos foram realizados os estudos *in vitro*.

2.1. Culturas Celulares

Com o objectivo de estudar os efeitos citotóxicos e o comportamento dos sensibilizadores nesta linha celular realizaram-se estudos de captação, de microscopia de fluorescência e de citotoxicidade.

A linha celular utilizada neste trabalho foi uma linha de adenocarcinoma colo-rectal

designada WiDr obtida na *American Type Culture Collection* (CCL-218, ATCC). Após recepção, a linha celular foi descongelada e propagada em cultura aderente de acordo com as recomendações do fornecedor. Assim, para todos os estudos a linha celular foi mantida a 37°C numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora HeraCell 150. Utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco 2010-09), 100µM de piruvato de sódio (Gibco – 11360), e 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 10µg/ml estreptomicina; GIBCO 15140-122).

Para a realização dos estudos *in vitro* foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para isso, as culturas celulares foram incubadas com 2ml de uma solução tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante cinco minutos a 37°C para que ocorra a separação celular. De seguida, para inactivar a tripsina, adicionaram-se 5ml de meio de cultura e centrifugou-se a suspensão celular a 200g durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7cm). Após a centrifugação, os *pellets* foram ressuspensos num volume conhecido de meio de cultura. Procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular corada com azul de tripano, em câmara de *neubauer*, num microscópio com ampliação de 100 vezes. Após a contagem o volume das suspensões celulares foi ajustado com meio de cultura de forma a obter a concentração celular pretendida para cada estudo.

Para todos os estudos preparam-se soluções dos sensibilizadores que consistiram em 1mg/ml de cada composto molecular numa mistura ternária de água, polietilenoglicol 400 (PEG₄₀₀) e etanol (50:30:20, v/v/v) sendo obtidas as concentrações desejadas por diluições sucessivas.

2.2 Estudos de Captação

Para a realização dos estudos de captação incubaram-se, em placas de 6 poços (Sarstedt 83.1839), 1×10^5 células por poço, com $0.5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{M}$ das soluções de sensibilizador na durante 24 horas. Após a incubação, as células destacadas por acção de tripsina foram lavadas com PBS a 4°C . Para garantir a completa degradação e ruptura das células, adicionaram-se 5ml de metanol e a solução foi colocada no escuro, a 4°C , durante 24 horas. A intensidade de fluorescência do sobrenadante foi determinada por espectroscopia de fluorescência recorrendo a um espectómetro SPEX fluoromax 322-2, utilizando um comprimento de onda de excitação de 410nm . A concentração intracelular foi determinada recorrendo a uma curva de calibração obtida a partir da intensidade de fluorescência de soluções de metanol para cada sensibilizador.

2.3. Localização Subcelular

Para a localização subcelular dos compostos realizaram-se estudos de microscopia de fluorescência. Para a preparação das lâminas utilizaram-se placas de 6 poços estéreis (Sarstedt 83.1839), nas quais se introduziu uma lamela previamente autoclavada em cada poço. Preparou-se uma suspensão celular que se distribuiu pelas placas preparadas anteriormente e incubou-se durante a noite, de forma a permitir a adesão das células às lamelas. Incubaram-se as culturas celulares durante 24 horas com os compostos estudados numa concentração de $5 \mu\text{M}$. Posteriormente, as lamelas foram lavadas duas vezes com PBS a 37°C e incubadas com 200nM de uma sonda mitocondrial fluorescente, MitoTracker *Green* FM durante 30 minutos, no escuro, a 37°C . A sonda

molecular MitoTracker *Green* FM é um corante selectivo da mitocôndria que cora a mitocôndria de verde brilhante ao acumular-se no ambiente lipídico mitocondrial. Por ser praticamente não fluorescente em solução aquosa, o *background* é muito reduzido. Após a incubação com esta sonda, efectuaram-se duas lavagens com PBS a 4°C. Fixaram-se as células com uma solução metanol/acetona (1:1) gelada durante 10 minutos no escuro e procedeu-se a duas lavagens com PBS a 4°C. De seguida incubaram-se as lamelas em 5µg/ml de Hoechst 33252 (Sigma B1155) em PBS durante 10 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Seguiram-se duas lavagens com PBS a 4°C. As lamelas foram colocadas sobre lâminas, utilizando o meio de montagem Dako *Glycergel* (Dako C0563) e aguardou-se cerca de 2 horas para que o meio de montagem secasse. As lâminas foram seladas com verniz.

As observações foram realizadas num microscópio Motic AE31 equipado com sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II com lâmpada halogénea de mercúrio de 100 watts. Para a observação da fluorescência emitida pelo sensibilizador e pelos corantes utilizaram-se diferentes combinações de filtros. Para observação dos sensibilizadores utilizou-se filtro de excitação 540±25nm, *beam splitter* de 565nm e filtro de emissão de 605±55nm. Para observação do MitoTracker *Green* FM utilizou-se filtro de excitação 480±30nm, *beam splitter* de 505nm e filtro de emissão de 535±40nm. Para a observação do Hoechst 33252 utilizou-se filtro de excitação 540±25 nm, *beam splitter* de 565 nm e filtro de emissão de 605±55nm. As imagens foram adquiridas em câmara Moticam 5000 *Cooled* acoplada a computador com o software Motic Images Advanced 3.2.

2.4 Estudos de Citotoxicidade

Para estudar a citotoxicidade dos sensibilizadores sintetizados na linha celular de adenocarcinoma colo-rectal foram realizados diferentes estudos. Após a realização do tratamento fotodinâmico, em células incubadas com diferentes concentrações dos sensibilizadores, foram avaliados diferentes parâmetros utilizando várias técnicas, a espectrofotometria, para proliferação celular, através do ensaio do MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide*), e a citometria de fluxo para avaliação da viabilidade celular e stresse oxidativo através da análise da formação de espécies reactivas de oxigénio e da alteração do potencial mitocondrial.

A irradiação para o tratamento fotodinâmico foi realizada recorrendo a uma fonte de luz fluorescente equipada com um filtro vermelho ($\lambda_{\text{cut off}} < 560\text{nm}$). A energia da luz foi medida com um radiómetro X97 da Gigahertz-Optic.

2.4.1 Avaliação da Proliferação Celular pelo ensaio do MTT

Para avaliar o efeito dos sensibilizadores na proliferação das células WiDr, foi realizado o ensaio do MTT. Este composto é reduzido por células metabolicamente activas devido à acção das enzimas desidrogenases, principalmente através da acção do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a succinato desidrogenase ou succinato-coenzima Q redutase. Assim, este método constitui uma forma de avaliar a função mitocondrial (Lodish *et al.*, 2000). As desidrogenases têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de formazan de cor azul escura que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos.

Desta forma, a quantidade de cristais de formazan obtidos é directamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Para a realização deste estudo foi preparada uma suspensão celular com 40.000 células/*ml* em meio de cultura que se distribuiu em placas de 48 poços (CLS3548, Corning Costar Corp, Cambridge, MA), contendo cada poço um volume final de 600 μ l. Estas placas foram incubadas durante a noite de forma a permitir a adesão das células às mesmas.

Os sensibilizadores foram administrados de modo a obter as seguintes concentrações: 50nM, 250nM, 500nM, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, para as quais se prepararam diversas soluções com uma concentração tal que permitiu administrar sempre o volume de 6 μ l em todas as condições. Em todos os ensaios foram realizados dois controlos: culturas não tratadas e culturas em que se administraram 6 μ l do veículo de administração dos sensibilizadores, neste caso H₂O/PEG₄₀₀/EtOH (50/30/20, v/v/v). Após 24 horas de incubação as culturas foram irradiadas com um fluxo de 7,5mW/cm² até atingir um total de 10J. A análise da proliferação celular foi realizada 24, 48 e 72 horas após a irradiação.

Com o objectivo de verificar a citotoxicidade dos sensibilizadores no escuro, ou seja, sem a activação pela luz, foram preparadas culturas celulares tal como descrito anteriormente, tendo sido realizada a análise da proliferação celular 24, 48 e 72 horas após a administração dos sensibilizadores, sem qualquer irradiação prévia.

Para a avaliação da proliferação celular o meio das culturas celulares foi aspirado e procedeu-se a uma lavagem para a qual se adicionaram 500 μ l de tampão fosfato salino (PBS) a cada poço. Posteriormente, em cada poço, colocaram-se 150 μ l de uma solução de MTT (0,5mg/*ml*; Sigma M2128) em PBS, pH 7,4, e incubou-se no escuro a 37°C durante 4 horas. De forma a solubilizar os cristais de formazan formados acrescentou-se

a cada poço $150\mu\ell$ de uma solução 0,04M de ácido clorídrico em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação durante 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi posteriormente homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços (Sarstedt 83.1835), e a absorvância foi quantificada a 570nm com um filtro de referência de 620nm, usando o espectrofotômetro ELISA (SLT-Spectra). A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de inibição nas culturas submetidas ao tratamento fotodinâmico correlacionada com as culturas tratadas apenas com o veículo de administração dos sensibilizadores. Este procedimento permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar a concentração dos sensibilizadores que inibe a proliferação das culturas em 50% (IC50). Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro 8.0.

2.4.2. Avaliação da Proliferação Celular pelo ensaio do MTT em Células Normais

Com o objectivo de verificar se existem diferenças na resposta ao tratamento fotodinâmico com os sensibilizadores sintetizados entre as células tumorais de adenocarcinoma colo-rectal e células não tumorais realizou-se a avaliação da proliferação celular recorrendo ao ensaio do MTT numa linha celular humana não tumoral.

Utilizou-se uma linha celular de fibroblastos da pele, HFF1, adquirida à ATCC. Esta linha celular foi recebida, descongelada e cultivada em cultura aderente de acordo com as recomendações do fornecedor. A linha celular foi mantida a 37°C numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora HeraCell 150. Utilizou-se meio de cultura DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal,

100 μ M de piruvato de sódio, e 1% de antibiótico (100U/ml de penicilina e 10 μ g/ml estreptomicina).

Para a realização dos estudos de citotoxicidade, as células foram incubadas em placas de 48 poços com os fotossensibilizadores de acordo com o mesmo procedimento já descrito. O ensaio do MTT foi realizado de acordo com a metodologia referida anteriormente.

2.4.3. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Este método permite analisar simultaneamente, e num curto período de tempo, múltiplas características físicas e químicas de células em suspensão através de um aparelho de detecção óptico-electrónico. Neste aparelho, um feixe de luz de um único comprimento de onda é direccionado para um meio líquido em fluxo. Vários detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz; um na linha do feixe de luz (*forward scatter*, FCS) e vários perpendiculares a este (*side scatter*, SSC), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma específica e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, por análise das flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. A

FSC correlaciona-se com o volume celular e a SSC depende da complexidade interna da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana).

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para avaliar o efeito dos sensibilizadores estudados ao nível da morte celular e do stress oxidativo. Assim foram determinados e caracterizados os níveis de morte celular através da dupla marcação com a anexina V (AnV) ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com iodeto de propídeo (IP); a alteração do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada através do 1st *J-aggregate-forming cationic* (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine, JC-1); e, a determinação da presença intracelular de ROS através do 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH2-DA) e do dihidroetídio (DHE).

Para a realização dos estudos de citometria de fluxo as culturas celulares foram preparadas à semelhança do descrito para a avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT. Resumidamente, as culturas celulares foram incubadas durante 24 horas com os sensibilizadores nas seguintes concentrações: 150nM e 1µM de BBr2HPP e 250nM e 1µM de TBr4Hpp, escolhidas com base nos resultados preliminares de avaliação da proliferação pelo ensaio do MTT. Realizaram-se controlos em todos os ensaios. Após 24 horas de incubação as culturas foram irradiadas com um total de 10J. Os estudos de citometria de fluxo foram realizada 24, 48 e 72 horas após a irradiação.

Para todas as marcações foram necessárias aproximadamente 10⁶ células. O número de eventos obtidos através do programa CellQuestTM, correspondente ao número de células, foi de 10⁴. Para a análise e quantificação da informação utilizou-se um software específico que corre em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

2.4.3.1 Avaliação da Viabilidade Celular

Para a análise da morte celular foram utilizados dois fluorocromos diferentes, a An-V e o IP, que permitem quantificar a viabilidade celular distinguindo os diferentes tipos de morte celular, a necrose e a apoptose. A An-V permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois este fluorocromo liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. De forma complementar, o IP é um corante que se intercala no DNA das células, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou necrose.

Desta forma, recorrendo à dupla marcação com An-V/IP é possível distinguir quatro grupos de células: o grupo I, a que correspondem as células vivas; o grupo II, que engloba as células que se encontram em apoptose inicial; o grupo III, que associa as células que se encontram em apoptose tardia/necrose; e o grupo IV, que contém as células que se encontram em necrose. Deste modo, as células pertencentes ao grupo I, isto é, as células vivas, apresentam-se negativas tanto para a marcação com An-V como para a marcação com IP. As células incluídas no grupo II, em apoptose inicial, apresentam-se positivas para a marcação com An-V e negativas para a marcação com o IP. As células que se apresentam positivas para as duas marcações, significa que se encontram em apoptose tardia/necrose, pelo que compõem o grupo III, enquanto as células que se encontram em necrose e constituem o grupo IV apresentam-se negativas para a marcação com An-V e positivas para a marcação com o IP, de acordo com a tabela II.

Tabela II. Padrões de marcação com An-/IP para os diferentes grupos de células

Grupos	Anexina V	Iodeto de propídeo
Grupo I		
Células vivas	-	-
Grupo II		
Células em apoptose inicial	+	-
Grupo III		
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Grupo IV		
Células em necrose	-	+

Para marcação com An-V/IP, utilizaram-se 10^6 células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 300g durante 5 minutos. De seguida, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* uma vez com FacsFlow® (BD Biosciences). Posteriormente, o *pellet* foi incubado com $100\mu\ell$ de tampão de ligação (KIT Immunotech), $1\mu\ell$ de An-V-FITC (KIT Immunotech) e $5\mu\ell$ de IP (KIT Immunotech), durante 15 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação, adicionaram-se $400\mu\ell$ de FacsFlow® e efectuou-se a análise no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525nm para a An-V-FITC e 640nm para o IP. Os resultados aparecem sob a forma de percentagem de células presentes em cada grupo.

2.4.3.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado usando uma sonda fluorescente, o JC-1. O potencial de membrana mitocondrial determina a captação

selectiva do JC-1 pela mitocôndria. O JC-1 é um catião lipofílico que existe em duas formas, monómeros (M) e agregados (A), consoante o estado de polarização/despolarização da membrana mitocondrial, emitindo fluorescência a comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana é elevado, forma agregados que emitem fluorescência vermelha (590 nm). Por sua vez, à medida que o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos em que a membrana se encontra despolarizada, o JC-1 é excluído da mitocôndria e mantém-se no citoplasma sob a forma de monómeros que emitem fluorescência verde (529 nm). Assim, a razão entre a fluorescência verde e vermelha (M/A), determinada por citometria de fluxo, fornece uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (Yao et al., 2008). Para este efeito, aproximadamente 10^6 células foram centrifugadas com PBS durante 5 minutos a 200g e posteriormente ressuspensas em 1ml do mesmo tampão. Seguidamente, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura de 37°C e ao abrigo da luz com $1\mu\text{l}$ de JC-1 (Molecular probes, Invitrogen), preparado em DMSO a 5mg/ml de modo a obter uma concentração final de 5mg/ml . Posteriormente, a suspensão foi novamente lavada com PBS e ressuspensa em $400\mu\text{l}$ do mesmo tampão. A detecção foi efectuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 488nm . Os resultados obtidos são expressos como MIF para os agregados e para os monómeros, tendo-se calculado posteriormente a razão M/A

2.4.3.3. Avaliação da produção intracelular de peróxidos

A expressão intracelular de peróxidos nas células submetidas a tratamento com as porfirinas foi determinada por citometria de fluxo através da oxidação intracelular da

sonda não fluorescente DCFH₂-DA. Este composto lipossolúvel entra nas células e acumula-se principalmente no citosol, onde é desacetilado por esterases intracelulares sob a forma de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este produto não fluorescente é oxidado na presença de peróxidos a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que é facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522nm quando excitada a 498nm (figura 9). A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio (Tarpey et al., 2004; Dikalov et al., 2007).

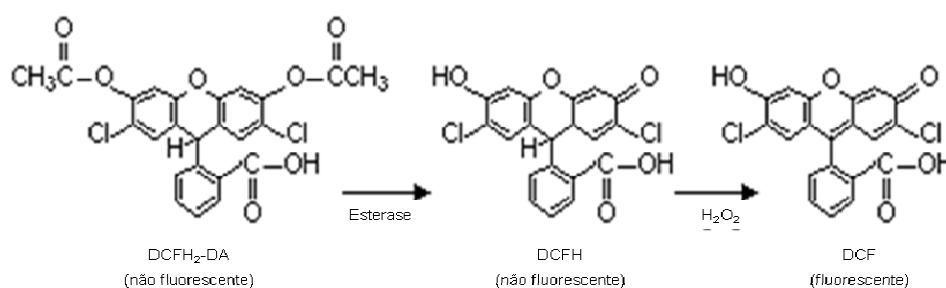


Figura 9. Detecção de peróxidos intracelulares. O 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) entra nas células e acumula-se principalmente no citosol, onde é desacetilado por esterases intracelulares a 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este produto é oxidado na presença de peróxidos a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que é visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522nm quando excitado a 498nm (adaptado de <http://media.wiley.com>)

Assim, para avaliação da produção de ROS, centrifugou-se uma suspensão celular com aproximadamente 10⁶ células a 200g durante 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se PBS para lavar. O sedimento foi ressuspensão em 100µl de PBS e foi incubado durante 45 minutos sem luz a 37°C com 5µl de DCFH₂-DA (Molecular probes, Invitrogen) dissolvido em dimetilformamida a 1mM de modo a obter a

concentração final de 5 μ M. A suspensão foi lavada com PBS por centrifugação a 3000g durante 5 minutos e ressuspensa em 400 μ l do mesmo. Posteriormente, foi feita a detecção por citometria de fluxo com uma excitação e emissão nos comprimentos de onda de 504 e 529nm, respectivamente. Os resultados obtidos foram analisados em termos da média das intensidades de fluorescência (MIF)

2.4.3.4 Avaliação da produção intracelular de radical superóxido

A avaliação da produção de radical superóxido foi efectuada por citometria de fluxo com recurso ao DHE. Este composto atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido a etídeo (figura 10), composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no DNA permanecendo no interior da célula. Esta reacção é relativamente específica para o radical superóxido com oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso (Zhao *et al.*, 2005). Utilizaram-se aproximadamente 10⁶ células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 200g durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado uma vez com PBS. De seguida, o sedimento foi ressuspenso em 1000 μ l de PBS, adicionou-se 5 μ l de DHE (Sigma) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mM, de modo a obter uma concentração final de 5 μ M. Incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente e sem luz. Após a incubação, a suspensão foi lavada com PBS por centrifugação a 300g durante 5 minutos e ressuspensa em 400 μ l do mesmo tampão. A detecção foi efectuada utilizando o comprimento de onda de excitação de 620nm.

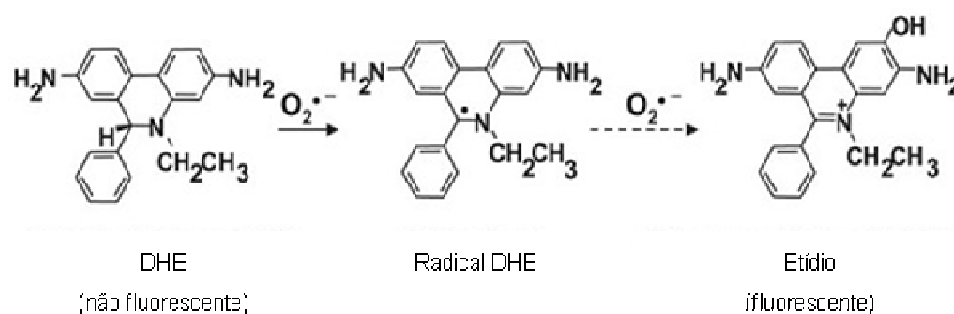


Figura 10. Detecção de radical superóxido intracelular. O DHE é convertido pelo radical superóxido a etídeo, um composto fluorescente que se intercala no DNA (adaptado de Robinson *et al.* 2006).

3. Estudos *in vivo*

Na continuidade dos estudos *in vitro*, e uma vez que os estudos *in vitro* são realizados num ambiente controlado, os resultados podem não corresponder aos obtidos num organismo vivo. Por este motivo, e sabendo que um tumor não é somente um conjunto de células tumorais mas sim um conjunto de células tumorais, células de suporte e as vias de drenagem vasculares associadas, é de extrema importância a realização de estudos *in vivo* para averiguar o potencial das porfirinas estudadas como agente citostático. Para tal, foram utilizados ratinhos *Balb/c* e *Balb/c nu/nu*. Esta estirpe foi escolhida tendo em conta que estes animais permitem o desenvolvimento de xenotransplantes uma vez que são animais atímicos e, portanto, deficientes em células T¹.

¹ As células-T pertencem a um grupo de linfócitos brancos do sangue. São os principais efectores da imunidade celular e são produzidos no timo a partir de precursores indiferenciados da medula óssea.

3.1 Desenvolvimento de Xenotransplantes

Para a realização deste trabalho, o modelo animal que escolhemos para os estudos *in vivo*, foi o xenotransplante em ratinhos *Balb/c nu/nu*, obtido através de injeção de 4×10^6 células da linha celular humana de adenocarcinoma colo-rectal WiDr na região dorsal.

A escolha desta zona, resultou de várias particularidades da mesma, que se traduzem em vantagens para o desenvolvimento dos xenotransplantes sendo uma boa área para expansão, por apresentar boa vascularização, permite o desenvolvimento rápido do xenotransplante e é uma zona na qual de monitorização bastante simples e acessível.

Após a administração das células os tumores foram monitorizados de modo a verificar o volume tumoral de acordo com a seguinte expressão:

$$V = \frac{L \times S^2}{2},$$

onde L corresponde ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor (Grosa *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004).

3.2 Tratamento Fotodinâmico

Quando se atingiu o volume tumoral de $300-500 \text{mm}^3$, os sensibilizadores foram administradas por via intraperitoneal numa dose de 2mg/Kg . Após a administração dos sensibilizadores os animais foram irradiados utilizando um dispositivo de luz laser com uma potência de $0,13 \text{ watts}$ durante 1500 segundos perfazendo um total de 180 joules .

Para a realização destes estudos os animais foram divididos em 3 grupos experimentais que diferiam no tempo no qual os animais foram irradiados, respectivamente 24, 48 e 72h, após a administração do sensibilizador. Para a irradiação os animais foram submetidos ao efeito de uma solução de anestesia de ketamina a 77% (Ketalar®, Porke-Davis) e cloropromazina a 23% (Largactil®, Laboratórios Vitoria).

A monitorização dos tumores realizou-se a cada 48 horas durante 12 dias. Avaliaram-se as dimensões do tumor de forma a calcular a variação de volume relativamente às dimensões iniciais, aquando da irradiação, segundo a fórmula

$$VTR = \frac{V_x}{V_0}$$

onde VTR representa o volume tumoral relativo, V_x representa o volume tumoral obtido em cada dia de avaliação ($x \in \{2;4;6;8;10;12\}$) e V_0 representa o volume tumoral obtido imediatamente antes da irradiação.

O grupo controlo consistiu em animais irradiados com as mesmas condições no entanto, sem administração dos sensibilizadores.

4. Estudos *ex vivo*

Após a realização dos estudos *in vivo* e atingidos os 12 dias de monitorização após a irradiação, os animais foram sacrificados com o objectivo de, a partir do isolamento das células tumorais, melhor caracterizar o ambiente tumoral.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e logo de seguida procedeu-se à excisão dos tumores. Cada tumor foi medido e fragmentado em duas partes, uma das quais foi utilizada para o isolamento das células e caracterização por citometria de fluxo, e a outra foi preservada em formol para posterior análise da

morfologia celular.

4.1 Isolamento das Células Tumorais

O tumor foi fragmentado e colocado numa solução com colagenase IV (Gibco 17104-019) em tampão HEPES (5mg/ml) a 37°C, e submetido a agitação suave durante 10 minutos permitindo a sua desagregação. O homogeneizado assim obtido, foi filtrado através de um filtro de 30µm, centrifugado a 50g à temperatura de 19°C e retirado o sobrenadante. O *pellet* obtido foi ressuspensado em 5ml de DMEM e centrifugado, tendo-se repetido este procedimento três vezes, com o objectivo de remover a colagenase IV. Após a última lavagem as células foram ressuspensas em 5ml de DMEM.

4.2 Citometria de Fluxo

As células obtidas no procedimento anterior foram analisadas recorrendo à citometria de fluxo, de acordo com a metodologia já referida anteriormente, no sentido de inferir acerca das alterações do microambiente tumoral causadas pelo efeito causado pelo sensibilizador. Assim, avaliou-se a viabilidade celular (marcação com An-V/IP), o potencial de membrana mitocondrial (JC1) e a presença intracelular de ROS (com recurso às sondas DCFH2-DA e DHE)

4.3 Análise Histológica

Para além da citometria de fluxo e como forma complementar de avaliação da citotoxicidade selectiva dos compostos realizou-se a avaliação da morfologia celular e determinação da classificação histológica através da microscopia óptica.

As amostras de tumor previamente conservadas em formol foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafaneizadas em xilol e embutidas em parafina. Realizou-se microtomia aleatória e preparação de lâminas que foram coradas com base na técnica de hematoxilina e eosina (H&E).

A observação microscópica foi realizada num microscópio Nikon ACT-1 equipado com câmara digital Nikon DMXM120F e computador dedicado com o software Nikon eclipse 80i.

5. Análise estatística

O tratamento estatístico foi efectuado recorrendo ao software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) Statistics versão 17.

Na análise estatística dos resultados de viabilidade celular, alteração do potencial de membrana mitocondrial e stresse oxidativo utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Na análise dos resultados do estudo prospectivo de terapia fotodinâmica *in vivo* recorreu-se à estimação de Kaplan Meier para a construção de curvas de sobrevivência. Foram considerados dois tratamentos, BBr2HPP e TBr4HPP, e 3 tempos de incubação, 24, 48 e 72 horas. Para cada combinação tratamento/tempo de incubação observaram-se

6 ratinhos, assim como para o grupo controlo. O volume do tumor foi medido nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12. Assim, o evento foi definido como a presença de volume tumoral inferior ao limite inferior do intervalo de confiança a 95% para a média dos volumes tumorais nos ratos do grupo controlo.

Para cada fármaco foram construídas quatro curvas de sobrevivência, uma para o grupo controlo e três relativas a cada um dos tempos de incubação. A comparação das quatro curvas de sobrevivência foi realizada em cada fármaco em separado através do teste de hipóteses de Wilcoxon para comparação de curvas de sobrevivência. O nível de significância aplicado a estes dois testes foi de 5%. Para cada curva de sobrevivência foram determinados os tempos medianos de sobrevivência.

Realizaram-se ainda todas as comparações múltiplas possíveis de cada dois grupos, sempre que foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as quatro curvas de sobrevivência. Também aqui se utilizou o teste Wilcoxon. O nível de significância para estes testes foi ajustado pelo método de Bonferroni e fixado em 0,8%.