

## **IV. Resultados**



Os métodos referidos no capítulo anterior, foram usados com o objectivo de desenvolver duas moléculas fotossensibilizadoras passíveis de serem utilizadas em terapia fotodinâmica para o cancro e avaliar a sua citotoxicidade e efeitos ao nível da produção de ROS, recorrendo a metodologias da biologia celular.

## 1. Estudos de química

### 1.1. Síntese de 5,10,15,20-*tetrakis*(2-bromo-3-hidroxifenil)porfirina (TBr4HPP) e de 5,15-*bis*(2-bromo-3-hydroxyfenil)porfirina (BBr2HPP)

Após a síntese química dos compostos, aplicaram-se os métodos descritos para a confirmação da estrutura e a avaliação das características físico-químicas dos mesmos. A estrutura química dos compostos sintetizados está representada na figura 11.

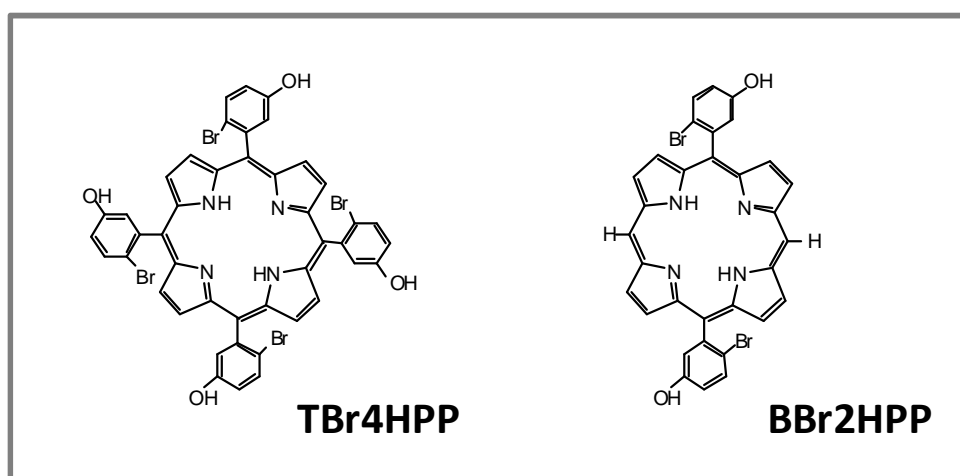


Figura 11: Estrutura química dos sensibilizadores obtidos.

### 1.1.1. TBr4HPP

Da análise elementar obteve-se o seguinte resultado:  $C_{44}H_{26}O_4Br_4N_4 \cdot H_2O$  (calculado: C, 52,2%; H, 2,79%; N, 5,53%; encontrado: C, 52,5%; H, 3,13%; N, 4,71%).

A ressonância magnética nuclear protónica realizada em metanol deuterado forneceu o seguinte resultado, RMN 1H (300 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$ : 4,63 (s, 4H, OH); 7,19-7,30 (m, 4H,  $H_{\text{fenil}}$ ); 7,55-7,72 (m, 4H,  $H_{\text{fenil}}$ ). Nesta expressão os valores que antecedem o parêntesis representam o desvio químico em partes por milhão (ppm), a primeira letra dentro do parêntesis representa a multiplicidade do sinal, que pode ser sob a forma de singuleto (s), duplete (d), tripleto (t) ou multiplete (m), a seguir apresenta-se a integração do sinal, isto é, o número de prótons a que corresponde e, finalmente, a atribuição do sinal.

A espectroscopia de massa revelou o seguinte espectro, ESI (MS):  $m/z=994$   $[(M+1)^+]$ . Na expressão, a massa 994 corresponde ao ião molecular menos 2 moléculas de HCl.

### 1.1.2. BBr2HPP

A análise elementar foi substituída por espectrometria de massa de alta resolução em que se obtém o valor da massa molecular do composto analisado:  $C_{32}H_{21}Br_2N_4O_2$  (M + H), 653,0054; encontrados, 652,99809.

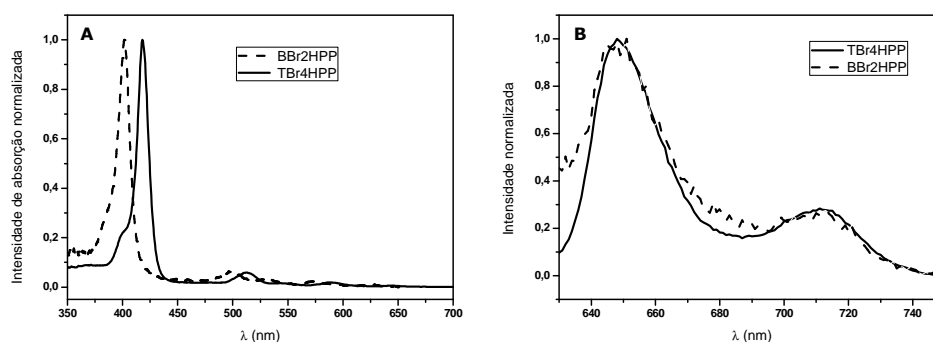
A ressonância magnética nuclear protónica realizada com DMSO como solvente, forneceu o seguinte resultado,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$ : 7,24 (2H, ArH), 7,70

(d,  $J \cong 3.03$  Hz, 2H, ArH), 7,87 (d,  $J \cong 8,7$  Hz, 2H, ArH), 8,95 (d,  $J \cong 4,6$  Hz, 4H, pirrol-H), 9,38 (d,  $J \cong 4,6$  Hz, 4H, pirrol-H) 10,29 (s. 2H, metileno bridge-H).

A espectroscopia de massa revelou o seguinte espectro: MS (ESI):  $m/z$  653 [(M + 1)<sup>+</sup>]. Na expressão, a massa 653 corresponde ao ião molecular.

## 1.2. Espectros de absorção e de emissão de fluorescência

O espectro de absorção das porfirinas em etanol mostra a típica banda Soret (B(0,0)) e as bandas Q destes compostos. Os máximos de absorção e os coeficientes de absorção dos sensibilizadores são apresentados na tabela III. As bandas de absorção da diarilporfirina BBr2HPP são deslocadas para o azul, em relação à tetraarilporfirina correspondente. A banda Q<sub>x</sub> (1-0) da porfirina 5,15-diarilsubstituída aparece em 630nm, em vez de 645nm como observado na tetraarilporfirina. Para concentrações entre  $1 \times 10^{-7}$  e  $1 \times 10^{-4}$  M não se observou nenhum desvio à lei de Beer-Lambert indicando que os sensibilizadores não formam agregados em condições experimentais.



**Figura 12: Espectros de absorção (A) e de emissão de fluorescência (B) de BBr2HPP e TBr4HPP.** Os valores máximos de absorção e de emissão de fluorescência foram normalizados a 1 utilizando o Software *Origin 8*. Os resultados expressam a média de três experiências independentes.

Os espectros de fluorescência apresentam duas bandas em cerca de 630 e 695 nm (figura 12). Os sensibilizadores apresentam um desvio de *Stokes* curto. Os rendimentos quânticos de fluorescência foram medidos utilizando a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) como referência seguindo o procedimento padrão (Pineiro *et al.*, 1998). O rendimento quântico de fluorescência de TPP em etanol medido foi 0,09 usando o rendimento quântico em tolueno (0,10) como referência (Parker, 1968) e a equação de Parker (Pineiro *et al.*, 1998), tendo em conta os diferentes índices de refração dos solventes. Os rendimentos quânticos de fluorescência dos sensibilizadores em etanol são apresentados na tabela III.

**Tabela III: Absorção, fluorescência, rendimento quântico de fluorescência e rendimento quântico de oxigénio singlete dos sensibilizadores.**

	Absorção, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm), $\epsilon$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )					Fluorescência, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)			
	B(0-0)	$Q_y(1-0)$	$Q_x(0-0)$	$Q_y(0-0)$	$Q_x(1-0)$	Q(0-0)	Q(0-1)	$\Phi_F$	$\Phi_\Delta$
<b>BBr2HPP</b>	402 $1,61 \times 10^5$	499 $1,13 \times 10^3$	529 $2,70 \times 10^3$	572 $3,57 \times 10^3$	627 $5,27 \times 10^2$	630	695	$0,002 \pm 0,00007$	$0,56 \pm 0,07$
<b>TBr4HPP</b>	416 $1,93 \times 10^5$	512 $1,24 \times 10^4$	540 $4,50 \times 10^3$	586 $4,98 \times 10^3$	646 $2,93 \times 10^3$	645	714	$0,10 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,03$

### 1.3. Rendimento quântico de oxigénio singlete

O rendimento quântico da formação de oxigénio singlete,  $\phi_\Delta$ , foi medido por fotólise no estado estacionário utilizando DMA como alvo. Este composto foi utilizado para calcular o rendimento quântico de formação de oxigénio singlete de diferentes porfirinas e compostos relacionados (referências). O DMA parece ser uma boa escolha,

pois reage selectivamente com  $O_2 (^1\Delta_g)$ , a reacção tem uma taxa constante elevada na água e em muitos solventes orgânicos, não apresentando diferenças de foto-degradação significativas. A observação da foto-oxidação do DMA sem a interferência da absorção do sensibilizador segue uma cinética de primeira ordem.

O sistema de fotólise no estado estacionário permitiu calcular o rendimento quântico de formação de oxigénio singlete para o rosa-de-bengala usando o azul-de-metileno como referência e DMA como alvo para o metanol. Obteve-se o valor de 0,82, os valores da literatura diferem entre 0,68 e 0,86.

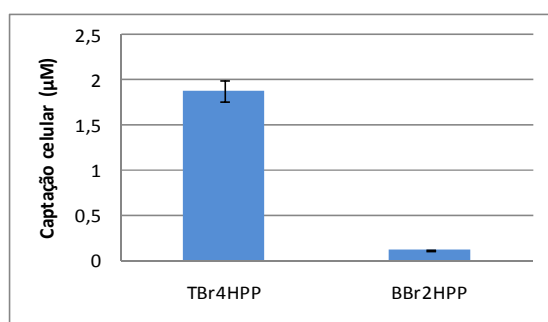
O rendimento quântico de formação de oxigénio singlete é apresentado na tabela III, não se verificando diferenças significativas entre os sensibilizadores estudados.

## 2. Estudos *in vitro*

Após a síntese e a análise química dos sensibilizadores iniciaram-se os estudos *in vitro*. Começou-se pelos estudos na linha celular humana de adenocarcinoma coloproctal, WiDr, com a qual se obtiveram as captações, localização subcelular, curvas de dose-resposta, os tipos de morte celular e os efeitos ao nível do stress oxidativo induzidos pelos sensibilizadores. Foi ainda possível comparar o efeito dos sensibilizadores ao nível da proliferação celular numa linha celular humana não tumoral de fibroblastos, HFF1.

## 2.1. Estudos de Captação

Os estudos de captação celular realizados com incubação dos sensibilizadores nas concentrações 0,5, 1 e 5 $\mu$ M mostraram que a captação celular é dependente da dose. A intensidade de fluorescência aumenta com o aumento da concentração dos sensibilizadores no período de incubação. Em culturas celulares submetidas a uma concentração de 5 $\mu$ M de sensibilizador verificou-se que a concentração intracelular dos sensibilizadores foi de  $1,88\pm 0,11\mu$ M para TBr4HPP e  $0,11\pm 0,01\mu$ M para BBr2HPP, como podemos ver na figura 13.



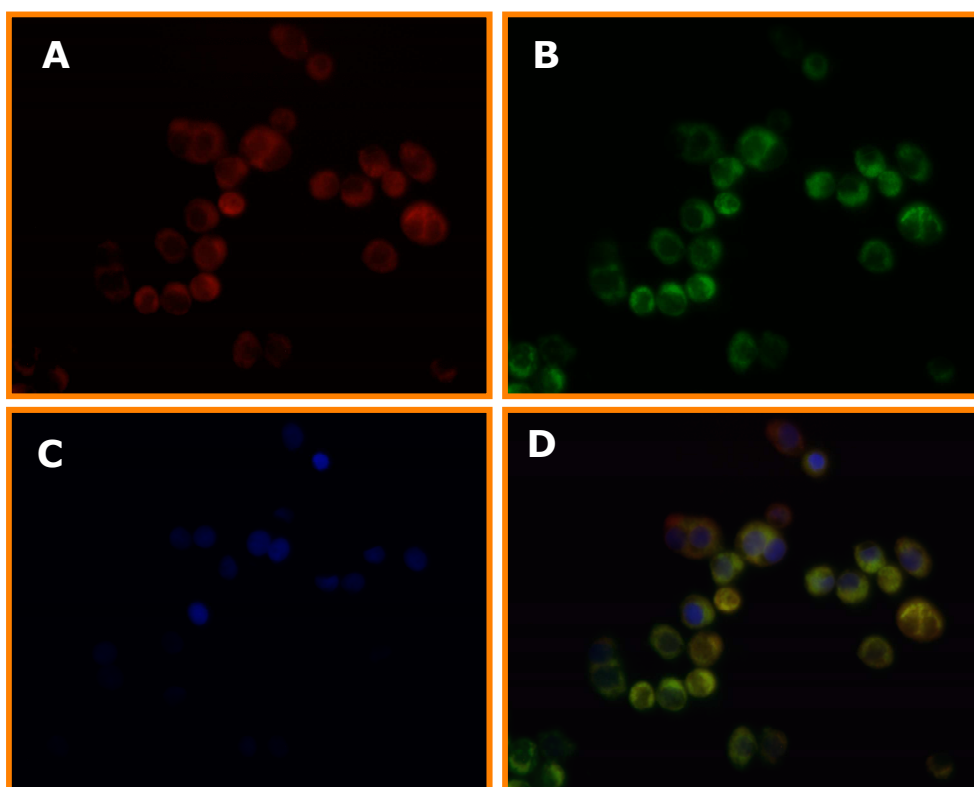
**Figura 13: Captação celular dos sensibilizadores nas células WiDR.** Resultados para incubação com 5 $\mu$ M. Os resultados expressam a média de três experiências independentes.

## 2.2. Localização Subcelular

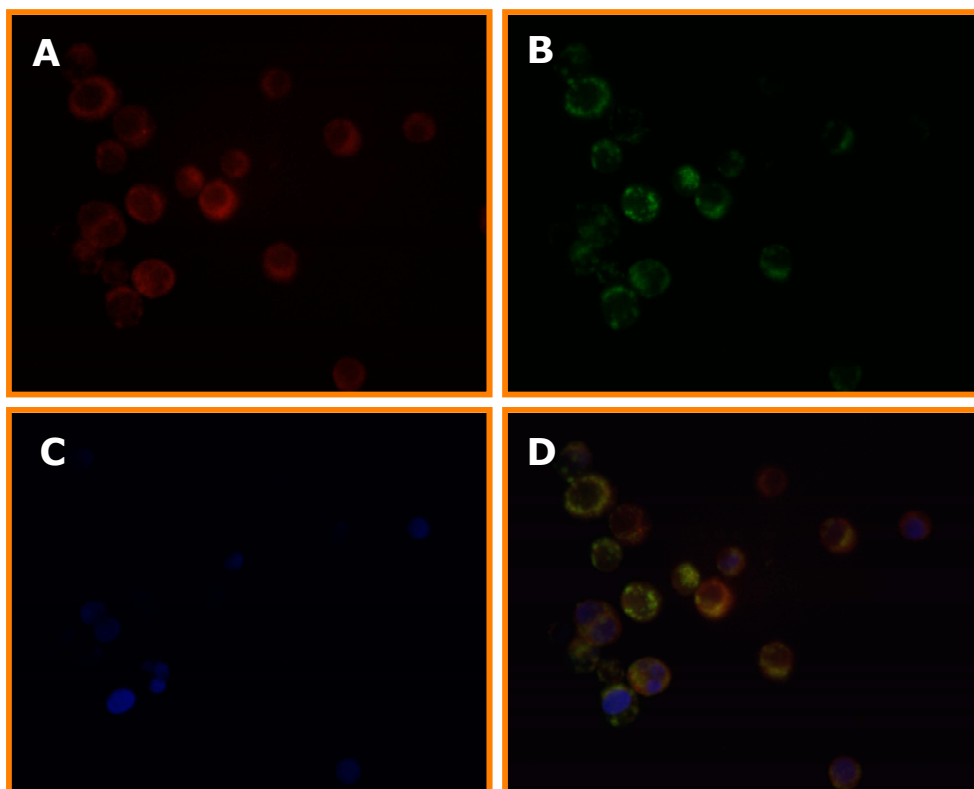
O padrão de localização de TBr4HPP, de BBr2HPP e da sonda mitocondrial MitoTracker *Green* FM na linha celular de adenocarcinoma colo-rectal WiDr foi estudado por microscopia de fluorescência.



As imagens da figura 14 e 15 mostram que o padrão de distribuição dos sensibilizadores parece coincidir com a localização da sonda mitocondrial. Pode ainda verificar-se que os sensibilizadores não se localizam no núcleo, uma vez que não se observou fluorescência na zona nuclear.



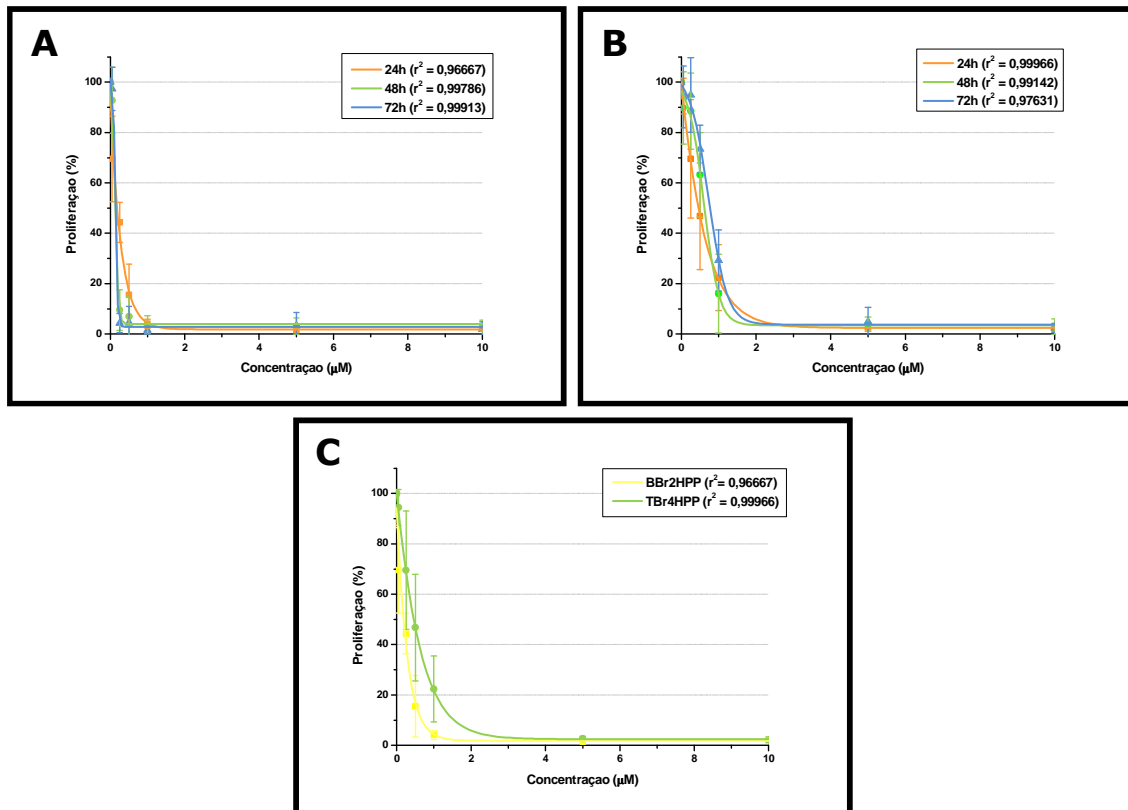
**Figura 14: Localização subcelular do sensibilizador BBr2HPP.** Imagens de microscopia de fluorescência obtidas com uma ampliação de 400x. Localização subcelular do sensibilizador (A), da sonda mitocondrial Mitotracker *Green* FM (B) e núcleos corados com hoechst 33252 (C). Sobreposição das imagens obtidas (D).



**Figura 15: Localização subcelular do sensibilizador TBr4HPP.** Imagens de microscopia de fluorescência obtidas com uma ampliação de 400x. Localização subcelular do sensibilizador (A), da sonda mitocondrial Mitotracker *Green FM* (B) e núcleos corados com hoechst 33252 (C). Sobreposição das imagens obtidas (D).

### 2.3. Avaliação da Proliferação Celular

Para avaliar os efeitos anti-proliferativos dos sensibilizadores sintetizados, em culturas celulares da linha adenocarcinoma colo-rectal WiDr, administraram-se os sensibilizadores em concentrações variáveis entre 50nM e 10 $\mu$ M, posteriormente procedeu-se ao tratamento fotodinâmico, com uma dose de 10J e realizou-se o ensaio do MTT. A figura 16 representa as curvas de dose resposta ao tratamento fotodinâmico com os sensibilizares TBr4HPP (figura 16, B) e BBr2HPP (figura 16, A) após 24, 48 e 72 horas da realização do tratamento fotodinâmico. Na figura 16 (C) estão representadas



**Figura 16: Curvas de dose-resposta das células de adenocarcinoma colo-rectal WiDr ao tratamento fotodinâmico. (A)** Curvas de dose-resposta ao tratamento fotodinâmico com BBr2HPP após 24, 48 e 72 horas. **(B)** Curvas de dose-resposta ao tratamento fotodinâmico com TBr4HPP após 24, 48 e 72 horas. **(C)** Comparação das curvas de dose-resposta após 24 horas para o tratamento fotodinâmico com os dois sensibilizadores estudados. Os resultados expressam a média de pelo menos seis experiências independentes.

as curvas de dose-resposta dos dois sensibilizadores estudados após 24 horas do tratamento fotodinâmico. Para estabelecer estas curvas utilizaram-se como termo de comparação as culturas celulares controle, submetidas apenas ao veículo de administração dos sensibilizadores (mistura ternária de PEG<sub>400</sub>:H<sub>2</sub>O:EtOH, 5:3:2, v:v:v), às quais se atribuiu o valor de 100%. As curvas de dose-resposta foram desenhadas no software Origin 8.0, que através do processamento dos resultados obtidos estabeleceu a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e forneceu a

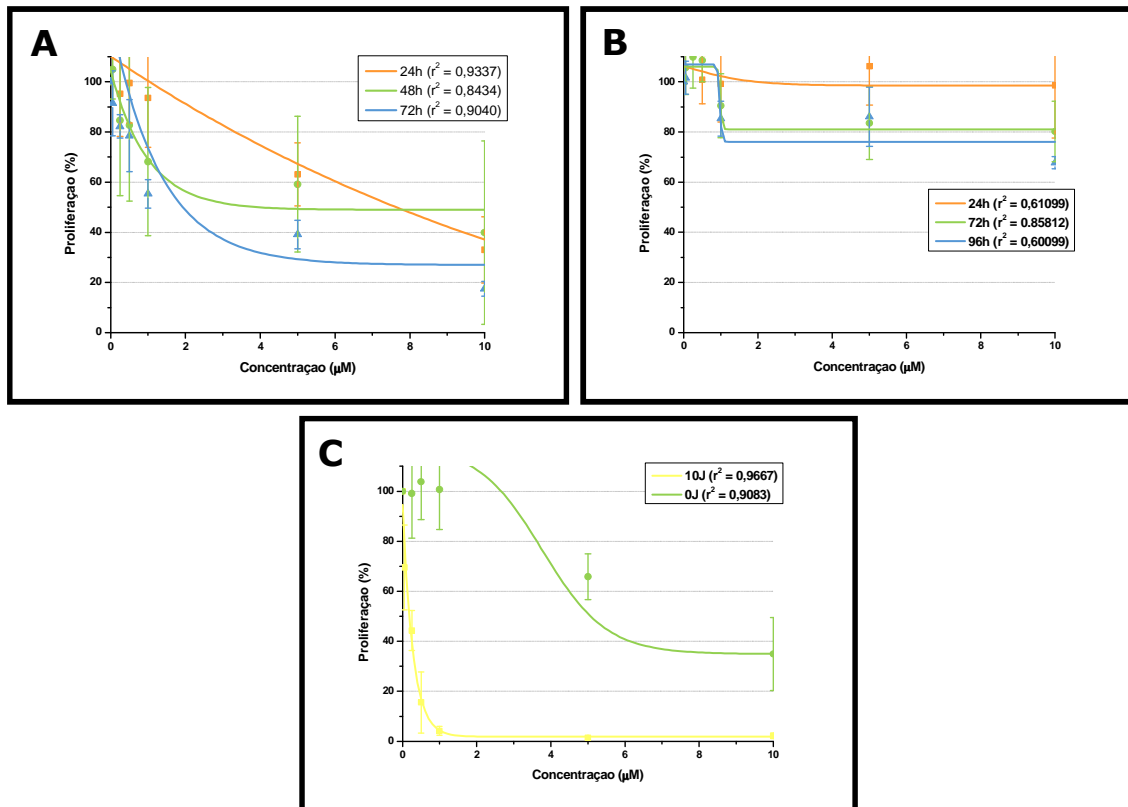
equação das mesmas. Assim, foi possível calcular o IC50 para os sensibilizadores estudados. Estes valores estão representados na tabela IV.

**Tabela IV: IC50 dos sensibilizadores BBr2HPP e TBr4HPP na linha celular de adenocarcinoma colo-rectal WiDr após 24h, 48h e 72h do tratamento fotodinâmico.**

	<b>BBr2HPP</b>	<b>TBr4HPP</b>
<b>24h</b>	180nM	464nM
<b>48h</b>	142nM	620nM
<b>72h</b>	141nM	765nM

Verifica-se que, após 24 horas, enquanto no tratamento fotodinâmico baseado em TBr4HPP são necessários 464nM para obter o IC50, no tratamento fotodinâmico baseado em BBr2HPP são necessários apenas 180nM, menos de metade da concentração. Tendo em conta a análise ao longo do tempo, no tratamento fotodinâmico baseado em BBr2HPP, a concentração correspondente ao IC50 diminui para 141nM às 72 horas. No caso do tratamento fotodinâmico baseado em TBr4HPP verifica-se um aumento da concentração necessária para obter o IC50 nas células de adenocarcinoma colo-rectal: 620nM para as 48 horas e 765nM para as 72 horas.

Para avaliar a citotoxicidade dos sensibilizadores estudados sem activação pela luz, administraram-se os sensibilizadores em concentrações variáveis entre 50nM e 10µM, e realizou-se o ensaio do MTT após 24, 48 e 72 horas. A figura 17 (A e B) representa as curvas de dose resposta aos sensibilizadores TBr4HPP e BBr2HPP após 24, 48 e 72 horas da administração. Para estabelecer as curvas de dose-resposta utilizaram-se como



**Figura 17: Curvas de dose-resposta das células de adenocarcinoma colo-rectal WiDr aos sensibilizadores não ativadas pela luz.** (A) Curvas de dose-resposta ao sensibilizador BBr2HPP após 24, 48 e 72 horas da administração. (B) Curvas de dose-resposta ao sensibilizador TBr4HPP após 24, 48 e 72 horas da administração. (C) Comparação das curvas de dose-resposta ao sensibilizador BBr2HPP 24 horas após ativação pela luz (linha amarela) e 24 horas após administração sem ativação pela luz (linha verde). Os resultados expressam a média de pelo menos seis experiências independentes.

termo de comparação as culturas celulares controlo, submetidas apenas ao veículo de administração dos sensibilizadores (mistura ternária de PEG<sub>400</sub>:H<sub>2</sub>O:EtOH, 5:3:2, v:v:v), às quais se atribuiu o valor de 100%. As curvas de dose-resposta foram desenhadas no software Origin 8.0, que através do processamento dos resultados obtidos estabeleceu a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e forneceu a equação das mesmas. Calculou-se o IC50 para os sensibilizadores nas 3 condições sempre que o ajuste o permitiu e os valores estão representados na tabela V.

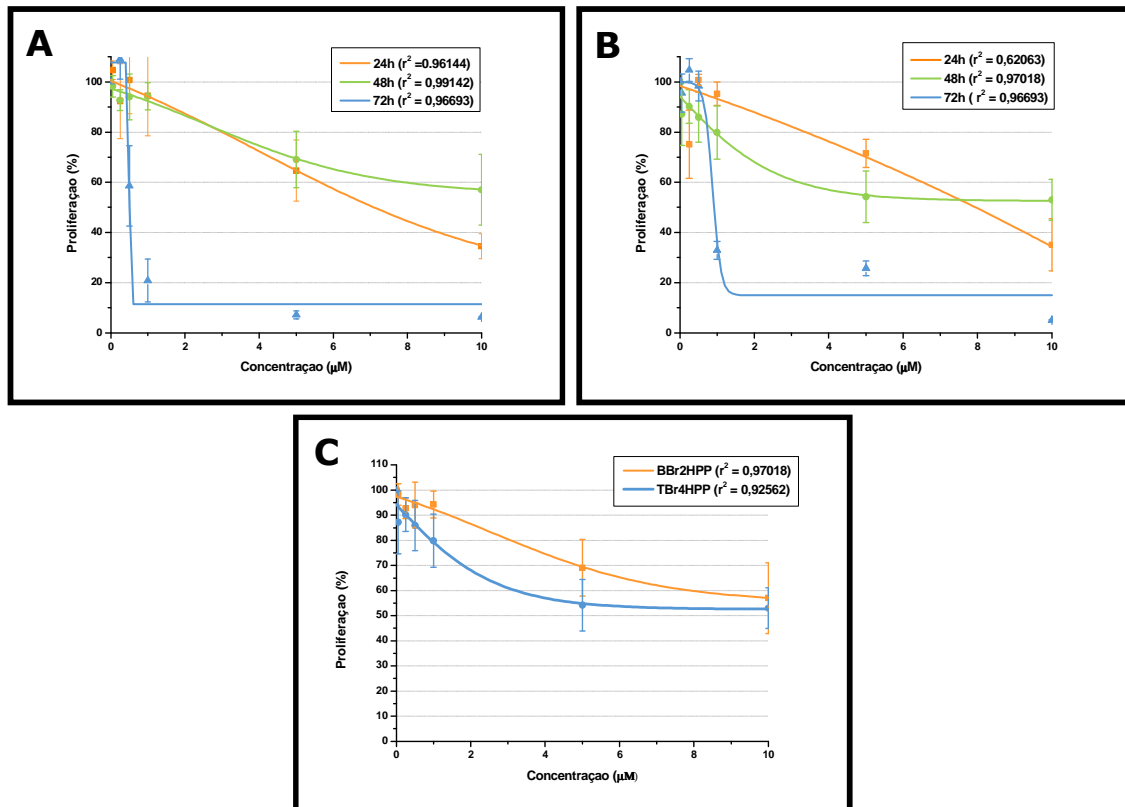
**Tabela V: IC50 dos sensibilizadores BBr2HPP e TBr4HPP na linha celular de adenocarcinoma colo-rectal WiDr após 24h, 48h e 72h de administração, sem activação pela luz. (\*: Impossível calcular.)**

	<b>BBr2HPP</b>	<b>TBr4HPP</b>
<b>24h</b>	7,08 $\mu\text{M}$	*
<b>48h</b>	3,96 $\mu\text{M}$	*
<b>72h</b>	1,12 $\mu\text{M}$	*

Para o sensibilizador TBr4HPP foi impossível calcular a concentração correspondente ao IC50 para os três tempos de avaliação. Pela observação do gráfico B da figura 17 pode-se observar que as curvas de melhor ajuste aos valores experimentais não se aproximam de  $y=50$ .

Para o sensibilizador BBr2HPP foi possível calcular os valores de IC50 que correspondem a 7,08 $\mu\text{M}$  para as 24 horas, 3,96 $\mu\text{M}$  para as 48 horas e 1,12 $\mu\text{M}$  para as 72 horas. Na figura 17 (C) estão representadas a comparação das curvas de dose-resposta a este sensibilizador para as 24 horas quando activado pela luz (IC50=180nM) e não activado pela luz (IC50=7,08  $\mu\text{M}$ ).

Uma vez que os potenciais sensibilizadores estudados neste trabalho seriam, num contexto clínico, administrados por via sistémica, estudou-se também a sua citotoxicidade em células não tumorais. Para tal, utilizou-se uma linha de células humanas normais que estava disponível, nomeadamente, a linha HFF1 de fibroblastos da pele. A figura 18 (A e B) representa as curvas de dose resposta aos sensibilizadores TBr4HPP e BBr2HPP após 24, 48 e 72 horas da administração. Para estabelecer as curvas de dose-resposta utilizaram-se como termo de comparação as culturas celulares controlo, submetidas apenas ao veículo de administração dos sensibilizadores (mistura



**Figura 18: Curvas de dose-resposta da linha celular humana de fibroblastos normais, HFF1, aos sensibilizadores estudados. (A)** Curvas de dose-resposta ao sensibilizador BBr2HPP após 24, 48 e 72 horas da administração. **(B)** Curvas de dose-resposta ao sensibilizador TBr4HPP após 24, 48 e 72 horas da administração. **(C)** Comparação das curvas de dose-resposta aos dois sensibilizadores após 24 horas de administração. Os resultados expressam a média de pelo menos três experiências independentes.

ternária de PEG<sub>400</sub>:H<sub>2</sub>O:EtOH, 5:3:2, v:v:v), às quais se atribuiu o valor de 100%. As curvas de dose-resposta foram desenhadas no software Origin 8.0, que através do processamento dos resultados obtidos estabeleceu a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e forneceu a equação das mesmas. Assim, foi possível calcular a concentração correspondente ao IC<sub>50</sub> para os sensibilizadores estudados. Estes valores estão representados na tabela VI. Para o sensibilizador BBr2HPP os valores de concentração que correspondem ao IC<sub>50</sub> são 7,07 $\mu\text{M}$  para as 24 horas, 10,3 $\mu\text{M}$  para as 48 horas e 0,504 $\mu\text{M}$  para as 72 horas. Para o sensibilizador TBr4HPP os valores de

concentração que correspondem ao IC50 são 8,07 $\mu$ M para as 24 horas, 6,57 $\mu$ M para as 48 horas e 0,912 $\mu$ M para as 72 horas

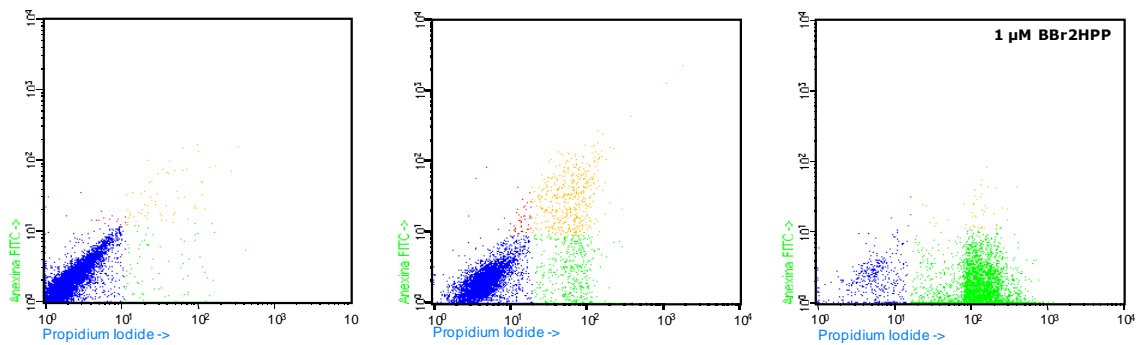
**Tabela VI: IC50 dos sensibilizadores BBr2HPP (ACS500) e TBr4HPP (ACS288) na linha celular humana de fibroblastos normais, HFF1, após 24h, 48h e 72h de administração.**

	<b>BBr2HPP</b>	<b>TBr4HPP</b>
<b>24h</b>	7,07 $\mu$ M	8,07 $\mu$ M
<b>48h</b>	10,3 $\mu$ M	6,57 $\mu$ M
<b>72h</b>	0,504 $\mu$ M	0,912 $\mu$ M

#### 2.4. Avaliação da Viabilidade Celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com AnV-FITC e IP. Como foi referido e discriminado na tabela II, esta marcação permite distinguir diferentes populações celulares: células viáveis, células em apoptose, células em apoptose tardia e necrose e células em necrose. Esta avaliação realizou-se em culturas celulares 24, 48 e 72 horas após o tratamento fotodinâmico com BBr2HPP e TBr4HPP nas concentrações de 1 $\mu$ M para ambos os sensibilizadores e ainda em concentrações aproximadas do IC50 obtido estudos preliminares de avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT, 150nM para BBr2HPP e 250nm para TBr4HPP. A figura 19 mostra os *dot-plots* representativos desta análise para uma amostra controlo e tratadas com 1 $\mu$ M BBr2HPP e 1 $\mu$ M TBr4HPP.





**Figura 19: Dot-plots representativos da dupla marcação com An-V/IP.**

Legenda: azul: células vivas; vermelho: populações em apoptose; amarelo: populações em apoptose tardia/necrose; verde: células em necrose. Observando os gráficos representados é notório o aumento da população de células em necrose para as amostras tratadas em relação ao controlo.

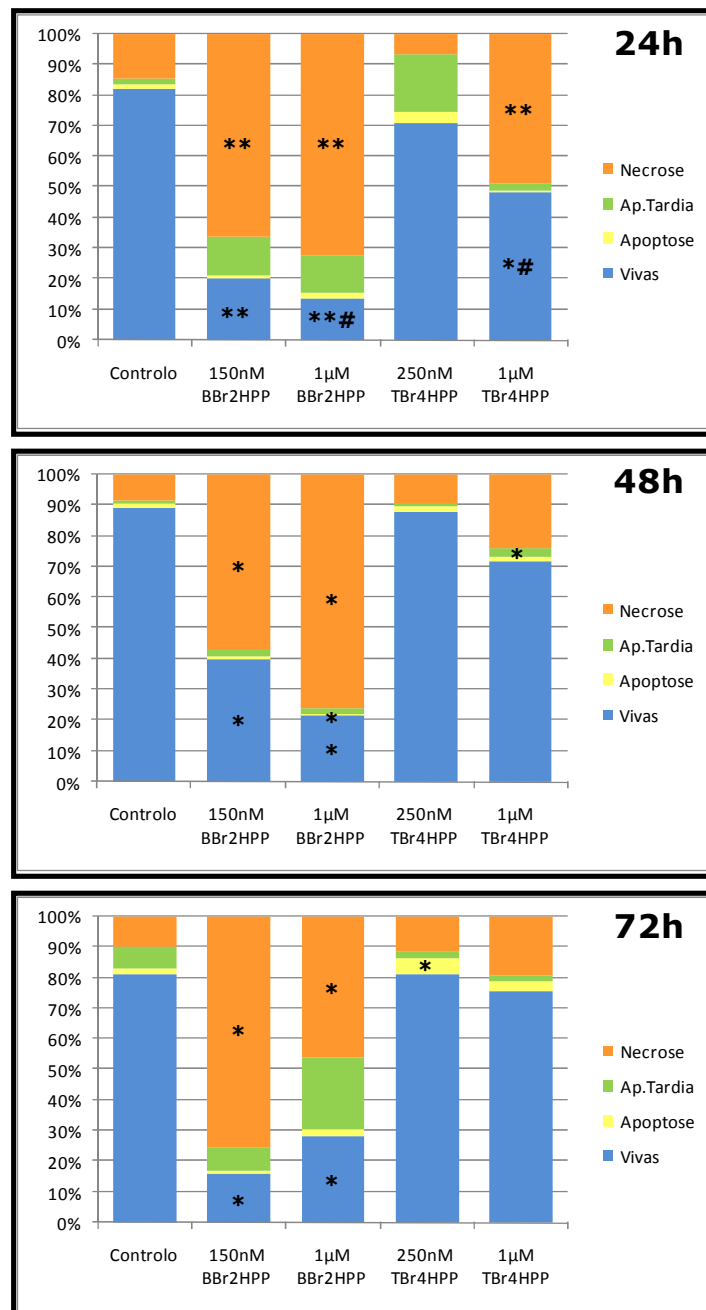
Para a avaliação às 24 horas, no tratamento com 1μM BBr2HPP atingiu-se 87% de morte, no entanto, com a mesma concentração de TBr4HPP obtém-se apenas 52%, em ambos os casos principalmente por necrose. Nos gráficos da figura 20 pode observar-se que para todas as concentrações estudadas, as culturas celulares tratadas com BBr2HPP têm menor viabilidade que as células tratadas com TBr4HPP. A morte celular ocorre principalmente por necrose.

Os resultados experimentais foram submetidos a tratamento estatístico no software SPSS utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com um nível de significância de 0,05. Compararam-se as populações celulares em necrose, apoptose tardia/necrose, apoptose e células vivas de cada condição (sensibilizador, concentração) com as respectivas populações celulares controlo para cada tempo, 24, 48 e 72 horas. Realizou-se ainda a comparação entre as populações celulares em necrose, apoptose tardia/necrose, apoptose e células vivas tratadas com 1μM BBr2HPP com as respectivas populações celulares tratadas com 1μM TBr4HPP. As diferenças com significância estatística estão assinaladas nos gráficos da figura 20.

Às 24 horas verificaram-se diferenças significativas em relação ao controlo para o tratamento com  $1\mu\text{M}$  de TBr4HPP sendo a população de células vivas menor ( $p=0,023$ ) e a população de células em necrose maior ( $p=0,008$ ). Em relação ao sensibilizador BBr2HPP, o tratamento fotodinâmico com  $150\text{nM}$  induziu um aumento significativo da população de células em necrose ( $p=0,004$ ) e diminuição das células viáveis ( $p=0,004$ ) e, com  $1\mu\text{M}$ , introduziu um aumento significativo das células em necrose ( $p=0,004$ ) e como diminuição de população de células vivas ( $p=0,004$ ). Ao comparar as populações celulares obtidas após o tratamento com ambos os sensibilizadores na concentração de  $1\mu\text{M}$ , verificou-se que no tratamento com TBr4HPP a população de células vivas é maior ( $p=0,027$ ).

A análise de viabilidade realizada 48 horas após o tratamento fotodinâmico mostrou poucas diferenças significativas entre o controlo e células tratadas com TBr4HPP. Apenas no tratamento com  $1\mu\text{M}$  se introduziu um aumento da população em apoptose tardia/ necrose ( $p=0,025$ ), sendo que não se considerou aumento da população celular em necrose, com  $p=0,053$ , e diminuição das células viáveis, com  $p=0,053$ . No entanto, o tratamento fotodinâmico com  $150\text{nM}$  de BBr2HP mostrou uma diminuição das células vivas ( $p=0,025$ ) e aumento das células em necrose ( $p=0,025$ ), e; em maior concentração ( $1\mu\text{M}$ ), verificou-se uma diminuição das populações de células em necrose ( $p=0,014$ ) e em apoptose ( $p=0,014$ ) e aumento das células vivas ( $p=0,014$ ). Para a comparação entre as populações celulares dos tratamentos com  $1\mu\text{M}$  não se consideraram diferenças significativas, no entanto, há uma tendência para a população de células vivas tratada com BBr2HP ser menor ( $p=0,057$ ) e as populações em necrose ( $p=0,057$ ) e apoptose ( $p=0,057$ ) serem maiores.

Às 72h verificou-se um aumento significativo da população de células em apoptose



**Figura 20: Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a dupla marcação AnV/IP.** Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e necrose, 24, 48 e 72 horas após o tratamento fotodinâmico com BBr2HPP e TBr4HPP. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* e as diferenças significativas entre os tratamentos com 1µM de cada sensibilizador estão assinaladas com #. Um símbolo indica  $p < 0,05$  e dois símbolos indicam  $p < 0,01$ . Os resultados expressam a média de pelo menos quatro experiências independentes.

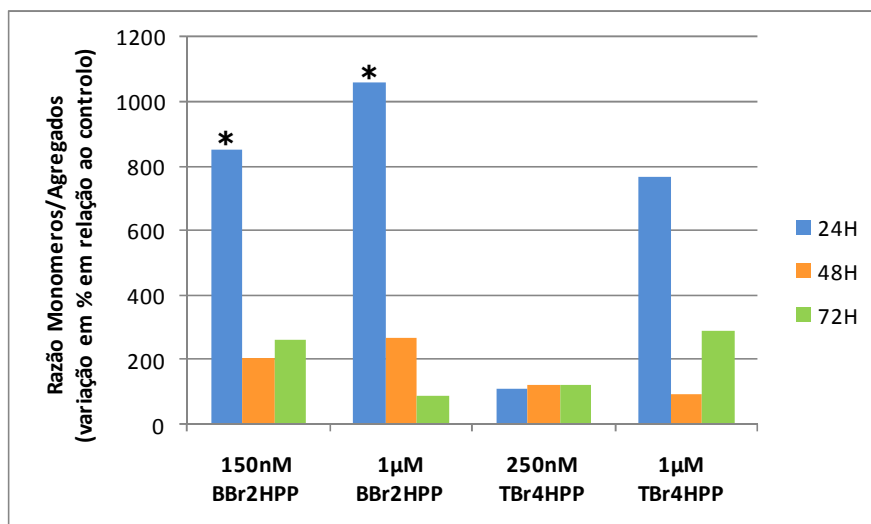
no tratamento fotodinâmico com 250nM de TBr4HPP ( $p=0,025$ ). O tratamento fotodinâmico com BBr2HPP introduziu diferenças estatisticamente significativas nas populações de células vivas (150nM:  $p=0,011$ ; 1 $\mu$ M:  $p=0,046$ ) e de células viáveis (150nM:  $p=0,046$ ; 1 $\mu$ M:  $p=0,011$ ).

## **2.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial**

Para verificar a integridade da mitocôndria avaliou-se o potencial de membrana mitocondrial recorrendo à sonda fluorescente JC1. Como já foi referido, o JC1 entra selectivamente na mitocôndria formando agregados ou monómeros que emitem fluorescência vermelha ou verde, respectivamente, dependendo do potencial membranar. Quando há despolarização da membrana mitocondrial, ou seja, diminuição do potencial de membrana, o JC1 predomina na forma de monómeros e verifica-se aumento da razão monómeros/agregados (M/A) de JC1.

As razões M/A das culturas celulares submetidas ao tratamento fotodinâmico foram comparadas com as razões de culturas celulares controlo não tratadas, para cada tempo, utilizando o software SPSS e o teste de Mann-Whitney.

No tratamento com TBr4HPP não se observaram diferenças estatisticamente significativas. Apesar de haver uma tendência para um aumento da razão monómeros/agregados em todas as condições do tratamento com BBr2HPP, apenas se verificaram diferenças significativas para a análise às 24 horas (150nM:  $p=0,025$ ; 1 $\mu$ M:  $p=0,025$ ). Nestas condições há despolarização da membrana mitocondrial e a viabilidade celular está comprometida. Os resultados estão representados no gráfico da figura 21.



**Figura 21: Análise do potencial de membrana mitocondrial.** Os resultados são expressos em % em relação ao controle para cada tempo. As diferenças significativamente significativas em relação ao controle estão assinaladas com \*, tendo-se considerado um nível de significância de 0,05. Os resultados expressam a média de pelo menos três experiências independentes.

## 2.6. Avaliação da produção intracelular de espécies reactivas de oxigénio

A produção de ROS foi avaliada através da determinação dos níveis intracelulares médios de peróxidos e de anião superóxido, por citometria de fluxo com recurso às sondas fluorescentes DCFH<sub>2</sub>-DA e DHE, respectivamente. Como já foi referido, a determinação de peróxidos é possível porque o DCFH<sub>2</sub>-DA ao entrar na célula é clivado por esterases que o transforma em DCFH. Este composto, na presença de peróxidos origina o composto fluorescente DCF. Assim, quanto maior a produção de peróxidos, maior a intensidade de fluorescência que se obtém.

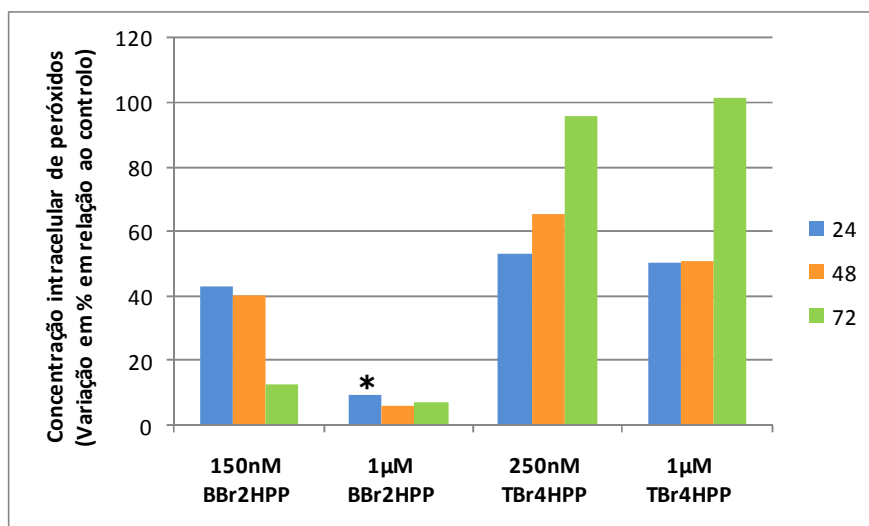
As MIF das culturas celulares submetidas ao tratamento fotodinâmico foram comparadas com as MIF de culturas celulares controlo não tratadas, para cada tempo, utilizando o software SPSS e o teste de Mann-Whitney.

Como se pode observar no gráfico da figura 22, não há diferenças significativas na

produção de peróxidos nas células submetidas ao tratamento fotodinâmico com TBr4HPP. No entanto no tratamento com BBr2HPP há uma tendência para a diminuição da concentração peróxidos intracelulares, com significância estatística para a análise as 24 horas com 1 $\mu$ M deste sensibilizador (p=0,017).

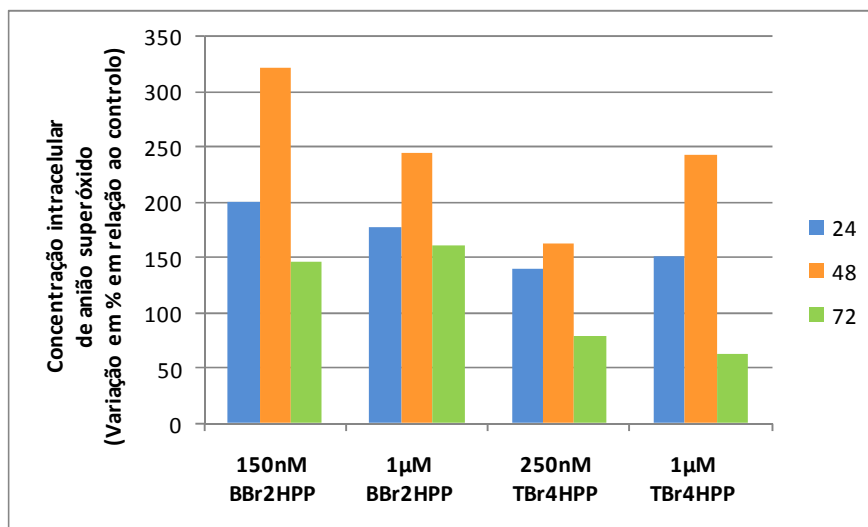
Realizou-se ainda a comparação entre as culturas celulares submetidas ao tratamento fotodinâmico com 1 $\mu$ M de cada sensibilizador, tendo-se encontrado uma tendência para haver maior produção de peróxidos nas células tratadas com BBr2HPP às 24 (p=0,050) e às 72 horas (p=0,050).

Para avaliar a produção anião superóxido recorreu-se à marcação com DHE, uma sonda que é convertida pelo anião superóxido a etídeo, composto que se intercala no DNA, permanecendo na célula e emite fluorescência.



**Figura 22: Avaliação da produção de peróxidos por citometria de fluxo recorrendo marcação com DCFH<sub>2</sub>-DA.** Os resultados são expressos em % em relação ao controlo para cada tempo. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \*. Considerou-se um nível de significância de 0,05. Os resultados exprimem a média de pelo menos três experiências independentes.

Como se pode observar no gráfico da figura 23, não há diferenças significativas na concentração intracelular de peróxidos nas células submetidas ao tratamento fotodinâmico. No entanto, verifica-se uma tendência para o aumento da concentração anião superóxido.



**Figura 23: Avaliação da produção de peróxidos por citometria de fluxo recorrendo marcação com DCFH<sub>2</sub>-DA.** Os resultados são expressos em % em relação ao controlo para cada tempo. Não existem diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Os resultados exprimem a média de pelo menos três experiências independentes.

### 3. Estudos *in vivo*

Após os estudos *in vitro*, cujos resultados mostraram que os sensibilizadores sintetizados e alvo deste estudo, são captados pelas células, produzem efeito fotodinâmico e induzem morte celular, iniciaram-se os estudos *in vivo*.

Os estudos iniciaram-se pelo desenvolvimento do modelo animal de

xenotransplante de adenocarcinoma colo-rectal de células humanas da linha WiDr em ratinhos atímicos *Balb/c nu/nu*.

A população do estudo foi constituída por 42 ratinhos com xenotransplante das células WiDr. Destes 42 ratinhos, 18 receberam o sensibilizador BBr2HPP, 18 o sensibilizador TBr4HPP e 6 não receberam sensibilizador, constituindo o grupo controlo. Os 18 ratinhos de cada sensibilizador foram divididos em três grupos que diferiram no momento de administração da luz: 24, 48 e 72 horas após a injeção do sensibilizador.

Com os resultados obtidos, na forma de volume tumoral relativo, estabeleceram-se as curvas de Kaplan-Meier representadas na figura 24. Determinaram-se os valores médios e limites do intervalo de confiança (IC) a 95% dos resultados do grupo controlo. Assim, foi possível definir os pontos de corte, que estão referidos na tabela VII, e o evento, que consistiu nos volumes tumorais relativos abaixo do limite inferior do intervalo de confiança do grupo controlo.

Desta forma, encontraram-se 31 eventos (73,8%), considerando os 42 casos. A comparação das curvas através do teste de Wilcoxon mostrou várias diferenças entre os grupos. Para o sensibilizador BBr2HPP verificou-se uma diminuição significativa do crescimento tumoral ( $p < 0,001$ ) nos ratinhos tratados em relação ao grupo controlo.

**Tabela VII: Pontos de corte para definir evento**

<b>Dia</b>		<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Controlo</b>	<b>Média</b>	1,155	1,347	1,662	2,185	2,583	3,125
	<b>LI IC95%</b>	1,081	1,173	1,576	1,983	2,257	2,612
	<b>LS IC95%</b>	1,23	1,52	1,747	2,387	2,91	3,638

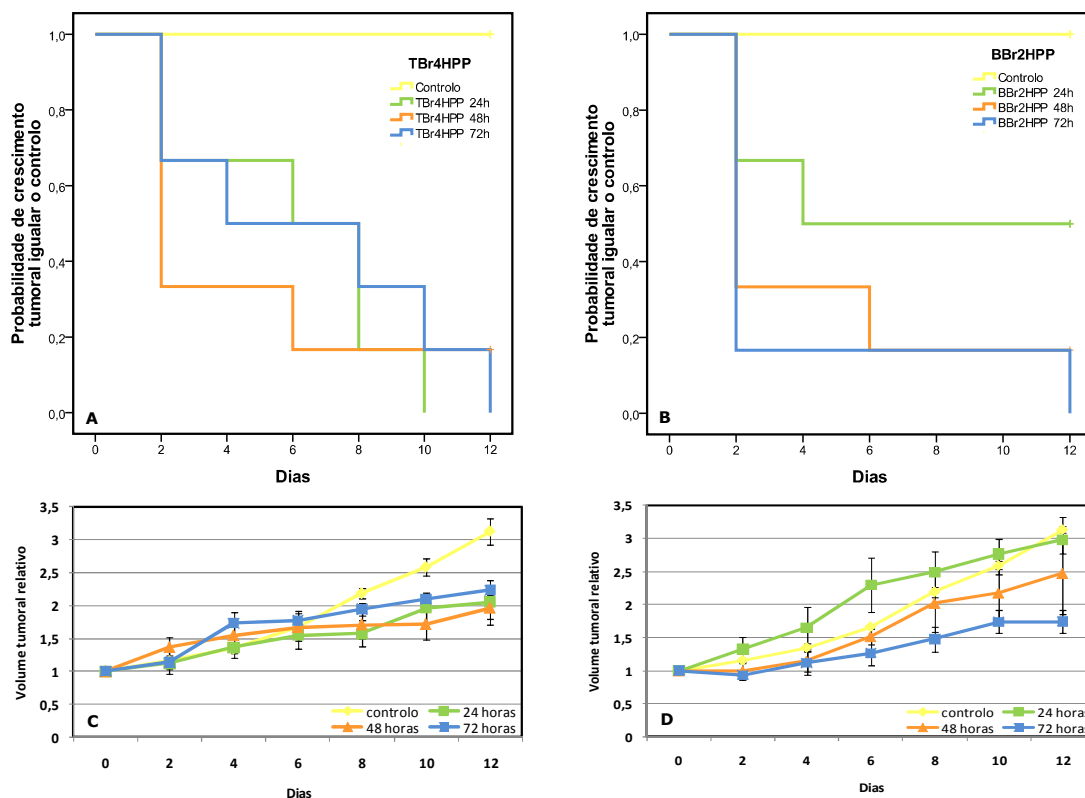


O tratamento mais eficaz consiste na irradiação 72 horas após a administração do sensibilizador ( $p=0,006$ ), havendo uma diminuição do crescimento significativa logo ao segundo dia de monitorização. Para o protocolo de 48 horas após a irradiação também se verificou uma diminuição significativa do aumento do volume tumoral ( $p=0,03$ ). Apesar de não se verificarem diferenças significativas para o grupo irradiado às 24 horas, durante o *follow-up*, não é provável que o volume do tumor ultrapasse o do grupo controlo. Os tempos medianos de sobrevivência foram 4, 2 e 2 dias para os tratamentos às 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A comparação entre os grupos tratados aos três tempos de incubação não mostrou diferenças nos diferentes tempos.

Para o sensibilizador TBR4HPP verificou-se a existência de diferenças muito significativas entre os grupos irradiados e o grupo controlo ( $p=0,009$ ). Para cada tempo de irradiação também se observaram diferenças relativamente ao controlo, 24 horas:  $p=0,006$ , 48 horas;  $p=0,03$  e 72 horas:  $p=0,006$ . Entre cada um dos grupos tratados aos três tempos de incubação não há diferenças, sendo os tempos medianos de sobrevivência de 6 dias, 2 dias e 4 dias, respectivamente.

A comparação para cada tempo, BBr2HPP *versus* TBr4HPP às 24, 48 e 72 horas, não mostrou diferenças significativas. Aliás, para as 48 horas verificou-se que as curvas se sobrepõem ( $p=1,0$ ).

Verificou-se que o tratamento com ambos os sensibilizadores reduz significativamente o crescimento tumoral. Apesar de não se terem encontrado diferenças significativas entre os dois sensibilizadores destaca-se o tratamento com BBr2HPP com irradiação às 72 horas, para o qual se verificam 5 em 6 eventos ao segundo dia de *follow-up*.



**Figura 24: Curvas de Kaplan-Meier (A e B) e da taxa de crescimento (C e D) que traduzem a probabilidade de diminuição do crescimento tumoral em resposta ao tratamento fotodinâmico com TBr4HPP (A e C) e BBr2HPP (B e D). As barras de erro correspondem ao erro padrão calculado para seis animais em cada grupo.**

#### 4. Estudos *ex vivo*

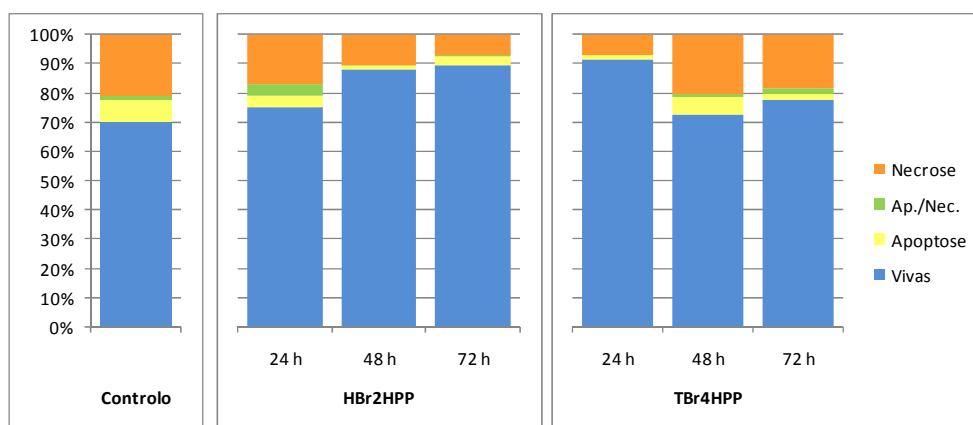
##### 4.1 Isolamento das Células Tumorais e Citometria de Fluxo

Após a excisão dos tumores, e isolamento das respectivas células tumorais, procedeu-se ao estudo celular através da citometria de fluxo. Os estudos realizados com estas células, foram os mesmos a que foram sujeitas as células dos estudos *in vitro*, já referidos. Assim, foi avaliada a viabilidade celular com quantificação da percentagem de células vivas, de células em apoptose e de células em necrose, através da dupla

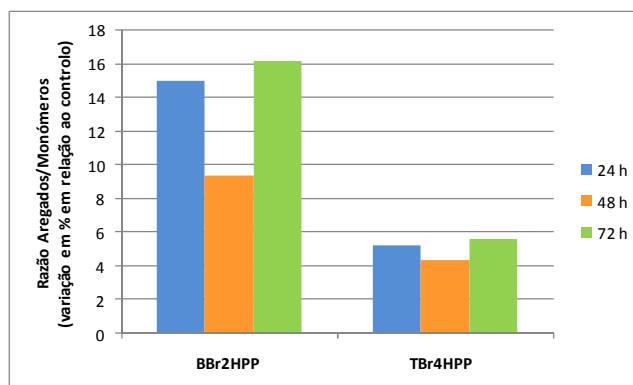
marcação com anexina-V e iodeto de propídeo, o potencial de membrana mitocondrial, usando o fluorocromo JC1, e a presença de ROS através das sondas DCFH<sub>2</sub>-DA e DHE.

Os resultados obtidos, para os diversos parâmetros atrás referidos foram sujeitos a tratamento estatístico através do teste de Mann-Whitney no software SPSS considerando-se como nível de significância 0,05.

Em relação à viabilidade, não se obtiveram diferenças significativas entre os grupos tratados em relação ao grupo controlo. Os resultados estão representados na figura 25. Relativamente ao potencial de membrana mitocondrial também não se verificaram diferenças significativas em relação ao grupo controlo. A razão M/A está representada na figura 26. A razão M/A do grupo controlo foi ajustada a 100% e podemos verificar que em todas as condições para ambos os sensibilizadores há uma tendência para diminuição da razão M/A, o que significa que a membrana mitocondrial se encontra polarizada.

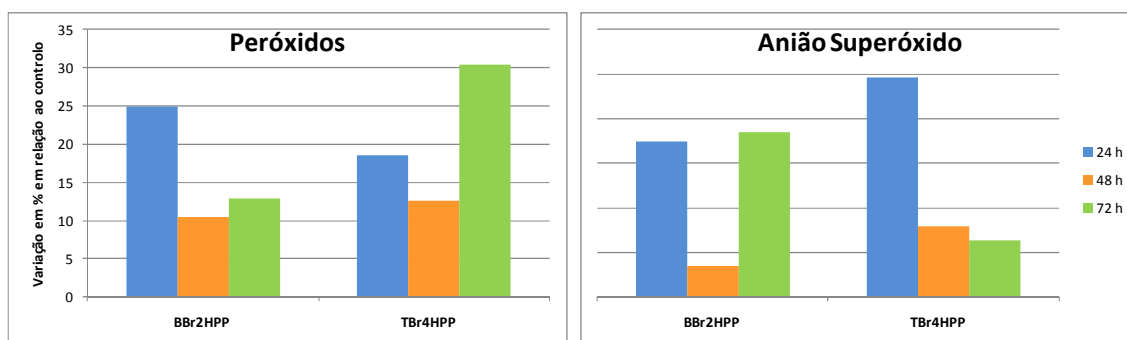


**Figura 25: Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a dupla marcação AnV/IP.** Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e necrose, 24, 48 e 72 horas após o tratamento fotodinâmico com BBr2HPP e TBr4HPP. Os resultados expressam a média de pelo menos três experiências independentes.



**Figura 26: Análise do potencial de membrana mitocondrial.** Os resultados são expressos em % em relação ao controlo para cada tempo. Não existem diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Os resultados expressam a média de pelo menos três experiências independentes.

Relativamente à produção de ROS, analisando os gráficos da figura 27, observa-se uma tendência para diminuição de peróxidos e anião superóxido, no entanto, não há diferenças estatisticamente significativas.



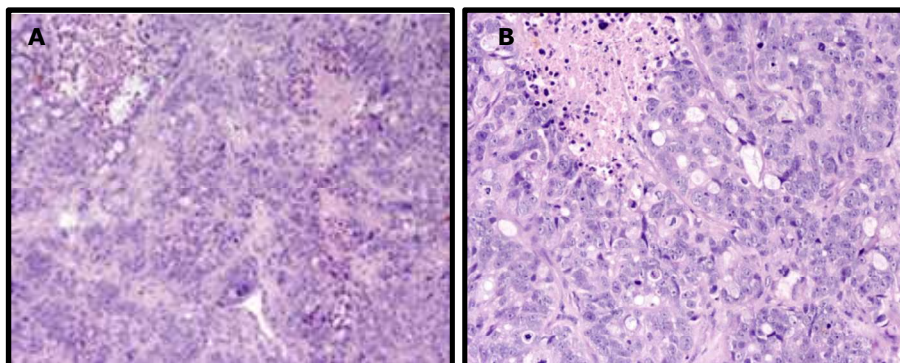
**Figura 27: Avaliação da produção de ROS por citometria de fluxo.** Os resultados são expressos em % em relação ao controlo para cada tempo. Não existem diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Os resultados expressam a média de pelo menos três experiências independentes.

## 4.2. Análise da Morfologia Celular

De cada ratinho sacrificado, um fragmento do tumor excisado foi submetido a análise histológica. Para tal, prepararam-se lâminas e submeteram-se os cortes à coloração com hematoxilina-eosina (H&E).

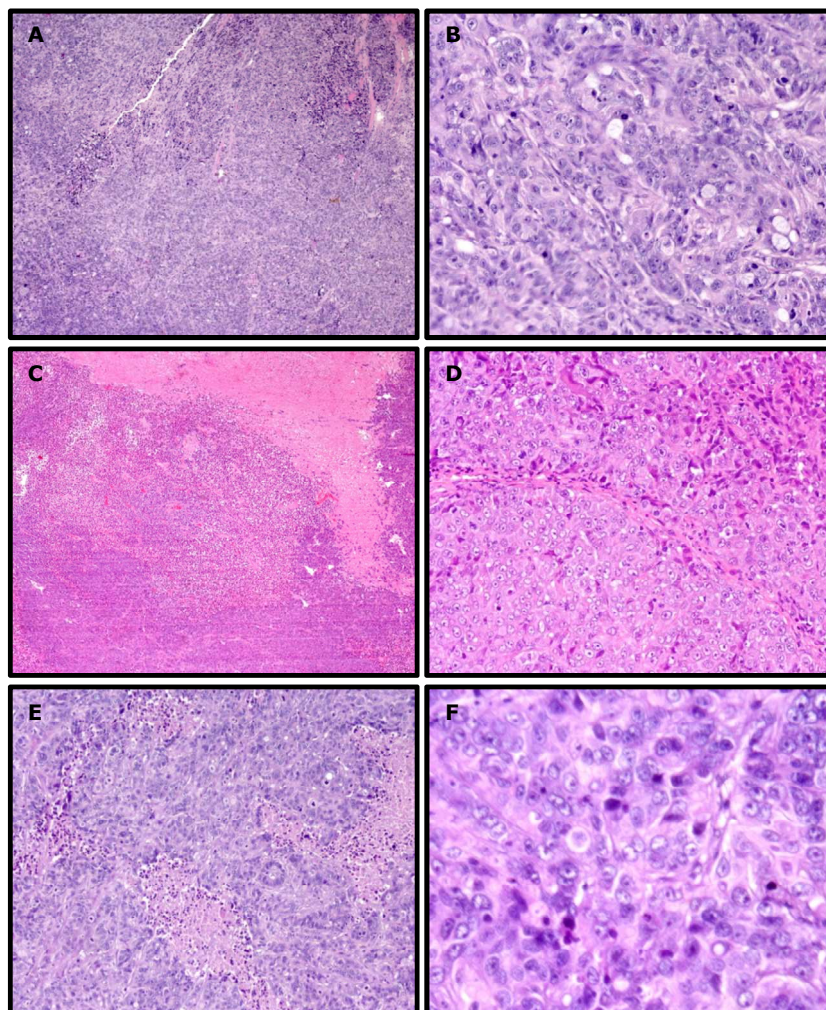
Na análise dos tumores excisados dos ratinhos do grupo controlo observaram-se nódulos tumorais subcutâneos com diâmetros entre 14 e 20 mm, constituídos por maciços, trabéculas e estruturas tubulares de células neoplásicas, com morfologia compatível com adenocarcinoma, como se pode observar na figura 28. A periferia apresentou-se sólida e a zona central apresentou necrose que corresponde a 30% a 80% do volume tumoral, esboçando a formação de estruturas macro e micro-tubulares. Periféricamente os nódulos são constituídos por células com altos índices mitóticos.

Os cortes dos tumores dos ratinhos tratados com BBr2HPP, para todos os tempos, que estão representados na figura 29, reflectem a estrutura histológica de adenocarcinomas bem diferenciados com padrão micro e macro-glandular. Os nódulos tumorais variaram entre 5 e 30mm. Na zona central observou-se necrose que ocupa 10%

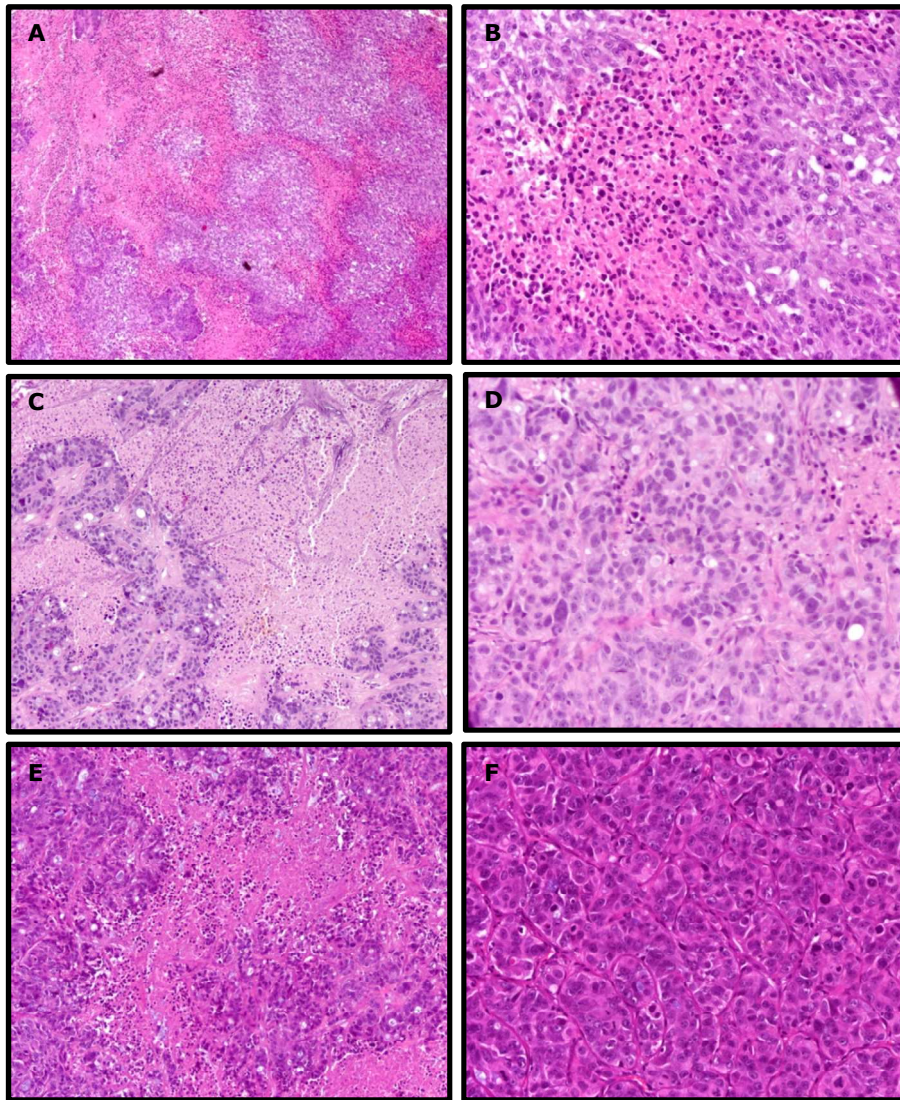


**Figura 28: Imagens histológicas de um corte de um tumor do grupo controlo. (A) Padrão sólido e zonas de necrose, H&E, 100x. (B) Padrão microacinar, H&E, 200x.**

a 50% do volume tumoral. O tecido é constituído por maciços e trabéculas de células neoplásicas onde focalmente há esboço de estruturas acinares. Frequentemente junto às áreas de necrose observou-se a formação de estruturas tubulares. Observaram-se também áreas sólidas com índices mitóticos elevados.



**Figura 29:** Cortes histológicas dos tumores dos animais submetidos à PDT com BBr2HPP após 24 (A, B), 48 (C, D) e 72 (E, F) horas, H&E. A, C e E (100x) reflectem a estrutura histológica geral na qual predomina o padrão sólido interrompido por zonas de necrose. Particularmente, na imagem C que corresponde aos animais irradiados após 48 horas de injeção é notória a transição de padrão sólido para a zona de necrose. A imagem B evidencia uma região de padrão microacinar, ampliação 200x. A imagem D reflecte o padrão sólido predominante, 40x. Na imagem F é possível distinguir algumas células em apoptose, ampliação 400x.



**Figura 30: Cortes histológicos dos tumores dos ratinhos tratados com TBr4HPP, H&E. Nas imagens A e B, correspondentes a animais irradiados 24 horas após administração do sensibilizador é possível distinguir o padrão sólido tumoral invadido por extensas áreas de necrose, 40x e 200x respectivamente. As imagens C e D, correspondem a animais irradiados 48 horas após administração do sensibilizador, 100x. Em E e F, podemos observar cortes de tumores de animais irradiados 72 horas após administração do sensibilizador, 100x e 200x respectivamente.**

Para os animais tratados com TBr4HPP, observaram-se nódulos tumorais subcutâneos com diâmetros entre 9mm e 2cm, correspondendo a adenocarcinomas pouco ou moderadamente diferenciados com predomínio periférico do padrão microacinar sólido e com necrose na zona central ocupando entre 5% a 50% do volume

tumoral. Tal como se pode observar nas imagens da figura 30 o tecido neoplásico adjacente à zona central esboça a formação de estruturas acinares, e perifericamente é constituído por maciços e trabéculas de células neoplásicas com esboço de formação tubular. As células tumorais são grandes, com relação núcleo/citoplasma e índice mitótico elevados.