

## **V. Discussão**



Ao longo dos últimos anos realizaram-se numerosos ensaios clínicos e estudos sobre a PDT para o cancro que tornaram esta terapêutica potencialmente importante na área oncológica. Na maior parte dos casos onde foi aplicada, provou ter vantagens em relação às terapêuticas convencionais, por ser uma terapia selectiva, não invasiva, não induzir resistência e ter poucos efeitos secundários. A investigação da acção biológica da PDT constitui uma área científica dinâmica com trabalhos publicados regularmente. Os sistemas de aplicação de luz também evoluíram estando disponíveis tecnologias capazes de concretizar esta terapêutica em órgãos parenquimatosos como o pâncreas ou o fígado (Fan, 2007; Qiang *et al.*, 2006).

Actualmente a PDT é uma terapêutica reconhecida em muitos países mas tem um número limitado de indicações aprovadas e poucos fármacos licenciados, não tendo ocorrido ainda a sua implementação clínica. Uma das razões para este facto poderá ser a inexistência de fotossensibilizadores com as características ideais, nomeadamente, ser selectivo para as células-alvo, ter o máximo efeito fotodinâmico e provocar o mínimo de efeitos secundários. Vários grupos de investigação trabalham na área da síntese de novos fotossensibilizadores motivados pela certeza de que a descoberta da molécula ideal dará espaço à PDT na clínica.

As porfirinas com grupos hidroxilo têm boa actividade como sensibilizadores em PDT. Trabalhos com sensibilizadores diaril com quatro grupos hidroxilo (dois em cada grupo fenil) apresentaram resultados promissores em xenotranplantes de adenocarcinoma do cólon (Bourré *et al.*, 2003; Ferrand, 2003). Os grupos hidroxilo na posição *meta* dos anéis fenil (na posição *meso*) parecem reforçar esta actividade em relação às posições *orto* ou *para* (Berenbaum *et al.*, 1986). Songca (2001) testou o efeito fotodinâmico de tetrahidroxifenilporfirinas fluoradas e concluiu que as substituídas na posição *meta* são as que têm fotoactividade mais alta, para além de que

os compostos porfirínicos substituídos na posição meta dos anéis fenil com grupos hidroxilo têm localização preferencial no tecido tumoral. Banfi *et al.* sintetizaram uma série de tetraarilporfirinas e diarilporfirinas com vários grupos hidroxilo nos anéis fenil e concluíram que os anéis na posição meta são os mais activos em PDT. O fotossensibilizador mais activo actualmente em uso clínico, Foscan®, tem uma substituição por grupos hidroxilo na posição *meta* dos quatro grupos fenil. A melhor performance fotodinâmica de compostos substituídos com grupos hidroxilo deverá ser devida à melhor solubilidade destas moléculas em meio aquoso (Banfi *et al.*, 2006).

Também as porfirinas halogenadas têm sido estudadas como sensibilizadores em PDT. Foram observadas boas propriedades de moléculas substituídas com flúor (Gryshuk *et al.*, 2006; Songca, 2001). Vários trabalhos confirmaram o efeito do átomo pesado, ou seja, a maior capacidade de produção de oxigénio singleto de FS substituídos por halogéneos (Azenha, 2002; Pineiro *et al.*, 1998) no entanto, a sua citotoxicidade não foi estudada. Picard *et al.* (2009) mostraram que a bromação favorece a formação de ROS, resultado sustentado por um trabalho desenvolvido com ftalocianinas que mostrou que a substituição com bromo aumenta a formação do estado tripleto e a geração de oxigénio singleto (Silva *et al.*, 2006).

Tendo em conta estas características tornou-se pertinente estudar a capacidade fotodinâmica de TBr4HPP e BBr2HPP, hidroxifenilporfirinas substituídas na posição *meta* e halogenadas com bromo, comparando o composto tetraaril com o diaril correspondente.

O rendimento de formação de oxigeno singleto,  $\Phi_{\Delta}$ , foi medido por fotólise em fase estacionária e os resultados apresentados na tabela III, demostram que não há diferenças na produção de oxigénio singleto para os dois compostos estudados.

Os espectros de absorção em etanol dos dois sensibilizadores mostram a banda Soret típica (B(0,0)) e bandas-Q. A diarilporfirina (BBr2HPP) tem o espectro de absorção ligeiramente desviado para o azul (630nm) em relação à tetraarilporfirina (TBr4HPP) (645nm), estando ambos os compostos dentro da gama de absorção terapêutica (600 a 800nm). Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que o aumento do número de halogéneos no anel fenil, a substituição com bromo ou iodo não influencia significativamente as características de absorção deste tipo de sensibilizadores, no entanto, e como seria de esperar, verifica-se um aumento do rendimento de produção de oxigénio singleto em relação aos compostos não substituídos, provavelmente, devido ao acoplamento do spin-orbital do átomo (Serra *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2010).

Após a síntese e avaliação das características químicas dos compostos, iniciaram-se os estudos *in vitro*. A reacção fotodinâmica depende grandemente da captação, retenção e acumulação dos sensibilizadores no tecido tumoral. A captação celular dos sensibilizadores foi analisada por métodos fluorimétricos. Para os dois compostos estudados verificou-se que a captação é dependente da dose, aumentando com o aumento da concentração dos sensibilizadores no período de incubação. Verificou-se também, que a captação de TBr4HPP é consideravelmente superior à captação de BBrH2PP, como podemos observar na figura 13. Isto deverá explicar-se pelas diferenças de capacidade de solubilidade destas moléculas, nomeadamente a hidrofiliabilidade, que adveem do facto da tetrafenilporfirina possuir mais dois grupos hidroxilo nos grupos fenil que a diarilporfirina. A própria estrutura tridimensional da molécula também deverá contribuir para esta diferença, já que a TBr4HPP terá uma estrutura mais globosa e BBr2HPP será uma molécula mais esguia e por isso com maior polaridade

Trabalhos recentes mostraram que a presença de átomos bromo nos anéis fenil de compostos porfirínicos, não está associada apenas ao bom rendimento de formação de oxigénio singleto, foto-estabilidade e hidrofiliçidade, mas também a uma maior captação celular (Serra *et al.*, 2008). Picard *et al.* (2009) estudaram a PDT baseada em porfirinas catiónicas e a influência da sua substituição com bromo e concluíram que o potencial do fotossensibilizador se torna três vezes superior, tendo sido associado este melhoramento ao aumento de 30% na captação celular das porfirinas bromadas em relação às correspondentes não bromadas.

A PDT pode actuar principalmente a dois níveis: efeitos letais directos sobre as células tumorais, que induzem vias de morte, ou efeitos letais indirectos, através do recrutamento de células inflamatórias e activação não específica do sistema imunitário do hospedeiro. O balanço entre estas duas repostas depende de vários parâmetros, sendo um deles a localização subcelular dos sensibilizadores (Saczek *et al.*, 2007).

As propriedades de fluorescência dos sensibilizadores podem ser usadas para avaliar a sua localização intracelular e o efeito do tratamento. A comparação entre o padrão de fluorescência dos sensibilizadores e o padrão de localização de marcadores fluorescentes de organelos constitui uma abordagem vantajosa para obter informação acerca da localização subcelular destes compostos e conhecer os possíveis alvos da reacção fotodinâmica (Uzdensky *et al.*, 2001). É assumido que os primeiros locais a sofrer os danos da reacção fotodinâmica são os mais próximos do local de formação de oxigénio singleto e dependem da distribuição do sensibilizador no interior da célula (Leung *et al.*, 2002; Marchal *et al.*, 2004).

As mitocôndrias, da linha celular WiDR, coradas com Mitotracker *Green FM* apresentam um aspecto granular, tal como já tinha sido descrito (Uzdensky *et al.*, 2001). As células coradas por ambos os sensibilizadores estudados apresentam fluorescência

vermelho brilhante. Em muitas células é possível observar que a fluorescência vermelha forma um anel que rodeia o espaço nuclear (Figura 14 A e figura 15 A). As imagens das figuras 14 e 15 mostram ainda que o padrão de distribuição dos fotossensibilizadores no interior da célula coincide com o padrão de distribuição da sonda fluorescente que marca a mitocôndria. Assim, os fotossensibilizadores estudados, com uma concentração de 5 $\mu$ M parecem localizar-se predominantemente na mitocôndria.

As porfirinas e macrociclos derivados são moléculas lipofílicas e têm tendência a acumular em organelos membranares como as mitocôndrias e lisossomas (Kolarova *et al.*, 2007). A literatura refere que entre os compostos tetrapirrólicos, os FS mais eficazes tendem a acumular na mitocôndria (Gryshuk *et al.*, 2006). Picard *et al.*, 2009 mostraram que as porfirinas bromadas localizam-se principalmente na mitocôndria. Os danos mitocondriais são considerados a consequência major da fototoxicidade (Marchal *et al.*, 2004). Os primeiros eventos que ocorrem poucos segundos após a fotossensibilização são a libertação de citocromo c do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol e/ou a dissipação do potencial de membrana mitocondrial. Ricchelli *et al.* (1990) mostraram que o Photofrin® se localiza principalmente na mitocôndria. Estudos posteriores de microscopia de fluorescência e electrónica, mostraram que imediatamente após a PDT mediada por Photofrin® ocorrem alterações estruturais na mitocôndria, como *swelling* (turgidez) e destruição do organelo (Kessel *et al.*, 1997). Trabalhos com outros fotossensibilizadores do tipo porfirínico mostraram a localização inicial nos lisossomas e que a irradiação induz a realocização para o citoplasma (Olivo *et al.*, 2003). Outros estudos mostraram que a irradiação pode induzir redistribuição dos sensibilizadores (Kunz *et al.*, 2007). Assim, seria de grande interesse realizar este estudo em microscopia confocal, ao longo do tempo, utilizando também marcadores de outros organelos, nomeadamente, ER, lisossomas e membrana celular uma vez que

também tem sido sugerida a localização de compostos com estruturas semelhantes nestes organelos.

A partir da análise da proliferação celular, pelo ensaio do MTT, pode-se confirmar, em primeiro lugar que a mistura escolhida para solubilizar os sensibilizadores, e que serviu de veículo para a sua administração, não influencia a proliferação celular, não tendo sido registadas diferenças em relação a culturas celulares controlo não submetidas a qualquer tratamento. Com os resultados de espectrofotometria obtidos dos ensaios do MTT foi possível determinar as curvas de dose-resposta. Os resultados mostraram claramente que a fototoxicidade aumenta com o aumento da concentração de incubação para ambos os sensibilizadores. Para a avaliação após 24 horas do tratamento fotodinâmico obteve-se um IC<sub>50</sub> de 464nM para o sensibilizador tetraaril TBr4HPP, enquanto que, para o sensibilizador diaril BBr2HPP, se conseguiu inibir a proliferação em 50% com uma concentração de apenas 180nM. Esta diferença é singular na medida que não se registaram diferenças no rendimento quântico de oxigénio singleto para estes sensibilizadores e se verificou que a captação de BBr2HPP é menor.

No âmbito de outro trabalho realizado pelo nosso grupo efectuaram-se ensaios do MTT para avaliar a inibição da proliferação introduzida pelo Photofrin®. Para a linha celular WiDr, e com o mesmo desenho experimental, obteve-se um IC<sub>50</sub> de 666nM (Serra *et al.*, 2008). Ambos os compostos estudados apresentam concentrações mais baixas para induzir 50% de inibição da proliferação celular e provaram ser mais citotóxicos que o Photofrin®.

A análise da proliferação 48 e 72 horas após o tratamento fotodinâmico também mostrou diferenças nos IC<sub>50</sub> para os dois sensibilizadores. O IC<sub>50</sub> do composto diaril BBr2HPP diminuiu, em relação às 24 horas, para cerca de 140nM, no entanto, para o composto tetraaril TBr4HPP verifica-se um aumento do valor de concentração para 620



e 765nM, respectivamente. Este aumento sugere que o tratamento fotodinâmico com este sensibilizador não introduz modificações irreversíveis na célula e que esta parece ser capaz de recuperar dos danos causados pela terapêutica. Nos seus trabalhos com tetraarilporfirinas e diarilporfirinas, Banfi *et al.* (2006), também demonstraram que as diarilporfirinas são muito mais activas que as tetraarilporfirinas correspondentes. Na linha celular de adenocarcinoma do cólon HCT116, obtiveram um IC50 médio de 10nM para as diarilporfirinas e apenas 344nM para as tetraarilporfirinas.

A citotoxicidade intrínseca dos sensibilizadores foi analisada através da incubação com omissão da irradiação no protocolo de tratamento. Para a tetraarilporfirina TBr4HPP não foi possível calcular o IC50 nestas condições experimentais, sendo superior à concentração máxima testada, 10µM. Assim, provou-se que a activação pela luz é um requisito fundamental para a actividade citotóxica deste sensibilizador. Também para a diarilporfirina BBr2HPP a fototoxicidade intrínseca (ausência de activação pela luz) é muito diferente da fototoxicidade obtida quando as células são irradiadas, sendo o IC50 de 7,08µM para as 24 horas. Uma vez que num contexto clínico, os sensibilizadores seriam administrados por via sistémica, e que vários estudos (Bergmann *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 1990; Pittet *et al.*, 2007) utilizaram linhas celulares humanas de fibroblastos para avaliar a toxicidade dos sensibilizadores em células não tumorais, avaliou-se a citotoxicidade dos sensibilizadores na linha celular humana de fibroblastos, HFF-1. Para além disso verificou-se que para ambos os sensibilizadores estudados os IC50 só são atingidos para concentrações muito elevadas (BBr2HPP: 7,07µM e TBr4HPP: 8,07µM, para as 24 horas após administração) e superiores às concentrações terapêuticas. As concentrações terapêuticas dependem do IC50 nas células tumorais que é muito mais baixo. Confirma-se também nas células normais a baixa toxicidade destes compostos caso não ocorra activação pela luz.

O ensaio do MTT dá alguma informação acerca da capacidade proliferativa e da função mitocondrial da célula, no entanto não mostra as alterações que levam a activação das vias de morte. Para tal avaliação, recorreu-se à citometria de fluxo. Esta técnica permitiu analisar a viabilidade celular através da dupla marcação com An-V/IP, o potencial de membrana mitocondrial através da sonda JC-1 e a produção intracelular de ROS através da marcação com DCFH2-DA e DHE. Para realizar esta análise, escolheram-se as concentrações a administrar para o tratamento das culturas celulares com base nos resultados preliminares dos ensaios do MTT. Procedeu-se ao tratamento fotodinâmico com 1 $\mu$ M de BBr2HPP e 1 $\mu$ M de TBr4HPP por ser uma concentração para a qual se esperava existir efeito do tratamento em ambos os casos. Para além desta concentração, pretendia-se analisar o tratamento em concentrações aproximadas das correspondentes ao IC50 para cada sensibilizador. No caso do sensibilizador BBr2HPP procedeu-se à análise por citometria de fluxo utilizando a concentração de 150nM, tendo-se vindo posteriormente a confirmar o IC50 em 180nM para o protocolo utilizado. No entanto, para o sensibilizador TBr4HPP não se estabeleceu uma aproximação tão boa. A avaliação foi feita com 250nM e o IC50 veio a verificar-se ser 464nM. Apesar desta limitação no desenho experimental, foi possível tirar várias conclusões.

A An-V é um corante aceite para a detecção de apoptose, que ao ligar-se à fosfatidilserina indica a translação desta proteína do folheto interno para o folheto externo da membrana nuclear. Por sua vez, o IP marca células em necrose devido aos poros que ocorrem na membrana, e é excluído de células apoptóticas e viáveis onde a membrana está intacta (Zelenkov *et al.*, 2007). Verificou-se que o tratamento fotodinâmico baseado em BBr2HPP e TBr4HPP induz morte por necrose. Para o tratamento com BBr2HPP (1 $\mu$ M e 150nM), a análise estatística mostrou diferenças

significativas ( $p < 0,05$ ) ou muito significativas ( $p < 0,001$ ) em relação às culturas celulares controlo, havendo diminuição da população de células viáveis e aumento da população de células em necrose para todos os tempos de PDT testados (24, 48 e 72 horas). Para o sensibilizador TBr4HPP encontraram-se diferenças significativas em relação às culturas celulares controlo para a análise 24 horas após o tratamento com  $1\mu\text{M}$ . No entanto, a população de células vivas de BBr2HPP é significativamente menor que a de TBr4HPP, o que confirma a melhor acção fotodinâmica do primeiro sensibilizador. O tratamento fotodinâmico com  $250\text{nM}$  de TBr2HPP não introduz diferenças em relação às culturas controlo, no entanto, sendo este valor de concentração, uma má aproximação do IC50 não é possível tirar conclusões. Um aspecto interessante do tratamento do  $1\mu\text{M}$  TBr4HPP é a tendência para aumento de viabilidade ao longo do tempo. Verifica-se que a população de células vivas às 48 horas é tendencialmente maior que às 24, e a população de células viáveis às 72 horas é tendencialmente maior que as 48 e é praticamente igual às culturas controlo. Pode estabelecer-se a mesma relação para as populações de células em necrose. Pelo ensaio do MTT verificou-se que a concentração necessária para obter IC50 aumenta ao longo do tempo sugerindo que o tratamento não é efectivo, havendo uma tendência para a recuperação por parte das células WiDR. Os resultados de viabilidade obtidos por citometria de fluxo são concordantes com este resultado.

Pela análise de viabilidade celular conclui-se que o sensibilizador mais eficaz é a diarilporfirina BBr2HPP e que a via de morte activada por estes sensibilizadores é a necrose. Curiosamente, a maior parte dos trabalhos publicados mostraram que a PDT baseada em derivados porfirínicos tetraaril induz morte principalmente por apoptose (Banfi *et al.*, 2004; Marchal *et al.*, 2004). No entanto, Mikes *et al.* 2007 reportaram a prevalência de morte celular por necrose em células de adenocarcinoma colo-rectal.

Vários trabalhos mostraram que o balanço entre morte celular por apoptose ou necrose depende da intensidade da reacção fotodinâmica (Mikes *et al.*, 2007). Para o tratamento fotodinâmico realizado neste estudo as culturas celulares foram submetidas a uma energia total de 10J com uma potência de 7,5mW. Como perspectiva futura, seria pertinente verificar se o tratamento com os sensibilizadores estudados utilizando menores energias e potências activam a mesma via de morte.

No entanto, está também comprovado que o mesmo sensibilizador pode induzir diferentes tipos de morte de acordo com a linha celular onde é estudado (Leung *et al.*, 2002; Mikes *et al.*, 2007). Para a linha celular de adenocarcinoma colo-rectal HT29 foi provado que independentemente da intensidade da reacção fotodinâmica a morte ocorre principalmente por necrose (Mikes *et al.* 2007). A proteína p53 é capaz de promover a apoptose quer por mecanismos independentes da transcrição, quer por activação transcricional de proteínas pró-apoptóticas como a Bax ou ainda por repressão de genes anti-apoptóticos. Na linha celular HT29 ocorre uma mutação da p53 associada a sobre-expressão desta proteína, provavelmente devido à produção de uma forma mais estável (Rodrigues *et al.*, 1990). Mikes *et al.* (2007) sugeriram que esta mutação de p53 nas HT29 pode estar relacionada com a sensibilidade à PDT que inclina o balanço da morte celular em direcção da necrose. Curiosamente, analisando o perfil genético das linhas celulares humanas de adenocarcinoma colo-rectal HT29 e WiDR, verifica-se que em ambas há sobre-expressão da proteína p53 como consequência de uma substituição da histidina na posição 273 por uma arginina (Rodrigues *et al.*, 1990). Tendo em conta esta análise, a activação da via de morte por necrose em resposta ao tratamento fotodinâmico com os sensibilizadores estudados pode estar intimamente relacionada com o perfil genético da linha celular de adenocarcinoma colo-rectal que foi utilizada ao longo deste

---

estudo e não só com as características fotoquímicas e fotofísicas dos sensibilizadores BBr2HPP e TBr4HPP.

Apesar dos protocolos de PDT que favorecem a morte por apoptose serem recomendados quando esta modalidade é aplicada de forma curativa de neoplasia *in situ*, hoje sabemos que a morte por necrose é acompanhada por activação da resposta inflamatória por parte do hospedeiro. Esta resposta favorece não só a erradicação do tumor a nível local como pode ainda ter consequências positivas sobre tumores que já tenham infiltrado para os tecidos circundantes ou mesmo em relação a células tumorais encontradas longe da área irradiada (Marchal *et al.*, 2005; Mikes *et al.*, 2007). Por este motivo a maior incidência de necrose observada após a PDT não deve constituir uma barreira à futura aplicação clínica.

Tendo em conta que os estudos de microscopia de fluorescência mostraram que os sensibilizadores estudados parecem acumular principalmente na mitocôndria e que está amplamente estabelecido que o primeiro alvo de actuação da PDT é o local de acumulação dos FS, avaliou-se por citometria de fluxo o potencial de membrana mitocondrial pela marcação com JC-1. Os resultados obtidos mostraram uma tendência para o aumento da razão M/A no tratamento com BBr2HPP (150nM e 1µM) e com 1µM de TBr4HPP. Este aumento é indicativo da despolarização da membrana mitocondrial e portanto do envolvimento deste organelo na reacção fotodinâmica e da perturbação na viabilidade celular. Os resultados obtidos são concordantes com os de proliferação e viabilidade celular na medida em que aponta para maior eficácia do tratamento com a diarilporfirina BBr2HPP. Foram encontradas diferenças significativas em relação às culturas celulares controlo apenas para este sensibilizador. Em relação às culturas celulares tratadas com TBr4HPP e analisando o gráfico da figura 21, só é

possível considerar um grande aumento a razão M/A para o tratamento com 1 $\mu$ M para a análise às 24 horas, e esta condição não se mantém ao longo do tempo.

Uma vez que as ROS desempenham um papel central no tratamento fotodinâmico, recorreu-se à utilização de duas sondas específicas para a detecção de peróxidos e do radical superóxido, DCFH2-DA e DHE, respectivamente. Ao contrário do que seria expectável não se verificaram aumentos significativas na concentração de peróxidos e radical superóxido em relação às culturas celulares controlo. Aliás, para o tratamento com o sensibilizador BBr2HPP, considerado mais eficaz, analisando os gráficos da figura 22, observa-se uma tendência para diminuição de peróxido de hidrogénio que é estatisticamente significativa para a análise às 24 horas. Em relação à concentração intracelular de anião superóxido verifica-se apenas uma tendência para o aumento de anião superóxido no tratamento com BBr2HPP. Apesar de termos verificado que a PDT baseada nos sensibilizadores estudados tem efeito fotodinâmico, nestas condições experimentais, não se verificam aumentos significativos de peróxidos ou de radical superóxido (figura 22 e figura 23). Uma hipótese explicativa para este resultado, é a formação de outras ROS ainda mais lesivas para a célula como o radical hidroxilo ou o oxigénio singleto. Infelizmente não foi possível avaliar a concentração destas ROS, no entanto, esta explicação é perfeitamente plausível na medida em que particularmente o oxigénio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) é considerado a principal ROS produzida pela reacção fotodinâmica (Hopper, 2000; Ortel *et al.*, 2009)

É ainda possível postular outra hipótese. A PDT requer oxigénio molecular durante a reacção para a formação de ROS. Nos tecidos normais os níveis de oxigénio variam entre 5 e 10% enquanto nos tecidos tumorais esses valores costumam variar entre 0 e 5%, havendo nas células tumorais uma condição de hipóxia típica. Em adição a esta condição a PDT aumenta a hipóxia por consumir oxigénio dos tecidos. A PDT também

---

pode destruir a microcirculação dos tumores, por indução da falta de oxigenação tumoral, o que, indirectamente, também causa hipóxia (Gallagher *et al.*, 2005). As ROS têm um tempo de vida limitado (O'Connor *et al.*, 2009). Tendo em conta estes dados bibliográficos e que a avaliação de ROS foi realizada apenas 24 horas após a reacção fotodinâmica, as ROS produzidas podem já ter-se dissipado, após introduzir danos nas células, e no momento de avaliação as células estarem em condição de hipóxia.

Inicialmente demonstrou-se que os sensibilizadores têm efeito directo *in vitro* sobre a proliferação e viabilidade das células de adenocarcinoma colo-rectal, WiDr. Com esta certeza, avançou-se para os estudos *in vivo*. Existem vários estudos *in vitro* sobre a eficácia de sensibilizadores, no entanto, o mesmo não se verifica relativamente a sua eficácia em modelo-animal. Optimizou-se um modelo animal em ratinhos *Balb/c nu/nu* de forma a obter desenvolvimento reprodutível de xenotransplantes, tendo-se optado pela injeção de  $4 \times 10^6$  células, num volume de  $100 \mu\ell$ , administrados na região dorsal. Quando os tumores atingiram um volume com valores entre  $300$  e  $500 \text{mm}^3$ , realizou-se o tratamento fotodinâmico com os sensibilizadores BBr2HPP e TBr4HPP. Para cada sensibilizador avaliaram-se três esquemas de tratamento que consistiram na administração do fármaco e irradiação do tumor 24, 48 e 72 horas depois. Os tumores foram monitorizados ao longo de 12 dias.

Os resultados da PDT *in vivo* mostraram que ambas as formulações não são tóxicas para os ratinhos pois não ocorreram mortes como consequência da administração. A formulação que serviu de veículo aos sensibilizadores tem como base o polietilenoglicol, um poliéter de cadeia longa solúvel em água que é largamente usado com veículo farmacêutico e é recomendado para a administração do Foscan® (Ris *et al.*, 1999). O protocolo utilizado levou a uma diminuição significativa do crescimento tumoral em relação aos grupos controlo não tratados. Verificou-se que o intervalo entre

a injeção e a irradiação influencia a diminuição do crescimento tumoral em resposta ao tratamento e é diferente para os dois sensibilizadores estudados. Enquanto que para o BBr2HPP os melhores resultados surgem quando a irradiação ocorre 72 horas após a injeção, para o TBr4HPP verificam-se os melhores resultados para as 48 horas. Estas diferenças deverão estar relacionadas com a biodistribuição e a eliminação dos sensibilizadores, que deverá ser mais lenta no caso do BBr2HPP.

BBr2HPP e TBr4HPP provaram ter efeito fotodinâmico *in vivo* em concentrações baixas. Vários sensibilizadores, incluindo o Photofrin® e várias ftalocianinas, têm sido tipicamente usados em concentrações iguais ou superiores a 5mg/kg para realizar PDT e obter efeitos em xenotransplantes de adenocarcinoma colo-rectal. Em xenotransplantes da linha celular HT29, o Photofrin® foi usado numa dose de 30mg/kg (Lim *et al.*, 2009).

Para tirar mais conclusões acerca dos resultados obtidos nos estudos *in vivo* seria necessário aumentar o tamanho da amostra estudada. No entanto, verifica-se uma tendência para a concordância destes resultados com os obtidos a partir dos estudos *in vitro* que apontam para que a diarilporfirina seja mais promissora que a tetraarilporfirina. Para o protocolo de irradiação às 72 horas após a administração de BBr2HPP verificam-se 5 em 6 eventos logo ao segundo dia de monitorização. Curiosamente, Bourré *et al.* (2003), testaram uma hidroxifenil-porfirina *in vivo*, e concluíram que o intervalo de 12 horas entre a injeção e a irradiação fornece melhores resultados que 24 horas. Este composto deverá ser distribuído e eliminado mais rapidamente que o BBr2HPP e o TBr4HPP, provavelmente devido à contribuição dos halogéneos, que apesar das boas propriedades fotofísicas e fotoquímicas que introduzem nas moléculas, possam talvez contribuir para retardar a sua distribuição.



Os resultados dos estudos *in vivo* sugerem que BBr2HPP e também TBr4HPP são candidatos dignos de estudos aprofundados em modelo animal. Para além dos estudos realizados, de forma a avaliar a aplicabilidade dos sensibilizadores em PDT, seria importante realizar estudos de biodistribuição e farmacocinética, de forma a determinar a taxa de depuração dos sensibilizadores a partir de tecidos diferentes. Estes estudos podem ser realizados com recurso à fluorescência destas moléculas utilizando sistemas de fluorescência *in vivo* (Lim *et al.*, 2009), por medição fluorimétrica (Douillard *et al.*, 2009) ou ainda por marcação radioactiva dos sensibilizadores (Westerman *et al.*, 1998). As medições de fluorescência, que são não invasivas e permitem determinar o momento em que existe maior concentração de fotossensibilizador nos tumores, podem permitir otimizar o diagnóstico e a terapia. No entanto, esta tecnologia não é suficientemente precisa para conhecer a concentração em cada órgão, sendo uma boa alternativa a marcação radioactiva dos sensibilizadores (Westerman *et al.*, 1998). Westermann *et al.* provaram que a marcação radioactiva de sensibilizadores não altera as suas propriedades fotoquímicas, nomeadamente comprimentos de onda de emissão e de absorção. Para além da análise referida fica ainda como perspectiva de estudos futuros a investigação das condições de optimização do protocolo de modo a compreender a dependência da eficácia PDT da concentração de sensibilizador administrado, do intervalo entre a administração e a irradiação e energia total de luz fornecida.

Após os 12 dias de *follow-up* do tratamento fotodinâmico, os animais foram sacrificados tendo-se realizado a excisão dos xenotransplantes, o que permitiu a realização de alguns estudos *ex vivo*. Para cada tumor procedeu-se à análise de viabilidade, do potencial de membrana mitocondrial e da concentração intracelular de ROS por citometria de fluxo, utilizando a mesma metodologia dos estudos *in vitro*. Para além disto procedeu-se ainda à análise histológica com recurso à coloração com H&E.

Em relação à avaliação por citometria de fluxo dos parâmetros acima descritos não se verificaram diferenças entre os tumores dos ratinhos dos grupos tratados em relação ao grupo controlo. A maior parte das células analisadas encontraram-se viáveis e com a membrana mitocondrial polarizada. Das células não viáveis verificou-se que a maior parte estava em necrose, quer para os grupos tratados, quer para o grupo controlo. Para ambos os sensibilizadores também não se verificaram diferenças na produção intracelular de ROS, havendo aliás, uma tendência para a diminuição nos grupos tratados. Esta ausência de diferenças poderá explicar-se pelo facto de esta avaliação ter sido realizada apenas 12 dias após o tratamento fotodinâmico, ou seja, após o *follow up* necessário à realização dos estudos *in vivo*.

A análise histológica confirmou que a principal via de morte activada é a necrose. Tendo em conta a geometria aproximadamente esférica do tumor, é comum a existência de um núcleo central de células não viáveis. As células periféricas têm um suprimento sanguíneo mais adequado, e por isso no núcleo frequentemente ocorrem células em apoptose e/ou necrose e maioritariamente em situação de hipóxia (Abrantes, 2007). Nos tumores do grupo controlo foi possível identificar neste núcleo central de células não viáveis, que sofreram morte por necrose. A análise histológica dos xenotransplantes submetidos ao tratamento fotodinâmico demonstrou a presença de células tumorais viáveis após o tratamento, apesar das extensas áreas de necrose. Este resultado reforça a necessidade de otimizar o protocolo em termos de concentração do sensibilizador e de luz a aplicar. De qualquer modo, como perspectiva futura, seria interessante verificar a extensão de necrose tumoral por estudos de histomorfometria.

Os resultado da análise histológica vêm corroborar a hipótese postulada anteriormente de que as células WiDR, assim como as HT29, têm tendência a morrer mais por necrose, devido à mutação da p53 que reprime a apoptose (Mikes *et al.* 2007).

Para além destes resultados, outros estudos em que foram utilizados sensibilizadores com a estrutura de base clorina, revelaram por análise histológica que é induzida morte por necrose em xenotransplantes de adenocarcinoma colo-rectal (Hajri *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2009).

A terapia fotodinâmica baseada na utilização dos sensibilizadores BBr2HPP e BBr4HPP têm a capacidade de induzir morte celular por necrose em células de adenocarcinoma colo-rectal *in vitro* e *in vivo*. Os sensibilizadores estudados exibem pelo menos algumas das características de fotossensibilizadores ideais. Têm uma banda de absorção forte a comprimentos de onda relativamente longos, são eficazes na formação de oxigénio singlete nas condições estudadas e não apresentam citotoxicidade intrínseca (no escuro) em concentrações terapêuticas. O seguimento dos animais injectados não deu evidências de que tenham efeitos secundários nas concentrações administradas e mostrou que têm efeito fotodinâmico significativo em doses relativamente baixas. Os resultados das experiências que conduziram a esta dissertação apontam, no entanto, para a necessidade de aprofundar esta investigação, particularmente, ao nível da biodistribuição e farmacocinética dos sensibilizadores, assim como a optimização do protocolo de tratamento.

