UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

*ANÁLISE DA NECROSE EM TECIDOS NORMAIS
FOTOSENSIBILIZADOS PÓS TERAPIA
FOTODINÂMICA - ESTUDO IN VIVO.*

Juliana Ferreira

—RIBEIRÃO PRETO—
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

*ANÁLISE DA NECROSE EM TECIDOS NORMAIS
FOTOSENSIBILIZADOS PÓS TERAPIA
FOTODINÂMICA - ESTUDO IN VIVO.*

Juliana Ferreira

—RIBEIRÃO PRETO—
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANÁLISE DA NECROSE EM TECIDOS NORMAIS
FOTOSENSIBILIZADOS PÓS TERAPIA FOTODINÂMICA – ESTUDO
IN VIVO.

Dissertação apresentada ao Departamento
de Patologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas.

Aluna: Juliana Ferreira
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Zucoloto
Co-orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Ferreira, Juliana

Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós Terapia Fotodinâmica – Estudo *in vivo*. / Juliana Ferreira. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Orientador: Sérgio Zucoloto

Co-orientador: Vanderlei Salvador Bagnato

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, necrose, fígado, porfirina.

DEUS

*Passei tanto tempo te procurando
Não sabia onde estavas, olhava para o infinito, e não te via.
E pensava comigo mesmo, será que tu existes?
Não me contentava com a busca e prosseguia.
Tentava te encontrar nas religiões e nos templos.
Tu também não estavas.
Busquei-te através dos sacerdotes e pastores,
Também não te encontrei.
Senti-me só, vazio, desesperado e descri.
E na descrença te ofendi. E na ofensa tropecei,
E no tropeço cai. E na queda senti-me fraco.
Fraco procurei socorro. No socorro encontrei amigos
Nos amigos encontrei carinho. No carinho eu vi nascer o amor
Com amor eu vi um mundo novo. E no mundo novo resolvi viver...
O que recebi, resolvi doar. Doando alguma coisa muito recebi
E em recebendo senti-me feliz. E ao ser feliz, encontrei a paz
E tendo a paz foi que enxerguei
Que dentro de mim é que tu estavas
E sem procurar-te foi que te encontrei.*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Cláudio Ferreira e Auriete B. C. Ferreira.

"A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade; a vocês que me iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheia de esperança. A vocês, pais por natureza, por opção ou amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Portanto, faço da minha conquista um instrumento de gratidão, por tudo quanto recebi de vocês".

Dedico a vocês este trabalho

Muito Obrigada!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus avós Leonilda Martins Ferreira e Francisco Caputo

Por todo amor e carinho que sempre me deram; por acreditarem e me apoiarem sempre.

À minha irmã Isabelle Ferreira

Mesmo distante, sempre torceu por mim, me apoiando e incentivando.

Amo muito vocês!!!

Às amigas Cristina Kurachi, Cláudia Melo e Lilian Tan Moriyama

Pela amizade, paciência, carinho e dedicação; pela disposição, disponibilidade e boa vontade em sempre ajudar, deixando muitas vezes seus compromissos e afazeres para me auxiliarem, estando nos momentos mais difíceis ao meu lado. Agradeço muito pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao técnico e amigo Clóvis

Pela amizade e atenção durante todo este tempo; pelo auxílio e boa vontade em ajudar na realização deste trabalho. Deixo a você meu muito obrigada.

Aos amigos Vitória, Mônica, Gláucia e Augusto

Pelo carinho, paciência, amizade e pela compreensão; pelas conversas e risadas e pelo ombro nas horas do desabafo. Agradeço à vocês pelo apoio, pela ajuda e confiança; pelo incentivo e por acreditarem no meu trabalho.

À Prof^a Edna

Pelo carinho, pela amizade e atenção durante anos. Agradeço pela disposição em me ajudar na correção do trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Marcassa

Pelo auxílio, pela amizade e por participar deste trabalho, estando sempre disponível para me ajudar e ensinar os princípios da física.

Aos funcionários do Instituto de física de São Carlos, Isabel e Bene e do Departamento de Patologia da FMRP, Neide.

Agradeço pela atenção e carinho, estando sempre disposta a me ajudar.

Às técnicas do Dep. de Patologia da FMRP Márcia e Laura

Agradeço pela ajuda, dedicação, paciência, amizade e carinho com que sempre me receberam; pelo auxílio na realização do presente trabalho.

Às funcionárias do Biotério do Departamento de Patologia da
FMRP, Ivone e Cida.

Pelo carinho e boa vontade em que me receberam; por me
auxiliarem nos cuidados com os animais e por atenderem aos
meus pedidos sempre que possível.

Aos demais amigos e colegas e a todos os funcionários do IFSC
e da FMRP

Que de alguma forma contribuíram para a realização deste
trabalho. Agradeço pela amizade, pelo carinho e pela torcida.

*"A todos aqueles que em algum momento se colocaram
disponíveis, para que hoje, juntos e felizes, pudéssemos
participar dessa conquista, minha gratidão. A nossa amizade
àqueles que nos quiseram bem. O nosso perdão àqueles que por
motivos alheios à nossa vontade não nos compreenderam e nem
se fizeram compreender. As nossas desculpas se houve
momentos que não foi possível mudar. A nossa compreensão
pela coragem que tivemos para mudar aquilo que pudemos. É
preferível fazer, a nada fazer pelo medo de errar. Nossos
agradecimentos àqueles que confiaram na honestidade do
nosso trabalho. Tentamos fazer o melhor".*

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Zucoloto

Agradeço pela confiança, paciência, pelos conhecimentos transmitidos, por sua orientação, tornando-se uma pessoa fundamental na minha formação profissional.

"Quem dera um dia pudéssemos medir nossos conhecimentos e saber exatamente quando deixamos de ser aprendiz para, enfim, haver-mo-nos tornado Mestre. Conhecemos a utopia do saber completo, mas não apraz da mediocridade total. Aprendemos aos poucos, a necessidade de aprender e somos gratos àqueles que têm se dedicado à tarefa de nos ensinar, e àqueles que se têm esforçado em nos mostrar que "sábio não é aquele que ensina, mas sim o que sabe aprender".

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Agradeço pela oportunidade de trabalhar com algo novo e maravilhoso; de conhecer o "mundo da física", abrindo meus horizontes e me ensinando o que é fazer ciência.

Agradeço pela dedicação, paciência, confiança e amizade durante o momento mais importante da minha formação profissional. Você é um dos grandes responsáveis por esta conquista. Expresso toda minha admiração e respeito.

"O merecimento maior é do homem que se encontra na arena com o rosto manchado de sangue, suor e poeira... Que conhece os grandes entusiasmos, as grandes devoções; Que sacrifica a si próprio por uma causa digna; E que, quando muito, experimenta no final o triunfo de uma grande realização; E, ... se ele fracassa, pelo menos fracassou ao ousar grandes coisas; E, por isso mesmo, seu lugar nunca pode ser tomado por essas almas tímidas e frias que não conhecem nem vitórias nem derrotas ".

SUMÁRIO

Índice de figuras e tabelas

Abreviações

Resumo

Abstract

I – INTRODUÇÃO.....	01
Considerações Gerais.....	02
Fotossensibilizador.....	07
Princípios da técnica de PDT.....	08
Mecanismo de Ação.....	09
Resposta Celular à PDT.....	11
Limitações da PDT.....	13
O Fígado.....	14
Detecção Óptica por Espectroscopia de Fluorescência.....	16
II – OBJETIVO.....	19
III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
Animais.....	22
Fotossensibilizador.....	22
Fonte de Luz.....	24
Sistema de Detecção Óptico.....	26
1 – Piloto para determinação do Tempo de Necrose.....	27
2 – Penetração da Luz em tecido Hepático Fotossensibilizado.....	28
3 – Mapeamento Térmico.....	29
4 – Estudo da Necrose Hepática pós – PDT.....	30
4.1 – Preparo do Animal.....	30
4.2 – Fotossensibilização.....	31
4.3 – Irradiação.....	31
4.4 – Detecção de HpD pelo Sistema de Detecção Óptico	32
4.5 – Sacrifício, Remoção e Preparo do Material.....	32
4.6 – Macroscopia.....	33
4.7 – Microscopia.....	33
4.8 – Morfometria do Epitélio Hepático.....	33
4.9 – Cálculos Estatísticos.....	34

4.9.1 – Teste de Mann-Whitney.....	34
4.9.2 – Teste de Kruskal-Wallis	35
4.9.3 – Teste de Friedman.....	36
IV – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
1 – Piloto para Determinação do Tempo de Necrose.....	38
2 – Indução da Necrose Hepática.....	40
3 – Indução da Necrose Hepática pelo Dispositivo à Base de LEDs	41
4 – Análise dos Espectros de Fluorescência.....	42
V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
VI – CONCLUSÕES.....	70
VII – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	72
Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Distribuição das Causas de Morte	3
Figura 2 - Estimativa de Mortalidade Feminina para os Tumores mais Frequentes..	3
Figura 3 - Estimativa de Mortalidade Masculina para os Tumores mais Frequentes.	4
Figura 4 - Estimativa do Número de Pacientes Tratados por PDT.....	5
Figura 5 – Ativação do Photogem [®] pela luz	10
Figura 6 – Evolução do CBC em Paciente submetido a PDT.....	12
Figura 7 - Evolução do CBC Ulcerado em Paciente submetido a PDT.....	12
Figura 8 – Fatores Envolvidos na PDT.....	14
Figura 9 – Estruturas Anatômicas do Fígado.....	16
Figura 10 – Evolução Temporal do Pico de Fluorescência do FS.....	17
Figura 11 – Evolução Temporal do Espectro de Fluorescência do FS.....	18
Figura 12 – Alojamento para Animais.....	22
Figura 13 - Photogem [®] (FS russo).....	23
Figura 14 – Estrutura Molecular do FS.....	23
Figura 15 – Espectro de Absorção do Photogem [®]	24
Figura 16 – Tipos de Lasers	25
Figura 17 – Fibra Óptica para Iluminação Direta, Acoplada ao Laser de Diodo.....	25
Figura 18 – Dispositivo à Base de LEDs Vermelhos	26
Figura 19 – Sistema de Diagnóstico.....	26
Figura 20 – Delimitação da Área Iluminada.....	28
Figura 21 – Níveis de intensidade de Luz no Fígado.....	29
Figura 22 – Irradiação.....	31
Figura 23 – Leitura de Fluorescência.....	32
Figura 24 – Espectros de Fluorescência.....	45
Figura 25 – Concentração do FS no Tecido Hepático.....	46
Figura 26 – Decaimento Exponencial da Intensidade.....	47
Figura 27 – Profundidade de Penetração Luminosa.....	48
Figura 28 – Sistema Experimento para o Mapeamento Térmico.....	49
Figura 29 – Conversão de Energia.....	50
Figura 30 – Esquema de Iluminação do Fígado.....	51
Figura 31 – Perfil de Intensidade e de Necrose.....	52
Figura 32 – Profundidade de Necrose em Função da Dose de Energia.....	55

Figura 33 – Profundidade de Necrose em Função da Concentração do FS.....	56
Figura 34 – Profundidade de Necrose em Função dos Tratamentos.....	56
Figura 35 – Profundidade de necrose em Função da Fonte de Luz.....	57
Figura 36 - Profundidade de necrose em Função da Fonte de Luz ($s/n^{1/2}$).....	57
Figura 37 – Espectro de Fluorescência do Tecido com e sem FS.....	58
Figura 38 – Alteração Hepática Imediatamente após a PDT.....	60
Figura 39 – Alteração Hepática 30h após a PDT.....	60
Figura 40 – Classificação da Necrose Hepática.....	63
Figura 41 – Fotomicrografias do Tecido Hepático	
A e B	64
C e D.....	65
E e F	66
G e .H.....	67
I e J.....	68
K e L.....	69
Tabela 1 – Divisão dos Grupos Experimentais.....	30
Tabela 2 – Descrição Estatística	54
Tabela 3 – Desvio entre a necrose e o pré-PDT.....	59
Tabela 4 – Alterações Microscópicas.....	62

ABREVIACÕES

PDT – Photodynamics Therapy (Terapia Fotodinâmica)

HpD – Derivado de hematoporfirina

FS – Fotossensibilizador

CBC – Carcinoma Basocelular

HCH – Carcinoma Hepatocelular

LED – Light emission diodo (diodos emissores de luz)

μ - micro

λ - Comprimento de onda

P – Potência da fonte de luz

I – Intensidade da luz

DE – Dose de Luz

T – tempo de irradiação

nm – nanômetros

W – Watts

J – Joule

RESUMO

O conceito de PDT é a fotoindução da citotoxicidade das células proliferativas envolvendo um agente fotossensibilizador, uma fonte de luz e oxigênio. Apesar de ser uma terapia eficiente no tratamento de várias neoplasias, a PDT apresenta algumas limitações dentre as quais a não seletividade em células do tecido hepático. O presente trabalho avaliou a correlação entre penetração luminosa e necrose, assim como a extensão da mesma em função da concentração do fotossensibilizador utilizado (Photogem[®]) e de três diferentes doses de energia. A transição do epitélio necrosado e do epitélio sadio, foi realizada após a irradiação de fígados normais de ratos previamente fotossensibilizados. O acúmulo do Photogem, administrado via endovenosa, no fígado, foi investigado através da espectroscopia de fluorescência. As fontes de luz utilizadas para irradiação foram um laser de diodo de 630nm e um dispositivo a base de LEDs (diodos emissores de luz). Observamos que o tecido hepático normal, fotossensibilizado, apresenta suas características ópticas alteradas, evidenciadas nos estudos de penetração da luz e alteração térmica durante a irradiação, refletindo na profundidade da necrose. Verificamos que a presença do FS no tecido alvo diminui a penetração da luz, levando a um aumento da temperatura, devido à grande quantidade de energia absorvida pelo FS, a qual é dissipada na forma de calor. Notamos uma abrupta delineação da necrose correspondendo à queda de intensidade luminosa no tecido iluminado. A profundidade de necrose obtida com o uso do LED apresentou uma pequena variação, devido à linha espectral do mesmo ser mais larga, quando comparado ao laser. Histologicamente o tecido hepático e irradiado apresentou necrose coagulativa, infiltrado inflamatório neutrofílico e necrose da veia centrolobular em todos os grupos experimentais; também observamos uma nítida delimitação entre o tecido epitelial normal e o tecido epitelial fotossensibilizado. Estes resultados serão importantes para o desenvolvimento de estratégias para um possível protocolo para aplicação da PDT em tumores malignos hepáticos.

ABSTRACT

The PDT concept is the photo induction of the cytotoxicity of proliferating cells involving a photosensitizer agent, a light source and oxygen. Despite being an efficient therapy on the treatment of several neoplasias, PDT presents some restrictions including the non-selectivity in hepatic tissue cells. This work evaluated the correlation between light penetration and necrosis, as well as the extension of such as function of the concentration of the photosensitizer used (Photogem) and three different doses of energy. The necrosed epithelium and healthy epithelium transition was performed after the irradiation of normal livers of previously photosensitized rats. The Photogem accumulation, intravenously administrated, on the liver was investigated through fluorescence spectroscopy. The light sources used for irradiation were: diode laser operating at 630 nm and a LEDs (Light Emitting Diode) device. We observe that the photosensitized normal hepatic tissue presents its optical characteristics altered, which was previously evidenced on the studies of light penetration and thermal alteration during the irradiation, altering the necrosis depth. We checked that the photosensitizer presence on the target tissue decreases the light penetration leading to a temperature increase, due to a large amount of energy absorbed by the photosensitizer, which is dissipated by means of heat. We noticed an abrupt necrosis delineation corresponding to the drop of the light intensity on the irradiated tissue. When the LED was used, the necrosis depth presented little variation, due to its spectral line being larger when compared to the laser's spectral line. Histological, the irradiated hepatic tissue presented coagulative necrosis, inflammatory infiltration neutrophilic and centrilobular vein necrosis in all experimental groups, we also observed a clear delimitation between normal epithelial tissue and photosensitized tissue. These results will be important to the development of strategies for a possible protocol for the PDT application on hepatic malign tumors.

I INTRODUÇÃO

Considerações Gerais

O Brasil continua a apresentar um quadro sanitário em que se combinam doenças ligadas à pobreza, típicas dos países em desenvolvimento, e doenças crônico-degenerativas, características dos países mais afluentes. Essa situação reflete, inquestionavelmente, as contradições do processo de desenvolvimento do País. Analisando-se as taxas de mortalidade das macrorregiões do Brasil, o câncer é encontrado em diferentes posições, mas sempre incluído entre as primeiras causas de morte, ao lado das doenças do aparelho circulatório, causas externas, doenças do aparelho respiratório, afecções do período peri-natal e doenças infecciosas e parasitárias (figura 1) [1].

O ministério da saúde estima que, para 2003, em todo o Brasil, ocorrerão 402190 casos novos e 126.960 óbitos por câncer. A distribuição das taxas de incidência e mortalidade de tumores malignos tem sido, em muitos países, de grande importância para o estabelecimento de diretrizes de políticas públicas e o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer e de assistência paliativa, em âmbito nacional, estadual e municipal. Dados estatísticos representam um componente essencial dos programas de vigilância em saúde pública, pois, permitem estimar a magnitude relativa dos problemas de saúde na população, conseqüentemente facilitando o estabelecimento de prioridades em ações preventivas e terapêuticas (figuras 2 e 3) [1].

O câncer sempre ocupou um lugar de destaque na Medicina Moderna, principalmente quando se avalia o campo de diagnóstico e tratamento. O tratamento de tumores malignos é uma área que vem conseguindo grande avanço nos últimos anos, e alcançado um grau de sucesso bastante satisfatório. Os resultados da terapêutica do câncer dependem de fatores que se relacionam ao indivíduo e ao tumor. Quanto aos aspectos individuais, há que se considerar a compatibilidade da condição clínica e psicológica do paciente com o tratamento proposto, além dos efeitos deste tratamento na sua vida pessoal e profissional. No que diz respeito aos aspectos tumorais, o tipo histológico, o grau de diferenciação do tumor, a extensão da doença e a sensibilidade à terapêutica, determinam a melhor opção de tratamento para o paciente [1].

Figura 1 – Gráfico da distribuição proporcional das principais causas de morte de 2002 (dados provenientes do INCA).

Figura 2 – Gráfico das taxas brutas de mortalidade, por 100.000 mulheres, para os tumores mais frequentes no Brasil, 1979 – 2000 e projeções para 2003 (fonte: <http://www.inca.gov.br>).

Figura 3 – Gráfico das taxas brutas de mortalidade, por 100000 homens, para os tumores mais frequentes no Brasil, 1979 – 2000 e projeções para 2003 (fonte: <http://www.inca.gov.br>).

O tratamento oncológico envolve eliminação do tumor, seja por via mecânica (remoção cirúrgica), via química (quimioterapia) ou por radiação ionizante (radioterapia), e estas são as bases da maioria dos tratamentos hoje existentes. Todas as terapias têm mostrado eficiência, principalmente quando a doença é detectada nos seus estágios iniciais. Apesar deste sucesso, ainda temos inúmeros casos onde as técnicas convencionais se mostram bastante limitadas. Para muitos casos, a única opção tem sido a cirurgia radical, comprometendo a função e a anatomia do órgão ou região residual. Isto mostra que o tratamento oncológico ainda tem espaço para muito desenvolvimento e inovação [2]. Atualmente, toda comunidade científica tem realizado esforços no sentido de desenvolver e implementar novas técnicas para tratamentos oncológicos. Uma destas novas alternativas é denominada de Terapia Fotodinâmica (PDT, acrônimo de Photodynamic Therapy) [3]. Esta é uma modalidade de tratamento que vem crescendo de forma vertiginosa nos últimos anos. Dados recentes mostram que o número de pacientes tratados no ano de 2000 deve ter

ultrapassado a casa dos 15.000. A curva mostrada na figura 4, expressa de forma clara o ascendente uso da PDT em todo mundo [2].

Trata-se de uma terapia que induz a citotoxicidade celular, utilizando a luz, um fotossensibilizador e o oxigênio. A relativa simplicidade e eficiência desta técnica têm atraído a comunidade médica de todo o mundo e promovido um grande interesse em profissionais da área da saúde em geral, por se tratar de uma terapia multidisciplinar, envolvendo não só profissionais da área da saúde bem como físicos e químicos.

Figura 4 – Estimativa do número de pacientes tratados pela PDT até 1998 (gráfico adaptado do *PDT in the 21st Century*, de Thomas Dougherty in *Photodynamics News*, volume 3, número 1, 2000).

Hoje, praticamente não há nenhum centro oncológico localizado nos países desenvolvidos que não tenha uma infra-estrutura montada para PDT. Os inúmeros resultados apresentados em todo mundo, comprovam de forma irrefutável a validade desta terapia.

Há quatro pontos importantes a serem considerados na PDT:

- Fotossensibilizador (FS): deve apresentar propriedades como baixa toxicidade no escuro, adequada seletividade para permanecer acumulado nas células neoplásicas e, principalmente, possuir uma banda de absorção na chamada janela biológica. Esta é uma estreita faixa do espectro de radiação onde há relativa penetração nos tecidos biológicos, ao mesmo tempo em que temos excitação dos estados moleculares da droga capazes de promoverem adequada transferência de energia para O_2 , criando a espécie reativa. A estrutura molecular do FS deve ser apropriada. Finalmente, a droga a ser usada deve ser eliminada pelo corpo num período não excessivamente longo; o ideal é que o paciente permaneça fotossensível o menor tempo possível após a iluminação da lesão.

- A fonte de Luz deve ser relativamente monocromática, centrada na banda de absorção do FS utilizado, isto é, na região do espectro na qual a luz pode excitar o FS, transferindo energia a fim de que a reação fotodinâmica seja desencadeada. A não - monocromaticidade da fonte faz com que uma grande quantidade de energia fora da faixa de absorção do FS seja depositada no tecido, causando excessiva reação adversa, como o aquecimento, e diminuindo sua eficiência de atuação.

- A lesão é um dos mais importantes pontos do tratamento com PDT. Sua geometria, localização e tipo celular devem ser considerados com muito cuidado para poder elaborar uma adequada estratégia de aplicação. As características da lesão como a cor, vascularização, invasividade ou o crescimento exofítico, determinarão as propriedades ópticas do tecido alvo, e, conseqüentemente, as interações luz / tecido biológico (reflexão, espalhamento, absorção, transmissão). A lesão deve ser iluminada uniformemente e globalmente, assim como a margem de segurança adotada. O conhecimento da lesão como um todo, sua localização e interação com tecidos adjacentes do organismo, permitem o cálculo adequado da dose de energia a ser ministrada, procurando otimização do tratamento sem causar efeitos colaterais excessivos ao paciente.

- As condições clínicas do paciente, a existência de problemas vasculares, doenças hepáticas ou renais, etc, devem sempre ser avaliados na indicação e no planejamento da terapia.

A técnica de PDT apresenta várias vantagens sobre os métodos tradicionais de tratamento de tumores malignos. Entre elas pode-se citar: dano seletivo às células tumorais, ausência de intervenções cirúrgicas, possibilidade de repetição do procedimento várias vezes se necessário, efeitos colaterais mais controlados e menos adversos. Outra vantagem a ser citada, é que uma vez sensibilizado, o paciente pode ser submetido ao diagnóstico por fluorescência para detecção tumoral. Além disso, o procedimento em geral é ambulatorial, não requerendo internação do paciente.

A PDT tem sido aplicada com os seguintes objetivos: i) Em cânceres no estágio inicial (lesões extensas, lesões múltiplas, localizações inconvenientes na face e orelha), pulmões, esôfago, bexiga (lesões superficiais e múltiplas), cavidade oral e de genitais; ii) com objetivo paliativo para a recanalização de traquéia, brônquios, esôfago, cárdia do estômago ou mesmo para conter o rápido avanço de alguns casos de tumores de pele. Em comparação com a fotoablação (vaporização) por laser, a PDT apresenta menores complicações e maior tempo entre os tratamentos; iii) pode ser utilizada em combinação com técnicas convencionais para recorrência de câncer de pele, cavidade oral, metástase intradérmica, recorrência de câncer de mama na parede do peito e metástase intradérmica de melanoma. Além disso, a PDT também tem sido utilizada para reduzir o volume do tumor antes de uma intervenção cirúrgica, bem como uma profilaxia após uma intervenção cirúrgica com uma pequena margem de segurança, apresentando bons resultados em ambos os casos. Seu principal inconveniente é a fotossensibilidade da pele, quando da administração sistêmica do FS, o que requer que o paciente não seja exposto a luz solar durante um período de 30 dias após a administração do fotossensibilizador. Isto deve ser considerado como um efeito colateral bastante minoritário comparado aos efeitos das demais terapias [2].

Fotossensibilizador

Há vários fotossensibilizadores de primeira geração aprovados e sendo utilizados em tratamentos clínicos. Entre eles podemos citar: Photofrin® (USA, Canadá), Photoscan® (Alemanha), HPD® (China), Photogem® (Rússia), Derivado de Benzoporfirina (Canadá), ácido 5-aminolevulinico (ALA) (Europa e USA). O ALA não é um FS exógeno, mais sim um precursor de FS, pois ele atua nas células

induzindo a produção de protoporfirina IX (banda de absorção centrada em 635 nm). Esta, durante a irradiação, provoca o efeito fotodinâmico nas células. Em geral o ALA é indicado para tumores superficiais de pele (aplicação tópica) e de brônquios (via inalação). Vários outros FS's estão sendo testados em experimentos com animais. Nestes FS's de segunda geração o objetivo é obter compostos que sejam excitados com radiação de comprimentos de onda maiores (onde o tecido biológico absorve menos e, portanto a profundidade de penetração é maior) e que apresentem um período de eliminação mais curto [2].

Princípios Básicos da Técnica de PDT

Nesta última década, pesquisadores americanos e europeus começaram a investigar a possibilidade de utilizar as propriedades da luz laser para a terapia de células cancerosas. O laser é um dispositivo que foi inventado na década de 60 e apresenta propriedades importantes como: concentração elevada de energia, pouca dispersão de energia à medida que a luz se propaga, coerência e monocromaticidade. A monocromaticidade difere grandemente a luz laser da luz comum. O laser, sendo monocromático, permite em estudos experimentais melhor controle de energia específica e tem maior definição na penetração em tecidos biológicos. Apesar de amplamente utilizado como instrumento de corte, devido a sua alta concentração de energia, permitindo vaporização de tecidos, foi somente na década de 90 que o laser se tornou mais presente na medicina por causa de uma característica que é muito usada pelos físicos que trabalham com átomos e moléculas: a seletividade. Com o laser, é possível iluminar um meio cheio de materiais distintos e só interagir com um determinado componente dele. Devido a monocromaticidade do laser, pode-se selecionar sua cor, de tal forma que a luz só interaja com uma determinada molécula dentro de um universo de várias moléculas: a isto chamamos de seletividade. Utilizando essa seletividade, os físicos desenvolveram técnicas extremamente precisas, de modo que se possa detectar um determinado tipo de átomo, na presença de bilhões de átomos, de outros elementos químicos [3].

A técnica que usa a propriedade de seletividade da luz laser para o combate ao câncer emprega uma substância fotossensível (aquela que é alterada quando iluminada) administrada via endovenosa no paciente oncológico. A droga percorre

todo o corpo, sendo absorvida por todas as células. As células sadias eliminam essa droga em um período de tempo que varia entre 24 a 36 horas, diminuindo consideravelmente sua concentração. Já as células tumorais, por apresentarem um metabolismo e características morfológicas diferentes, retêm esta droga por um tempo mais prolongado [2]. Apesar desta retenção não ser muito bem compreendida, alguns fatores são descritos como responsáveis. A permeabilidade da membrana das células tumorais encontra-se alterada, as fibras colágenas que integram o tumor são imaturas e semelhantes às observadas em tecidos embrionários e em processo de cicatrização recente. Essas fibras imaturas apresentam grande capacidade de ligação às porfirinas, constituindo um local para retenção e acúmulo do FS [4, 5, 6]. Outros fatores como a rede linfática pouco desenvolvida, a ligação das porfirinas a lipoproteínas, a presença de macrófagos e o menor pH intracelular, também levam a uma maior concentração da droga em células tumorais [5, 6, 7]. Assim, esperando mais de 24 horas (normalmente de 24 a 48h) após a administração da droga, a substância fotossensível estará mais concentrada nas células neoplásicas, estabelecendo uma diferenciação entre estas células com as demais. Esta substância fotossensível quando iluminada por uma luz laser de cor específica é excitada (isto significa que os elétrons que constituem as ligações moleculares passarão a um estado energético superior ao normal), e uma vez neste estado energético, provoca uma reação química com o oxigênio molecular abundantemente presente nos tecidos, produzindo uma espécie eletrônica do oxigênio (o estado singlete) altamente reativa para os constituintes celulares e, portanto bastante citotóxica. Como consequência disso, a célula neoplásica e o tecido como um todo, são levados à necrose, eliminando a lesão [3].

Mecanismos de Ação

O conceito de PDT é a indução da citotoxicidade das células proliferativas através de uma fonte de luz, sendo necessário um agente fotossensibilizador, luz do comprimento de onda adequado e oxigênio molecular. [8, 9, 10, 11]

Durante a PDT, o FS ligado ao tumor é ativado na presença da luz. Essa ativação leva o FS do estado fundamental ao estado excitado chamado triplete, de meia vida curta. Nessa etapa, as moléculas podem retornar ao estado fundamental

emitindo energia na forma de fluorescência, através da liberação de fótons ou progredir na cadeia de reações químicas até retornar ao estado fundamental. As moléculas no estado triplete podem sofrer dois tipos de reações. Na reação do tipo I, as moléculas interagem diretamente com os substratos biológicos para formar radicais livres como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido. Na reação tipo II, as moléculas transferem sua energia diretamente para o oxigênio, formando o oxigênio singleto altamente reativo e responsável pela morte celular (figura 5) [4, 5, 6, 12, 13, 14, 15, 16].

Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do FS, substratos intracelulares e concentração de oxigênio do meio. Na ausência de oxigênio, o efeito é praticamente inexistente. Em condições de anóxia tecidual ou concentração de oxigênio inferior a 2%, as células tumorais se mostram resistentes à citotoxicidade induzida pela PDT [4, 6, 17, 18].

Figura 5 – Ativação do agente fotossensibilizador pela luz.

A produção de oxigênio singleto é o mecanismo mais importante, para a PDT, porém outro importante mecanismo, já comprovado, é a indução da morte celular por apoptose (morte celular programada), que pode ocorrer por via mitocondrial ou por alteração da membrana plasmática, através da inibição das proteínas da família Bcl-2 (inibidoras da apoptose celular) e ativação das caspases (proteínas iniciadoras e executoras da apoptose) [19]. A droga excitada por si só, é um agente reativo dentro da célula, destruindo vários substratos celulares importantes. A reação fotodinâmica também ocasiona um dano vascular do tumor. A droga ainda presente nos vasos

sanguíneos pode ser excitada promovendo a destruição de pequenos vasos e conseqüentemente a estase sangüínea local.

Além da influência fotoquímica direta nas células neoplásicas tratadas por PDT, há outros mecanismos importantes envolvidos na morte celular. A perturbação do suprimento sangüíneo ao tumor devido à destruição do endotélio dos vasos, pode levar a uma isquemia e hipóxia celular. O efeito hipertérmico, condicionado pela absorção ativa da luz pelas células neoplásicas, também pode causar dano celular. Reações citotóxicas, condicionadas pelo estímulo da produção do fator de necrose tumoral, produzem um infiltrado inflamatório com a migração de macrófagos, leucócitos e linfócitos [3].

Utilizando-se FS sistêmicos, o efeito citotóxico direto induzido pelo oxigênio singlete ocorre, porém, parece ter importância secundária. Estudos histopatológicos, evidenciaram hemorragia no interior do tumor em modelos experimentais e em pacientes que foram fotossensibilizados com FS sistêmico. Possivelmente, a necrose tumoral era secundária à destruição da microvascularização do tumor havendo menor participação do efeito direto da reação tipo II induzida pela terapia [4]. Desta forma o principal mecanismo de destruição tumoral dos FS sistêmicos, parece ser a necrose isquêmica, um tipo de necrose chamada de coagulativa, ocasionada por falta de irrigação sangüínea e conseqüente hipóxia (ausência de oxigenação), comumente encontrada em casos de infarto do miocárdio [14, 20, 21, 22, 23, 24].

Resposta Celular à PDT

Um efeito observado na PDT é a reparação do tecido irradiado. Relatos clínicos demonstram, em alguns casos, um reparo tecidual perfeito, com discreta ou mesmo ausência de fibrose residual. As figuras 6 e 7 mostram dois casos de pacientes submetidos a PDT, no Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP, com utilização do FS sistêmico, Photogem[®]. O tratamento foi realizado em uma única aplicação, resultando na completa eliminação da lesão e reepitelização tecidual.

Figura 6 - Paciente do sexo masculino, 43 anos, apresentando um CBC (carcinoma basocelular) em perna direita. A foto A mostra a lesão inicial exofítica. A foto B logo após a PDT; nota-se o edemaciamento e o processo de exudação da lesão. A foto C apresenta a lesão após 1 mês da PDT, em processo de cicatrização epitelial e a foto D 1 ano após a terapia. Observe a perfeita reepitelização do tecido, sem formação de fibrose tecidual.

Figura 7 – Paciente masculino, 81 anos, apresentando um CBC ulcerado. Foto A apresenta a lesão inicial. B mostra a evolução da lesão 1 mês após a PDT. Após 1 ano, foto C, reparação tecidual completa, importante salientar que não houve enxerto, ocorreu um processo natural de cicatrização.

Este fato pode estar relacionado com o tipo de agravo, resposta vascular e celular. Estes fatores levam a uma exsudação inflamatória aguda com conseqüente necrose celular. A morte celular causada pela PDT, citada anteriormente, sendo uma necrose coagulativa, apresenta como característica a preservação do arcabouço estrutural da célula, e supostamente, um aumento da acidose intracelular

desnaturando não só as proteínas estruturais, como também as proteínas enzimáticas, bloqueando a proteólise da célula [27]. Este fator pode ser um indicativo do tipo e da forma de cicatrização tecidual observada em pacientes submetidos à terapia, pelo fato desta necrose facilitar a regeneração, restauração da estrutura normal do tecido, devido à ausência de autólise e heterólise celular, observadas na necrose liquefativa.

Determinar a dose de luz e a concentração do FS a serem utilizados na PDT, são fatores extremamente importantes. Estes dois fatores, quando combinados, devem causar eliminação do tumor com mínimo dano aos tecidos normais adjacentes. A presença do FS e sua concentração no tecido alvo, são aspectos relevantes dentro da terapia; quando em baixas concentrações, não há o efeito fotodinâmico, comprometendo a eficiência da técnica [25].

A adequada combinação luz/droga leva a um completo dano vascular no tumor e no tecido adjacente a ele, seguido de necrose celular, portanto é observado um dano em tecido sadio margeando o tumor [25]. Uma justificativa para tal efeito é a infiltração de células neoplásicas além das margens visíveis do tumor.

Apesar de existir um *threshold* sobre o limiar da dose de luz relacionado com a concentração do FS, o qual causa destruição somente do tumor, acredita-se que exista um dano mínimo em tecido sadio. A concentração e presença do FS, a penetração da luz e as características ópticas do tecido, são pontos importantes para a indução da morte celular [26].

Limitações da PDT

A PDT, apesar de ser uma terapia eficiente no tratamento de neoplasias, apresenta algumas limitações, dentre as quais a não seletividade de concentração do FS pelas células do tecido hepático. Isto ocorre pelo fato dos FS's, atualmente utilizados, serem metabolizados no fígado, não apresentando diferença de concentração entre as células tumorais e as células sadias, diferentemente do que ocorre nos demais órgãos. Este é um fator limitante para a utilização da PDT em hepatocarcinoma, pois a não seletividade implica não só na eliminação da lesão, mas também em danos irreversíveis ao tecido sadio.

Apesar da técnica de PDT (Photodynamic Therapy) estar sendo amplamente utilizada para tratamento de câncer em todo o mundo, alguns pontos importantes

ainda são considerados “em aberto” dentro da técnica. Um destes pontos de extrema importância é com relação à necrose do tecido irradiado. Ainda não se sabe a correlação entre a penetração luminosa e a necrose, assim como a extensão da mesma em função da concentração do fotossensibilizador.

Estes pontos foram estudados no presente trabalho, utilizando os princípios da PDT em fígado normais de ratos; além deste fator, foi analisada a transição entre a região necrosada com a região de tecido normal, assim como o tipo de necrose observada. Os parâmetros investigados podem contribuir para futura elaboração de um protocolo de dosimetria para aplicação da terapia em hepatocarcinoma.

A figura 8 procura demonstrar, através de um diagrama, fatores relevantes envolvidos na PDT em fígado, para desenvolvimento de um possível protocolo para aplicação em hepatocarcinoma.

Figura 8 – Diagrama dos principais fatores envolvidos na PDT

O Fígado

Localizado na encruzilhada entre o trato digestivo e o restante do corpo, o fígado é dividido em quatro lobos: direito, esquerdo, quadrado e caudal. Este órgão desempenha a enorme tarefa de manter a homeostasia metabólica do organismo e a ele estão atribuídas cerca de 5000 funções. O sangue chega ao fígado através da veia

porta e da artéria hepática; a bile sai através do ducto biliar hepático comum. Esses 3 condutos se ramificam em paralelo dentro do fígado para formar o espaço portal. A figura 9 mostra um desenho esquemático das principais estruturas anatômicas do fígado.

O fígado é vulnerável a uma ampla variedade de insultos metabólicos, tóxicos, microbianos circulatórios e neoplásicos. Praticamente qualquer insulto significativo ao fígado pode causar necrose dos hepatócitos. Na necrose isquêmica persistem hepatócitos mumificados e precariamente corados (necrose por coagulação). Na necrose tóxica ou de mediação imunológica hepatócitos isolados tornam-se arredondados, contraídos picnóticos e intensamente eosinofílicos para formar os corpúsculos de Councilman (processo conhecido como apoptose). Há vários tipos de necrose hepática, sendo a necrose centrolobular caracterizada por lesão isquêmica e de muitas reações químicas, medicamentosas e tóxicas [27].

O carcinoma hepatocelular (CHC) perfaz mais de 90% de todos os cânceres primários do fígado. As taxas de incidências anuais são de 3 a 7 casos por 100000 nas Américas do Norte e do Sul e na Europa do Norte e Central e na Austrália. Os maiores números de casos são observados em Taiwan, Moçambique e Sudoeste da África. Os negros exibem taxas de ataque, aproximadamente, quatro vezes mais altas que os brancos e uma predominância em homens. Sua causa está ligada, enfaticamente, à prevalência da infecção por HBV (vírus da hepatite B), exposição a aflotoxina e cirrose, entre outras.

A evolução natural do câncer primário do fígado é o aumento progressivo da massa primária até afetar a função hepática ou metastatizar, em geral, primeiro para os pulmões e a seguir para outros locais [27].

Devido à alta incidência e gravidade, muitos estudos são realizados com o intuito de se encontrar melhores alternativas para o tratamento do CHC.

Há várias modalidades clínicas de tratamento para hepatocarcinoma. Os principais tratamentos são: remoção cirúrgica do tumor, ligação da artéria hepática ou da veia portal, embolização terapêutica da artéria hepática ou da veia portal, quimioterapia e transplante de fígado. Embora importantes progressos no tratamento de câncer de fígado tenham sido realizados, existe a necessidade do desenvolvimento

de novas modalidades terapêuticas mais eficientes, entre as quais se estuda a possibilidade da aplicação da PDT [28].

Figura 9 – Desenho esquemático das estruturas anatômicas do fígado.

Deteção Óptica por Espectroscopia de Fluorescência

A comunidade científica, além de trabalhar em inovações no tratamento de neoplasias, tem mostrado um crescente interesse no desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, buscando métodos mais rápidos, mais eficientes e menos invasivos, dentre os quais destaca-se o diagnóstico por fluorescência.

A Fluorescência é um fenômeno que ocorre quando moléculas são excitadas por absorção de uma radiação eletromagnética. Quando as espécies excitadas relaxam para o estado fundamental, podem liberar o seu excesso de energia na forma de fótons, com emissão de luz. Quando esta relaxação ocorre em tempos inferiores a 0.00001 segundos, chama-se de fluorescência. A investigação de materiais utilizando técnicas de fluorescência para a diferenciação de componentes é um procedimento usualmente empregado. A identificação e estudo de tecidos biológicos através da autofluorescência começaram a ser utilizados nas áreas biomédicas mais recentemente. A fluorescência pode ser encontrada, por exemplo, como ferramenta de diagnóstico de tecido cariado [29] e tecidos tumorais [30]. Nesse sentido dois

tipos de análise de fluorescência são encontrados: investigação por imagem, que fornece uma diferenciação macroscópica, através da cor e o estudo por espectroscopia.

A análise por fluorescência também pode ser utilizada para a investigação da presença e distribuição de fotossensibilizadores nos tecidos biológicos. A fotodeteção dinâmica é uma técnica que vem sendo utilizada para mapeamento de tecidos tumorais e determinação indireta da concentração do FS para PDT [31].

C.A.S. Melo realizou um estudo para determinar a janela do tempo de espera para irradiação de animais fotossensibilizados para PDT. Através da detecção por fluorescência, foi possível determinar a maior concentração do Photogem[®] presente nos diferentes tecidos sadios de ratos. O fígado apresentou maior concentração do FS, 30min após a administração por via endovenosa em uma veia caudal lateral esquerda do animal [32].

A figura 10 mostra o pico de fluorescência do FS no tempo de 30min e a figura 11 mostra o espectro de fluorescência do FS nos tempos 0, 30, 60 e 120min; observa-se que a maior concentração do Photogem encontrada no fígado é 30min após a sua administração.

Figura 10 – Gráfico da evolução temporal do pico de fluorescência do Phtotogem[®] em 623nm no fígado.

Figura 11 – Gráfico da evolução temporal do espectro de fluorescência do Photogem® no fígado.

Baseado neste trabalho realizamos o estudo da necrose hepática utilizando o tempo de espera de 30min para iluminação dos animais fotossensibilizados para PDT, ou seja, o período de tempo em que se observou a maior concentração do FS presente no tecido alvo, de acordo com os resultados obtidos no trabalho citado [32].

II OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o de investigar os aspectos básicos da necrose em tecidos saudáveis de ratos fotossensibilizados, para um posterior desenvolvimento de estratégias que permitam a utilização da técnica de PDT em neoplasias hepáticas. Para tal, o acúmulo do Photogem[®] administrado via endovenosa, a penetrabilidade de luz e a combinação destes efeitos levando a diferentes taxas de necrose, serão os pontos alvos do presente trabalho.

III MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 62 ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP – Universidade de São Paulo . Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um Alojamento para animais, com 4 filtros para entrada de ar e 1 exaustor para saída de ar, montado no Instituto de Física da USP de São Carlos (IFSC), no laboratório de laser em Odontologia e Medicina (figura 12). Ficaram alojados em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) de polietileno, com tampas metálicas e assoalho forrado com maravalha. Receberam água filtrada e ração comercial específica para roedores Primor[®]. A temperatura foi mantida entre 23 a 25 °C.

Figura 12 – Alojamento dos animais montado no Laboratório de Laser em Odontologia e Medicina no IFSC – USP/São Carlos.

Fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado foi o **Photogem[®]** (HpD), um derivado de hematoporfirina proveniente da Rússia – Moscou (figura 13). Este medicamento aprovado pelo “Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation” sob autorização 42-3199-98, acumula – se seletivamente em tecidos neoplásicos , podendo ser usado tanto para diagnóstico por fluorescência (DF) como para a Terapia Fotodinâmica. O Photogem é um FS de primeira geração russo o qual

pertence ao grupo dos derivados de hematoporfirina. É produzido a partir de sangue de animais e sua preparação ocorre no Instituto de Química Fina de Moscou sobre a supervisão do Professor Mironov. O Photogem é aprovado para uso em humanos pelo comitê estatal de Farmacologia da Federação Russa e recentemente aprovado pela ANVISA (data 08/ 04/ 2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4). Este FS é constituído de uma mistura de monômeros e oligômeros de derivados de hematoporfirina (figura 14). E trata-se de um pó violeta escuro, contido em frascos esterilizados de 50 ml contendo 200 mg. Pode ser guardado por até 2 anos em um local protegido da luz e com temperatura menor que 5⁰C. A figura 15 mostra o espectro de absorção do Photogem entre as bandas de 500 e 630nm.

O FS foi previamente pesado e separado em alíquotas de 5 mg, no Instituto de Química de São Carlos – USP (IQSC), envolvidas em alumínio para proteção da luz e mantidas à temperatura de -4⁰. O medicamento separado em alíquotas, antes de utilizado, foi diluído em 1 ml de solução estéril de cloreto de sódio (0.9%), sendo sua concentração final, aproximadamente 1.32x10⁻³mol/L e administrado por via endovenosa, em uma veia caudal lateral esquerda do animal.

Figura 13 - **Photogem**[®], derivado de hematoporfina, fotossensibilizador de origem russa.

Figura 14 – Estrutura molecular da HpD (Photogem), FS sistêmico.

Figura 15 – Espectro de absorção do Photogen. O pico em 630 nm é utilizado tanto para detecção quanto para tratamento do tumor.

Fonte De Luz

A região do espectro eletromagnético de emissão da fonte de luz para PDT deverá ser escolhida levando em consideração as bandas de absorção do FS e a profundidade de penetração da luz nos tecidos biológicos. Apesar da região do vermelho não ser uma das bandas de absorção mais relevantes do HpD, o comprimento de onda usualmente empregado é o de 630nm, uma vez que se encontra na janela biológica terapêutica. Caso o comprimento de onda de 540nm, por exemplo, fosse o escolhido, a reação fotodinâmica provocada não seria muito evidente, já que, apesar da maior absorção pelo FS, a penetração no tecido biológico seria comparativamente muito inferior ao do 630nm. Os lasers para geração de luz neste comprimento de onda mais utilizados para PDT são: laser de corante bombeado por um laser de argônio (com potência em torno de 3W), permitindo ampla variação de comprimento de onda, o que significa ampla gama de atuação com praticamente todos os FS existentes ou os que foram desenvolvidos (figura 16 A); laser diodo de alta potência (em torno de 2W), este sistema tem a limitação de operar em apenas um comprimento de onda, não possuindo a flexibilidade de ajuste de acordo com a droga a ser utilizada (figura 16 B).

Para a aplicação da PDT foram utilizadas duas fontes de luz. O Laser de Diodo Ceralas 630 Ceramoptec[®], Alemanha, produzindo até 2W de luz no comprimento de onda de 630 nm (adequado para excitação do Photogem[®]), acoplado a ele uma fibra óptica para iluminação direta (figura 17) e um Dispositivo à base de LEDs vermelhos (diodos emissores de luz) desenvolvido no Instituto de Física da USP de São Carlos (IFSC), (figura 18), titulado “The Hex” fabricado pela *Norlux Corp.* Abaixo seguem os dados do Fabricante:

LED Vermelho	Pico de emissão	Corrente	Voltagem	Potencia Total	Potência Útil
	626nm	0,455A	13,2V	6W	1,2W

Figura 16 – Laser de corante bombeado por um laser de argônio (16 A). Laser de diodo alemão da Ceramoptec[®] (16 B). Ambos no comprimento de onda de 630 nm.

Figura 17 - Laser de Diodo cujo comprimento de onda é de 630 nm; acoplado a ele uma fibra óptica para iluminação direta.

Figura 18 - Dispositivo a base de LEDs vermelhos (diodos emissores de luz)

Sistema de Detecção Óptico

O aparato experimental utilizado para a leitura por autofluorescência é composto por um laser de excitação (442nm ou 532nm), monocromador, computador com um programa de aquisição LightView e uma fibra do tipo Y (figura 19.). O laser de excitação, acoplado à fibra óptica, é entregue à superfície do tecido a ser analisada. A fibra deve ser mantida em contato com o tecido e o mais perpendicularmente possível. A outra extremidade da fibra é conectada ao monocromador, levando a luz coletada do tecido. A fibra Y é composta por uma fibra central, que leva a luz de excitação, e seis fibras concêntricas coletoras da luz emitida pelo tecido avaliado. O monocromador está conectado ao computador e o programa LightView fornece os resultados obtidos da intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Neste trabalho, o laser de excitação utilizado foi no comprimento de onda de 532nm, na região do verde do espectro eletromagnético.

Figura 19 – Foto do Sistema de Diagnóstico (A) e desenho esquemático das partes constituintes (B)

1 - Piloto para Determinação do Tempo de Necrose

Foram utilizados 12 animais no total, para realização deste experimento, cada um com um tempo de sacrifício. Os animais foram submetidos a período de jejum de 12 horas, tendo livre acesso à água. Em seguida foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução de *Quetamina base* 1g (Francotar - Virbac®) na dose de 0.08ml/100g de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *cloridrato de xylazina* 2% (Virbaxyl - Virbac®) na dose de 0.04ml/100g. Foi realizada uma incisão mediana; o lobo direito do fígado foi deslocado para apresentação e isolado com gaze de algodão embebida em soro fisiológico; em seguida, foram fotossensibilizados por injeção endovenosa com a HpD na concentração de 1,5mg/kg diluída em soro fisiológico 0.9% na dose 0,06ml. Após o período de 30 minutos os animais foram irradiados com o laser de diodo de comprimento de onda de 630nm (região do vermelho), com potência de 140mW, dose de 200J/cm² e intensidade de 170mW/cm² durante o tempo de 19min e 40s. A área irradiada foi de 1.0 x 1.0cm; para proteção do restante do lobo foi feita uma máscara de papel alumínio envolta por gaze com um orifício de 1.0 x 1.0 cm; esta máscara evitou a iluminação das demais áreas e delimitou a área desejada (figura 20). Os animais, após iluminação, foram suturados e mantidos no alojamento do Laboratório de Laser em Odonto e Medicina. O sacrifício ocorreu em períodos variados para determinar o tempo ideal de morte celular, aquele em que maiores alterações morfológicas no tecido hepático foram observadas. Foram utilizados 12 diferentes tempos com intervalo de 3 horas entre os animais para o sacrifício: 0h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 27h, 30h, 33h e 36h. Cada animal foi sacrificado, por inalação de éter sulfúrico, nos tempos pré – determinados; em seguida, o lobo direito do fígado foi removido da cavidade abdominal, a área alterada cortada em fatias com o auxílio de um bisturi e colocadas em frascos plásticos contendo uma solução de formaldeído a 40% (Formalina - Merck®), misturado a uma solução tampão de monofosfato de sódio hidratado (NaH₂PO₄H₂O - Merck®) e difosfato de sódio hidratado (Na₂HPO₄2H₂O - Merck®) diluídos em água destilada, durante 24 horas para fixação do material; após este período o material foi colocado em solução de álcool 70% e levado ao Departamento de Patologia de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP para preparação de lâminas histológicas.

Figura 20 – Delimitação da área iluminada. Máscara de papel alumínio envolta por gaze com um orifício de 1.0 x 1.0 cm

2 - Penetração da Luz em Tecido Hepático Fotossensibilizado

Neste estudo, 2 animais foram utilizados. Os animais foram submetidos a período de jejum de 12 horas, tendo livre acesso à água. Foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução de *Quetamina base* 1g (Francotar - Virbac[®]) na dose de 0.08ml/100g de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *cloridrato de xylazina* 2% (Virbaxyl - Virbac[®]) na dose de 0.04ml/100g. Em seguida foram fotossensibilizados por injeção endovenosa com a HpD na concentração de 1,5mg/kg diluída em soro fisiológico 0.9% na dose 0,06ml. Após o período de 30 minutos foi realizada uma incisão mediana; o lobo direito do fígado foi retirado da cavidade abdominal e iluminado com laser hélio-neônio de 632nm. Este experimento foi realizado *in vivo* e em *ex vivo*, com a remoção do lobo direito do fígado. O lobo direito foi seccionado transversalmente para permitir a análise da penetração da luz direcionada perpendicularmente à uma superfície plana. O fragmento de tecido foi posicionado em uma lâmina de vidro transparente. O feixe de HeNe foi direcionado ao centro do tecido alvo, e abaixo, uma câmara CCD foi posicionada para aquisição da imagem. A figura 21 mostra as propriedades de penetração e espalhamento da luz incidente no tecido hepático [33].

Figura 21 –Foto mostrando em cores falsas níveis de intensidade durante o estudo de penetração em fígado (escala em mm)

3 - Mapeamento Térmico do Tecido Hepático.

Neste experimento foram utilizados 2 animais, no total. Os animais foram submetidos a período de jejum de 12 horas, tendo livre acesso à água. Foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução de *Quetamina base* 1g (Francotar - Virbac[®]) na dose de 0.08ml/100g de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *cloridrato de xylazina* 2% (Virbaxyl - Virbac[®]) na dose de 0.04ml/100g. Foi realizada uma incisão mediana; o lobo direito do fígado foi deslocado para apresentação e isolado com gaze de algodão embebida em soro fisiológico. Em seguida, em um dos animais foi introduzido um termistor na parte dorsal do lobo direito, a 1mm da superfície do órgão e iluminado com laser de diodo de 630nm, com dose de 200J/cm², 200mW de potência e com intensidade de 250mW/cm², durante 300s. O outro animal foi fotossensibilizado por injeção endovenosa com a HpD na concentração de 1,5mg/kg diluída em soro fisiológico 0.9% na dose 0,06ml. Após o período de 30 min foi introduzido um termistor na parte dorsal do lobo direito, a 1mm da superfície do órgão e iluminado com laser de diodo de 630nm, com dose de 200J/cm², 200mW de potência e com intensidade de 250mW/cm², durante 300s. Os parâmetros de potência e intensidade do laser foram escolhidos, reproduzindo os valores que foram empregados no experimento da avaliação da necrose pós – PDT. O objetivo deste estudo foi a avaliação da variação da temperatura durante a irradiação laser. Nesse sentido, a principal preocupação foi a de desconsiderar o efeito térmico do laser sobre o tecido alvo.

4 – Estudo da Necrose Hepática pós – PDT

4.1 - Preparo do Animal

Foram utilizados 50 animais para realização deste experimento, divididos em 10 grupos com 5 animais: 1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B, 1C, 2C, 3C, D . A tabela 1 apresenta a divisão dos grupos experimentais de acordo com a concentração do FS e da dose de energia utilizados. Os animais foram submetidos a período de jejum de 12 horas, tendo livre acesso à água. Em seguida foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução de *Quetamina base* 1g (Francotar - Virbac[®]) na dose de 0.08ml/100g de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *cloridrato de xylazina* 2% (Virbaxyl - Virbac[®]) na dose de 0.04ml/100g. Foi realizada uma incisão mediana, o lobo direito do fígado foi retirado da cavidade abdominal e isolado com gaze de algodão embebida em soro fisiológico.

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais. A letra A corresponde a dose de luz de 100J/cm², B a dose de 150J/cm² e C a dose de 200J/cm². O número 1 corresponde a concentração de HpD de 1.0mg/kg, 2 de 1.5mg/kg e 3 de 2.0mg/kg. D corresponde ao grupo iluminado com o LED.

Divisão dos Grupos	Dose de Energia (J/cm²)	Concentração de HpD (mg/kg)
Grupo 1A	100	1,0
Grupo 2A	100	1,5
Grupo 3A	100	2,0
Grupo 1B	150	1,0
Grupo 2B	150	1,5
Grupo 3B	150	2,0
Grupo 1C	200	1,0
Grupo 2C	200	1,5
Grupo 3C	200	2,0
Grupo D (LED)	150	1,5

4.2 - Fotossensibilização

O FS foi diluído em soro fisiológico 0.9%, na concentração de 5.0mg/ml. Os animais foram fotossensibilizados por injeção endovenosa, pela veia caudal lateral esquerda, com a HpD, em concentrações de 1.0, 1.5 e 2.0mg/Kg de peso corpóreo.

4.3 - Irradiação

Os animais foram fotossensibilizados com o Photogem[®] nas concentrações de 1.0, 1.5 e 2.0mg/kg e iluminados após o período de 30 minutos com laser de diodo de 630nm (figura 22), com doses de 100, 150 e 200J/cm², 200mW de potência e com intensidade de 250mW/cm², durante 400, 600 e 800s, respectivamente. Os animais do grupo D, foram fotossensibilizados por injeção endovenosa com a HpD, na concentrações de 1.5mg/Kg de peso corpóreo. Após o período de 30 minutos, foram iluminados com o dispositivo à base de LEDs vermelhos com emissão centrada em 626nm, com dose de 150J/cm², 345mW de potência e com intensidade de 150mW/cm², durante 16min. A área irradiada foi de 1.0 x 1.0cm; para proteção do restante do lobo foi feita uma máscara de papel alumínio envolta por gaze com um orifício de 1.0 x 1.0cm; esta máscara evitou a iluminação das demais áreas e delimitou a área desejada. Após iluminação, os animais foram suturados e mantidos no Alojamento do laboratório até a próxima etapa.

Figura 22 – Iluminação do animal com o laser de diodo de 630nm, através de uma fibra óptica. Observe a máscara de proteção sobre o órgão.

4.4 - Detecção de HpD pelo Sistema de detecção Óptico

A fluorescência foi medida em 4 fases. Em uma primeira fase medimos a autofluorescência do fígado. A segunda medida foi realizada 30min após a administração do FS no animal, com o objetivo de detectar a presença do medicamento no tecido hepático. Após a iluminação do animal, medimos novamente a fluorescência para observar alterações nos espectros da fluorescência nos animais fotossensibilizados e submetidos à PDT. A última medida foi realizada após 30h, antes do sacrifício dos animais, com o objetivo de detectar espectros de tecido hepático necrosado. Em cada tempo de investigação, foram realizadas 10 leituras, para obtenção dos valores médios. A ponta de leitura, protegida com filme de PVC, foi posicionada em contato e o mais perpendicularmente possível à superfície do lobo hepático, como mostrado na figura 23.

Figura 23 – Medida de fluorescência do tecido hepático. Note como a fibra encosta perpendicularmente ao órgão.

4.5 - Sacrifício, Remoção e Preparo do Material

Após 30h do tratamento, os animais foram anestesiados e o fígado retirado da cavidade abdominal. Os animais anestesiados foram sacrificados por abertura da cavidade torácica; o lobo direito do fígado foi removido da cavidade abdominal e a área necrosada cortada em fatias de aproximadamente 1mm de espessura com o auxílio de um bisturi. As fatias foram colocadas em frascos plásticos contendo uma solução de formaldeído a 40% (Formol - Merck®) misturado a uma solução tampão de monofosfato de sódio hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ - Merck®) e difosfato de sódio

hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Merck®) diluídos em água destilada, durante 24 horas para fixação do material; após este período, o material foi colocado em solução de álcool 70% e levado ao Departamento de Patologia de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP para preparação de lâminas histológicas.

4.6 - Macroscopia

Antes do processamento histológico para inclusão do material coletado, o órgão foi observado e fotografado por uma máquina digital Mavica Sony®, para análise da área necrosada em relação à sua extensão e aspecto.

4.7 - Microscopia

Para análise histológica, retiraram-se fragmentos de tecido hepático necrosado, que foram desidratados e incluídos em parafina. Cortes de 4µm de espessura foram obtidos de cada fragmento e corados com hematoxilina – eosina (HE), com o objetivo de analisar as diferenças morfológicas do tecido alterado em relação ao tecido normal, a transição de separação do epitélio hepático necrosado e do epitélio hepático normal, determinar o tipo de necrose observado e medir a profundidade do tecido necrosado

4.8 - Morfometria do Tecido Hepático

Nas mesmas preparações histológicas usadas no estudo da microscopia óptica, analisou-se morfometricamente o epitélio hepático alterado, medindo-se a profundidade de necrose, a distância entre o tecido necrosado e o tecido normal. As medidas foram obtidas com uma ocular micrométrica de 2 aumentos (2x) Zeiss Kpl em microscópio de rotina Zeiss RA-18. Para calibração da ocular usou-se uma lâmina micrométrica, calculando-se a distância em micra entre 2 traços consecutivos na ocular (M) pela fórmula abaixo [34].

$$M = \frac{a \times c}{b}$$

a = número de traços consecutivos e coincidentes na lâmina micrométrica com os traços da ocular micrométrica.

b = número de traços consecutivos e coincidentes na ocular micrométrica com os traços da lâmina micrométrica.

c = constante (10 micra)

A profundidade da necrose foi obtida desde a superfície epitelial alterada até a zona de transição de separação do epitélio necrosado e do epitélio normal.

Dos 10 grupos experimentais cada um com 5 animais, escolheram-se 2 lâminas de cada grupo (aquelas que apresentaram melhores cortes e colorações histológicas). Foram realizadas medidas em 3 pontos distintos de cada uma das lâminas, o que totalizou 6 medidas por grupo.

4.9 - Cálculos Estatísticos

Testes não paramétricos foram aplicados, pois os tamanhos amostrais foram pequenos e os dados não apresentaram normalidade. Os testes utilizados foram: Kruskal-Wallis, Friedman e Mann-Whitney.

O teste de Kruskal-Wallis é aplicado quando temos mais do que duas amostras independentes e desejamos verificar se há diferença entre tais amostras. Caso exista diferença, um outro teste não paramétrico é aplicado, o teste tipo-Tukey, para mostrar qual grupo ou quais grupos diferem dos demais. O teste de Friedman é utilizado para comparação, quando temos amostras vinculadas, “pareadas” e o teste de Mann-Whitney é empregado no caso de duas amostras independentes.

4.9.1 - Teste de Mann-Whitney

O teste de Mann-Whitney é um teste baseado em postos e isto é muito útil para observações que não podem ser expressas com valores numéricos; basta que possam ser ordenadas em algum sentido. É utilizado quando se deseja usar um teste estatístico para verificar se pode ser rejeitada a hipótese de que as duas populações são idênticas ou que as amostras foram retiradas de mesma população.

Os dados consistem de duas amostras aleatórias independentes. Denote por $X_1, X_2, \dots, X_n$ a amostra aleatória de tamanho n da população 1 e por $Y_1, Y_2, \dots, Y_m$ a amostra aleatória de tamanho m da população 2. Seja $N = n + m$, o número total de observações. Associe posto às observações (como no teste de Wilcoxon). Denote $R(X_i)$ o posto atribuído a X_i , para todo i e $R(Y_j)$ o posto atribuído a Y_j , para todo j . Se vários valores amostrais são iguais, então será atribuída a média dos postos a cada valor amostral empatado. A média dos postos é determinada utilizando postos que seriam atribuídos se não houvesse empate.

As suposições do teste são de que cada amostra é uma amostra aleatória de sua respectiva população; a escala de medida é pelo menos ordinal: existe independência entre as observações no grupo e entre os grupos e as variáveis aleatórias são contínuas. A hipótese a ser testada é a de que as duas populações são iguais, ou seja:

H_0 : as duas funções distribuições são iguais;

H_1 : uma das populações tende a produzir observações maiores do que as demais.

O teste estatístico é dado por,

$$T = \sum_{i=1}^n R(X_i) - \frac{n(n+1)}{2}.$$

A regra de decisão para o teste é dada por: rejeite H_0 ao nível de significância α se T é menor que $w_{\alpha/2}$ ou se T é maior que $w_{1-\alpha/2}$. Tais quantidades são dadas na Tabela 8 [35].

4.9.2 - Teste de Kruskal-Wallis

Este teste é aplicado quando se tem mais do que duas amostras independentes, sendo uma generalização do teste de Mann-Whitney. Estas amostras possivelmente foram obtidas de populações diferentes (uma amostra por população), e se quer verificar se todas as populações são iguais (ou não).

Dados

Os dados consistem de k amostras aleatórias (possivelmente de tamanhos diferentes), sendo N o número total de observações nas k amostras, $N = \sum_{i=1}^k n_i$. A atribuição dos postos se dá da mesma forma que o teste de Wilcoxon. Sejam X_{ij} a j -

ésima observação da i -ésima amostra, $R(X_{ij})$ o posto associado a esta observação e R_i a soma dos postos associados a i -ésima amostra, $R_i = \sum_{j=1}^{n_i} R(X_{ij})$, $i = 1, 2, \dots, k$.

Suposições

As suposições para este teste também são as mesmas do teste de Mann-Whitney

Hipóteses

As hipóteses a serem testadas são:

H_0 : todas as k funções distribuições são iguais;

H_1 : pelo menos uma das populações tende a produzir observações maiores do que as demais.

Estatística Teste

O teste estatístico T é definido por,

$$T = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1).$$

Regra de decisão

A regra de decisão do teste é definida por, se k é igual a 3 e todas as amostras têm tamanho de no máximo 5, então a região crítica de tamanho α pode ser determinada a partir da Tabela 12 [34]; caso contrário, a distribuição aproximada de T é χ^2 com $(k-1)$ graus de liberdade. Rejeite H_0 ao nível α de significância se T for maior do que o quantil $(1-\alpha)$ da distribuição χ^2 com $(k-1)$ graus de liberdade, obtido na Tabela 2 [35].

4.9.3 - Teste de Friedman

A aplicação deste teste considera problemas de análise de algumas amostras relacionadas, que podem ser consideradas como uma extensão do problema de duas amostras relacionadas ou ‘pareadas’ e que não satisfazem a suposição de normalidade e homocedasticidade (igualdade de variâncias). Este método depende somente dos postos das observações dentro de cada bloco (unidade amostral), e portanto é algumas vezes chamado de análise de variância *two-way* por postos. Neste teste, os dados consistem de b variáveis aleatórias mutuamente independentes

(blocos) e k tratamentos aplicados a estes blocos. Associamos postos aos dados dentro de cada bloco, e a soma dos postos por tratamento é chamada de R_i , isto é:

$$R_i = \sum_{j=1}^b R(X_{ij}),$$

para $j = 1, 2, \dots, k$ e X_{ij} representando a observação do j -ésimo tratamento do i -ésimo bloco. Para aplicação do teste, supomos que os b blocos são mutuamente independentes e que dentro de cada bloco as observações podem ser arranjadas em ordem crescente, de acordo com algum critério de interesse. A hipótese a ser testada é a seguinte:

H_0 : os tratamentos têm o mesmo efeito,

H_1 : pelo menos um dos tratamentos tende a produzir observações maiores do que os outros.

O teste estatístico de Friedman é dado por:

$$T = \frac{12}{bk(k+1)} \sum_{j=1}^k R_j^2 - 3b(k+1).$$

A regra de decisão é:

- rejeite a hipótese nula (H_0), ao nível α de significância, se T exceder o quantil $(1-\alpha)$ da distribuição χ^2 com $(k-1)$ graus de liberdade, obtido da Tabela 2 [35].

OBS: Neste trabalho, o bloco representa a unidade em que se obteve as medições e o nível de significância utilizado foi $\alpha = 0.05$ e portanto o nível de confiança é de $(1-\alpha) = 0.95$.

IV DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

1 - PILOTO PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE NECROSE

2 - INDUÇÃO DA NECROSE HEPÁTICA

3 - INDUÇÃO DA NECROSE HEPÁTICA PELO DISPOSITIVO À BASE DE LEDs

4 - ANÁLISE DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

V RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise microscópica, do grupo piloto, no fígado tratado com 1.5mg/kg de HpD e 150J/cm² de luz, notaram-se, após 30 horas do tratamento, maiores alterações hepáticas em relação aos demais fígados dos animais sacrificados após os períodos de 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 33 e 36 horas. A análise da lâmina, mostrou necrose hepatocitária difusa do tipo coagulativa, mantendo a integridade parcial dos ramos da veia porta e do ducto interlobular no espaço portal. O endotélio da veia centrolobular foi totalmente necrosado apresentando em suas cercanias infiltrado inflamatório tipo misto, com predomínio de neutrófilo. Algumas áreas apresentaram intensa congestão nos sinusóides e focos hemorrágicos discretos, não tendo preferência na estrutura hepática.

Utilizando a técnica de fluorescência, foram realizados experimentos para detecção da presença do HpD no tecido hepático. Através da análise dos espectros de fluorescência obtidos, foi possível determinar, indiretamente, a concentração do FS no fígado para a irradiação. A consideração inicial é de que a quantidade de luz emitida pela fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de emissores no tecido. Esta consideração é tão mais verdadeira quanto menor for a concentração relativa das moléculas procuradas e menos ligada às moléculas que fazem parte do tecido. Na diluição utilizada, espera-se, no máximo, uma concentração da ordem de $1.5 \times 10^{-4}\%$ em moléculas de FS. Esta, certamente, pode ser considerada como baixa; neste caso, efeitos inibitórios da fluorescência como reabsorção ou formação de agregados podem ser desconsiderados. Em relação à incorporação pelo substrato biológico, em se tratando de uma forte ligação química, as bandas de emissão poderiam ser modificadas, também, mascarando a quantidade real de moléculas presentes no tecido. A figura 24 mostra um exemplo dos espectros de autofluorescência e de fluorescência no tecido fotossensibilizado. A curva preta demonstra a banda de emissão da autofluorescência do tecido normal. A curva vermelha mostra o espectro de emissão do Photogem no tecido normal fotossensibilizado com duas bandas, uma centrada em 623nm e a outra em 688nm. Pelo fato da HpD ter essas bandas, a análise restringiu-se à quantidade de luz emitida ao redor de seus valores centrais. No entanto, é importante lembrar que dependendo da posição e da vizinhança que a molécula do FS irá encontrar no interior da célula, essas bandas poderão sofrer pequenos deslocamentos (da ordem de alguns nm).

Figura 24 – Gráfico dos espectros de autofluorescência e de fluorescência do tecido fotossensibilizado. A leitura do tecido fotossensibilizado com Photogem[®] foi realizada 30min após a administração do FS.

A aquisição dos dados de fluorescência foi feita através do programa LightView, que forneceu os dados da relação da intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Para análise desses dados foi realizada uma normalização de todo o espectro pela máxima intensidade na região do comprimento de onda de excitação (532nm). A análise espectral restringe-se ao valor de pico do espectro de emissão. Seriam possíveis outras análises, como a normalização de áreas, etc, que, aplicadas a este caso não adicionam informações além daquelas obtidas pelo valor da fluorescência. Utilizando os valores absolutos do espectro de emissão em 623nm, observa-se o gráfico mostrado na figura 25. Nota-se aqui que as três concentrações de HpD, administradas nos animais, não levaram ao correspondente aumento da concentração incorporada no tecido. Isto, possivelmente ocorre, devido ao fato de que após 30min da administração do FS, atinja-se o pico de fluorescência no fígado [32], porém isto não significa que indefinidamente haverá aumento da quantidade acumulada no fígado. Acima de determinado valor injetado, espera-se que ocorra

uma saturação da quantidade acumulada no fígado, não sendo possível se conseguir além desse valor de saturação, mesmo aumentando a concentração da HpD injetada. Os resultados da figura 25 mostram, claramente, que as três concentrações utilizadas (1.0, 1.5 e 2.0mg/kg) já estão além do valor de saturação. Por esta razão não será possível, neste trabalho, esperar diferenciações causadas pelas três concentrações do FS utilizadas.

Figura 25 – Gráfico da intensidade luminosa em função da concentração de HpD.

A investigação da fotorreação causada pela luz em um tecido fotossensibilizado, depende, fortemente, da adequada quantidade de luz que atinge o tecido em consideração. Assim, a penetrabilidade da luz é um fator dominante e que, necessariamente, deve ser levado em conta em qualquer tipo de experimento em PDT. Foi possível determinar as propriedades ópticas do tecido biológico, através do estudo da caracterização da penetração e distribuição da luz em tecidos normais de ratos [33], no comprimento de onda de 630nm. Baseados nestes resultados, realizou-se um experimento para análise da interação da luz com o tecido hepático fotossensibilizado, para avaliar se a penetração da luz em 630nm possui um comportamento diferente em comparação com o tecido sem HpD. Observa-se que a profundidade de penetração da luz no tecido fotossensibilizado é menor quando comparado ao tecido não fotossensibilizado, devido à absorção da luz incidente pelo FS. Esta análise pode ser feita comparando-se os coeficientes de penetração da luz (α) do fígado, obtidos quando tomamos o logaritmo da intensidade com base no

decaimento exponencial da intensidade em função da distância (figura 26). O modelo exponencial de decaimento já foi amplamente explorado pelo nosso grupo de pesquisa [33] e mostra que tantos efeitos de espalhamento, quanto de absorção, podem ser resumidos em um coeficiente efetivo, denominado penetração de coeficiente de luz. Neste caso, a intensidade em qualquer porção do tecido alvo com relação ao ponto de incidência pode ser matematicamente representado pela relação:

$$I = I_0 e^{-\alpha z}$$

Nesta expressão α^{-1} representa o comprimento característico de penetração de luz.

A figura 27 nos permite visualizar a diferença de profundidade de penetração da luz no tecido hepático. Notamos que o α^{-1} do tecido não fotossensibilizado é de 4.73mm, enquanto no tecido hepático fotossensibilizado o α^{-1} é de 1.14mm, sendo α obtido através do coeficiente angular das retas nos gráficos logarítmicos. Esse resultado mostra que uma grande parcela de luz incidente está sendo absorvida no tecido fotossensibilizado.

Figura 26 – Gráfico do decaimento da intensidade em função da distância.

Figura 27 – Gráfico da profundidade de penetração da luz em função do logaritmo da intensidade normalizada.

A distância de penetrabilidade de luz, por nós obtidos, de 1.14mm está de acordo com medidas anteriores realizadas por Bown e Cols, em um trabalho onde, realizaram um estudo quantitativo em fígado normal de ratos fotossensibilizados. Utilizando uma concentração de 5mg/kg de HpD e irradiando o tecido após 3h, foi observado que o diâmetro da necrose em tecido hepático normal era proporcional à energia aplicada e inversamente proporcional ao tempo de espera para a irradiação. Notou também que a profundidade de penetração da luz no fígado fotossensibilizado foi de 1.2mm, porém não descreveu os danos causados no tecido, bem como a profundidade de necrose [36]. Esta concordância corrobora com nossas considerações iniciais de que já estamos acima da saturação, pois os autores mencionados, utilizaram 5mg/kg do FS e obtiveram a mesma absorção por nós verificada.

O FS presente no fígado absorve uma grande quantidade de luz, diminuindo a profundidade de penetração luminosa no tecido. Grande parte desta energia absorvida é dissipada na forma de calor. Esse fato pode ser comprovado através das medidas de variação da temperatura durante a iluminação prolongada. Para realizar esta medida, foi idealizado um sistema experimental, como mostrado na figura 28. Brevemente, o sistema é constituído do mesmo arranjo utilizado para medida da

penetração da luz, só que desta vez, um termistor especial foi colocado na região, imediatamente após a superfície iluminada, como já descrito no capítulo de materiais e métodos.

Figura 28 – Esquema do sistema experimental para medida da temperatura. A figura A apresenta o feixe de luz incidente e o termistor posicionado a 1mm da superfície do fígado. A figura B representa o termistor no interior do fígado, ligado a um computador para aquisição da variação da temperatura.

Como podemos notar no gráfico da figura 29, verificou-se que há um aumento, consideravelmente maior, da temperatura no fígado fotossensibilizado e irradiado do que no fígado não fotossensibilizado. O aumento de temperatura do tecido na presença da HpD é cerca de 3 vezes maior que no tecido sem HpD, demonstrando que há uma maior quantidade de luz sendo absorvida pelo FS no tecido e conseqüentemente, eliminando o feixe de luz e a energia do feixe incidente, diminuindo a penetração da luz.

Figura 29 – Gráfico da curva de conversão de energia, mostrando a diferença de temperatura entre o tecido não-fotossensibilizado e o fotossensibilizado.

Considerando que a capacidade calorífica do tecido não é muito alterada com a presença do FS, é possível correlacionar o aumento da temperatura com o coeficiente de penetração da luz. O α do tecido não fotossensibilizado é, aproximadamente, 3 vezes o α do tecido fotossensibilizado. O mesmo se observa, com relação à quantidade de energia absorvida, pois a temperatura do fígado fotossensibilizado é, aproximadamente, 3 vezes a temperatura do fígado não fotossensibilizado. Através destes dados, podemos demonstrar que o fígado, na presença do FS, absorve maior quantidade de energia, a qual é dissipada na forma de calor, justificando a alteração térmica e levando a uma redução da profundidade de penetração, que é comprovada pelos valores dos coeficientes. O aumento de temperatura observado, nas condições da PDT, no presente experimento, foi em torno de apenas 3°C , o que não é suficiente para promover necrose tecidual ou mesmo, considerável degradação do FS [32]. Desta forma, todos os efeitos de alteração tecidual, que serão descritos posteriormente, devem ser associados, exclusivamente, às fotorreações inerentes à PDT.

Os resultados até aqui discutidos, mostram que o tecido hepático normal, na presença do FS, tem suas características ópticas alteradas. Isto deve refletir na profundidade da necrose observada.

A morte celular depende da taxa de excitação da HpD, deste modo, se o FS for excitado poucas vezes, ter-se-á um dano tecidual menor, também chamado de lesão reversível, não causando necrose celular. Desta maneira, para que a ativação da HpD pela luz cause uma necrose tecidual é necessária uma quantidade mínima da taxa de excitação, sendo que abaixo desta, o tecido deva recuperar-se após a aplicação e acima a necrose deva predominar.

A figura 30 procura representar, esquematicamente, uma seqüência da iluminação no fígado e o aspecto macroscópico do tecido necrótico.

Figura 30 – Esquema de iluminação do fígado: A representa a luz incidindo perpendicularmente no fígado; B apresenta o espalhamento da luz no tecido e C a necrose no tecido hepático.

A figura 30A mostra a incidência da luz no lobo do fígado. Note que a incidência da luz é perpendicular ao fígado. Adotou – se incidência perpendicular para evitar variações que levariam à mudanças nas quantidades refletidas, absorvidas e transmitidas, que dependem do ângulo. A figura 30B demonstra a penetração e o espalhamento da luz no tecido. Observa-se que a luz incide em uma área pré-determinada, porém quando penetra no tecido, o processo de espalhamento faz com que uma região muito maior seja atingida pela luz. A figura 30C representa um corte perpendicular do fígado dando uma noção da profundidade e da forma da necrose ocorrida no tecido. Verifica-se que, mesmo delimitando e protegendo a área para a iluminação, a região que sofreu dano tecidual sempre será maior (alguns milímetros).

Isto é constatado pela área necrosada superior à região irradiada, devido ao espalhamento da luz no tecido, como descrito anteriormente.

A luz penetra no tecido hepático fotossensibilizado com uma intensidade pré-determinada, porém com a absorção luminosa causada pelo HpD a intensidade cai, de acordo com a lei exponencial já mencionada; ao longo deste decaimento o valor dessa intensidade atinge o mínimo necessário para causar lesão irreversível no tecido. Desta forma, ao analisar a necrose espera-se observar uma abrupta separação entre o tecido normal e o necrosado. A figura 31 mostra, simultaneamente, o perfil de intensidade e de necrose. Importante salientar que o tecido hepático não fotossensibilizado e iluminado com luz laser, não apresentou necrose, demonstrando que na ausência do FS não há dano irreversível no tecido.

Figura 31 – Relação da intensidade luminosa com a transição do tecido normal (A) e necrosado (B) (aumento de 100x)

Realizando a análise histológica do tecido, nota-se que o limiar entre o tecido normal e o necrosado, é evidente e bem delimitado; provavelmente, isto se deve ao decaimento da intensidade, pois o esperado seria uma necrose gradual, ou seja, uma intensa necrose na região superficial do tecido que iria diminuindo gradativamente, da mesma forma que a luz decai ao penetrar no tecido normal. A observação da abrupta delimitação da necrose confirma as idéias de um limiar de intensidade necessário para se atingir tal efeito.

A necrose observada tem sua linha de transição a uma profundidade média de 1,5mm. Comparando essa profundidade com o tecido fotossensibilizado verifica-se que nessa região a intensidade é em torno de 60mW/cm^2 , o que para as condições apresentadas neste trabalho, representa a intensidade de limiar para a necrose. Para intensidades abaixo deste valor (que representa profundidade superior a 1.5mm) as observações da alteração tecidual, restringem-se a uma degeneração dos hepatócitos, quadro este reversível clinicamente, e constatado pela normalidade do tecido a profundidades superiores a 1.5mm. Deve-se lembrar que o tecido hepático é conhecido pela sua rápida regeneração após pequenos danos teciduais, devido a sua alta capacidade de proliferação celular. Importante salientar aqui, que estas observações não se aplicam, necessariamente, aos tecidos não normais. O tecido hepático neoplásico é, naturalmente, caracterizado por um substrato celular deficitário e que, portanto, deve apresentar um limiar de intensidade muito mais baixo do que o aqui relatado.

Acredita-se que, mesmo aumentando a intensidade luminosa, a penetração não seria superior à obtida, devido à saturação do fígado pelas concentrações de Photogem utilizadas. Altas concentrações de HpD, no fígado, formam uma espécie de barreira com alta absorção da energia luminosa nas camadas superficiais do tecido impedindo uma maior penetração e conseqüentemente a ativação da reação fotodinâmica e posterior profundidade de necrose. Possivelmente esta limitação de penetração da luz, no caso do fígado, serve como uma proteção ao tecido sadio; devido a não seletividade dos hepatócitos ao FS, uma menor quantidade de células normais são destruídas e as lesões ocorridas reversíveis. Cumpre salientar, que esta baixa penetrabilidade de luz e necrose superficial observada é um fato que deve ser seriamente considerado ao se fazer um planejamento de PDT para o fígado. Apesar

do tecido hepático ser muito pouco seletivo, quando comparado a outros tecidos, em relação ao FS, podemos dizer que a razão da concentração no tecido normal/neoplásico, a alta saturação, a baixa penetrabilidade e o alto limiar de intensidade, são fatores que devem minimizar a necrose nos tecidos adjacentes a um tumor localizado no fígado. Este assunto deverá ser estudado em futuros trabalhos a serem realizados pelo nosso grupo.

A morfometria do fígado, permitiu a análise da profundidade da necrose causada pela PDT. Através dos resultados obtidos foi possível realizar uma análise estatística, considerando a dose de luz e a concentração do FS no tecido. A tabela 2 mostra uma descrição estatística dos parâmetros avaliados.

Tabela 2 – Descrição estatística da profundidade de necrose

Variável	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	SE Média	Mínimo	Máximo	1ºQ	3ºQ
1A	6	1,21	1,11	0,4	0.18	0,72	1,8	0,81	1,71
2A	6	1,69	1,8	0,5	0.187	0,96	2,1	1,275	2,1
3A	6	1,44	1,44	0,07	0.0268	1,32	1,5	1,41	1,5
1B	6	1,39	1,35	0,1	0.0608	1,26	1,56	1,26	1,56
2B	6	1,47	1,47	0,1	0.0458	1,32	1,62	1,365	1,575
2C	6	1,51	1,5	0,1	0.0523	1,38	1,68	1,38	1,635
1C	6	1,16	1,17	0,2	0.0769	0,9	1,38	0,99	1,335
2C	6	1,16	1,14	0,09	0.0369	1,08	1,26	1,08	1,26
3C	6	1,62	1,56	0,2	0.082	1,44	1,92	1,44	1,83

Aplicando testes não paramétricos, verifica-se que não há diferença significativa entre os grupos. Utilizando o teste Kruskal-Wallis para a concentração de 1mg/kg de HpD em função da variação da dose de energia, obteve-se $P = 0.293$; para a concentração de 1.5mg/kg $P = 0.017$, e para a concentração de 2.0mg/kg $P = 0.226$. Analisando os valores de P , é possível dizer, com 95% de confiança, que não existe diferença significativa entre as doses nas concentrações de 1.0 e 2.0mg/kg do FS, porém, na concentração de 1.5mg/kg, pode-se dizer, com 95% de confiança, que existe diferença significativa entre as doses. Estes resultados podem ser visualizados no gráfico da figura 32, mostrando a profundidade de necrose em função da dose de energia nas três concentrações do FS, empregadas.

O grupo de 1.5mg/kg foi o único que apresentou diferença significativa entre duas doses de luz, sendo 100 e 200J/cm², porém, não é possível afirmar que esta

diferença foi em função somente da irradiação aplicada, devido à presença de bactérias no grupo tratado com $100\text{J}/\text{cm}^2$ de energia, i.e., um fator externo que pode ter ocasionado alterações na resposta frente ao tratamento. Avaliando o Box-plot, observa-se que o grupo 2B e 2C apresentam resultados semelhantes diferindo apenas o grupo 2A. Os gráficos Box-plot mostram a presença de assimetria entre os grupos e a ausência de valores discrepantes.

Apesar de, estatisticamente, todas as doses de energia terem levado a mesma penetração, o gráfico da figura 32 indica, pelos seus valores medianos de cada grupo, que o aumento da dose deve levar a um aumento da profundidade, porém devido à alta dispersão dos resultados, esta observação deve ser tomada apenas como mais uma suspeita do que uma constatação. Caso esta observação seja verdadeira, seriam necessárias correções com relação ao conceito de limiar de intensidade; porém, o fato de não se observar variações estatísticas significantes é algo que fortalece o conceito de limiar acima estabelecido.

Figura 32 – Box-plot da profundidade de necrose em função da dose de energia.

Aplicando o teste de Friedman para as doses de energia em função da concentração do FS, obteve-se em $100\text{J}/\text{cm}^2$ $P = 0.380$, em $150\text{J}/\text{cm}^2$ $P = 0.905$ e em $200\text{J}/\text{cm}^2$ $P = 0.880$. Analisando os valores de P é possível dizer, com 95% de confiança, que não existe diferença significativa entre os três tratamentos utilizados. Estes resultados podem ser visualizados no gráfico da figura 33, mostrando a profundidade de necrose em função da concentração do HpD para as três doses de energia aplicadas.

Figura 33 – Box-plot da profundidade de necrose em função da concentração do FS.

Estas análises nos permitem afirmar que, tanto a concentração do HpD como a dose de energia por nós utilizadas no fígado, não ocasionaram variações na profundidade de penetração da luz e conseqüentemente da necrose celular. Isto, possivelmente, ocorre devido à saturação do FS no tecido hepático, o qual como já citado anteriormente, absorve uma grande parte da luz, dissipando-a na forma de calor, limitando a penetração da luz e o dano tecidual. O gráfico da figura 34 fornece a posição da média e considera mais ou menos o erro padrão da média (tabela 2 coluna 6): $s/n^{1/2}$, onde s é o desvio padrão da amostra (tabela 2 coluna 5) entre os grupos tratados.

Gráfico 34 – Profundidade de necrose em função dos tratamentos, fornecendo a posição da média e considerando o erro padrão da média.

Aplicou-se o teste de Mann-Whitney para comparar o grupo tratado com o dispositivo à base de LEDs (D), fotossensibilizado com 1.5mg/kg de HpD e iluminado com 150J/cm²; com o grupo tratado com o laser (2B), com os mesmos parâmetros, verificou-se $P = 0.1946$, podendo dizer, com 95% de confiança, que não existe diferença significativa entre os 2 grupos, assim como observado durante todo o trabalho. O gráfico da figura 35 apresenta o Box-plot da profundidade de necrose em função da fonte de luz e o gráfico da figura 36, mostra a profundidade de necrose em função da fonte de luz, considerando a média e o erro padrão da média ($s/n^{1/2}$) onde s é o desvio padrão da amostra.

Gráfico 35 – Box-plot da profundidade da necrose em função da fonte de luz.

Gráfico 36 – Profundidade da necrose em função da fonte de luz, fornecendo o desvio padrão e considerando o erro padrão da média.

Em termos práticos, a penetrabilidade da necrose obtida com o LED e comparada com o laser, implica em uma diferença muito pequena. Observa-se que, em média, as diferenças de profundidade da necrose são inferiores a 10%. No entanto, considerando-se o gráfico da figura 36, com escala expandida, comprova-se a pequena superioridade de profundidade de necrose do laser em comparação ao LED. Esta pequena diferença, advém, do fato que a linha espectral mais larga do LED, influencia tanto a penetrabilidade quanto à eficiência de ativação do FS, tendo como resultado global, uma leve diminuição da necrose.

A fluorescência, além de adotada como um método de detecção do HpD no tecido fotossensibilizado, foi utilizado também, para diferenciação do tecido normal fotossensibilizado do tecido necrosado após PDT.

O gráfico da figura 37 permite visualizar a fluorescência do tecido hepático normal e do necrosado. Observa-se, através dos espectros obtidos, a presença do FS 30h após a iluminação; entretanto, há um deslocamento da banda de emissão no tecido necrosado (λ_2), centrado em 630nm, em relação à banda de emissão do HpD em 623nm(λ_1).

Figura 37 – Gráfico do espectro de fluorescência do tecido fotossensível e do tecido necrosado.

A tabela 3 apresenta a banda de emissão do FS no tecido normal e no tecido necrosado. Através dos valores dos λ_1 e λ_2 , foi calculado o desvio (δ) existente entre as duas bandas; somando os δ s e dividindo pelo número total de grupos, encontrou-se um deslocamento médio de 7.6nm e, mesmo sendo um valor mínimo, representa um desvio entre as bandas de emissão e uma possível diferenciação entre tecido normal e necrosado, utilizando método de detecção óptica. A mudança no espectro de fluorescência do tecido necrosado, provavelmente é decorrente da associação do HpD com outras biomoléculas produzidas após a iluminação, da formação de produtos do processo de necrose e provavelmente, da fotólise do FS.

Tabela 3 – Desvio existente entre necrose e pré-PDT. O λ_1 é a banda do HpD (pré – PDT), λ_2 é a banda da necrose e o δ é o desvio entre duas bandas.

Grupos	λ_1	λ_2	$\delta (\lambda_2 - \lambda_1)$
1A	623nm	630nm	7nm
2A	623nm	632nm	9nm
3A	623nm	630nm	7nm
1B	623nm	631nm	8nm
2B	623nm	630nm	7nm
3B	623nm	630nm	7nm
1C	623nm	630nm	7nm
2C	623nm	631nm	8nm
3C	623nm	631nm	8nm
D	623nm	631nm	8nm

Foi investigada, além das características ópticas do tecido hepático com e sem HpD, a morfologia do tecido submetido à PDT, comparando-o com o tecido normal, bem como a profundidade da necrose.

Na análise macroscópica de todos os animais, observaram-se, imediatamente após irradiação do fígado, alterações significativas na cápsula de Glisson quando comparada à região adjacente não irradiada, sendo este último considerado parênquima normal. A área iluminada apresentou aspecto enrugado, com uma coloração vermelho intenso, facilmente diferenciada da região não irradiada, como

mostra a figura 38. Após 30 horas, esta área iluminada tornou-se esbranquiçada, marchetada por pequenas áreas escuras, com aspecto de úlcera, também de fundo irregular, de forma mais ou menos circular (figura 39).

Aos cortes desta lesão, viu-se uma faixa também esbranquiçada, marchetada com pequenas áreas escuras, mostrando limites precisos na sua profundidade comparando com o parênquima hepático normal que não foi atingido pela irradiação.

Figura 38 – Alteração hepática causada logo após aplicação da PDT

Figura 39 –Alteração hepática 30h após iluminação. A área circulada mostra úlcera de fundo esbranquiçado entremeado com áreas escuras, com bordas bem delimitadas.

A lesão hepática induzida pela PDT causou necrose coagulativa com graus variados de severidade. Em todos os fígados, na análise microscópica, houve necrose total da veia centrolobular, infiltrado inflamatório linfocitário discreto e a nítida separação entre os parênquimas necrosado e normal.

Os animais do grupo 1A apresentaram necrose coagulativa difusa, mantendo o arcabouço celular íntegro, preservando o epitélio do ducto interlobular e o endotélio dos ramos da veia porta e artéria hepática no espaço portal com moderada congestão nos sinusóides e ausência de hemorragia. Observou-se um discreto infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

Os animais dos grupos 2A, 3A, 1B, 2B, 3B, 1C, 2C e D apresentaram necrose coagulativa difusa, mantendo parcialmente o arcabouço celular, os ductos interlobulares, ramos da veia porta e artéria hepática no espaço portal necrosados, fazendo exceções aos grupos 2B, que apresentou o endotélio vascular necrosado, 3B e 2C que mostraram o espaço portal totalmente necrosado, sem preservação dos ductos e vasos e o grupo 1C onde houve destruição dos ductos interlobulares e preservação parcial do endotélio vascular. Notou-se congestão moderada dos sinusóides nos animais dos grupos 2A, 1B, 1C, 2C e D; já nos animais dos grupos 3A, 2B, e 3B, observou-se uma intensa congestão dos sinusóides. Foram encontrados focos hemorrágicos moderados no tecido necrosado dos grupos 2A, 1B, 3B, 1C, 2C e D, intensa hemorragia no grupo 2B e uma discreta área hemorrágica no grupo 3A. Observou-se infiltrado inflamatório com predomínio neutrofílico e moderada presença de macrófagos, na maioria dos grupos; porém, nos animais do grupo 1B houve moderado infiltrado de neutrófilo e discreta quantidade de macrófagos. No grupo 2C notou-se intenso infiltrado neutrofílico e discreta infiltração de macrófagos.

No grupo 3C, tratado com 2,0mg/kg de FS e 200J/cm² de luz, foram encontradas relevantes diferenças em relação aos demais grupos. A necrose hepatocitária foi difusa, porém, em algumas regiões, o hepatócito necrosado foi fagocitado e substituído por uma intensa quantidade de neutrófilos. O epitélio dos ductos interlobulares, o endotélio dos vasos sangüíneos portais, bem como a veia centrolobular apresentaram-se completamente necrosados. Os sinusóides estavam intensamente congestos e extensas áreas hemorrágicas foram notadas. Presença de infiltrado inflamatório com predomínio neutrofílico, moderada concentração de macrófagos e discreta quantidade de linfócitos, foram observados.

Com esta análise verificaram-se semelhantes características morfológicas na maioria dos grupos, exceto nos grupos 1A e 3C, sendo que o primeiro apresentou discretas alterações com leve dano tecidual e o segundo intensas alterações celulares.

A análise histológica dos fígados dos animais do grupo D, iluminados com o dispositivo à base de LEDs vermelhos, apresentou alterações semelhantes aos animais iluminados com o laser, observando-se características semelhantes ao do grupo 2B que recebeu a mesma concentração de HpD e de dose de luz, mostrando-se uma alternativa como fonte de luz para tratamento da PDT, mesmo sendo sua linha

espectral mais larga que a linha espectral do laser e conseqüentemente, diminuindo a penetrabilidade de luz e a profundidade de necrose, como já foi mencionado anteriormente.

A tabela 4 resume as principais alterações histológicas encontradas nos fígados com necrose coagulativa, nos diversos grupos.

Tabela 4 – Resumo, das alterações microscópicas encontradas nos diversos grupos.

MICROSCOPIA	GRAU DE LESÃO		
	Discreta	Moderada	Intensa
Ductos biliares	1A	2A; 3A; 1B; 2B; D	3B; 1C; 2C 3C
Vasos sanguíneos			
no espaço portal	1A	2A; 3A; 1B; 1C	2B; 3B; 2C; 3C; D
Veia centrolobular		Necrosada em todos os grupos	
Congestão		1A; 2A; 1B; 1C; 2C	3A; 2B; 3B; 3C; D
Hemorragia	1A; 3A	2A; 1B; 3B; 1C; 2C; D	2B; 3C;
Neutrófilo	1A	1B; D	2A 3A; 2B; 3B; 1C; 2C; 3C
Macrófago	1A; 1B; 2C	2A; 3A; 2B; 3B; 1C; 3C; D	
Linfócito		Infiltrado discreto em todos os grupos	

A análise da necrose foi um dos objetivos deste trabalho. Para facilitar tal análise foi feita uma classificação, baseada na severidade da necrose coagulativa, utilizando-se graus que variaram de 1 a 3, sendo grau 1 necrose coagulativa com preservação do arcabouço celular, grau 2 necrose coagulativa com o arcabouço celular parcialmente preservado e grau 3 necrose coagulativa com intenso infiltrado inflamatório neutrofílico substituindo o arcabouço celular hepático. O gráfico da figura 40 mostra o grau de necrose coagulativa ocorrida em cada grupo.

Figura 40 – Gráfico qualitativo da classificação da severidade da necrose. Grau 1 preservação do arcabouço; Grau 2 preservação parcial do arcabouço e Grau 3 arcabouço hepático necrosado e substituído por conglomerados neutrofilicos.

Apesar de, em linhas gerais, não apresentarem grandes diferenças em relação aos aspectos morfológicos, o uso de baixas ou altas concentrações do FS leva a diferentes alterações do tecido hepático, assim como o uso de menor ou maior dose de energia. Quando a dose de energia e a concentração da HpD são associadas e variadas, é possível observar diferenças teciduais. No entanto, neste estudo, não se notam alterações histológicas discrepantes entre os grupos, devido a fatores já mencionados.

Algumas das principais alterações microscópicas hepáticas, acima referidas, podem ser visualizadas nos quadros de fotomicrografias aumentadas 100x (figura 41).

A - Espaço-porta destruído, moderada congestão e infiltrado neutrofílico discreto.

B - Necrose total da veia centrolobular com intenso infiltrado neutrofílico, congestão sinusoidal discreto. Veia, artéria e ducto parcialmente necrosados.

C - Ducto biliar, vasos sanguíneos no espaço-porta; hemorragia; infiltrado de neutrófilos e macrófagos discretamente alterado

D - Espaço-porta e veia centrolobular destruídas, intensa congestão e hemorragia com intenso infiltrado neutrofílico

D - Intensa congestão sinusoidal e hemorragia

E - Espaço-porta necrosado, intenso infiltrado inflamatório neutrofílico e hepatócitos totalmente necrosado e substituído por conglomerado neutrofílico.

F - Conglomerados de neutrófilos, com infiltrado inflamatório neutrofílico intenso e moderada quantidade de macrófagos. Ductos e vasos portais parcialmente mantidos, congestão sinusoidal moderada e hemorragia discreta.

G - Intenso infiltrado inflamatório neutrofílico difuso

H - Transição de tecido hepático normal e necrosado. Nota-se na transição do tecido hepático normal, alguns hepatócitos com degeneração saculiforme e espaço porta íntegro. No tecido necrosado vê-se espaço porta parcialmente destruído, congestão sinusoidal discreta.

I - Transição de tecido hepático normal e necrosado

J - Parênquima hepático normal, perto das lesões necrosadas. Apresenta, aparentemente 2 espaços-portas e uma veia centrolobular íntegros.

K - Parênquima hepático normal, veia centrolobular e espaço-porta íntegros.

VI CONCLUSÕES

O trabalho realizado, confirma, através de um estudo sistemático, observações anteriormente feitas esporadicamente de que a profundidade de necrose de um tecido sadio fotossensibilizado é bem delineado correspondendo a uma intensidade de luz também bem determinada. Este fato leva a conclusão, inequívoca, de que existe um valor de intensidade de luz denominado de limiar, abaixo do qual não há ocorrência de necrose e acima da qual o dano celular é irreversível levando, conseqüentemente à necrose. O valor desta intensidade de limiar está relacionada com a concentração do FS administrado, bem como, com o tempo de espera até a iluminação com luz. A prova da existência do limiar de intensidade faz com que este tipo de conceito esteja envolvido nos procedimentos de determinação de dosimetria em PDT. A existência do limiar, também permite concluir que para levar uma célula à morte é necessária uma taxa mínima de excitação das moléculas do FS. Conclusão importante é a dependência dos coeficientes de penetração da luz quando o tecido está fotossensibilizado. Concentrações convencionalmente utilizadas em PDT (1.5 e 2.0mg/kg) chegam a alterar os coeficientes de penetração da luz por mais de um fator de 3. Levando-se este fato em conta, juntamente com as conclusões já descritas, relacionadas com a existência do limiar de intensidade, torna-se evidente que a profundidade de necrose será uma função da intensidade de luz usada, do tipo de exposição e da concentração do FS. Medidas de variação térmica tecidual permitem mostrar que a diminuição da penetrabilidade com o aumento da concentração da HpD esta intimamente ligado à absorção de energia e sua subsequente conversão em calor. Tanto a prova da existência do limiar como a dependência da penetrabilidade de luz e da concentração do FS fornecem subsídios para o estabelecimento de um modelo matemático que permite uma compreensão global do efeito profundidade de necrose nos tecidos sadios hepáticos aqui estudados, este encontra-se em apêndices. Para demonstrar que as conclusões aqui tiradas não são em função exclusiva da fonte de luz utilizada, realizou-se experimentos com uma fonte de luz LED, obtendo praticamente, os mesmo resultados . Este fato fortalece as novas tendências de substituição de lasers para vários tipos de PDT. O presente trabalho permite concluir que a PDT causou, no fígado, uma necrose coagulativa difusa, com presença de infiltrado inflamatório neutrofílico predominante e necrose total da veia centrolobular.

VII REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1 – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER / INCA. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. *Ministério da Saúde*, 2003.
- 2 – MARCASSA, L.G.; CESTARI, G.A.; MARCASSA, J.C.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Tumores. 1ª.Edição, novembro de 2002.
- 3 – KURACHI, C.; MELO, C.A.S.; MARCASSA, L.G.; ZÍLIO, S.C.; BAGNATO, V.S.; CESTARI, G.A.; JAVARONI, A.; BERTO, J.C.; PASSERI, C.; BONILHA, V.S.; SILVA, M.; FERREIRA, J.; VERISSÍMO, F.M.; SOUZA, C.S. Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Breve Histórico e Resultados Alcançados. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*, ano V, nº 20, p. 33-41, 4º Trimestre 2002.
- 4 – TOREZAN, L.A.R. Avaliação da Eficácia da Terapia Fotodinâmica com Ácido 5-Delta Aminolevulínico (ALA) Tópico no Carcinoma Basocelular. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Medicina, 2000.
- 5 – LUI, H.; BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy. In: GOLDMAN, M.P.; FITZPATRICK, R.E., ed. *Cutaneous Laser Surgery*. 2º edição Saint Louis, Mosby, p.437-58, 1999.
- 6 – NELSON, J.S.; MCCULLOUGH, J.L.; BERNIS, M.W. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. In: ARDNT, K.A.; DOVER, J.S.; OLBRIGHT, S.M. *Laser in Cutaneous and Aesthetic Surgery*. Philadelphia, Lippincott-Raven, p.349-82, 1997.
- 7 – SPIKES, J.D. The original and meaning of the term “Photodynamic” (as used in “Photodynamic Therapy”, for example). *J. Photochem. Photobiol. B.*, v.9, p.369-74, 1991.

-
- 8 – FRITSCH, C.; GOERRZ, G.; RUZICKA, T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch. Dermatol.*, v.134, p.207-14, 1998.
- 9 – KALKA, K.; MERCK, H.; MUKTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.42, p.389-413, 2000.
- 10 – LUI, H.; ANDERSON, R.R. Photodynamic therapy in dermatology [Editorial]. *Arch. Dermatol.*, v.128, p.1631-5, 1992.
- 11 – WILSON, B.D.; MANG, T.S.; STOLL, H.; JONES, C.; COOPER, M.; DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, v.128, p.1597-601, 1992.
- 12 – FREITAS, I.; BARONZIO, G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.*, v.11, p.3-30, 1991.
- 13 – KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v.14, p.275-92, 1992.
- 14 – MARTHY, H.J.; MURASECCO-SUARDI, P.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A.M. Primary effects of singlet oxygen sensitizers on eggs and embryos of sea urchins. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v.7, p.303-15, 1990.
- 15 – ROBERTS, D.J.H.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *Br. J. Plast. Surg.*, v.48, p.360-70, 1995.
- 16 – TROMBERG, B.J.; ORENSTEIN, A.; KIMEL, S.; BARKER, S.J.; HYATT, J.; NELSON, J.S.; BERNS, M.W. “*In vivo*” tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, v.52, p.375-85, 1990.

- 17 – GOMER, C.J.; RAZUM, N.J. Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochem. Photobiol.*, v.40, p.435-9, 1984.
- 18 – GROSSMAN, M.C. What's new in cutaneous laser research? *Dermatol. Clin.*, v.15, p.1-8, 1997.
- 19 – OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I.; The role apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* v.1, p.1-21, 2002.
- 20 – DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K.R.; MITTLEMAN, A. Photoirradiation therapy for the treatment of malignant tumours. *Cancer Res.*, v.38, p.2628-35, 1978.
- 21 – KESSEL, D.; LUO, Y. Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, v.64, p.601-4, 1996.
- 22 – LEVECKIS, J.; BROWN, N.J.; REED, M.W.R. The effect of aminolaevulinic acid-induced, proporphyrin IX – mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle microcirculation “*in vivo*”. *Br. J. Cancer*, v.72, p.1113-9, 1995.
- 23 – NELSON, J.S.; LIAW, L.H.; BERNIS, M.W. Mechanism of tumor destruction in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, v.46, p.829-36, 1987.
- 24 – WIEMAN, T.J.; MNAG, T.S.; FINGAR, V.H.; HILL, T.G.; REED, M.W.R.; COREY, T.S. NGUYEN, V.Q.; RENDER, E.R., Jr. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*, v.104, p.512-7, 1988.

-
- 25 – FINGAR, V.H.; HENDERSON, B.W. Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: a study of tumor and normal tissue response. *Photochem. Photobiol.*, v.46, n°5, p.837-41, 1987.
- 26 – GROSSWEINER, L.I. PDT light dosimetry revisited. *Photochem. Photobiol. B.*, v.38, p.258-68, 1997.
- 27 – ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. Robbins – Patologia estrutural e funcional. 5ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., 1996.
- 28 – LIU, L.; SVANBERG, K.; WANG, I.; STERAM, U.; ANDERSON-ENGELS, S. SVANBERG, S. Liver twin tumours: a new experimental hepatic tumour model in the investigation of various treatment strategies. *Med. Sci. Res.*, v.21, p. 703-6, 1993.
- 29 – ALFANO, R.R.; YAO, S.S. Human teeth with and without dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. *J. Dent. Res.*, v.60, p.120-22, 1981.
- 30 – DOUGHERTY, T.J. Yarly review. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.*, v. 45, n°6, p.879-89, 1987.
- 31 – LIPSON, R.L.; BALDES E.J.; OLSEN, A.M. The use derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *Journal of the National Cancer Institute.*, v.26, n°1, p. 1-11, 1961.
- 32 – MELO, C.A.S. Tese para obtenção do Título de Doutor e Física Aplicada. Instituto de Física de São Carlos – USP.
- 33 - MELO, C.A.S.; IMA, A.L.L.A.; BRASIL, I.R.C.; CASTRO E SILVA, O.Jr; MAGALHÃES, D.V.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. Characterization of light penetration in rat tissues. *J. Clin. Laser Medicine & Surgery*, v.19, n°4, p.175-79, 2001.

- 34 – ROULET, I. Methoden der pathologischen histologie. Springer – Verlag, Wien, 1948
- 35 - CONOVER, W. J. “Practical Nonparametric Statistics”, 2nd edition, John Wiley & Sons, 1980.
- 36 - BOWN, S.G.; TRALAU, C.J.; SMITH, P.D.C.; AKDEMIR, D.; WIEMAN, T.J. Photodynamic therapy with porphyrin and phtalocyanine sensitisation: Quantitative studies in normal rat liver. *Br. J. Cancer*, v.54, p.43-52, 1986.

ANEXOS

Requerimento de Patente, datada de 01 de agosto de 2002, intitulada: “DISPOSITIVO À BASE DE LEDs (LIGHT EMITTING DIODES) PARA BANHO DE LUZ NO TRATAMENTO NEONATAL DE ICTERÍCIA”. Protocolado com o número PI0204158-8

Requerimento de Direitos Autorais, datada de 17 de dezembro de 2002, intitulada: “GUIA PRÁTICO DE TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DE TUMORES”. Protocolado com o número 12637/RJ/ 2002

Artigo publicado na Revista Photodynamics News, vol 4, nº3 2001 ISSN: 1461-3131. Intitulado: “PDT IN BRAZIL”

Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia, ano V, nº20, 4º Trimestre de 2002. Intitulado: “IMPLATAÇÃO CLÍNICA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO BRASIL: BREVE HISTÓRICO E RESULTADOS ALCANÇADOS”.

Integrante da equipe clínica de PDT, no Hospital Amaral Carvalho de Jaú/SP e do Hospital das Clínicas da Faculdade da Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Regional Profile: PDT in Brazil

THE CLINICAL application of photodynamic therapy (PDT) in Brazil has been pioneered by a collaborative programme involving physicists and physicians from the University of São Paulo (USP) in São Carlos and the Amaral Carvalho Hospital in Jaú. The work began in 1997, and the first patient was treated in 1999. To date, this multidisciplinary group has treated over 130 patients for skin lesions and oral cancers. This ground-breaking project spans both clinical applications and the development of scientific research. For a developing country like Brazil, the importance of PDT is based on the simplicity of the technique when compared to conventional chemotherapy and radiotherapy. PDT does not require high level personnel training or computerised dosimetry and does not cause major side-effects in patients. Even when compared to surgery, PDT offers several advantages. Its relatively low overall cost makes it especially important in developing countries.

Overview of cancer in Brazil

Official data from the Brazilian National Institute of Cancer shows cancer as the second largest cause of death due to disease in Brazil. The official estimate from the Brazilian Health Ministry for 2001 is that 305,330 new cancer cases will be registered and 177,550 deaths by cancer will occur. In Figure 1, the estimated numbers of new cancer cases are shown, specified by cancer type and patient sex. Non-melanoma skin cancer is by far the commonest type of cancer affecting the Brazilian population. Coincidentally, this is a type of cancer that is well suited to PDT treatment.

Figure 1: Estimated numbers of new cases for 2001 in Brazil. Data reproduced from <http://www.inca.org.br> (07/17/2001).

Clinical application of PDT in Brazil

The clinical implementation of PDT in Brazil involved the establishment of several international collaborations. Firstly, there was a visit to the Buffalo General Hospital PDT Center (Dr Thomas Mang and Dr R. Allison). After this, we invited Dr Strnadko (State Research Center of Laser in Medicine, Moscow, Russia) for a two-week stay in Brazil, followed by the establishment of a collaboration with Dr V.V. Sokolov (Hertzen Research Oncology Institute, Moscow, Russia), who provided the specialist training to our group. In turn, this sequence of events has determined the way in which clinical implementation of PDT in Brazil has taken place.

Initially, only patients with skin cancer were treated. All the patients underwent clinical assessment for their eligibility to receive PDT. The photosensitiser used was a haematoporphyrin derivative, Photogem (Moscow, Russia). The drug was injected 24-48 hours prior to laser irradiation at the hospital. The

patients received laser irradiation at the Physics Institute of São Carlos, USP and then returned to the hospital for medical attendance. The system employed was an argon ion pumped-dye laser (Coherent, USA). Clinical examinations were performed regularly to evaluate the results. Recently, a full PDT department was installed at the Amaral Carvalho Hospital, and all clinical procedures are now carried out within the hospital.

Some of the skin cancer lesions treated are shown in Figure 2. Even the advanced cases have resulted in a positive response with PDT.

We are using PDT for both curative and palliative therapy. The technique is limited by the depth of light penetration. Where the lesion is thicker than 1cm, a complete response with one application is not possible, and additional applications are required. In some patients, PDT was given to improve their quality of life, as their clinical condition was poor or there were metastases. Even in those cases, positive results have been achieved.

So far, we have already treated over 130 patients. Our results indicate

Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Breve Histórico e Resultados Alcançado

C. Kurachi, C.S. Melo, L.G. Marcassa, S.C. Zílio e V.S. Bagnato,
G.A. Cestari Filho, A. Javaroni, J.C. Berto, C. Passeri, V.S. Bonilha e
M. Silva, J. Ferreira, F.M. Veríssimo e C.S. Souza

Abstract: A collaborative program involving physicians and physicians from the University of São Paulo (USP) in São Carlos and the Amaral Carvalho Hospital of Jaii has pioneered the clinical application of photodynamic therapy (PDT) in Brazil. The work began in 1997, and the first patient was treated in 1999. To date this multidisciplinary group has treated over 130 patients, especially with skin and oral cancers. This groundbreaking project spans both clinical applications and the development of scientific research. For a developing country like Brazil, the importance of PDT is based on the simplicity of the technique when compared to

conventional chemotherapy and radiotherapy. PDT does not require high level personnel training or computerized dosimetry and does not cause major side effects in patients. Even when compared to surgery, PDT presents several advantages. Its relatively low overall cost makes it especially important in developing countries.

Breve Histórico da Implantação

O câncer sempre ocupou um lugar de destaque na Medicina Moderna, principalmente quando se avalia o campo de diagnóstico e tratamento. Atualmente, toda a comunidade científica tem realizado esforços no sentido de desenvolver e implementar novas técnicas para tratamentos oncológicos. Uma destas novas alternativas é a denominada Terapia Fotodinâmica (PDT, acrônimo de Photodynamic Therapy)¹⁻⁵. Praticamente todo grande centro de oncologia nos países do chamado primeiro mundo já oferecem esta modalidade de terapia. Só para mostrar a importância desta nova terapia, basta dizer que por ano estão sendo realizados cerca de 6 encontros internacionais no tema. Além de utilizar as revistas tradicionais na oncologia, os pesquisadores e adeptos desta nova técnica têm agora uma revista especializada. Esta nova revista, Photodynamics News, está sendo publicada desde 1998, com registro ISSN 1461-3131. Nos vários números publicados desta revista pode-se notar o enorme crescimento

Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Tumores

1ª Edição – Novembro 2002

EQUIPE

V. S. Bagnato e L. G. Marcassa - Físicos
J. C. Marcassa e G. Cestari - Médicos
J. Ferreira - Biomédica
C. Kurachi - Cirurgiã-Dentista

INSTITUIÇÕES:

CePOF
Centro de Pesquisa em
Óptica e Fotônica