**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Clóvis Grecco

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FOTODINÂMICA EM FÍGADO
NORMAL DE RATOS UTILIZANDO FONTE DE LUZ PULSADA NO
REGIME DE FEMTOSSEGUNDOS.**

São Carlos
2009

Clóvis Grecco

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FOTODINÂMICA EM FÍGADO
NORMAL DE RATOS UTILIZANDO FONTE DE LUZ PULSADA NO
REGIME DE FEMTOSSEGUNDOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada - Opção Física Biomolecular.

Orientador: Prof(a). Dr(a). Cristina Kurachi

São Carlos
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Grecco, Clovis.

Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando fonte de luz pulsada no regime de femtossegundos./ Clovis Grecco ; orientador Cristina Kurachi.-- São Carlos, 2009. 73p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Dosimetria. 3. Laser de femtossegundos. 4. Fotodegradação. I. Título.

IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
13566-590 - São Carlos, SP

Fone/Fax: (16) 3373. 9777
www.ifsc.usp.br
svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Clovis Grecco

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada – Opção:
Física Biomolecular.

Aprovado em: 13/02/2009

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Cristina Kurachi

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Júnior

Instituição: FMRP/USP

Assinatura

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Dedico este trabalho aos meus pais, Margarida e Miguel, que sempre me apoiaram em todas as decisões, mesmo não sendo a desejada por eles. Agradeço pelo carinho, dedicação e compreensão que tiveram por mim durante esta jornada.

Agradecimentos

Aos meus pais, Margarida e Miguel, que aceitaram minha necessidade de procurar novas experiências, e permitiram e apoiaram minhas escolhas mesmo que tortuosas.

Às minha irmãs, Andréia e Adriana, que em minha ausência cuidaram de todos os assuntos possíveis para que eu continuasse meu trabalho com tranquilidade.

À Larissa Marin que, com muita paciência, suportou meus momentos de fúria.

Aos muitos amigos e colegas que tive a oportunidade de conhecer e conviver em todos esses anos em que estive em São Carlos, e com os quais compartilhei muitos momentos bons e outros não tão alegres. Obrigado por tudo, pessoal!

Aos funcionários Leandro e Evaldo, que não me faltaram quando precisei de ajuda para executar qualquer tarefa.

Ao pessoal do Laboratório de Atômica, que sempre me forneceram apoio material e técnico.

Ao Daniel Varela, pela assistência e orientação que me prestou durante a realização deste trabalho.

Ao camarada Juliano, o qual muitas e muitas vezes “quebrou” aquele galho. Valeu, amigo!

Aos professores, técnicos e funcionários do Instituto de Física de São Carlos, pelo apoio e ensinamento dado durante todo esse período.

À Isabel e Benê, secretárias do Grupo de Óptica, pela paciência, carinho e disponibilidade para nos auxiliar. Obrigado!

Ao pessoal do Laboratório de Apoio Técnico e do LIEPO, pelo suporte em eletrônica e pela amizade de vocês.

Ao Sebastião e à Paula, pelo apoio e ensinamentos em um momento de muita angústia. Agradeço pela paciência e ajuda que me deram.

Ao Denis, por quem, desde de que nos conhecemos e passamos a trabalhar juntos neste grupo de pesquisa, desenvolvi uma grande consideração e apreço, bem como por sua família. Muito obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Biofotônica, onde este trabalho foi realizado; Carla, Emery, Everton, Fernando, Gustavo Sabino, Gustavo Nicolodelli, Jeison, Juçaira, Larissa, Mardoqueu, Maristela, Natália, Raquel, Ruy, Vitória e Willian, sempre presentes no dia a dia, e dispostos a ajudar. Agradeço a todos de coração.

À Juliana Ferreira, por tudo que me ensinou, pelo apoio e pela amizade. Muito obrigado.

Ao camarada José Dirceu, não apenas um companheiro de trabalho mas sim um grande amigo. Sempre disposto a socorrer os fracos e oprimidos. Meu velho amigo, queria ter um coração tão grande quando o teu, obrigado por tudo.

À Lilian, que nesses últimos meses descobri que poderia ser mais do que uma colega – uma grande amiga. Obrigado por alimentar minha mente com novas idéias e conceitos.

Ao professor Vanderlei, pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos e pela contribuição para minha formação profissional e pessoal, servindo com exemplo de caráter e atitude. Obrigado, Vanderlei!

À CAPES e a FAPESP, pelo suporte financeiro por meio da bolsa de mestrado e do CEPOF – Centro de Ensino e Pesquisa em Óptica e Fotônica (programa CePID/FAPESP).

E, em especial, à professora Cristina, com quem pude conviver ao longo desses anos e a quem aceito como exemplo a ser seguido, tanto pelo profissionalismo quanto pela arte de gerenciar pessoas. Agradeço pela paciência, pelos ensinamentos no fazer ciência e o mais importante, pela amizade. Os anos irão passar, mas sempre estará comigo. Obrigado, Cristina.

Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. Mas no fundo isso não tem muita importância. O que interessa mesmo não são as noites em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre. Em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.

Shakespeare

Resumo

GRECCO, C. Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando fonte de luz pulsada no regime de femtossegundos. 2009. #f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma promissora técnica para o tratamento de câncer e de outras patologias. O tratamento baseia-se na ação de uma fonte de luz com o agente fotossensibilizador (FS) e o oxigênio molecular presente nas células, gerando espécies reativas de oxigênio que causam a morte celular. Uma das limitações atuais da técnica é a penetração da luz no tecido biológico. Entre os fotossensibilizadores mais empregados, estão os derivados de hematoporfirina, que são excitados da região do vermelho do espectro eletromagnético. Fotossensibilizadores vêm sendo desenvolvidos para iluminação com comprimentos de onda maiores, com o potencial de aumentar a profundidade de penetração e em consequência, o volume tecidual tratado. Outra opção para aumentar o volume tecidual de resposta utilizando derivados de hematoporfirina é a utilização de fontes de luz pulsada que, em comparação com a contínua, vem apresentando resultados significativos no estudo da TFD. Neste estudo, foi realizada a fotodegradação *in vitro* do fotossensibilizador comercial Photogem[®] (Moscou, Rússia) com tempos variando entre 0 e 40 minutos. Como fonte de luz contínua foi utilizado um laser de diodo (Eagle Heron – Quantum Tech, Brasil), e como fonte de luz pulsada, foi utilizado um laser em regime de femtossegundos emitindo em 630 nm, 1 kHz, pulso < 70 fs (Ti:Sapphire Libra-S, Opera-VIS – Coherent, USA). Para a coleta dos dados, foi utilizado um sistema de espectroscopia por fluorescência portátil composto por um espectrometro USB 2000, um *laptop* e sonda em Y para excitação e coleta da fluorescência do FS. Também foi realizada a TFD em fígados normais de ratos. Foram utilizados 18 animais, pesando entre 180 e 250g. Os animais foram divididos em 2 grupos. Ambos os grupos receberam 1,5 mg/kg de FS, e após 30 minutos foram iluminados com dose de energia de 150 J/cm² e intensidade de 74 mW/cm². Também foi realizado o estudo da penetração da luz utilizando macerado de fígado de rato, e o mapeamento térmico durante a TFD com a fonte de luz CW e o laser pulsado. O estudo da taxa de fotodegradação do FS nos mostrou uma maior eficiência da fonte de luz pulsada para a degradação da molécula de Photogem[®], enquanto que a taxa de degradação para o CW foi 6 vezes menor. O macerado mostrou que o coeficiente de penetração da luz CW e a luz pulsado são praticamente os mesmos, o que sustenta a análise com a intensidade média. O estudo *in vivo* mostra, através de uma análise histológica do perfil de necrose, que a fonte de luz pulsada alcança uma profundidade de necrose cerca de 2 vezes maior, em comparação com a fonte em regime contínuo, além de um melhor resultado em uma avaliação qualitativa da morfologia da região de necrose. Isto está relacionado com a alta intensidade dos pulsos emitidos pela fonte de luz pulsada com o tecido e o FS presente, promovendo o aumento na profundidade de necrose.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, dosimetria, laser de femtossegundos, fotodegradação.

Abstract

GRECCO, C. Evaluation of photodynamic response in normal rat liver using a femtosecond regime pulsed irradiation. 2009. #f. Dissertation (Master's degree) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.

Photodynamic therapy (PDT) is a useful technique for the treatment of cancer lesions and other diseases. The treatment is based on the interaction of light with a photosensitizer agent (PS) and with molecular oxygen that is present in cells, which generates reactive oxygen species that promote cell death. One of the limitation factors of this technique is limited light penetration in biological tissue. Hematoporphyrin derivatives are among the most used photosensitizers. They are excited on the red region of the electromagnetic spectrum. New photosensitizers has been developed for the use with longer wavelengths, potentializing the increase of penetration depth and, hence, the volume of treated tissue. Another option to increase the volume of responding tissue in PDT studies is to use pulsed light sources, which has presented satisfactory results when compared to continuous (CW) light sources. In this study, *in vitro* photodegradation of Photogem[®] (commercial photosensitizer, Moscow, Russia) was performed, during irradiation times between 0 and 40 minutes. A diode laser (Eagle Heron – Quantum Tech, Brazil) was used as CW light source, and a femtosecond laser (Ti:Sapphire Libra-S, Opera-VIS – Coherent, USA) emitting in 630 nm (1 kHz, < 70 fs pulse) was used as a pulsed light source. Data collection was performed using a portable fluorescence spectroscopy system, including a spectrometer USB 2000 (Ocean Optics[®], Palo Alto, CA), a laptop and a Y-type optical fiber probe for PS fluorescence excitation and collection. Photodynamic response was investigated in eighteen animals, weighting between 180 g and 250 g, which were divided in two groups. Both groups received 1.5 mg/kg of body mass of PS, and after thirty minutes were irradiated with light dose of 150 J/cm² and 74 mW/cm² for fluence rate. Light penetration was also investigated using rat liver macerate, and thermal monitoring during PDT as well, for both pulsed and CW light sources. The photodegradation rate study allowed us to observe a greater efficiency in Photogem[®] molecules degradation for the pulsed light source. For the CW irradiation, the degradation rate was 6 times lower. Macerate study showed that light penetration coefficient values for CW and pulsed were similar, which corroborates with the average intensity analysis. The depth of necrosis histological analysis showed that the pulsed light source allows depth of necrosis to be about 2x deeper when compared to CW source. Additionally, the pulsed source showed a better result in the qualitative evaluation of necrotic tissue morphology. This is related to the high intensity of the pulses emitted from the pulsed light source on the photosensitized tissue, promoting an increase in depth of necrosis.

Keywords: photodynamic therapy, dosimetry, femtosecond laser, photodegradation.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Gráfico dos números de casos para os tipos de câncer mais incidentes estimados para a população brasileira no ano de 2008 (fonte: http://www.inca.gov.br).....	17
Figura 2. Espectro de absorção do Photogem [®]	20
Figura 3. Estrutura básica da porfirina.	23
Figura 4. Diagrama de Jablonski – Passagem do FS do estado fundamental para o estado tripleto a partir da absorção de um fóton e as reações básicas das quais o FS excitado pode participar(adaptado de Mironov et. al (11)).	25
Figura 5. Estrutura monomérica do Photogem [®]	30
Figura 6. Tipos de agregados formados pelas porfirinas em solução aquosa(4).	30
Figura 7. Irradiação de uma Cubeta de plástico (a) com uma fibra para iluminação direta (b) e limitada por uma máscara (c) com a ponteira de coleta da fluorescência (d) posicionada na outra face.	43
Figura 8. Ponteira de coleta do sistema portátil de fluorescência posicionado para coleta de fluorescência de solução de Photogem [®] diluída.....	44
Figura 9. Conjunto óptico utilizado para a irradiação com laser pulsado: a) OPera – VIS; b) espelho dielétrico ($\theta=45^\circ$); c) lente convergente ($f=2,0\text{ mm}$); d) lente convergente ($f=20,0\text{mm}$); e) cubeta de plástico; f) ponteira de fibra de coleta da fluorescência.	46
Figura 10. Gráfico dos espectros da fluorescência do Photogem [®] coletados em três tempos de irradiação.....	46
Figura 11. Desenho esquemático mostrando o posicionamento da fibra isotrópica e o sentido do deslocamento no caminho do feixe de incidência.	48
Figura 12. Esquema de iluminação com laser de diodo (CW).....	49
Figura 13. Desenho esquemático mostrando o conjunto óptico montado para expandir o feixe de saída do sistema OPera.....	50
Figura 14. Imagem macroscópica da superfície do fígado 30 horas após o término da irradiação com laser de Diodo (A) e com laser pulsado em regime de femtossegundos(B) ...	52
Figura 15. Corte histológico de fígado de rato visto ao microscópio óptico (32x), onde pode ser observado o tecido sadio (b) e o perfil de necrose(a) provocada pela TFD com fonte de luz contínua (A) e pulsada (B)	53

Figura 16. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW(A) e com laser pulsado(B), (400x) mostrando a região do espaço porta em uma área necrosada, a seta aponta para células viáveis.	54
Figura 17. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW (A) e com laser pulsado (B), vista ao microscópio óptico (400x) mostrando a região da veia centro lobular de uma área de necrose; seta contínua - presença de hemácias, seta tracejada - canalículos biliares dilatados, indicando dano.	55
Figura 18. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW (A) e com laser pulsado (B), vista ao microscópio óptico (400x) mostrando a interface necrose-tecido sadio; seta contínua - presença de infiltrado neutrofílico, e seta tracejada - canalículos biliares dilatados. As regiões delimitadas mostram células saculiformes, ou seja, células em degeneração.....	56
Figura 19. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW (A) e com laser pulsado(B), vista ao microscópio óptico (400x), apresenta a superfície do tecido necrosado; seta contínua mostra algumas células viáveis na cápsula de Glisson, e seta tracejada mostra os canalículos biliares edemaciados.	56
Figura 20. Gráfico da profundidade de necrose para cada fonte de luz utilizada. O laser de diodo apresentou profundidade do tecido necrosado de $1,0 \pm 0,1\text{mm}$, enquanto que o laser pulsado apresentou $2,0 \pm 0,2\text{ mm}$	58
Figura 21. Comparação da intensidade de energia em 1ms para o laser de CW (a) e o laser pulsado(b).	59
Figura 22. Gráfico do logaritmo da intensidade normalizada em função do deslocamento da fibra para o laser de diodo e o laser pulsado.	60
Figura 23. Gráfico da variação da temperatura em função do tempo de irradiação utilizando fonte de luz CW. O gráfico apresenta o resultado da variação para os três animais.	61
Figura 24. Gráfico da variação de temperatura em função do tempo de irradiação utilizando fonte de luz pulsada. O gráfico apresenta o resultado da variação para os três animais.	62
Figura 25. Representação dos níveis de energia do fotossensibilizador quando excitado com um fóton e a transferência de energia entre o fotossensibilizador e o oxigênio molecular.....	64
Figura 26. Gráfico da dose em função da distância.	65
Figura 27. Gráfico da taxa de fotodegradação em função da intensidade para o laser CW e o laser de femtossegundos.	66

Lista de Abreviaturas ou Siglas

ALA – ácido 5-aminolevulinico

FS – fotossensibilizador

IDL – Intervalo Droga Luz

PDT – *Photodynamic Therapy*

TFD – Terapia Fotodinâmica

mm – milímetros (10^{-3} metros)

μm – micrometros (10^{-6} metros)

nm – nanômetros (10^{-9} metros)

s – segundo

ms – milissegundos (10^{-3} segundos)

μs – microssegundos (10^{-6} segundos)

ps – picossegundos (10^{-9} segundos)

fs – femtossegundos (10^{-15} segundos)

mW – (mili)Watts (10^{-3} Watts)

J - Joule

mJ – (mili)Joules (10^{-3} Joules)

μJ – (micro)joules (10^{-6} joules)

cm^2 – centímetro quadrado

F – fluorescência do FS

E – eficiência de coleta da fluorescência

h – constante de Plank

Lista de Símbolos

λ – comprimento de onda

F – fluorescência do FS

E – eficiência de coleta da fluorescência

ϕ_f – rendimento quântico da reação de fluorescência

$[S_0]$ – concentração de FS no estado fundamental

$[S_1]$ – concentração do FS no estado singleto

$[T_1]$ – concentração do FS no estado tripleto

$[^1O_2]$ – concentração do oxigênio molecular no estado singleto

$[^3O_2]$ – concentração do oxigênio molecular no estado tripleto

$^1\Delta_o$ – estado singleto do oxigênio molecular

$^3\Sigma_g$ – estado tripleto do oxigênio molecular

σ_{so} – seção de choque do FS

Φ – intensidade de excitação

$h\nu$ – energia da radiação incidente

ν – frequência da onda eletromagnética

S_Δ - fração de FS no estado tripleto que transfere energia para o oxigênio, resultado na formação do oxigênio singleto

k_s – constante cinética de decaimento do FS para o estado singleto

k_{isc} – constante cinética do cruzamento intersistema do FS

k_f – constante cinética do decaimento do FS do estado S_1 para o estado S_0 com emissão de fluorescência

k_p – constante cinética do decaimento do FS do estado S_1 para o estado S_0 com emissão de fosforescência

k_{ot} – constante cinética de transferência de energia do FS para o oxigênio molecular

k_d – constante cinética do decaimento do oxigênio singleto para o estado fundamental

k_{ta} – constante cinética da reação entre o FS no estado tripleto e o aceptor

k_{os} – constante cinética da reação entre o oxigênio singleto e o FS no estado fundamental

k_{oa} – constante cinética de reação entre o oxigênio singleto e o aceptor

k_{so} – constante cinética entre a reação do primeiro estado singleto excitado do FS e o estado fundamental do oxigênio

k_{sa} – constante cinética de reação entre o primeiro estado singleto do FS com o aceptor

D_0 – máximo da dose de luz na superfície do tecido

D_{th} – limiar de dose de luz para se obter a necrose

I – número de fótons absorvidos pelo fotossensibilizador por segundo

α – Coeficiente efetivo de absorção

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
1.2 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA TFD	21
1.3 FOTOSSENSIBILIZADOR	22
1.4 MECANISMOS DE AÇÃO	24
1.5 ESPECTROSCOPIA POR FLUORESCÊNCIA.....	26
1.6 FOTODEGRADAÇÃO	29
1.7 FONTES DE LUZ PARA A TFD	35
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 ANIMAIS	40
3.2 FOTOSSENSIBILIZADOR	40
3.3 SISTEMA DE DETECÇÃO ÓPTICA	41
3.4 FONTE DE LUZ	42
3.4.1 CW.....	42
3.4.2 Laser Pulsado	42
3.5 PROCEDIMENTO IN VITRO	43
3.5.1 Fotodegradação com Laser CW	43
3.5.2 Fotodegradação com Laser Pulsado	45
3.6 PENETRAÇÃO DA LUZ.....	47
3.7 ESTUDO IN VIVO	48
3.7.1 TFD	48
3.7.2 Mapeamento Térmico.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	52
4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	53
4.3 ANÁLISE DA RESPOSTA FOTODINÂMICA INDUZIDA	57
5. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	72

1 Introdução

1.1 Considerações gerais

O crescimento desordenado de células capazes de invadir tecidos e órgãos e que podem ainda se espalhar por outras regiões do corpo é o que chamamos de câncer. De um total de 58 milhões de mortes ocorridas em 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, representando 13 % do total de mortes ocorridas naquele ano. Estimativas para o ano de 2008, válidas para o ano de 2009, apontam que ocorrerão cerca de 466.730 novos casos de câncer no Brasil, sendo 231.860 para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino (1).

Figura 1. Gráfico dos números de casos para os tipos de câncer mais incidentes estimados para a população brasileira no ano de 2008 (fonte: <http://www.inca.gov.br>).

Os registros de câncer fazem parte de um sistema de vigilância que é um dos componentes para o planejamento e monitoramento de programas de controle do câncer, onde bem estruturado, fornece informações sobre a magnitude da doença, como também medidas de prevenção, detecção precoce, tratamento e cuidados paliativos (1).

O tratamento de tumores malignos tem conseguido grande avanço nos últimos anos com sucesso satisfatório. Os resultados da terapêutica dependem de fatores relacionados ao indivíduo e ao tumor. A compatibilidade da condição clínica e psicológica do paciente com o tratamento proposto, além dos efeitos do tratamento na vida pessoal e profissional é levado em consideração. Quanto aos aspectos tumorais, o tipo histológico, grau de diferenciação, a extensão da doença e a sensibilidade à terapêutica determinam o melhor tratamento ao paciente (1).

Os tratamentos existentes envolvem a remoção do tumor por via mecânica, via química através da quimioterapia ou por intermédio da radioterapia que envolve radiação ionizante. Além dessas ainda há a possibilidade de utilizar a imunoterapia que se baseia na ativação do sistema imune contra células malignas, produzindo proteínas que passariam a ser reconhecidas pelas células de defesa do organismo, provocando a destruição das células do tumor. Há também a possibilidade de vacinas, onde se separam antígenos da célula tumoral, sendo re-injetado nos pacientes, que teriam seu sistema imune ativado (2).

Todas as terapias apresentam resultados satisfatórios principalmente quando diagnosticada nos estágios iniciais da doença. Ainda assim, em muitos casos é necessária a cirurgia radical, comprometendo a função e a anatomia do órgão (1). Apesar de todo o esforço já despendido para o tratamento da doença, o tratamento oncológico ainda tem espaço para desenvolvimento e inovação. Dentre as alternativas estudadas nos últimos anos, destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD) (3).

A TFD é uma promissora técnica para o tratamento de câncer e outras moléstias. O tratamento baseia-se na ação de uma fonte de luz com um agente fotossensibilizador (FS) e o oxigênio molecular presente nas células (4). A técnica apresenta muitas vantagens com relação às técnicas tradicionais como o dano seletivo as células neoplásicas, efeitos colaterais menos adversos e controlados, possibilidade de repetição do procedimento e, além disso, sem a necessidade de intervenção cirúrgica (4,5). Esse tratamento é conhecido e estudado desde o início do século passado, mas ganhou impulso a partir da década de 1970 com os experimentos de Dougherty (4).

Como fonte de luz para a TFD tem-se utilizado o laser. Dispositivo inventado na década de 60 e que apresenta características importantes como: elevada concentração de energia, pouca perda de energia enquanto a luz se propaga, monocromaticidade e coerência. Devido à monocromaticidade é possível selecionar um comprimento de onda que interaja com uma determinada molécula dentro de um universo de moléculas variadas (4,5).

O FS deve apresentar baixa toxicidade no escuro, adequada seletividade para permanecer acumulado nas células neoplásicas, possuir uma banda de absorção na janela biológica (estreita faixa do espectro de radiação onde há relativa penetração nos tecidos biológicos), alta eficiência quântica e ter uma rápida eliminação pelo corpo, para que o paciente permaneça fotossensível o menor tempo possível após a irradiação da lesão.

Durante a TFD, o FS se liga as células tumorais e na presença de luz, o FS vai do estado fundamental ao estado tripleto, nesse estágio ocorrem dois tipos de reação. Nas reações do tipo I, as moléculas reagem com o substrato formando radicais livres. Nas reações do tipo II, as moléculas transferem diretamente sua energia para o oxigênio molecular presente na célula, formando o oxigênio singleto, este altamente reativo e citotóxico (6,7)

Uma das limitações da TFD é a penetração da luz no tecido biológico. Atualmente os fotossensibilizadores mais comumente empregados são excitados em comprimentos de onda

na região do vermelho. Apesar de a maior eficiência quântica estar na excitação correspondente à banda de Soret, $\lambda = 369\text{nm}$ (figura 2), a iluminação das lesões malignas não é realizada no UV-violeta devido a menor penetração da luz nos tecidos biológicos. A profundidade de penetração da luz vermelha em tecidos biológicos, especialmente pele e mucosas, é em torno de 1 cm, mas a necrose tecidual induzida em muitos casos ainda é inferior a esse valor.

Fotossensibilizadores vêm sendo desenvolvidos para a iluminação em comprimentos de onda maiores, isto é, na região do infravermelho próximo, com o potencial de aumentar a profundidade de penetração em alguns centímetros.

Outra opção para aumentar o volume de resposta ainda utilizando os derivados de hematoporfirina é a utilização de fontes de luz pulsada, que em comparação com a de irradiação contínua, apresenta uma maior potência de pico, levando a uma maior profundidade de penetração da luz.

Figura 2. Espectro de absorção do Photogem®.

O Photogem[®] em solução, quando excitado com comprimento de onda em 530 nm, apresenta um espectro de fluorescência característico com um pico intenso em 614 nm e outro em torno de 670nm. Em tecidos biológicos, como o fígado de rato, há um deslocamento da emissão de fluorescência para o vermelho. Com a técnica de espectroscopia por fluorescência é possível monitorar a presença e a eliminação do FS no tecido proporcionando o estudo da cinética (8).

Pelo mesmo princípio, o acompanhamento da degradação e a formação de fotoprodutos, pode ser acompanhado pelo monitoramento da fluorescência do FS (4).

1.2 Princípios Básicos da TFD

A TFD usa as propriedades benéficas da luz em associação com uma substância fotossensível e ao oxigênio molecular presente na célula. A droga, administrada via endovenosa, percorre todo o corpo sendo absorvida pelas células. As células tumorais apresentam metabolismo e características morfológicas diferentes, retêm a droga por mais tempo (3). A permeabilidade das células tumorais está alterada, as fibras colágenas estão imaturas e são semelhantes às observadas em tecidos embrionários e em processo de cicatrização. Tais fibras apresentam grande capacidade de ligação com as porfirinas, mantendo o acúmulo da droga por mais tempo em comparação com as células normais. Fatores como a rede linfática pouco desenvolvida, a ligação das porfirinas a lipoproteínas, presença de macrófagos e pH intracelular menor, são fatores que levam a uma maior concentração do FS em células tumorais (4,9,10). Após um tempo, que pode ser normalmente entre 24 e 48 horas, da administração da droga, a droga estará concentrada preferencialmente no tecido neoplásico estabelecendo uma diferenciação para a terapia local. Este medicamento

poderá ser iluminado, com o comprimento de onda adequado. O FS receberá esta energia e passará para um estado energético excitado, onde poderá trocar elétron com o oxigênio molecular presente nas células. O oxigênio presente na célula se encontra no estado tripleto, quando recebe esta energia ele passa para o estado singleto, se tornando uma espécie altamente reativa para os constituintes celulares. Esta espécie reativa é altamente citotóxica e em consequência disso, a célula neoplásica é levada a morte (5).

A morte celular é o resultado final da lesão celular. Uma das causas da lesão celular pode ser por agentes físicos, que incluem trauma mecânico, extremos de temperatura, súbitas mudanças de pressão, choque elétrico e radiação, ou ainda podem ser causadas por hipóxia, agentes químicos, agentes infecciosos, reações imunológicas, distúrbios genéticos e desequilíbrio nutricional. Estes fatores levam a dois padrões de morte celular, a necrose e a apoptose: a apoptose é um evento regulado, participando inclusive de eventos fisiológicos, enquanto que a necrose é o tipo mais comum de morte celular devido a estímulos exógenos, tais como ruptura celular e degradação de organelas celulares. A TFD lida com um mecanismo importante de lesão celular que é a lesão induzida por radicais livres, a qual há vários processos envolvidos, tais como lesão química, por radiação e a toxidez por oxigênio.

1.3 Fotossensibilizador

As porfirinas compreendem uma classe de moléculas muito importantes em sistemas biológicos, desenvolvendo papéis vitais no funcionamento de muitos sistemas bioquímicos como a fotossíntese, transferência de elétrons na cadeia respiratória bem como transporte e

armazenamento de oxigênio. A protoporfirina IX e a clorofila são conhecidas como moléculas vitais responsáveis pela manutenção, em nível fisiológico, das principais formas de vida (10).

Figura 3. Estrutura básica da porfirina.

Dentre os fotossensibilizadores aprovados e utilizados em tratamentos clínicos, podemos citar o Photofrin[®] (USA e Canadá), Phoscan[®] (Alemanha), HPD[®](China), Photogem[®] (Russia), Derivado de Benzoporfirina (Canadá), Ácido 5-aminolevulínico (Europa e USA). O Ácido 5-aminolevulínico (ALA) é um precursor de FS atuando nas células induzindo a produção de Protoporfirina IX. O ALA é indicado para tumores superficiais e de Brônquios. Outros fotossensibilizadores estão sendo testados, chamados de fotossensibilizadores de segunda geração, que tem como características, compostos que são excitados com comprimentos de onda maiores, buscando maior penetração no tecido biológico e que também apresentem eliminação mais rápida (3). Os fotossensibilizadores para o uso da TFD devem apresentar algumas propriedades específicas para atuarem como FS fototerápico, tais como:

- i. Ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico;
- ii. Apresentar seletividade quanto a retenção por células malignas após algumas horas da injeção da droga na corrente sanguínea;

- iii. Ter habilidade para o transporte passivo ou ativo dentro das células e ter um alvo intracelular conhecido;
- iv. Possuir alto rendimento quântico, ou seja, falicidade para receber ou emitir fótons, no estado singleto;
- v. Baixa toxicidade a níveis terapêuticos, com mínima morbidez para o paciente;
- vi. Ser metabolizado rapidamente (10).

1.4 Mecanismos de Ação

O mecanismo de atuação da TFD consiste na interação da luz, de comprimento de onda adequado com o fotossensibilizador e o oxigênio molecular, resultando em espécies reativas que induzem a morte celular. Os fenômenos físico-químicos podem ser resumidos em um Diagrama de Jablonski adaptado ao FS (Figura 4).

Quando esses fotossensibilizadores são irradiados com luz visível a uma dada energia, ocorre a elevação do nível de energia S_0 para o estado excitado S_1 , onde os elétrons estão com os *spins* emparelhados. Esses elétrons podem retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou por decaimento vibracional. Também pode ocorrer o cruzamento inter sistema, estado esse onde o FS está no estado tripleto, sendo capaz de transferir carga elétrica para o oxigênio molecular que se encontra no mesmo estado.

Esta transferência ocorre por vias de processos colisionais, e o caráter citotóxico é devido ao alto poder oxidante do oxigênio singleto (10,12,13). A equação 3 representa o FS no estado tripleto como T_1 , o oxigênio molecular como 3O_2 , o FS no estado fundamental como S_0 e o oxigênio singleto como 1O_2 :

1.5 Espectroscopia por Fluorescência

Dentre as inúmeras aplicações, a espectroscopia de fluorescência pode ser usada como técnica alternativa para a diferenciação de moléculas e tecidos biológicos, tanto para o diagnóstico de lesões quanto para a investigação de alterações metabólicas celulares (14).

Quando um material é fotoexcitado, a energia recebida faz com que os elétrons sejam transferidos de uma camada de menor energia para uma de maior energia. Esta condição é mais instável e, portanto, os elétrons excitados retornarão à camada de menor energia, liberando o excesso de energia para recuperar maior estabilidade. Uma das formas permitidas para esse decaimento é um fenômeno radiativo denominado fluorescência, que é a re-emissão de fótons (15).

Define-se fluorescência por uma transição radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade *spin* (singleto ou tripleto). A maioria das moléculas orgânicas possui elétrons emparelhados na sua configuração orbital do estado molecular fundamental. Assim, os *spins* são equilibrados ($S=0$) e a multiplicidade *spin* é singleto. Quando ocorre uma inversão de *spin* do elétron excitado, o resultado são dois elétrons desemparelhados, com

mesma orientação de *spin* ($S=1$), o chamado estado tripleto. O tipo mais comum de transição é singlete-singlete, especialmente entre S_1 (o primeiro estado singlete excitado) e $S=0$ (o estado fundamental) (16).

O processo de absorção de energia envolve a interação da molécula em S_0 com um fóton, promovendo a transferência de um elétron de um orbital molecular de menor energia para um de maior energia. O tipo mais simples de fluorescência, em termos fotofísicos, seria o inverso do processo de absorção, i.e., emissão de luz de comprimento de onda idêntico ao da luz absorvida (fluorescência ressonante), a qual é rara, sendo observada para condições bastante particulares de átomos ou gases moleculares (a pressões muito baixas), e raramente observada em moléculas maiores nos estados condensados, nos quais as perdas vibracionais por colisões intermoleculares ocorrem mais rapidamente do que o processo de emissão de fluorescência. Por isso, a fluorescência provém em geral do menor nível vibracional do estado eletrônico excitado. A energia do fóton emitido, por sua vez, é muito inferior à do absorvido, deslocando a fluorescência para a região do vermelho do espectro eletromagnético com relação à absorção. Segundo o princípio de Frank-Condon, a transição associada à emissão de um fóton é tão rápida, que não é observada nenhuma alteração na configuração nuclear durante o processo (15). O espectro de emissão resultante da fluorescência reflete os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental, bem como o espectro de absorção reflete os do estado excitado, desta forma podendo ser empregados para a caracterização e identificação das moléculas (15).

A técnica de fluorescência é muito utilizada no estudo de materiais para a determinação da composição química, uma vez que cada composto tem uma fluorescência característica (dependente da excitação) que permite diferenciá-la dentre diversos componentes. Assim, podemos quantificar a concentração de determinadas substâncias fluorescentes numa mistura. Isso é possível porque a intensidade da fluorescência será

diretamente proporcional à quantidade presente da substância. Já no tecido biológico, a complexidade química e estrutural aumenta e com isso passa a ser muito difícil realizar tal avaliação, pois a fluorescência coletada do tecido resultará de diversos fatores, os quais se combinam de maneira muito mais complexa que em estruturas mais simples e homogêneas.

Existem três principais tipos de cromóforos biológicos: os fluoróforos (que convertem a luz absorvida em fluorescência), os absorvedores (que absorvem luz e não produzem fluorescência) e os espalhadores (que alteram a direção de propagação do fóton incidente, conservando, porém, sua energia). As propriedades ópticas de cada um dependem dos comprimentos de onda de excitação e do tecido, pois os cromóforos em geral alteram suas características conforme o ambiente, e principalmente conforme o estado metabólico em que estão inseridos (16).

Tecidos biológicos são opticamente turvos. Por isso, o espalhamento e a absorção da luz são mais prováveis que a conversão em fluorescência. Quando se incide uma luz monocromática na superfície do tecido, ela se espalha intersticialmente, podendo ser absorvida ou difusamente refletida. A luz absorvida pode converter-se em fluorescência, que por sua vez será espalhada e pode ser reabsorvida ou re-emitida na superfície tecidual. Portanto, a fluorescência re-emitida detectada nesta superfície é resultado da contribuição não apenas dos fluoróforos, mas também dos absorvedores e espalhadores teciduais (17). Além da composição química, a fluorescência também é afetada pela geometria/arquitetura do tecido alvo e suas características ópticas que alteram a interação luz/tecido.

A utilização de sistemas laser para a excitação do material a ser investigado pode ser interessante, uma vez que a monocromaticidade possibilita uma maior seletividade de excitação dos fluoróforos tornando o processo mais eficiente e, portanto, mais evidente a sua identificação. A região mais usada para excitação de tecidos biológicos é a região ultravioleta do espectro eletromagnético, com fótons de alta energia e com alta absorção pelos tecidos

biológicos. A região inicial do espectro visível - violeta, azul e verde - também pode ser empregada com ligeiro aumento do volume tecidual excitado uma vez que a profundidade de penetração no tecido biológico é comparativamente maior. Dependendo da luz de excitação empregada, a absorção pelos componentes teciduais será diferente e conseqüentemente haverá a contribuição de biomoléculas distintas para a fluorescência resultante (14).

1.6 Fotodegradação

Derivados de hematoporfirinas, fotossensibilizadores de primeira geração, consistem em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirina unidas por ligações éter ou éster. O Photogem[®] é um composto de primeira geração e vem sendo amplamente utilizado na TFD clínica, a proporção de monômeros e oligômeros faz com que esse fotossensibilizador seja eficiente na TFD, com relação a localização e a absorção da luz (figura 4).

Em solução, os fotossensibilizadores se arranjam de forma a minimizar a energia envolvida em suas interações. Muitas vezes, a interação das moléculas do FS entre si é mais favorável que a interação com o solvente, resultando em formação de agregados, processo principalmente dirigido por ligações de van der Waals e interações hidrofóbicas.

A formação de agregados representam um papel importante na dinâmica da TFD, sendo responsável por um efeito distinto na cinética e na dinâmica do FS. Os monomeros são o principais participantes na formação de oxigênio singleto, enquanto a forma agregada são os responsáveis pelo acúmulo seletivo do fotossensibilizador no tecido tumoral. O equilíbrio na concentração das diferentes formas é importante para que haja maior eficácia no tratamento.

Dessa forma, deve haver um equilíbrio na concentração dessas diferentes formas para que se consiga uma maior eficácia do tratamento (4).

Figura 5. Estrutura monomérica do Photogem®.

Duas formas de agregados de porfirinas já foram identificadas por espectroscopia de absorção, os dímeros formando agregados do tipo “sanduíche” ou do tipo linear. Agregados do tipo “sanduíche” podem ser detectados por um deslocamento para o azul da banda de Soret e um deslocamento para o vermelho das bandas Q. Já os agregados lineares causam um pequeno deslocamento para o vermelho da banda de Soret e das bandas Q (18).

Figura 6. Tipos de agregados formados pelas porfirinas em solução aquosa(4).

Os fotossensibilizadores utilizados na TFD sofrem degradação quando expostos a luz. Com a utilização desses fotossensibilizadores aumentou a importância de estudos

investigando a fotodegradação de medicamentos de uso terapêutico cujo mecanismo de ação ocorre por intermédio da interação com a luz (19).

Baseado no Diagrama de Jablonski (figura 4), a variação da população dos estados singleto da molécula podem ser expressos pela seguinte equação;

$$\frac{d[S_o]}{dt} = -I_1 + k_f[S_1] + k_p[T_1] + k_{ot}[T_1][^3O_2] - k_{os}[S_0][^1O_2] \quad (3)$$

Onde a variação da concentração de moléculas do FS no estado fundamental ($[S_o]$) diminui devido à excitação (I_1) e a reação entre o FS e o oxigênio singleto e aumenta devido à fluorescência do estado singleto, à fosforescência do estado tripleto e a transferência de energia do estado tripleto do FS para o 3O_2 . Há uma diminuição quando o FS reage com o 1O_2 . As constantes cinéticas que aparecem na expressão são;

k_f – constante cinética do decaimento do FS do estado S_1 para o estado S_0 com emissão de flourescência;

k_p – constante cinética do decaimento do FS do estado S_1 para o estado S_0 com emissão de fosforecência;

k_{ot} – constante cinética de transferencia de energia do FS no estado tripleto para o oxigênio molecular;

k_{os} – constante cinética da reação entre o oxigênio singleto e o FS no estado fundamental.

A variação do FS no estado singleto é influenciada pela excitação, fluorescência, o cruzamento inter sistema de singleto para tripleto e por reações que podem ocorrer entre o FS nesse estado e o substrado($[A]$) presente no meio (eq. 4);

$$\frac{d[S_1]}{dt} = I_1 - k_f[S_1] - k_{isc}[S_1] - k_{sa}[A][S_1] \quad (4)$$

Onde:

k_{isc} – constante cinética do cruzamento intersistema do FS;

k_{sa} – constante cinética de reação entre o primeiro estado estado singlete do FS com o aceptor.

As moléculas de FS no estado tripleto ($[T_1]$), por sua vez, sofrem variação devido a processos já comentados e também da reação que ocorre desse estado com aceptores de elétrons

$$\frac{d[T_1]}{dt} = k_{isc}[S_1] - k_p[T_1] - k_{ot}[T_1][^3O_2] - k_{ta}[A][T_1] \quad (5)$$

Onde:

k_{ta} – constante cinética da reação entre o FS no estado tripleto e o aceptor.

A variação do oxigênio molecular é dada pela formação de oxigênio singlete e pelo decaimento deste para o estado fundamental (eq. 6), enquanto a do oxigênio singlete é dada pela sua formação, seu decaimento a oxigênio molecular, e pela sua reação com aceptores e com o FS no estado fundamental (eq. 7).

$$\frac{d[^3O_2]}{dt} = -S_\Delta k_{ot}[T_1][^3O_2] + k_d[^1O_2] \quad (6)$$

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = S_\Delta k_{ot}[T_1][^3O_2] - k_d[^1O_2] - k_{oa}[A][^1O_2] - k_{os}[S_0][^1O_2] \quad (7)$$

Onde:

k_d – constante cinética do decaimento do oxigênio singlete para o estado fundamental;

k_{oa} – constante cinética de reação entre o oxigênio singlete e o aceptor;

S_Δ - fração de FS no estado tripleto que transfere energia para o oxigênio, resultando na formação do oxigênio singleto.

As espécies excitadas S_1 , T_1 , e 1O_2 decaem rapidamente, ou seja, variam pouco no tempo, assim, podemos considerar que o sistema está em um estado estacionário, então a variação do FS no estado singleto, variação do estado tripleto e a variação do oxigênio no estado singleto é zero. A equação 1 pode ser escrita em termos da concentração de oxigênio molecular e das constantes cinéticas(k).

$$\frac{d[S_o]}{dt} = -k_{ta}[A][T_1] - k_{os}[S_o][^1O_2] - k_{sa}[A][S_1] \quad (8)$$

$$\frac{d[S_o]}{dt} = \delta + \frac{\beta + \gamma[^3O_2]}{\alpha + [^3O_2]} \quad (9)$$

Em que $\delta, \alpha, \beta, \gamma$ são dados por:

$$\delta = -I_1 + k_f[S_1] \quad (10)$$

$$\alpha = \frac{k_s + k_{ta}[A]}{k_{TO}} \quad (11)$$

$$\beta = \frac{k_{isc}k_p[S_1]}{k_{TO}} \quad (12)$$

$$\gamma = (1 - S_\Delta k_{os}[S_o])k_4[S_1] \quad (13)$$

$$[S_1] = \frac{I_1}{k_f + k_{isc} + k_{sa}[A]} \quad (14)$$

A constante I_1 ligada à iluminação é dada por:

$$I_1 = \frac{\sigma_{so} \Phi}{h \nu} \quad (15)$$

Em que Φ é a intensidade de iluminação, $h \nu$ é a energia do fóton e σ_{so} é a seção de choque de absorção do FS (20).

As equações acima descrevem a cinética da fotodegradação do FS e que esta é dependente do oxigênio tripleto, porém, nesta análise, sem o substrato biológico mostra que não ocorre degradação do fotossensibilizador sem a presença do oxigênio molecular (21). O tempo de vida do oxigênio singleto é influenciado pelo meio em que se encontra. Em água destilada é cerca de 4,0 μ s, enquanto que em água deterada esse tempo sobe para 70,0 μ s. Em sistemas biológicos passa a ser extremamente baixo, inferior a 0,04 μ s, tornando o raio de ação extremamente reduzido (12,20).

Uma das maneiras de monitorar a fotomodificação induzida no FS é através da espectroscopia por fluorescência. O Photogem[®] em solução (água destilada) apresenta duas bandas de emissão, uma em 614 nm e outra ao redor de 670 nm. Pode-se monitorar a emissão como medida indireta da concentração de moléculas fluorescentes ativas. A fluorescência do fotossensibilizador pode ser expressa como;

$$F = E \phi_f [S_0] \frac{\sigma_{so} \Phi}{h \nu} \quad (16)$$

Onde:

F = fluorescência do FS;

E = Eficiência de coleta da fluorescência;

ϕ_f = Rendimento quântico da reação de fluorescência;

$[S_0]$ = Concentração de FS no estado fundamental;

σ_{so} = Seção de choque do S_0 ;

Φ = Intensidade de excitação;

$h\nu$ = energia da radiação incidente;

Se considerarmos que não há formação de agregados, que E , ϕ_f , σ_{so} e Φ constantes, podemos supor que a concentração do FS é proporcional a fluorescência emitida. A solução apresenta intensidade inicial de fluorescência que decai em função do tempo de irradiação. Dado a interação da luz com o FS, pode ocorrer o *photobleaching*, que é o fotoprocesso onde a molécula passa a não realizar transições eletrônicas. Dentre os processos que podem ocorrer pode-se destacar três: fotodegradação, a droga é transformada em fotoprodutos que não absorvem luz; fototransformação, produtos que absorvem em outro comprimento de onda; fotorrelocalização, mudanças das propriedades físicas devido à ligações em outras moléculas. Tais processos podem ocorrer interligados, sendo difícil de detectar em separado. A taxa de fotomodificação, pode ser usada para avaliar a fotoestabilidade do FS na procura de novos parâmetros clínicos (20,22).

1.7 Fontes de Luz para a TFD

Os fotossensibilizadores utilizados atualmente na TFD, aprovados para utilização em humanos, apresentam uma boa absorção na região do vermelho no espectro luminoso ($\lambda = 630\text{nm}$). Para seleccionar este comprimento de onda, antigamente, utilizava-se o laser de corante (*Dye laser*) bombeado por um laser de argônio (*Argon-Dye laser*) ou um laser de vapor de ouro. O *Dye laser* era um sistema mais flexível no que consiste na potência de

emissão alcançada e com ampla variação do comprimento de onda. Posteriormente apareceram os lasers de diodo de alta potência e com a manutenção e operação simplificadas em relação ao laser de corante, contudo, com comprimento de onda fixo não permitindo a flexibilidade de ajuste para utilização de drogas em outros comprimentos de onda. Mais recentemente sistemas de iluminação a base de LEDs (*Light – Emitting - Diode*) de alta potência foram desenvolvidos para aplicações na TFD. Esses sistemas apresentam vantagens aos sistemas laser considerando, custo, operação e manutenção (23).

Nas últimas décadas, um grande número de estudos foram realizados para avaliar a resposta de lasers pulsados para aplicações na TFD, contudo, os resultados encontrados foram ambíguos (24). Sterenborg e van Germet realizaram um estudo teórico a respeito de tais aplicações e encontraram uma taxa de fluência limiar para que haja a diferenciação entre os dois regimes de luz, contínuo e pulsado (25).

Pogue et. al (26) , avaliou a dose de luz absorvida por um FS comparando a irradiação pulsada e a contínua. Os resultados demonstraram um aumento na penetração para a luz pulsada. Rausch (27) estudou a resposta fotodinâmica em tumores implantados em camundongos tratado com luz pulsada e contínua. O estudo avaliou a remissão completa ou parcial das lesões de duas linhagens, fotossensibilizados com Photosan[®], um derivado de hematoporfirina. Os dois sistemas mostraram resultados semelhantes quanto ao número de remissões completas.

Trabalhos investigando os efeitos biológicos pela irradiação pulsada em terapia fotodinâmica ainda são escassos. O emprego de laser de pulsos ultracurtos, em regime de femtossegundos, pode constituir uma alternativa para aumentar a profundidade de penetração da luz e, conseqüentemente o volume tecidual tratado.

A tecnologia de femtossegundos, com seus pulsos ultracurtos, é uma inovação na tecnologia laser que pode ser utilizada para aplicações muito diversas, seja na indústria ou nas

tecnologias de informação, comunicação e meio ambiente, bem como nas ciências da vida (medicina, química e biologia) (28) .

A característica principal deste tipo de tecnologia são os pulsos extremamente curtos que variam entre aproximadamente 10 ps (10^{-11} s) e 10 fs (10^{-14} s). Outra característica predominante dos pulsos ultracurtos são as intensidades extremamente altas atingidas. Num único pulso, centenas de Gigawatts podem ser obtidas. Para se ter uma idéia, num pulso de 100 fs, numa área de $100 \mu\text{m}^2$, uma energia por pulso de 1 mJ fornece um valor de intensidade que atinge a ordem de 10^{16} W/cm^2 (28).

As aplicações variadas dos lasers de femtossegundos têm duas características em comum: a geração dos pulsos ultracurtos e sua interação com a matéria. Lasers convencionais geram pulsos pelo bombeamento da fonte, obtendo pulsos de frações de milissegundos (pulsos longos), ou por *Q-switching*, com o que se obtém pulsos de até nanossegundos (pulsos curtos). Os lasers de pulsos ultracurtos geram pulsos por *mode-locking* – superpondo modos com comprimentos de onda levemente diferentes acoplados por dispositivos ópticos apropriadamente passivos ou ativos. Com isso, obtém-se uma concentração de energia temporal muito elevada, levando ao aumento da potência de pico. A alta intensidade é resultado do uso de *mode-locking*, o que acaba levando a diversos efeitos multi-fótons que possibilitam uma infinidade de aplicações, como tratamento de material orgânico e inorgânico transparente ou produção de raios-X (28).

Quanto mais modos forem travados ao mesmo tempo, mais curtos são os pulsos, o que exige que os lasers de femtossegundos usem materiais laser-ativos com ampla largura de banda de ganho (*broad gain-bandwidth*), que liberam um amplo espectro de comprimentos de onda. Isto torna o laser de femtossegundos interessante também para técnicas de medição não destrutivas, uma vez que tais fontes são pré-requisito para interferometria de luz branca (28).

O interesse existente no uso desses pulsos ultra-curtos em áreas de saúde, como no caso a que este trabalho se destina, é que os eventos primários envolvidos em muitas interações que ocorrem a nível molecular e celular ocorrem em intervalos de tempo dessa ordem. Por isso, utilizar uma fonte de luz que possui tal escala pode permitir estudar de maneira mais apropriada estes eventos, bem como permitir que se observem novos graus de interação para processos fotoquímicos, como os que acontecem durante a Terapia Fotodinâmica.

2 Objetivos

O principal objetivo do presente estudo é a investigação da resposta fotodinâmica empregando um derivado de hematoporfirina (Photogem[®]) e um laser de femtossegundos como fonte de luz.

Para essa avaliação os seguintes objetivos secundários foram propostos:

- Avaliação da fotodegração induzida;
- Avaliação qualitativa e quantitativa da necrose induzida em fígado normal de ratos Wistar.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 26 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 180 g e 250g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais permaneceram acondicionados em um alojamento para animais montado no Instituto de Física de São Carlos, no Laboratório de Biofotônica. O alojamento possui quatro entradas de ar com filtro e um exaustor para a saída do ar. A temperatura foi mantida entre 23⁰ e 25⁰. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno (cinco animais por gaiola), com tampa metálica e o assoalho forrado com serragem. Receberam água filtrada e ração para roedores comercial da marca Primor[®].

3.2 Fotossensibilizador

Foi utilizado como agente fotossensibilizador o Photogem[®], um derivado de hematoporfirina proveniente da Photogem, Moscou – Rússia. Medicamento aprovado pelo “Ministry of Public Health Service na Medicam Industry of Russian Federation” sob autorização 42-3199-98. O Photogem[®] é aprovado para o uso em humanos pelo comitê estatal de Farmacologia da Federação Russa e aprovado pela ANVISA (data 08/04/2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4).

Para a utilização em animais, a concentração empregada foi de 5mg/mL em solução de cloreto de sódio (0.9%). Para o estudo *in vitro*, 5 mg do fotossensibilizador foi inicialmente diluído em 1 ml água destilada (solução de estoque).

3.3 Sistema de Detecção Óptica

Sistema portátil de espectroscopia por fluorescência, desenvolvido pelo Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, é composto por um espectrofotômetro USB 2000 (Ocean Optics, Orlando, EUA), laser de excitação, um laptop e sonda de investigação tipo Y. O laser utilizado para a excitação foi o Nd³⁺:YAG emitindo em 532 nm (2º harmônico) com 15 mW de potência na saída da fibra. A sonda possui duas fibras de 600 µm de diâmetro, sendo uma para conduzir a luz de excitação, enquanto a outra coleta a luz re-emitida pela amostra. O espectrofotômetro possui um intervalo de leitura de 350-1000 nm. Em sua entrada, um filtro passa-alta (550nm) barra a luz retroespalhada.

3.4 Fonte de Luz

3.4.1 CW

A fonte de luz CW (*continuous wavelenght*) utilizada foi o laser de Diodo de alta potência (em torno de 2W) Eagle Heron[®] (QuantumTech, São Carlos - Brasil), no comprimento de onda de 630 nm, acoplado a ele, uma fibra óptica para iluminação direta.

3.4.2 Laser Pulsado

Como fonte de luz pulsada foi utilizado o laser Libra-S: *Ti: Sapphire Regenerative Amplifier* (Coherent[®], Santa Clara, EUA), operando no regime de femtossengundo, a taxa de repetição de 1 kHz, potência de pico de 1 MW, no comprimento de onda 801 nm e largura de pulso de < 70 fs.

Para comprimentos de onda variáveis foi utilizado o Opera - VIS (*Optical Parametric Amplifier*, Coherent, Santa Clara, EUA) em combinação com o Libra-S, onde é possível a seleção de comprimentos de onda entre 400 nm - 1150 nm.

3.5 Procedimento in vitro

3.5.1 Fotodegradação com Laser CW

O Photogem[®] foi diluído em água destilada para uma concentração final de 8,0 µg/ml, a solução foi colocada cubeta de plástico de $l = 1$ cm. O volume utilizado foi de 0,16 ml e a área de irradiação foi limitada por uma máscara de plástico preta. A cubeta foi fixada em um suporte preso a mesa óptica. A ponteira da fibra de iluminação direta foi posicionada a 4,6 cm da amostra (figura 7).

Figura 7. Irradiação de uma Cubeta de plástico (a) com uma fibra para iluminação direta (b) e limitada por uma máscara (c) com a ponteira de coleta da fluorescência (d) posicionada na outra face.

Uma de suas faces (0,4cm) foi irradiada enquanto na outra face a 90° (1cm) foi coletada a fluorescência emitida utilizando o sistema portátil de espectroscopia por fluorescência. A ponteira da fibra de coleta do sistema portátil de fluorescência foi posicionada em contato com a face de 1,0 cm para a coleta da fluorescência da amostra (figura 10). A coleta de fluorescência ocorreu nos intervalos de 0, 5, 10, 20,30 e 40 min.

Figura 8. *Ponteira de coleta do sistema portátil de fluorescência posicionado para coleta de fluorescência de solução de Photogem[®] diluída.*

Foram avaliadas 3 intensidades de irradiação, 280, 340 e 400 mW/cm², e 3 repetições para cada amostra. Os espectros coletados foram trabalhados utilizando um *software* matemático.

3.5.2 Fotodegradação com Laser Pulsado

A diluição do Photogem[®], o volume utilizado e a fixação da amostra para a irradiação foram as mesmas utilizadas para o laser de diodo, bem como o posicionamento da ponteira, os intervalos de coleta e as intensidades investigadas.

Para a utilização do laser pulsado, foi necessário a expansão do feixe para se obter o mesmo volume irradiado com o laser de diodo (figura 9). Para a expansão do feixe foram utilizados 2 lentes com deposição de filme fino (coating) para o comprimento de onda de 630 nm, uma com 2,0 mm de foco e outra com 20,0 mm, e um espelho dielétrico ($\theta = 45^0$) para o direcionamento do feixe que sai do laser. O uso de lentes e espelhos dielétricos, evitam que haja a perda de intensidade da luz emitida pelo laser no conjunto óptico utilizado. A iluminação da amostra era interrompida por cerca de 3 segundos para a coleta dos espectros de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram processados utilizando um *software* matemático.

Foi feito o monitoramento da amplitude de fluorescência em 614 nm, a banda de emissão mais intensa do Photogem[®] observada. Através do monitoramento da amplitude de fluorescência, pode-se acompanhar a evolução da degradação do fotossensibilizador ao longo do período de irradiação com o laser pulsado ou com o laser de diodo.

Figura 9. *Conjunto óptico utilizado para a irradiação com laser pulsado: a) OPera – VIS; b) espelho dielétrico ($\theta=45^\circ$); c) lente convergente ($f=2,0$ mm); d) lente convergente ($f=20,0$ mm); e) cubeta de plástico; f) ponta de fibra de coleta da fluorescência.*

A figura 10 apresenta um gráfico com a intensidade em função do comprimento de onda para alguns tempos de irradiação.

Figura 10. *Gráfico dos espectros da fluorescência do Photogem® coletados em três tempos de irradiação.*

3.6 Penetração da Luz

Foram utilizados dois animais sacrificados na câmara de gás CO₂ e o fígado removido. Como fonte de luz contínua foi utilizada o laser de diodo da Quantum Tech.

A coleta dos dados foi realizada com o sistema portátil de espectroscopia por fluorescência com uma fibra de coleta isotrópica fixa a uma mesa de translado com parafuso micrométrico.

Foi preparada uma macerado de fígado de rato, aos quais foram acrescentados 10 ml de soro fisiológico com solução de heparina para evitar a formação de coágulos. O macerado foi colocado em um recipiente de vidro, onde se fez incidir o feixe de luz. Utilizando uma fibra isotrópica posicionada no caminho do feixe, foi realizada a coleta da intensidade de luz em diversas posições no recipiente de vidro. A intensidade do feixe incidente na amostra foi de 20 mW.

Para cada posição da sonda no eixo x, foi coletado um espectro da luz coletada (figura 11). Para a análise dos dados, foi utilizado o máximo de intensidade coletada, isto é, em $\lambda = 630\text{nm}$. A fibra isotrópica foi deslocada dentro do macerado até que a intensidade de coleta se extinguisse ($\approx 7\text{ mm}$). Os dados coletados foram processados utilizando um *software* matemático.

Figura 11. *Desenho esquemático mostrando o posicionamento da fibra isotrópica e o sentido do deslocamento no caminho do feixe de incidência.*

3.7 Estudo in vivo

3.7.1 TFD

Foram utilizados 18 animais divididos em 2 grupos. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A) em associação com o sedativo, analgésico e relaxante muscular (Coopazine[®], Coopers Brasil Ltda), via intramuscular, na proporção de 1:1 e dose de 100mg/kg de massa corporal.

Foi feita uma incisão na cavidade abdominal e o Photogem[®] foi administrado, na concentração de 1,5 mg/kg, através da veia cava. Após 30 min., o fígado do respectivo animal foi exposto e teve início a irradiação. A irradiação teve duração de 34 minutos. A intensidade de irradiação foi de 74 mW/cm² e os dois grupos receberam 150 J/cm² de dose de energia – para obter a área apropriada, a região foi delimitada com uma máscara de 1 cm² (figura 12).

Figura 12. Esquema de iluminação com laser de diodo (CW)

Para a irradiação com o laser pulsado, foi necessária a expansão do feixe para que a área de irradiação fosse a mesma. Para isso foram utilizadas as 2 lentes com filme fino depositado para o comprimento de onda de 630 nm, uma com 2,0 mm de distância focal e outra com 10,0 mm, e dois espelhos dielétricos ($\theta = 45^\circ$) para o direcionamento do feixe de saída do sistema laser até o tecido alvo (figura 13).

Figura 13. *Desenho esquemático mostrando o conjunto óptico montado para expandir o feixe de saída do sistema OPera.*

Ao término da irradiação, os animais foram suturados, realojados e, após 30 horas, foram mortos utilizando uma câmara de CO_2 . O fígado foi removido, a área irradiada foi fotografada e posteriormente fatiada para o procedimento histológico. As fatias de tecido foram colocadas em formol tamponado para a conservação.

Após o processo de desidratação, as lâminas histológicas foram preparadas com coloração de hamatoxilina e eosina para a determinação do perfil de necrose e das características histológicas e celulares da região tratada e adjacências. A leitura das lâminas histológicas foi feita utilizando uma lupa (aumento de 40x) acoplado uma base com 2 micrometros para leitura longitudinais e latitudinais. A fotografia da lâminas foram realizadas utilizando uma câmera CCD acoplada a um microscópio óptico. Foram feitas 7 medidas por corte histológico e o tratamento dos dados com um *software* matemático.

3.7.2 Mapeamento Térmico

Foram utilizados 6 ratos machos da linhagem Wistar, divididos em 2 grupos. Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A) em associação com o sedativo, analgésico e relaxante muscular (Coopazine[®], Coopers Brasil Ltda), via intramuscular, na proporção de 1:1 e dose de 100mg/kg de massa corporal, foi realizada uma incisão na cavidade abdominal e receberam injeção de Photogem[®], na concentração de 1,5 mg/kg, via intravenosa (veia cava).

Previamente à iluminação o fígado foi exposto e no local da irradiação foi inserido um termistor a 1mm da superfície irradiada. O primeiro grupo foi irradiado com o laser de diodo e o segundo grupo com laser de femtossegundos. Todos os grupos receberam 150 J/cm² de dose de luz. A intensidade de irradiação foi de 74 mW/cm². A aquisição de dados foi feita mediante o software LabView e o processamento com um *software* matemático.

O protocolo de utilização dos animais nestes experimentos foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) em dezembro de 2007 (Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 151/2007), cópia em anexo.

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise Macroscópica

Quanto aos aspectos morfológicos da necrose induzida pelo efeito da TFD, cabe uma análise qualitativa sobre as características teciduais macroscópicas. Logo após a irradiação, foi possível notar mudanças quanto à cor e a textura do tecido hepático exposto a luz. O tecido irradiado com o laser de diodo apresentou algumas mudanças quanto à coloração da região iluminada. O tecido irradiado com a fonte de luz pulsada sofreu alterações mais significativas, apresentando escurecimento e um leve enrugamento do tecido.

A figura 14 apresenta a região iluminada com o laser de diodo e com o laser pulsado. O laser de diodo apresentou uma necrose bem definida. O tecido estava esbranquiçado e com muitos pontos avermelhados, indicando a presença de hemorragia ou congestão vascular, enquanto que a necrose apresentada pela fonte de luz pulsada mostrou uma área necrosada bem definida e com poucas irregularidades superficiais e ausência de pontos hemorrágicos.

Figura 14. Imagem macroscópica da superfície do fígado 30 horas após o término da irradiação com laser de Diodo (A) e com laser pulsado em regime de femtossegundos (B)

4.2 Análise Histológica

Através das lâminas histológicas já se pode perceber que a profundidade da necrose era superior para o laser pulsado em relação ao laser de diodo, para mesmas condições de irradiação. Também foi observado que o perfil de necrose para o laser pulsado apresenta melhor definição da interface entre tecido necrosado e tecido normal (figura 15).

Para uma análise microscópica qualitativa, os efeitos causados na borda da necrose foram avaliados, ou seja, na interface entre o tecido sadio e o tecido necrosado, espaço porta, veia centrolobular e a superfície da necrose – local onde houve a incidência da luz.

Figura 15. Corte histológico de fígado de rato visto ao microscópio óptico (32x), onde pode ser observado o tecido sadio (b) e o perfil de necrose (a) provocada pela TFD com fonte de luz contínua (A) e pulsada (B)

O fígado é constituído por células hepáticas que se agrupam em placas, formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos. Os lóbulos vizinhos são separados por regiões compostas por tecido conjuntivo e vasos. Essa região é chamada de espaço porta. O espaço porta é constituído por ramos da veia porta e da artéria hepática, um ducto biliar, vasos linfáticos e nervos. Esse conjunto é protegido por uma capa de tecido conjuntivo e contínuo

com a cápsula de Glisson. O espaço porta é ricamente oxigenado, local onde ocorre a maioria dos processos celulares e onde há um número maior de mitocôndrias. No centro dos lóbulos se encontra a veia centro lobular. O sangue faz o caminho do espaço porta para a veia centrolobular, havendo grande gradiente de composição sanguínea.

A figura 16 mostra a necrose na região periportal em fígado de rato, induzida pela TFD com laser de diodo e com laser pulsado.

Figura 16. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW (A) e com laser pulsado (B), (400x) mostrando a região do espaço porta em uma área necrosada, a seta aponta para células viáveis.

A figura 17 mostra a veia centro lobular. Do gradiente de composição sanguínea comentado anteriormente, nessa região é onde o lóbulo recebe maior quantidade de sangue venoso. As células que formam a veia centro lobular apresentam-se necrosadas, sugerindo morte celular induzida pela TFD ou pela hipóxia provocada pelo tratamento. Podemos ver ainda presença de hemácias na região necrosada, sugerindo congestão. Além das células mortas na região da veia centro lobular, podemos ver os canaliculos biliares, que devido ao efeito da TFD com o laser pulsado se apresentam edemaciados.

Figura 17. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW (A) e com laser pulsado (B), vista ao microscópio óptico (400x) mostrando a região da veia centro lobular de uma área de necrose; seta contínua - presença de hemácias, seta tracejada - canalículos biliares dilatados, indicando dano.

Quando as características são comparadas nessas lâminas, pode ser verificado que a fonte de luz CW e a fonte de luz pulsada apresentaram resultados bastante semelhantes. Ambas as fontes de luz induziram necrose coagulativa com a preservação do arcabouço celular. Na interface necrose-tecido sadio (figura 18) encontram-se as células saculiformes, células degeneradas que poderão se recuperar. Apresentam necrose na veia centro lobular, causada pelo efeito fotodinâmico, ou pela hipóxia causada indiretamente pela TFD. Na superfície do tecido, foi observada a preservação da cápsula de Glisson, um revestimento de tecido conjuntivo que protege o órgão (figura 19).

Figura 18. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW (A) e com laser pulsado (B), vista ao microscópio óptico (400x) mostrando a interface necrose-tecido sadio; seta contínua - presença de infiltrado neutrofilico, e seta tracejada - canaliculos biliares dilatados. As regiões delimitadas mostram células saculiformes, ou seja, células em degeneração.

Figura 19. Lâmina histológica do fígado necrosado de rato, irradiado com fonte de luz CW (A) e com laser pulsado (B), vista ao microscópio óptico (400x), apresenta a superfície do tecido necrosado; seta contínua mostra algumas células viáveis na cápsula de Glisson, e seta tracejada mostra os canaliculos biliares edemaciados.

Algumas diferenças foram observadas entre os efeitos dos dois regimes de luz. Para o laser pulsado, foi observada, qualitativamente, uma diminuição das células viáveis ao redor do espaço porta com relação ao número de células observadas na lâmina do tecido irradiado com o laser de diodo. Uma hipótese é o efeito da alta intensidade dos pulsos do laser de

femtosssegundos, conseguirem romper uma barreira biológica muito eficiente, pois o espaço porta conta com uma proteção de tecido conjuntivo, onde se sugeriu que haja pouco acúmulo de FS nas células daquela região neste IDL (Intervalo Droga Luz).

Na região de interface necrose-tecido sadio, aparece um quadro de edema e a presença de canalículos biliares dilatadas para as lâminas do tecido irradiado com laser pulsado. Enquanto que na superfície do tecido, pode ser observada a presença de células viáveis do tecido conjuntivo, com a cápsula de Glisson intacta. Foi observado ainda, para o laser de diodo, um grande número de hemácias, evidenciando sinais de congestão

Quanto à resistência a TFD da cápsula de Glisson e da região do espaço porta, pode se atribuir a baixa concentração de FS, pois se trata de um tecido conjuntivo rico em fibras, principalmente colágeno e elastina. Também podem possuir baixo suprimento de O_2 limitando a ação fotodinâmica. Não podemos deixar de considerar problemas com a iluminação e também o IDL, que poderiam indicar se intervalo entre a administração do FS e a irradiação não é o mais adequado para que haja uma concentração suficiente de FS, e assim tornar a TFD mais efetiva.

4.3 Análise da Resposta Fotodinâmica Induzida

O primeiro resultado importante, o qual merece uma discussão mais ampla, corresponde ao fato que, relativo ao uso de femtosssegundos, a comparação com a mesma quantidade de energia entregue ao tecido sensibilizado de forma contínua, produz uma profundidade de necrose praticamente 2 vezes maior (figura 20). Esse fato é de extrema relevância quando é considerado o tratamento de tumores sólidos. Nos casos onde o volume

tumoral não é completamente tratado, ou seja, a resposta fotodinâmica (necrose tecidual) não é observada em toda a lesão, o tratamento terá apenas uma resposta parcial. As células tumorais remanescentes apresentarão uma grande probabilidade de originar novo crescimento tumoral, tornando o tratamento cada vez mais complexo.

Figura 20. Gráfico da profundidade de necrose para cada fonte de luz utilizada. O laser de diodo apresentou profundidade do tecido necrosado de $1,0 \pm 0,1$ mm, enquanto que o laser pulsado apresentou $2,0 \pm 0,2$ mm.

A análise inicial a ser realizada, comparando o regime CW e o de femtossegundos, é a taxa de energia entregue (figura 21). Onde a intensidade de pico foi estimada dada a energia do pulso (E_{pulso}) ser da ordem de 10^{-6} J e a duração do pulso da ordem de 10^{-15} segundos, tempos:

$$I_{\text{pico}} = \text{potência de pico} / \text{área} = E_{\text{pulso}} / (\text{duração do pulso} \times \text{área}) \quad (17)$$

Isto nos dá uma intensidade de pico da ordem de 10^{12} mW/cm².

Figura 21. Comparação da intensidade de energia em 1ms para o laser de CW (a) e o laser pulsado (b).

Embora a mesma quantidade de energia seja entregue ao tecido em 1 ms; a intensidade do pulso é muitas ordens de grandeza maior que no caso do CW. Com isto, esperamos que, no caso pulsado a luz apresente uma maior penetração no tecido. A questão básica aqui é se esta maior intensidade de pico pode ser responsável pela maior profundidade de necrose.

Uma das análises para responder essa primeira questão, é considerar um único coeficiente efetivo de absorção para a penetração da luz para os dois regimes de luz. Neste caso, a dose a que cada região tecidual localizada a uma distância Δx da superfície estará exposta será a mesma, uma vez que a intensidade média é a mesma. No experimento da distribuição da luz no macerado de fígado de rato foi possível verificar as variações da intensidade local de luz em função da distância de coleta, ou seja, da penetração da luz na amostra. O comportamento observado do decaimento da intensidade em função de Δx foi semelhante para os regimes CW e femtossegundos investigados (figura 22).

Desta forma, a consideração de que o coeficiente efetivo de absorção é o mesmo foi comprovada experimentalmente como apresentada na figura 22. O gráfico mostra a variação da intensidade normalizada em função do deslocamento x , sendo zero a superfície irradiada e Δx a distância entre a fibra de coleta e a superfície (posição da medida).

Figura 22. Gráfico do logaritmo da intensidade normalizada em função do deslocamento da fibra para o laser de diodo e o laser pulsado.

Como descrito nos resultados, a inclinação do decaimento da intensidade média em ambos os casos de fontes de luz diferentes é a mesma, assegurando a mesma penetração. Assim sendo, a dose em cada ponto tecidual é a mesma, isso demonstra que a maior profundidade de necrose do laser pulsado deve advir de outros fatores que não apenas do pico de intensidade.

Uma segunda questão a ser investigada é o aumento da temperatura induzido no local da irradiação. Caso seja induzido um aquecimento excessivo com o uso de um dos regimes de luz, é possível serem obtidos resultados bem diversos na profundidade de necrose. Para realizar essa análise, o experimento da variação térmica foi investigado no fígado do rato empregando os mesmos parâmetros de iluminação do experimento da necrose induzida. Os gráficos das figuras 23 e 24 apresentam a variação térmica medida durante um período de 6 minutos, para os regimes CW e femtossegundos, respectivamente. O período total de

iluminação de 34 minutos foi monitorado, mas pode-se observar que o aquecimento tecidual ocorre nos primeiros minutos da iluminação, sendo que a temperatura posteriormente permanece praticamente estável. O regime de femtossegundos um maior aumento de temperatura tecidual, no entanto, os valores máximos obtidos ao redor de $\Delta T \equiv 4,5^{\circ}\text{C}$ não são suficientes para promover necrose por dano térmico.

Figura 23. *Gráfico da variação da temperatura em função do tempo de irradiação utilizando fonte de luz CW. O gráfico apresenta o resultado da variação para os três animais.*

Figura 24. Gráfico da variação de temperatura em função do tempo de irradiação utilizando fonte de luz pulsada. O gráfico apresenta o resultado da variação para os três animais.

Em termos de temperatura média, os resultados apresentados mostram que não há considerável variação térmica, para produzir danos teciduais termicamente induzidos. Observamos que durante os tempos de iluminação, a variação de temperatura no caso da fonte de CW é cerca de 2 °C e para o uso de fonte pulsada é cerca de 4 °C. Esta variação de 2 °C não pode ser responsável pela variação de profundidade de necrose por um fator de 2 acima observado. A variação da temperatura, aumento ou diminuição, pode variar o transporte de oxigênio no tecido, em decorrência de vasodilatação ou vasoconstrição, respectivamente. A maior abundância de oxigênio promove maior reação fotodinâmica, caso a concentração de $[O_2]$ seja o fator limitante no controle da reação. Um aumento de 2 °C no tecido pode causar alguma alteração, mas não um fator de 2. Isto pode ser verificado através de experimentos

recentes realizados (29), onde se dobrando a intensidade da luz usada (CW) não leva ao dobro de necrose, quando a quantidade total de energia depositada no tecido é mantida constante.

Se o aumento de temperatura não pode ser a causa do aumento da profundidade de necrose, certamente o resultado observado deve estar relacionado a mecanismos básicos envolvidos na reação fotodinâmica.

Durante a reação fotodinâmica, ocorre uma complexa transferência de energia que é iniciada com a excitação de níveis do fotossensibilizador. Esta energia é então transferida ao oxigênio molecular, formando a espécie singlete, que acaba oxidando o substrato celular. A sequência de excitação está esquematizada no diagrama da figura 19, onde apenas a absorção de um fóton foi considerada.

Inicialmente a luz é absorvida em um estado singlete do fotossensibilizador [1]. Em seguida ocorre o processo de relaxação dentro das bandas vibracionais do estado singlete [2], levando ao menor nível de energia do estado S_1 . Ocorre então uma transferência de energia para a banda vibracional do estado tripleto T_1 [3], seguido de uma relaxação para o menor nível de energia da banda [4]. Nessa situação, o sistema está pronto para transferir energia para o estado singlete $^1\Delta_0$ da molécula de oxigênio [5] que encontrava-se inicialmente no estado tripleto $^3\Sigma_g$. Após uma relaxação final dentro da banda $^1\Delta_0$ [6], a molécula de oxigênio reage com outra molécula produzindo a reação fotodinâmica (figura 25).

Figura 25. Representação dos níveis de energia do fotossensibilizador quando excitado com um fóton e a transferência de energia entre o fotossensibilizador e o oxigênio molecular

Esta seqüência de transferências de energia depende de um sistema de equações de taxa, que quando em equilíbrio, leva à taxa final de produção de oxigênio singleto, para certa concentração de fotossensibilizador. Obviamente, que a taxa final de ¹O₂, depende da taxa de excitação do estado S₁ do fotossensibilizador. Esta taxa depende da intensidade de excitação, e da maneira, como depende em função do tempo. Considerando esse fator, a excitação com pulsos de femtossegundos ou CW, é bem diferente. Um pulso intenso pode promover completa inversão de população dos estados S₀ → S₁, desbalancear o sistema de equações, levando a uma maior quantidade de formação de oxigênio singleto.

A maior taxa de formação de ¹O₂ torna a reação fotodinâmica mais eficiente para uma determinada quantidade de fótons entregues ao sistema. O resultado final é a diminuição da energia mínima necessária para levar o tecido à necrose, a denominada dose limiar (*threshold dose*, D_{th}). A expressão para o limiar de dose é dada por:

$$D_{th} = D_0 \cdot \exp(-\alpha d_{nec}) \quad (18)$$

Onde, D₀ é a dose total de energia em J/cm² entregue na superfície do tecido, α é o coeficiente de absorção do tecido em mm⁻¹ e d_{nec} é a profundidade de necrose em mm, induzida pela TFD (31).

O gráfico da variação da intensidade média como função da distância convertido em um diagrama de dose *versus* distância está mostrado na figura 26.

Figura 26. Gráfico da dose em função da distância.

Para nosso caso, observamos uma variação do D_{th} , de aproximadamente $D_{th}(CW)/D_{th}(femto) \approx 5$.

Uma comprovação desse modelo pode ser feita analisando a taxa de degradação do fotossensibilizador usando intensidades médias equivalentes, porém com fontes de luz diferentes. Este experimento foi realizado, como descrito no procedimento e apresentado nos resultados (gráfico da figura 27). A taxa de degradação está intrinsecamente associada à taxa de produção de 1O_2 . Uma porcentagem do oxigênio singleto produzido, de fato, reage com a própria molécula do fotossensibilizador sendo a principal causa do *photobleaching* através da qual as moléculas degradam (20). A maior taxa de *photobleaching* está certamente relacionada com a maior ação fotodinâmica e conseqüentemente maior profundidade de necrose. Estes fatos estão bem estabelecidos em artigo recentemente produzido dentro do nosso grupo de pesquisa (30).

Dos resultados de taxa de degradação apresentados (Figura 27), pode-se observar um fator de até 6 vezes na taxa de degradação, quando comparamos os efeitos do *photobleaching* do laser pulsado com o contínuo. Este fato está certamente na mesma ordem de grandeza do que esperado para produzir uma considerável diminuição da dose limiar (D_{th}) induzindo uma maior profundidade de necrose.

Figura 27. Gráfico da taxa de fotodegradação em função da intensidade para o laser CW e o laser de femtossegundos.

Esta discussão mostra claramente que o efeito do laser de femtossegundos quando comparado com o laser de CW está relacionado com alterações nos mecanismos básicos envolvidos na formação de oxigênio reativo, onde observamos que o laser de pulsado foi mais eficiente na produção de oxigênio singlete que nos experimentos *in vitro* nos mostrou uma maior taxa de degradação quando irradiado com o laser pulsado e no estudo *in vivo* uma maior profundidade de necrose.

5. Conclusões

Através dos resultados obtidos, foi possível quantificar e comparar a profundidade de necrose induzida pela TFD com uma fonte de luz CW e com o laser de femtossegundos. Com estes resultados, foi verificado experimentalmente que a resposta fotodinâmica induzida pelo laser de femtossegundos é cerca 2 vezes mais profunda do que a resposta com o laser de CW. Esta resposta não foi resultado de efeito térmico devido as fontes de luz uma vez que os dois sistemas laser empregados não induziram aumento de temperatura para dano tecidual, também não foi resultado de uma maior profundidade de penetração. A taxa de degradação com o laser pulsado é superior à taxa com o laser CW por um fator de 6, e isto está certamente relacionado com a profundidade de necrose medida nas lâminas histológicas. O valor de $D_{th}(\text{femto})$ para o femtossegundos foi ≈ 5 vezes menor que o valor do $D_{th}(\text{CW})$, o que nos leva a crer que o uso de pulsos ultracurtos altera os mecanismos básicos envolvidos na terapia fotodinâmica como, por exemplo, a inversão de população do FS do estado fundamental para o estado singleto, provocando a formação de um número maior de oxigênio singleto que contribui para a reação fotodinâmica. A análise qualitativa mostrou que não há diferenças significativas entre os dois regimes de luz com relação às características morfológicas macro e microscópicas. Os resultados apresentados demonstram que a irradiação para a TFD com laser de pulsos ultracurtos como o laser de femtossegundos, promove uma reação fotodinâmica com maior volume de necrose, provavelmente por maior produção de oxigênio singleto.

Referências

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Cancer. Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil. p. 24-39, 2007. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf> > . Acesso em 2009
2. SASSE, A. Tratamentos do Futuro - alguns já em prática. Disponível em: <<http://andre.sasse.com/futuro.htm>> . Acesso em: 2009.
3. BAGNATO, V. S. et al. Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Tumores. São Carlos: IFSC, 2002. 111p.
4. MENEZES, P. F. C., Estudos Espectroscópicos e Citotóxicos do Photogem® Fotodegradado e dos Fotoprodutos Formados pela Irradiação com Laser. 2006. 186 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
5. KURACHI, C., et al. Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Breve histórico e Resultados Alcançados. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*, Salvador, v.5, n.20, p.33-41, 2002.
6. WILSON, B. C. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Canadian Journal of Gastroenterology*, v.16, n.6, p. 393-396, 2002.
7. WILSON, B. C. PATTERSON, A. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, Bristol, v.53, n.9, p. R61-R109, 2008.
8. MELO, C. A. et al. Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Lausanne, v.73, n.3, p.183-188, 2004.
9. FERREIRA, J. Análise da Necrose em Tecidos Normais Fotossensibilizados pós Terapia Fotodinâmica - Estudo in Vivo. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

10. CARVALHO, V. C. M. Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do cancer. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
11. MIRONOV, A. F.; NIZHNIK, A. N.; NOCKEL, A. Y. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Lausanne v.4, n.3, p.297-306, 1990.
12. MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v.23, n.2, p.237-243, 2000.
13. TOREZAN, L. A. R. Avaliação da Eficácia da Terapia Fotodinâmica com Ácido 5 - Delta Aminolevulínico (ALA) Tópico no Carcinoma Basocelular. 2000. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.
14. KURACHI, C. Espectroscopia de fluorescência na detecção de lesões quimicamente induzidas por agente carcinogênico na borda lateral da língua - estudo in vivo. 2005. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Física de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
15. LAKOUWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 2 ed. New York: Plenum, 1999. 698 p.
16. RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy in vivo. In MEYERS, R. A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, John Wiley. 2000. p. 20-56.
17. GEORGAKOUDI, I.; FELD, M. S.; MÜLLER, M. G., Intrinsic Fluorescence spectroscopy of biological tissue, In MYCEK, M-A.; POGUE, B. W. *Handbook of biomedical fluorescence*. Marcel Dekker: New York. 2003. p. 109-142.
18. STRECKYTE, G.; ROTOMSKIS, R. Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 18, n.2-3, p. 259-63.1993.
19. BONNETT, R.; MARTINES, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, v.57, n.47, p. 9513-9547, 2001

20. PRATAVIEIRA, S. et al. Phototransformation of hematoporphyrin in aqueous solution; anomalous behavior at low oxygen concentration. *Laser Physics Journal*. no prelo
21. DYSART, J.S.; SINGH, G.; PATTERSON, M. S. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. *Photochemistry and Photobiology*, v.81, n.1, p. 196-205, 2005
22. CHEUNG, R. et al. Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic-therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model. *Journal of Biomedical Optics*, v. 8, n.2, p. 248-52, 2003
23. BAGNATO, V.S. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. São Paulo: Livraria da Física, 2008.
24. OKUNAKA, T. et al. A comparison between argon-dye and excimer-dye laser for photodynamic effect in transplanted mouse tumor. *Japan Journal of Cancer Research*, v. 83, n.2, p. 226-231, 1992
25. STERENBORG, H. J.; van GEMERT, M. J. Photodynamic therapy with pulsed light sources: a theoretical analysis. *Physics in Medicine and Biology*, v.41, n.5, p. 835-849, 1996
26. POGUE, B. W. et al. Absorbed photodynamic dose from pulsed versus continuous wave light examined with tissue-simulating dosimeters. *Applied Optics*, v.36, n.28, p. 7257-69, 1997
27. RAUSCH, P. C. et al. Pulsed versus continuous wave excitation mechanisms in photodynamic therapy of differently graded squamous cell carcinomas in tumor-implanted nude mice. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, v. 250, n.2, p. 82-7, 1993
28. DAUSINGER, F.; NOLTE, S. Introduction to femtosecond technology. In: DAUSINGER, F.; LITCHER, F.; LUBATSCHOWSKI, H. *Femtosecond technology for technical and medical applications*. Berlin: Springer Verlag, c2004.
29. VOLLET-FILHO, J. D. identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância na terapia fotodinâmica. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007

30. VOLLET-FILHO, J. D.; et al. Possibility for a Full Optical Determination of PDT Outcome. *Journal of Applied Physics*. no prelo
31. MENEZES, P.F.C.; et al. Correlation of cytotoxicity and depth of necrosis of the photoproducts of Photogem[®]. *Laser Physics Journal*. v. 17, n. 4, pp. 461 – 467, 2007

ANEXOS

ANEXO A – Certificado para o uso de animais em experimentação.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 151/2007, sobre o projeto intitulado “*Avaliação da resposta fotodinâmica utilizando fonte de luz pulsada*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Vanderlei Salvador Bagnato**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **03 de dezembro de 2007**.

(We certify that the protocol nº 151/2007, about “*Evaluation of the photodynamic response using pulsed light source*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 12/03/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 05 de dezembro de 2007.

Profa. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Presidente, em exercício, da Comissão de Ética
em Experimentação Animal