

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CLÓVIS GRECCO

Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser
CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e
comprimentos de onda

São Carlos – SP

2013

CLÓVIS GRECCO

Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser
CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e
comprimentos de onda

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de atuação: Física Aplicada

Opção: Biomolecular

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que Aloja o Programa)

São Carlos

2013

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo autor.

Grecco, Clóvis

Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda / Clóvis Grecco; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2013.

112 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Photogem. 2. Photodithazine. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Fotodegradação. 5. Laser de femtossegundos. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou em todas as decisões que tomei sem jamais criticá-las ou julgá-las.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Margarida e Miguel que sempre me apoiaram ao longo desta jornada e as minhas irmãs, Andréia e Adriana que cuidaram de todos os assuntos familiares na minha ausência.

À Larissa Marin que tem me acompanhado todos esses anos, muito obrigado por tudo.

À Isabel, Benê, Cristiane e Adriane, pela paciência, carinho e disponibilidade. Muito obrigado.

Ao Laboratório de Apoio Tecnológico e ao LIEPO por nos resgatar nos momentos de aperto, pelo suporte em eletrônica e pela amizade.

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

Aos funcionários do serviço de pós-graduação que sempre estão dispostos à nos atender e orientar e às bibliotecárias do IFSC, que estão sempre dispostas a nos orientar e nos tornar melhores com relação às tecnologias de informação.

Ao Laboratório de Biofotônica, que vem crescendo a cada ano. Gostaria que todos os membros do laboratório, recebam estes agradecimentos de coração. Obrigado pessoal!

À Lilian, que considero uma grande amiga, que nunca faltou com a sinceridade comigo e me ensinou muito durante este período. Obrigado pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao professor Vanderlei Bagnato, pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos e pela contribuição em minha formação pessoal e profissional.

Ao amigo Sebastião Pratavieira, o qual contribui para a realização deste trabalho não apenas com a amizade, mas que participou de todos os momentos do desenvolvimento, meu muito obrigado.

Meu agradecimento especial à Professora Cristina Kurachi, com quem convivi boa parte da minha vida acadêmica e que tenho como um exemplo para seguir. Obrigado pela paciência, pelos ensinamentos ao longo deste período e pela amizade.

O princípio da sabedoria é:
Adquire a sabedoria; sim, com tudo o
que possuis adquire o entendimento.

Provérbios 4:7

RESUMO

GRECCO, C. **Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda.** 2013. 112p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento para o câncer baseado na interação da luz com um agente fotossensibilizador (FS) e o oxigênio molecular presente na célula alvo. A TFD apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais de tratamentos como o dano seletivo às células neoplásicas, ausência de intervenção cirúrgica, possibilidade de repetição do procedimento e efeitos colaterais controlados. Uma das limitações da técnica é a profundidade de pouca penetração da luz no tecido biológico e conseqüentemente o volume tecidual tratado. Uma alternativa para superar esta limitação é o emprego de fonte de luz pulsada que comparativamente a irradiação com luz contínua (CW), apresenta maior potência de pico levando a uma maior profundidade de penetração e maior formação de espécies reativas de oxigênio. O objetivo deste trabalho é a avaliação da TFD utilizando fonte de luz pulsada no regime de femtossegundos através de ensaios *in vitro* da fotodegradação de dois tipos de FSs e da necrose induzida em fígado sadio de ratos (estudos *in vivo*). Nos estudos *in vitro* foram avaliadas a fotodegradação do Photogem (PG - 8µg/mL) e do Photodithazine (PDZ - 6µg/mL), para as irradiâncias de 280, 340 e 400 mW/cm² com PG, e 15, 56 e 112 mW/cm² para o PDZ. Nos estudos *in vivo* foram avaliados o perfil de necrose induzida com as fontes de luz CW e pulsado em modelo animal, que receberam PG e PDZ nas concentrações de 1,5 mg/kg e 1,0 mg/kg, respectivamente. Foram irradiados com 74 mW/cm² (PG) e 102 mW/cm²(PDZ) e dose total de energia de 150 J/cm². Posteriormente foi avaliada a dependência de profundidade de necrose com a irradiância (60, 80, 107, 127, 138, 188 e 229 mW/cm²) utilizando PG e com dose total entregue de 150 J/cm². As fontes de luz empregadas foram um laser de diodo 630 nm (PG), um laser de diodo emitindo em 660 nm (PDZ) e um laser de Ti:Safira, taxa de repetição de 1 kHz, comprimento de onda 800 nm e largura de pulso de 75 fs em associação com amplificador paramétrico óptico (APO) para conversão de comprimentos de onda na região de 400 - 1150 nm. Os experimentos *in vitro* mostraram que taxa de fotodegradação para o PG foi maior utilizando o laser pulsado do que para o laser CW. Quando utilizado o PDZ, o laser CW promoveu uma taxa de fotodegradação maior do que o pulsado. Nos estudos *in vivo*, foi observada a necrose induzida com laser pulsado cerca de duas vezes mais profunda do que a induzida pelo laser CW, enquanto necrose induzida pelo laser pulsado com PDZ foi maior do que a do laser CW. No estudo da dependência da profundidade de necrose em função da irradiância, o laser pulsado induziu profundidade de necrose maior do que o laser CW para irradiâncias abaixo de 80 mW/cm², acima desta irradiância, o laser CW e o pulsado não mostraram diferença significativa. Estes resultados mostram que a combinação da fonte de luz pulsada e PG podem ser consideradas como alternativa para aumentar o volume tecidual tratado, porém, devem-se observar os parâmetros empregados para se obter o maior volume tecidual tratado. O mesmo resultado não foi observado para o PDZ como fotossensibilizador, o que indica uma forte dependência dos mecanismos da TFD com o FS e o regime de iluminação empregado.

Palavras-chave: Photogem. Photodithazine. Terapia fotodinâmica. Fotodegradação. Laser de femtossegundos.

ABSTRACT

GRECCO, C. **Comparative study of photodynamic therapy using CW and femtosecond laser at different intensities and wavelengths.** 2013. 112p. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality for cancer based on light, a photosensitizer agent (PS) and molecular oxygen into the target cells. PDT has advantages over traditional treatments, such as, selective damage to tumor cells, absence of surgical intervention, possibility of repeated procedures and controlled side effects. One of the limitations of PDT is the low light penetration in biological tissues and hence the treated tissue volume. An alternative to overcome this limitation is the use of pulsed light sources that compared to continuous (CW) irradiation, present higher peak power leading to a greater penetration depth and enhancing the reactive oxygen species production. The aim of this study is to evaluate PDT using pulsed light source at femtosecond regime through *in vitro* photodegradation of two PSs types and *in vivo* induced necrosis in healthy rat liver. In the *in vitro* study we evaluated the photodegradation of Photogem (PG - 8 μ g/mL) and Photodithazine (PDZ - 6 μ g/mL), at different irradiances (280, 340, and 400 mW/cm² for PG and 15, 56 and 112 mW/cm² for PDZ). In the *in vivo* studies the induced necrosis profile with CW laser and Pulsed Laser were evaluated in animal model which received PG (1,5 mg/kg) and PDZ (1,0 mg/kg) and were irradiated with 74 mW/cm² and 102 mW/cm², respectively, and the fluence was 150 J/cm². After that, the dependence of depth of necrosis with irradiance (60, 80, 107, 127, 138, 188 and 229 mW/cm²) with PG and 150 J/cm² of fluence was evaluated. The light source used in those studies were a 630 and 660 nm diode laser (PG and PDZ excitation light, respectively) and a Ti:Sapphire Regenerative Amplifier laser, 1 kHz repetition rate, 800 nm wavelength and 75 fs pulse width in association with an optical parametric amplifier (OPA) to convert 400-1150 wavelengths. The *in vitro* results showed that the PG photodegradation rates were greater to pulsed laser when compared with CW laser. When PDZ was used, the photodegradation rates with pulsed laser were lower than CW laser. In the *in vivo* studies, the induced necrosis with pulsed laser was twice the induced by CW laser with PG as photosensitizer. When PDZ was used, the induced necrosis was greater for CW laser than for pulsed laser. For different irradiances, the depth of necrosis induced by CW laser was greater than for pulsed laser below 80 mW/cm², above this, the pulsed and CW laser did not show difference. These results demonstrated that pulsed light and PG can be considered an alternative to enhance the treated tissue volume. The same was not observed to PDZ, which indicate the strong dependence of PDT mechanisms with PS and the light regime applied.

Keywords: Photogem. Photodithazine. Photodynamic therapy. Photodegradation. Femtosecond laser.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema mostrando o raio de luz incidindo sobre um material, e os efeitos que o raio pode sofrer como a reflexão, absorção e espalhamento.31
- Figura 2 - Gráfico mostrando os principais constituintes do tecido biológico. Destaque para janela óptica, onde ocorre o mínimo de absorção pelo tecido nos comprimentos de onda entre 600 e 1200 nm¹⁰.34
- Figura 3 - Diagrama de Jablonski adaptado, mostrando os possíveis níveis de energia que a molécula pode alcançar após absorção de energia e a transferência de energia para o oxigênio molecular.....35
- Figura 4 – Espectro de absorção normalizada do Photogem (PG) e do Photodithazine (PDZ) em água destilada. O gráfico mostra a banda de Soret, em torno de 400nm, as bandas Q de 500 à 680 nm.40
- Figura 5 - Espectro de emissão do Opera-VIS, com o máximo de emissão em 630 nm.....50
- Figura 6 - Desenho esquemático mostrando o sistema para determinação da cintura do feixe pelo método da lâmina.....51
- Figura 7 - Gráfico da potência normalizada em função do deslocamento da lâmina para um o feixe do Opera antes (□) e após (Δ) a expansão do feixe. Os ajustes das curvas (linha vermelha e linha azul) foram realizados utilizando a equação(4.2).....52
- Figura 8 - Diagrama mostrando a expansão do feixe com duas lentes (f1 = 20 mm e f2 = 100 mm).....53
- Figura 9 - Espectro da fluorescência normalizada pelo máximo de emissão de fluorescência do Photogem em 614nm em solução de água destilada. O gráfico apresenta duas bandas características, a primeira em 614 nm e outra em 660 nm, quando excitado em 532 nm.54
- Figura 10 - Diagrama esquemático mostrando o feixe expandido incidindo sobre uma face da cubeta. Uma fibra óptica, tipo Y, posicionada a 90° com o feixe de incidência do laser. A fibra de entrega conectada ao laser de excitação e a fibra de coleta conectada a um filtro passa alta (540nm), este a um espectrofotômetro.54
- Figura 11 - Gráfico da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm² emitidos utilizando fonte de luz CW nas intensidades de 280 mW/cm² (□), 340 mW/com² (○) e 400 mW.cm² (☆).....57
- Figura 12 - Gráfico da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm² emitidos utilizando fonte de luz pulsada em regime de femtossegundos nas intensidades de 280 mW/cm² (□), 340 mW/com² (○) e 400 mW/cm² (☆).....57

Figura 13 – Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm ² emitidos com iluminação CW (●) e pulsado (○) com intensidade de 280 mW/cm ²	58
Figura 15 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm ² emitidos com iluminação CW (●) e pulsado (○) com intensidade de 400 mW/cm ²	59
Figura 14 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) do photogem em função do número de fótons/cm ² emitidos com iluminação CW (●) e pulsado (○) com intensidade de 340 mW/cm ²	59
Figura 16 – Desenho esquemático dos processos que podem ocorrer quando o fotossensibilizador absorve energia.	62
Figura 17 – Gráfico da taxa de fotodegradação do Photogem em função da Irradiância com fonte de luz CW (●) e com laser pulsado (○).....	63
Figura 18 – Corte histológico de fígado de rato 30 horas após a terapia fotodinâmica com laser CW e Photogem como FS. A figura A apresenta o corte do tecido hepático sadio (I) e o perfil de necrose induzida pela terapia (II) com aumento de 32x (barra de escala de 1 mm). A figura B apresenta a interface tecido sadio (I) e necrose (II) com aumento de 400x (barra de escala de 50 μm).	64
Figura 19 - Corte histológico de fígado de rato 30 horas após a terapia fotodinâmica com laser pulsado e Photogem como FS. A figura A apresenta o corte do tecido hepático sadio (I) e o perfil de necrose induzida pela terapia (II) com aumento de 32x (barra de escala com 1mm). A figura B apresenta a interface tecido sadio (I) e necrose (II) com aumento de 400x (barra de escala 50 μm).....	65
Figura 20 - Gráfico da profundidade de necrose induzida pela terapia fotodinâmica com fonte de luz CW e pulsada e Photogem como FS.	65
Figura 21 - Gráfico da intensidade de fluorescência do Photodithazine em função do comprimento de onda para várias concentrações, quando excitado com laser de Nd: YAG em 532 nm.	68
Figura 22 - Gráfico mostrando o máximo de intensidade de fluorescência, quando excitado com 532 nm, em função da concentração. Os Dados foram normalizados em 650nm e a região linear mostra o limite para a escolha da concentração onde a fluorescência emitida pode ser considerada proporcional a concentração.	69
Figura 23 - Espectros de absorção em função do comprimento de onda (λ) do Photodithazine as concentrações de 12,5 μg/mL, 6,25 μg/mL, 3,12 μg/mL, e 1,56 μg/mL.....	69
Figura 24 - Espectro de emissão normalizado do laser após o Opera, mostrando o perfil do laser quando sintonizado em 660 nm, comprimento de onda para excitação do Photodithazine.....	71

- Figura 25 - Esquema do posicionamento dos feixes de luz. A figura mostra como foi posicionada a mascara para as fontes de luz no lobo direito do fígado.....73
- Figura 26 - Espectros da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda mostrado a banda de emissão característica do Photodithazine, quando excitado em 532 nm.....74
- Figura 27 - Gráfico mostrando a variação da concentração molar (mol/L) do PDZ em função do número de fótons/cm². Nesta figura estão apresentados o decaimento para as intensidades de 15mW/cm² (□), 50 mW/cm² (○) e 112 mW/cm²(☆) com laser CW.....75
- Figura 28 - Gráfico mostrando a variação da concentração molar (mol/L) do PDZ em função do número de fótons/cm². Nesta figura estão apresentados o decaimento para as intensidades de 15mW/cm² (□), 50 mW/cm² (○) e 112 mW/cm²(☆) com laser pulsado.....75
- Figura 29 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (○) e pulsado (●) com intensidade de 15 mW/cm², para o fotossensibilizador Photodithazine.....76
- Figura 30 - Gráfico mostrando os ajustes para variação da concentração molar (mol/L) em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (○) e pulsado (●) com intensidade de 50 mW/cm², para o fotossensibilizador Photodithazine.....77
- Figura 31 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (○) e pulsado (●) com intensidade de 112 mW/cm², para o fotossensibilizador Photodithazine.....77
- Figura 32 - Gráfico da taxa de fotodegradação do PDZ em função da irradiância com fonte de luz CW (●) e com laser pulsado (○).....79
- Figura 33 – Corte histológico de fígado de rato extraído 30 horas após o procedimento de terapia fotodinâmica com laser CW. A figura (a) mostra uma região de interface tecido sadio-necrose (seta branca e barra de escala com 100 μm – aumento de 100x). A figura (b) mostra uma região necrótica com a presença de infiltrado neutrofilico (seta tracejada) e ilhas de células ao redor do vaso sanguíneo apontadas pela seta continua (barra de escala de 50 μm).....81
- Figura 34 - Corte histológico de fígado de rato extraído 30 horas após o procedimento de terapia fotodinâmica com laser pulsado. A figura (a) mostra o espaço porta com a presença de células viáveis (seta continua) grande quantidade de infiltrado neutrofilico (quadrado) e hemácias(seta tracejada) – barra de escala de 50 μm (aumento de 100x). A figura (b) mostra a interface tecido sadio-necrose, com presença de células saculiformes (seta continua) e hemácias (seta tracejada) -barra de escala de 50 μm.....81

Figura 35 – Gráfico da profundidade de necrose induzida com PDZ pela fonte de luz CW e pulsada utilizando PDZ como fotossensibilizador e entregando uma dose total de energia de 150 J.cm^{-2} em fígado sadio de ratos.....	82
Figura 36 - Esquema do posicionamento dos feixes de luz pulsada e CW. A figura mostra como foi posicionada a mascara para as duas fontes de luz em um mesmo lobo do fígado.	84
Figura 37 - Desenho esquemático mostrando os sistemas de iluminação empregados (Libra-S, Opera e Eagle Heron). O método para expandir o feixe do laser pulsado (M1, L1 e L2) e manter o feixe CW paralelo (Fibra óptica e L3). A montagem de espelhos para direcionar os feixes de luz para a amostra (M3, M2 e M4).....	85
Figura 38 – Profundidade de necrose em função da irradiância (mW/cm^2) para o laser CW (●) e o laser pulsado (○) utilizando o Photogem como FS.	86
Figura 39 – Mapa de interações de lasers com tecido biológico aplicado a medicina. O eixo das ordenadas mostra a irradiância (W/cm^2) e o eixo das abscissas mostra o tempo de interação da luz. As diagonais pontilhadas apresentam a doses de energia típicas (J/cm^2). As figuras geométricas apresentam os tipo de interação e os parâmetros utilizados em diversos relatos clínicos e aplicações experimentais. (Adaptado de Boulnois, 1986 ⁵⁵)	105
Figura 40 – Estrutura molecular da porfirina, apresentado as subunidades pirrolicas (anéis I, II, III e IV) que compõe a macrociclo tetrapirrólico.....	108
Figura 41 – Estrutura molecular de análogos de porfirina. A figura mostra moléculas que sofreram redução (círculos pontilhados) e geraram a clorina (a) e a bacterioclorina (b).	108

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Taxa da degradação (mol/fótons) calculada a partir do ajuste das curvas de fotodegradação. A coluna 1 mostra as irradiâncias investigadas; coluna 2 apresenta a taxa de fotodegradação com laser CW; coluna 3 o R^2 para os ajustes das curvas; coluna 4 a taxa de fotodegradação promovida pelo laser pulsado e a coluna 5 o R^2 para os ajustes das curvas de degradação com laser pulsado.....61
- Tabela 2 - A tabela mostra o taxa de degradação (mol/fótons) calculado a partir do ajuste das curvas de fotodegradação. A coluna 1 mostra as irradiâncias investigadas; coluna 2 apresenta a taxa de fotodegradação com laser CW; coluna 3 o R^2 para os ajustes das curvas; coluna 4 a taxa de fotodegradação promovida pelo laser pulsado e a coluna 5 o R^2 para os ajustes das curvas de degradação com laser pulsado.78
- Tabela 3 - A tabela mostra os grupos experimentais estudados para cada regime de iluminação. O número de animais por cada grupo. A potência utilizada, a área de iluminação, as taxa de fluências investigadas, o tempo de iluminação para cada taxa e a dose total de energia.....84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	Terapia Fotodinâmica
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
IDL	Intervalo Droga Luz
FS	Fotossensibilizador
CW	<i>Continuous wave</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
UV	Ultra Violeta
m	Metro
cm	Centímetros (10^{-2} metros)
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)
ns	Nanossegundos (10^{-9} segundos)
ps	Picossegundos (10^{-12} segundos)
fs	Femtosssegundos (10^{-15} segundos)
W	Watts
mW	(mili)Watts (10^{-3} Watts)
μW	(micro)Watts (10^{-6} Watts)
J	Joule
mJ	(mili)Joules (10^{-3} Joules)
μJ	(micro)Joules (10^{-6} Joules)
h	Constante de Planck
Hz	Hertz
kHz	Kilohertz (10^3 Hertz)
MHz	Megahertz (10^6 Hertz)
Nd^{3+} :YAG	<i>Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet</i>
BBO	Borato de Bário

LISTA DE SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Estado Singlete do Oxigênio Molecular
$^3\text{O}_2$	Estado Tripleto do Oxigênio Molecular
α	Coefficiente de Absorção
ϵ	Coefficiente de Extinção Molar
ν	Frequência da Onda Eletromagnética
S_0	Estado Fundamental do Fotossensibilizador
S_1	Primeiro Estado Singlete Excitado do Fotossensibilizador
T_1	Primeiro Estado Tripleto do Fotossensibilizador
τ_{S_1}	Tempo de Vida do Estado S_1
E_Δ	Diferença de Energia do Primeiro Estado Excitado do Oxigênio Molecular
τ_Δ	Tempo de Vida do Oxigênio Singlete
k_f	Constante Cinética de Decaimento por Fluorescência
k_{CI}	Constante Cinética de Conversão Interna
k_{CIS}	Constante Cinética de Cruzamento Intersistema
Φ_f	Rendimento Quântico de Fluorescência
Φ_{CI}	Rendimento Quântico de Conversão Interna
Φ_{CIS}	Rendimento Quântico de Cruzamento Intersistema

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	INTERAÇÃO DA LUZ COM TECIDO BIOLÓGICO	31
2.2	TERAPIA FOTODINÂMICA	33
2.3	FOTOSENSIBILIZADORES	39
2.4	FONTES DE LUZ	40
2.5	REGIMES DE ILUMINAÇÃO	41
2.6	PULSOS ULTRACURTOS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA	43
3	OBJETIVOS	47
4	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FOTODINÂMICA COM PULSOS ULTRACURTOS COMPARADOS COM LASER CW UTILIZANDO PHOTOGEN COMO FOTOSENSIBILIZADOR.	49
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS:	49
4.1.1	ESTUDO <i>IN VITRO</i>	49
4.1.2	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	55
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FOTODINÂMICA COM PULSOS ULTRACURTOS COMPARADOS COM LASER CW UTILIZANDO PHOTODITHAZINE COMO FOTOSENSIBILIZADOR.	67
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
5.1.1	ESTUDO <i>IN VITRO</i>	67
5.1.2	ESTUDO <i>IN VIVO</i>	72
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6	AVALIAÇÃO DA DEPENDÊNCIA DA PROFUNDIDADE DE NECROSE COM A IRRADIÂNCIA	83
6.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
8	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo humano. Uma característica que define o câncer é o crescimento anormal de células que se multiplicam descontroladamente além de seus limites naturais os quais passam a invadir tecidos adjacentes e se espalham para outros órgãos (metástase). A partir de uma simples célula normal, ocorrem transformações que levam a uma célula tumoral através de um processo que envolve vários estágios. A célula passa tipicamente de uma lesão pré-cancerígena para um tumor maligno. Essas transformações são o resultado de interações entre fatores genéticos e três categorias de agentes externos incluindo carcinogênese física, química e biológica¹⁻².

A carcinogênese física engloba a radiação ionizante e a ultravioleta. A química consiste, por exemplo, na exposição ao amianto, componentes do cigarro, contaminantes de alimentos e água, enquanto que a carcinogênese biológica envolve infecções por certos vírus, bactérias ou parasitas. Além disso, o envelhecimento é um fator importante para o desenvolvimento de/do câncer. A chance de desenvolver algum tipo de câncer aumenta drasticamente com a idade. Essa acumulação de riscos está combinada com a tendência dos mecanismos de reparação celular se tornarem menos efetivos à medida que o indivíduo envelhece, relacionados com o processo de crescente urbanização e também com ações voltadas à promoção e recuperação da saúde¹.

A principal causa das mortes no mundo é o câncer. No ano de 2008 foram computadas 7,6 milhões de mortes, o que corresponde a, cerca de, 13 % de todas as mortes registradas. Aproximadamente 70% de todas as mortes de câncer, no ano de 2008, ocorreram em países de baixa e média-renda sendo o câncer causado por infecções virais, responsável por 20 % destas mortes. A projeção do número de mortes para os próximos anos indicam crescimento significativo neste número, com uma estimativa de 13,1 milhões para o ano de 2030¹.

No Brasil, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) divulga bianualmente dados referentes à estimativa de novos casos de câncer. As estimativas 2012-2013, mostram a previsão de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma. O tipo de câncer mais incidente será o de pele não melanoma, com aproximadamente 134 mil novos casos, seguido pelo de próstata em homens (60 mil) e mama feminina (53 mil), dentre outros²⁻³.

Uma vez desenvolvida a doença, os tratamentos empregados atualmente contra o câncer são a cirurgia de remoção da lesão, radioterapia e quimioterapia havendo, em muitos casos, a necessidade de utilização de duas ou mais modalidades acopladas. A radioterapia é uma modalidade de tratamento que envolve a aplicação de radiação ionizante a fim de eliminar ou impedir que um tumor aumente de volume e pode ser utilizada em associação com a quimioterapia ou com outras modalidades de tratamento. A quimioterapia utiliza distintos medicamentos para destruir as células tumorais, podendo ser administrado por diversas vias (oral, intramuscular, subcutânea, tópica, intratecal ou tópica)⁴, podendo ser associado a radioterapia ou cirurgia. Ambos os tratamentos oferecem resultados satisfatórios, porém apresentam uma série de efeitos adversos.

Nas últimas décadas, uma modalidade de tratamento tem ganhado espaço no arsenal terapêutico do câncer. Esta técnica chama atenção devido aos mínimos efeitos colaterais apresentados em comparação com as técnicas tradicionais e também pela possibilidade de repetição do procedimento, caso seja necessário, podendo atuar como modalidade de tratamento ou adjuvante de tratamento. A técnica é conhecida como terapia fotodinâmica (TFD).

A TFD consiste na utilização de uma fonte de luz, uma substância fotossensível, que é ativada pela luz e transfere energia (para o oxigênio molecular) ou carga elétrica para os constituintes do meio extracelular⁵. Esta modalidade de tratamento vem sendo utilizada em diversos países e tem ganhado espaço em território brasileiro, atuando principalmente no tratamento de lesões de pele não melanoma, basocelular e epidermóide.

A característica óptica do tecido biológico é um dos grandes limitantes da técnica, impedindo a penetração da luz em camadas mais profundas. Isto implica em um volume tecidual tratado inferior ao ideal, deixando células tumorais remanescentes que irão reiniciar o crescimento tumoral. Para superar esta limitação, diferentes estratégias estão sendo testadas, dentre elas, novos fotossensibilizadores com absorção da luz na região do infravermelho próximo estão sendo sintetizados e análises dos efeitos para o organismo ainda estão em fase de estudos.

Uma outra alternativa para superar a profundidade de penetração em tecidos biológicos, pode ser o uso de fontes de luz pulsadas⁶⁻⁷. Devido as suas características de interação com o tecido biológico e aos mecanismos de geração de espécies reativas serem diferentes daqueles utilizando um laser CW (do inglês *Continous Wave*), existe o potencial de se obter um volume tecidual de tratamento superior.

Neste trabalho, o efeito da iluminação com pulsos de femtossegundos na resposta fotodinâmica foi investigado. Para isso, foram avaliados os efeitos da interação da luz pulsada com um derivado de hematoporfirina através de experimentos *in vitro*, onde foi estudada a taxa de fotodegradação das moléculas do fotossensibilizador em função do número de fótons absorvidos e comparada com a irradiação CW (Seção 4.1.1). Foi avaliado o efeito da TFD com hematoporfirina como fotossensibilizador, em modelo animal, através do estudo do perfil de necrose induzida com laser pulsado em comparação com o laser CW (Seção 4.1.2). Posteriormente, foram realizados estudos de fotodegradação com um fotossensibilizador derivado de clorina, com as fontes de luz pulsada e CW (Seção 5.1.1) e a análise do perfil de necrose induzida com a TFD (Seção 5.1.2). Posteriormente, foi realizado um estudo, em modelo animal, da dependência da profundidade de necrose pela irradiância durante o tratamento com derivado de hematoporfirina como fotossensibilizador (Capítulo 6).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interação da luz com tecido biológico

A radiação eletromagnética, como a luz, pode interagir com a matéria de diversas maneiras. Quando um raio de luz incide sobre uma superfície, como o tecido biológico, pode ocorrer uma variedade de eventos que interferem na maneira como este raio de luz irá se propagar no tecido. O raio de luz pode sofrer reflexão, refração, absorção e espalhamento⁸.

Uma parcela da luz que incidiu sobre o tecido e atravessou a amostra pode ser detectada e a razão de intensidade transmitida e incidente determina a transmitância deste material. A natureza da constituição deste tecido e o comprimento de onda da luz incidente determinarão quais dos efeitos – reflexão, absorção ou espalhamento – será o fator dominante para a perda na intensidade. Sendo de fato, o comprimento de onda um fator importante que determinará o índice de refração da amostra, bem como depende deste parâmetro os coeficientes de absorção e espalhamento do tecido⁸.

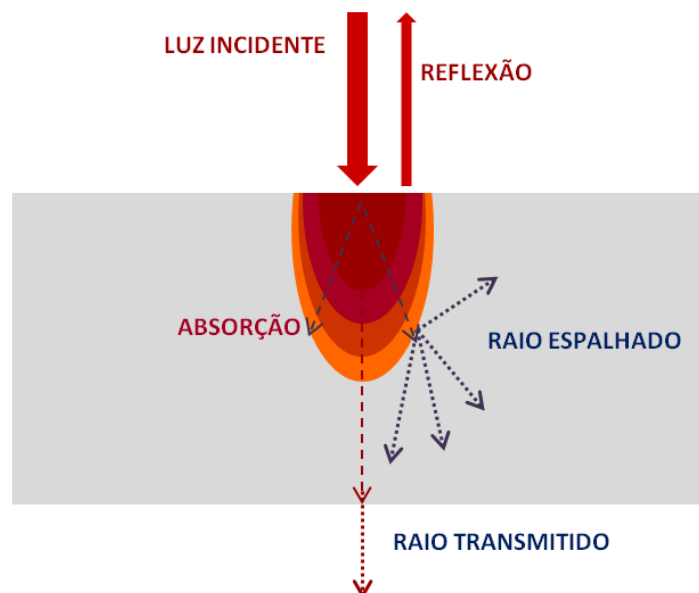


Figura 1 - Esquema mostrando o raio de luz incidindo sobre um material, e os efeitos que o raio pode sofrer como a reflexão, absorção e espalhamento.

A reflexão é definida pelo retorno da luz após incidir sobre uma superfície. Uma superfície refletora é um limite físico entre dois materiais de diferentes índices de refração, como o ar e o tecido biológico. A lei da reflexão requer que o raio de incidência, o raio

refletido e a normal da superfície refletora, estejam em um mesmo plano, chamado plano de incidência e o ângulo de reflexão seja igual ao ângulo de incidência ($\theta = \theta'$). Considerando que a superfície contenha irregularidades menores do que o comprimento de onda do raio incidente resulta na chamada reflexão especular. Quando as irregularidades da superfície são maiores do que o comprimento de onda da luz incidente, ocorre a reflexão difusa⁸. Fótons provenientes de múltiplos espalhamentos no interior do tecido e que saem pela superfície investigada, também contribuem para a reflexão difusa.

Quando a luz está passando por um meio, ela pode ser absorvida resultando na redução da intensidade da luz incidente. A razão entre a intensidade absorvida e a intensidade incidente é definida como absorvância. Na absorção, a energia luminosa pode ser convertida em calor e transferência de movimento vibracional para as moléculas que constituem o material absorvedor. A energia absorvida também pode resultar em reações fotoquímicas, ou ser transferida para outra molécula na proximidade. Um material transparente é aquele que permite a passagem da luz sem ocorrer absorção, ou seja, a quantidade de energia luminosa que entra no material é mesma que o deixa, enquanto que, materiais que reduzem a quantidade de energia luminosa à praticamente zero é chamado de opaco⁸. A habilidade de um meio de absorver radiação depende de uma série de fatores, principalmente da constituição eletrônica de seus átomos e moléculas, do comprimento de onda da radiação, da espessura da camada absorvedora e parâmetros internos da amostra, como, a temperatura e a concentração dos absorvedores presentes.

Duas leis são aplicadas para descrever os efeitos da espessura da amostra ou da concentração na absorção. Elas são chamadas de lei de Lambert e lei de Beer, e são expressas, respectivamente, por;

$$I(z) = I_0 \exp(-\alpha z) \quad (2.1)$$

e,

$$I(z) = I_0 \exp(-\epsilon cz) \quad (2.2)$$

Nas quais, z denota o eixo óptico, $I(z)$ é a intensidade a uma distância z , I_0 é a intensidade de luz incidente, α é o coeficiente de absorção do meio, c é a concentração de agentes absorvedores no meio e ϵ é o coeficiente de extinção molar, que depende dos parâmetros internos e da concentração de outros constituintes do meio. As duas leis descrevem o mesmo

comportamento da absorção e elas são chamadas de lei de Lamber-Beer. Da equação (2.1), pode-se obter;

$$z = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{I_0}{I(z)} \quad (2.3)$$

O inverso do coeficiente de absorção é definido como o comprimento de absorção L ;

$$L = \frac{1}{\alpha} \quad (2.4)$$

O comprimento de absorção mede a distância z , na qual a intensidade $I(z)$ decai de $1/e$ da intensidade incidente I_0 .

Uma variedade de mecanismos pode ocorrer quando um feixe de luz incide sobre o tecido biológico. As características específicas do tecido bem como os parâmetros do feixe de luz incidente contribuem para esta diversidade de efeitos. Quando falamos do feixe de luz, o comprimento de onda, a energia aplicada, o diâmetro do feixe, a dose de energia e a irradiância, são parâmetros importantes a serem considerados quando empregado para aplicações em tecidos biológicos⁸.

2.2 Terapia Fotodinâmica

O termo “fotodinâmica” é atribuído ao efeito causado pela luz na interação com o agente fotossensível e os componentes do meio. Os três principais componentes deste processo são a luz, o fotossensibilizador e o oxigênio molecular presente na célula⁵. Apesar da fotofísica e a fotoquímica dos fotossensibilizadores estarem sendo estudados em detalhes nas últimas décadas, ainda há uma série de questões a serem respondidas a respeito dos mecanismos que operam em culturas de células e em condições terapêuticas *in vivo*⁹.

Para ocorrer ação fotodinâmica, o fotossensibilizador precisa absorver energia no comprimento de onda da luz de excitação específico. A energia do fóton precisa ser suficiente para produzir a excitação eletrônica da molécula de fotossensibilizador, o qual requer energia na região espectral do ultravioleta (UV), visível (VIS) ou no infravermelho próximo (NIR). Altas energias, ou seja, comprimentos de ondas menores do que o UV são ionizantes e

comprimentos de onda maiores do que o infravermelho próximo apenas oferece energia molecular vibracional o que é insuficiente para causar excitação eletrônica⁹.

Para aplicações em tecidos biológicos, é necessário levar em consideração a penetração da luz no tecido. Comprimentos de ondas na região do UV ou do azul tem pouca penetração o que implica em um tratamento superficial. Desta forma, torna-se necessária utilização de comprimentos de onda na região do vermelho e do infravermelho próximo devido a pouca concentração de absorvedores nativos e de espalhamento do tecido biológico deixando uma janela óptica nesta região e consequentemente, o fotossensibilizador deve ser capaz de absorver energia nesta região (Figura 2). Contudo, deve-se evitar aprofundar na região do infravermelho devido aos processos energéticos. A luz, nos comprimentos de onda no infravermelho penetra no tecido, porém, o fóton pode não ter a energia necessária para causar excitação eletrônica para a ativação fotodinâmica⁸⁻⁹.

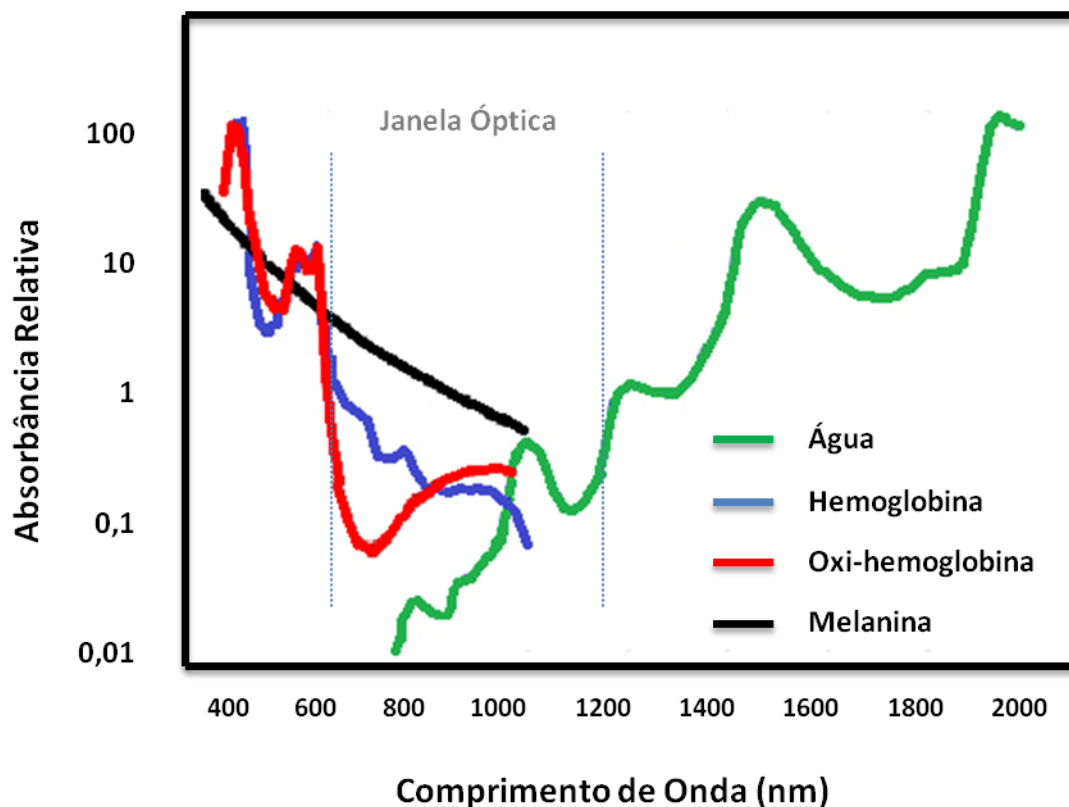


Figura 2 - Gráfico mostrando os principais constituintes do tecido biológico. Destaque para janela óptica, onde ocorre o mínimo de absorção pelo tecido nos comprimentos de onda entre 600 e 1200 nm¹⁰.

O estado fundamental do FS é o estado singleto (S_0), que ao absorver um fóton é excitado para um estado eletrônico excitado de maior energia (S_1) e de curto tempo de vida.

Para cada nível eletrônico existente (S_n) em uma molécula há vários níveis vibracionais e rotacionais, ao ser excitado para um desses níveis, o elétron decai rapidamente para o menor nível vibracional do referido estado excitado. Este fenômeno é conhecido como relaxamento vibracional (RV), e é muito mais rápido (da ordem de 10^{-12} s) que o decaimento entre estados eletrônicos. Após alcançar o menor nível vibracional possível do estado eletrônico S_1 , o FS pode voltar ao estado S_0 emitindo fluorescência ou interagindo com outras moléculas, por um processo não radiativo chamado conversão interna (CI). No estado S_1 , o FS pode transferir carga elétrica para os constituintes do meio gerando espécies oxidativas ¹¹.

No estado S_1 , há também a probabilidade do FS realizar uma transição chamada de cruzamento intersistema (CIS), para o estado tripleto (T_1) metaestável de tempo de vida mais longo sendo da ordem de microssegundos a milissegundos, que pode resultar no retorno diretamente para o estado fundamental, por emissão de fosforescência ou através de meios não-radiativos¹¹.

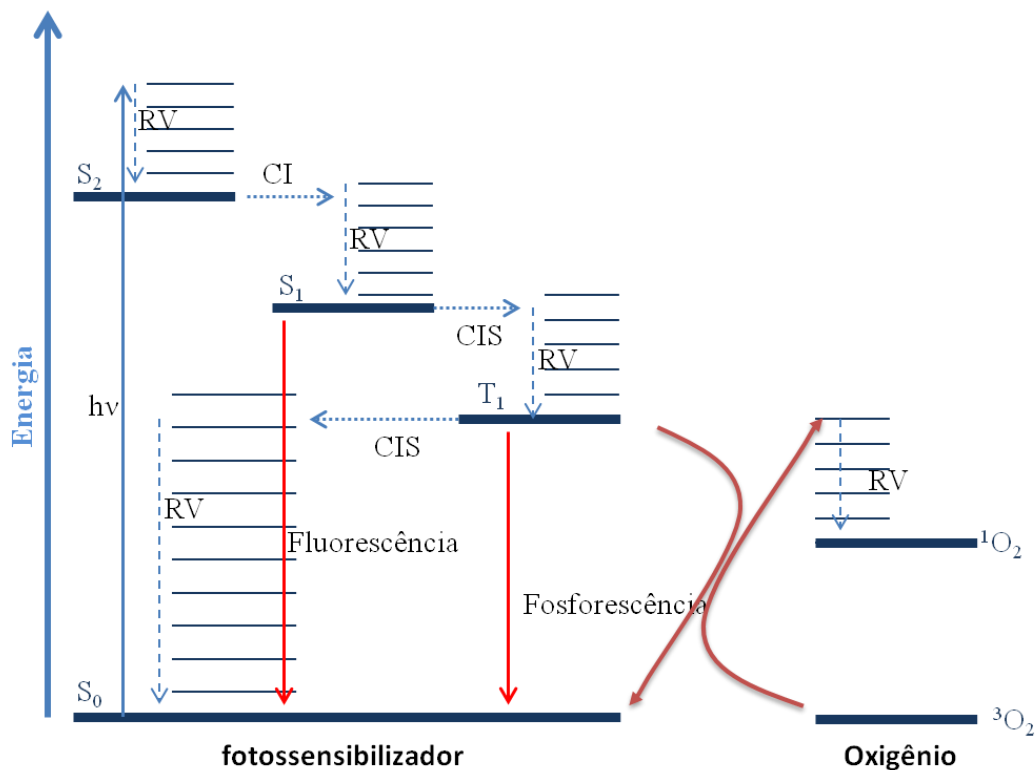


Figura 3 - Diagrama de Jablonski adaptado, mostrando os possíveis níveis de energia que a molécula pode alcançar após absorção de energia e a transferência de energia para o oxigênio molecular.

No estado tripleto, a molécula pode sofrer *quenching* (supressão), doando energia para o O_2 presente na célula e retornar para o estado fundamental. A molécula de O_2 que recebe esta

energia vai de um estado fundamental tripleto para um tripleto excitado, e rapidamente decai para um estado singleto, o qual é, por sua vez, altamente citotóxico, devido ao seu alto potencial reativo. Neste estado, desencadeia uma cascata de eventos que resulta na morte da célula¹¹.

O primeiro estado excitado S_1 do fotossensibilizador é de interesse para a TFD. Uma fração de moléculas neste estado retorna para o estado fundamental por relaxamento radiativo emitindo fóton com energia correspondente a diferença de energia S_1-S_0 . Este relaxamento com emissão de fótons é conhecido como fluorescência. O uso frequente de fotossensibilizadores para a TFD em estudos experimentais mostra que a fluorescência e suas características são importantes ferramentas para visualização de tumores, determinação de cinética da droga e avaliação da dosimetria na terapia¹²⁻¹³.

A taxa de relaxamento do estado S_1 é dada pela soma das constantes de taxa que contribuem para o processo de decaimento – relaxamento radiativo para o estado fundamental (emissão radiativa), relaxamento não radiativo para o estado S_0 (conversão interna), e cruzamento intersistema para o estado T_1 . A taxa total de decaimento do estado S_1 é dada pela soma de $k_R + k_{CI} + k_{CIS}$, a constante de taxa para os processos de emissão radiativa, conversão interna para S_0 , e cruzamento intersistema para T_1 respectivamente. O inverso deste valor é o tempo de vida (τ_s) do estado S_1 , chamado de tempo de fluorescência.

$$\tau_f = \frac{1}{k_R + k_{CI} + k_{CIS}} \quad (2.5)$$

O rendimento quântico (Φ) de formação de qualquer um dos processos pode ser definido pela razão do número de moléculas, em um determinado processo, pelo número de total de fótons que a moléculas absorve. Também é definido como a constante de taxa de um determinado processo dividido pela soma de todas as constantes de taxa no processo de decaimento da molécula excitada.

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_R + k_{CI} + k_{CIS}} \quad (2.6)$$

A soma dos rendimentos quânticos de (Φ_f), conversão interna (Φ_{CI}) e cruzamento intersistema (Φ_{CIS}) é tipicamente 1 em soluções simples. Para a maioria dos agentes da TFD, a diferença de energia entre S_1 e S_0 é muito grande e a diferença entre S_1 e T_1 é pequena e

como os processos de conversão interna são desprezíveis, o processo de cruzamento intersistema predomina $\Phi_{CIS} > \Phi_f > \Phi_{CI}$ e $\Phi_f + \Phi_{CIS} \approx 1$.

O tempo de vida do estado S_1 do fotossensibilizador é da ordem de 1 a 15 ns. O tempo de vida do estado tripleto é mais longo devido ao fato que o decaimento para o estado S_0 envolve a mudança de spin e há uma grande diferença de energia T_1-S_0 , resultando em um tempo de vida da ordem de centenas de microssegundos ou maiores, na ausência de interação com outras moléculas do meio.

A diferença nos tempos de vida de S_1 e T_1 é o que influencia na probabilidade de interações com outras moléculas nestes dois estados. Do ponto de vista cinético é mais provável que as moléculas no estado T_1 interajam com componentes do substrato, contudo, a heterogeneidade de tecidos biológicos é um componente que pode alterar este comportamento.

O mediador do dano fotodinâmico em tecidos vivos é o oxigênio singleto. O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons não pareados e a menor configuração eletrônica é o estado tripleto (3O_2). O menor estado excitado do oxigênio é o singleto (1O_2) que tem uma energia $E_\Delta = 94,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ acima do estado fundamental e, devido à diferença na multiplicidade de spin entre esses dois estados, a excitação direta do estado tripleto para o singleto é altamente improvável⁹.

Entretanto, a formação de oxigênio singleto pode ser alcançada, com alta eficiência, na transferência de energia envolvendo estados excitados tripletos de fotossensibilizadores para a molécula de oxigênio. A transferência de energia ocorre através da colisão entre as moléculas e a probabilidade deste evento ocorrer depende de um número de fatores que incluem o tempo de vida do fotossensibilizador no estado excitado, a concentração de reagentes, multiplicidade de spin do reagente e a energia dos estados energéticos das moléculas envolvidas⁹.

A supressão pelo oxigênio de estados excitados do fotossensibilizador é um processo complexo. A supressão do estado T_1 através da transferência de carga ou de energia contribui para o controle dos valores das constantes de taxa e do rendimento quântico de formação do oxigênio singleto para um dado fotossensibilizador. O rendimento quântico de formação de oxigênio singleto também depende da concentração de oxigênio na vizinhança, apresentando papel importante para o sucesso da TFD⁹.

O tempo de vida do oxigênio singleto é dependente do solvente no qual se encontra imerso. O menor tempo de vida ocorre quando em solução aquosa ($\tau_\Delta = 4\mu\text{s}$). Em sistemas biológicos, como células e tecidos são heterogêneos e o tempo de vida passa a ser mais curto

(cerca de $0,04\mu\text{s}$), o raio de ação e a difusão de oxigênio singleto é severamente prejudicada ^{9,14}.

A ação fotodinâmica é tradicionalmente discutida em termos de reações do tipo I e tipo II. As reações do tipo I são diferenciadas pela interação do fotossensibilizador com os constituintes do meio exceto o oxigênio molecular. Os mecanismos das reações do tipo I envolvem a transferência de carga, como elétrons, perda de átomos (hidrogênio), fotoadição e várias outras reações fotoquímicas bimoleculares. Reações do tipo II envolve a transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio molecular presente na célula ou tecido.

Os mecanismos atuais que operam nos sistemas biológicos dependem do ambiente o qual o fotossensibilizador está inserido. Os caminhos para estas interações dependem das constantes de taxa de decaimento do fotossensibilizador no estado excitado e das várias constantes de taxas como a de decaimento do fotossensibilizador no estado excitado (k_d), de reações com o oxigênio (k_q), a variedade de potenciais reagentes (R-Z) e com as respectivas constantes de reação ($k_R - k_Z$) destas espécies, dadas pela equação:

$$-\frac{d[FS]}{dt} = k_d + k_q[O_2] + k_R[R] + k_S[S] + k_T T + \dots k_Z[Z] \quad (2.7)$$

A formação de oxigênio singleto é o caminho predominante para maioria dos fotossensibilizadores utilizados devido ao alto valor de k_q e $[O_2]$, isto nos diz que a formação de oxigênio singleto é a reação primária formada na excitação de agentes fotodinâmicos sendo um fato a ser considerado também em sistemas biológicos.

Como discutido anteriormente, o tempo de vida do oxigênio singleto é da ordem de $4\mu\text{s}$ em água. Com este tempo de vida, reações em vários substratos são possíveis. O colesterol, lipídios insaturados, proteínas e ácidos e bases nucleicos são exemplos de biomoléculas que atuam como substrato para o oxigênio singleto. Na presença de oxigênio singleto nestes substratos, podem ocorrer alterações nas funções celulares levando a morte da célula.

No caso de tumores há dois caminhos para a eliminação da lesão a destruição direta e a indireta. A destruição indireta ocorre pela destruição do sistema vascular (endotélio e outros componentes da parede vascular) ou matriz intercelular, seguido pela hipóxia tecidual, resultando na morte das células neoplásicas. Na destruição direta, a célula tumoral morre devido ao mau funcionamento de funções mitocondriais, sistema de biomembranas celulares dentre outros fatores ocorrendo, em nível celular, a morte das células por apoptose e ou necrose. Necrose é o estado de morte de um tecido ou parte dele em um organismo vivo,

sendo um processo patológico e desordenado, causado por fatores que levam a morte celular, enquanto que, a apoptose é conhecida como uma morte celular programada e que ocorre de forma ordenada.

2.3 Fotossensibilizadores

Em geral, os fotossensibilizadores utilizados para o tratamento de câncer com TFD são compostos sintetizados a partir da porfirina. Não há razão para o uso restrito desta substância, porém, estes compostos apresentam grandes vantagens como a estabilidade da molécula, alto rendimento quântico para a formação de oxigênio singleto, aparente ausência de toxicidade no escuro e absorção na região do vermelho.

Os derivados de hematoporfirina, e suas versões purificadas, foram os primeiros fotossensibilizadores empregados na TFD e são chamados de fotossensibilizadores da primeira geração. O derivado de hematoporfirina é uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de porfirinas, os quais são formados a partir da hematoporfirina. Entretanto, a primeira geração de fotossensibilizadores possui três grandes desvantagens: apresenta baixa seletividade, o que conseqüentemente causa maior efeito colateral, causa fotossensibilidade da pele; a absorção na região do vermelho é fraca, tornando tumores volumosos difíceis de tratar⁹.

Para superar este problema com os fotossensibilizadores de primeira geração, uma segunda geração de fotossensibilizadores (Clorinas, Bacterioclorinas e ftalocianinas) tem sido estudada em vários laboratórios. Uma série de novos fotossensibilizadores já foram produzidos e receberam aprovações de várias organizações de saúde para o tratamento de lesões tumorais ou não tumorais. Além destes, alguns fotossensibilizadores de terceira geração estão em estágios de avaliações pré-clínicas.

Porfirinas possuem absorção em torno de 630 – 650 nm. As Clorinas são porfirinas reduzidas (Figura 41(a)) com uma forte banda de absorção na região de 640 – 700 nm com alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto.

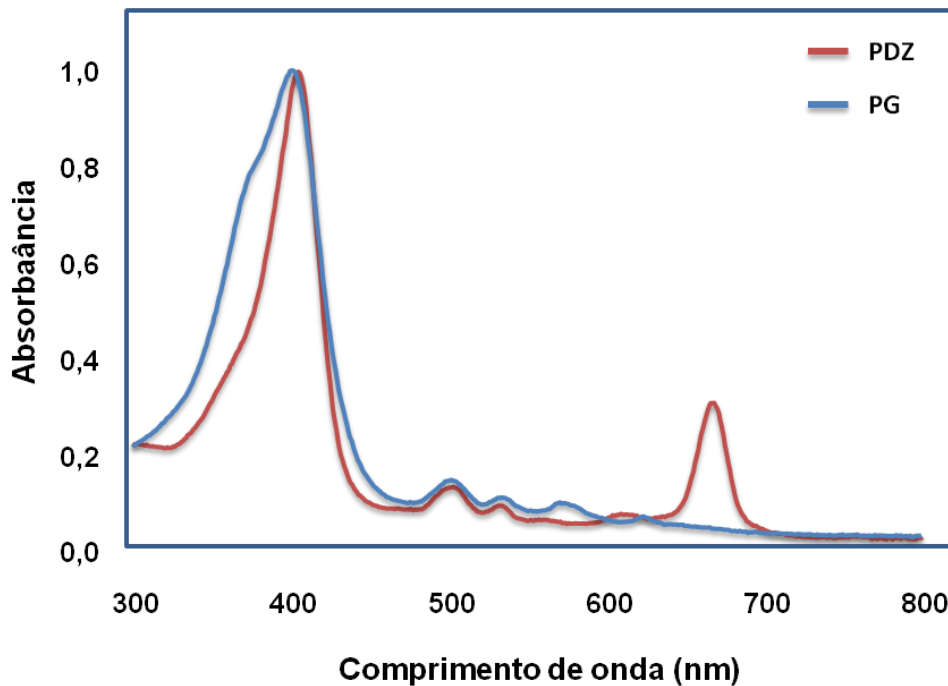


Figura 4 – Espectro de absorção normalizada do Photogem (PG) e do Photodithazine (PDZ) em água destilada. O gráfico mostra a banda de Soret, em torno de 400nm, as bandas Q de 500 à 680 nm.

2.4 Fontes de Luz

As fontes de luz convencionalmente empregadas na TFD são as que operam em regime CW^{7,15-17}. A escolha da fonte de luz está intimamente ligada a localização do tumor, a dose de luz que deverá ser entregue e a escolha do fotossensibilizador, podendo ser entregue diretamente sobre a lesão ou, dependendo da localização, através de uma fibra óptica¹⁵.

Além das fontes CW convencionais, as fontes de luz pulsadas podem ser uma alternativa para a entrega da dose de energia necessária para causar um dano irreversível ao tecido alvo. Alguns sistemas laser podem operar no regime pulsado com larguras de pulso de ms até fs. Uma série de estudos tem avaliado o uso de fontes de luz que operam no regime de ms e μ s. Com estas larguras de pulso tem-se avaliado o efeito da TFD em acne utilizando precursor de protoporfirina de aplicação tópica¹⁸⁻¹⁹. Neste regime temporal, tem-se avaliado efeitos vasculares²⁰.

Os efeitos da TFD com pulsos curtos têm sido avaliados principalmente com sistemas laser capazes de gerar pulsos com tempo de nanossegundos. Existe uma série de estudos *in vitro*^{17,21} e *in vivo*^{7,22} para avaliar a eficácia deste regime de iluminação em comparação com o

laser CW. Em uma escala menor de largura temporal de pulso, Karu e colaboradores²³ estudaram os efeitos de pulsos ultracurtos, no regime de picossegundos na protoporfirina.

Outro sistema de fonte de luz que tem ganhado destaque é o laser que opera em regime de femtossegundos. Uma característica destes sistemas de iluminação é a intensidade de pico extremamente alta, da ordem de Gigawatts/cm². Dentre as principais utilizações na TFD é pela terapia via dois fótons²⁴ e na oftalmologia atuando no tratamento da degeneração macular²⁵.

2.5 Regimes de Iluminação

A estratégia padrão para a TFD tem sido a administração da mais alta dose possível de fotossensibilizador e dose de luz em uma sessão de tratamento simples, a fim de alcançar o máximo de destruição tumoral ou das células do tecido alvo. A irradiância aplicada é também a mais alta possível, enquanto procura-se evitar o aquecimento no local de tratamento pela absorção da energia entregue no tecido ou a depleção do oxigênio por via fotoquímica. Entretanto o consumo de oxigênio via processos fotoquímicos, pode ocorrer em baixos níveis de potência.

Uma estratégia de iluminação que visa aumentar a seletividade do tratamento e melhorar a taxa entre a destruição tumoral e o dano ao tecido sadio adjacente à lesão é conhecida como mPDT (*Metronomic Photodynamic Therapy*) e consiste na entrega de fotossensibilizadores e luz a uma taxa muito baixa e por períodos extensos (dias)²⁶⁻²⁷.

O regime de entrega de luz *ON-OFF* implica na entrega da luz de maneira que a fonte de luz seja acionada e desligada em intervalos de tempo, que podem variar de milissegundos a tempos mais longos (150s - horas)²⁸⁻²⁹. Este método busca a melhoria da TFD através da recuperação parcial das células e reoxigenação entre os pulsos de luz, alcançando assim, o aumento da toxicidade pelo possível aumento na produção de oxigênio singlete e ou radicais livres. Estudos *in vitro* em células de câncer de mama mostraram um aumento na toxicidade, quando utilizado o regime *ON-OFF* em comparação com o regime CW de iluminação, tendo o mTHPC como fotossensibilizador²⁹ enquanto que, estudos em lesões com modelos *in vivo* não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos utilizando ALA, como precursor da protoporfirina IX²⁸.

Outra estratégia de tratamento é o uso da entrega da dose total de luz fracionada, ou seja, é realizada uma seção da TFD e após um tempo (2 horas) outra seção é realizada. Neste

caso aplicado a carcinoma basocelular, tendo o ALA como precursor da protoporfirina IX. Neste caso, ocorre o consumo da droga na primeira seção, e com o tempo de espera para a próxima seção, o tecido irá produzir mais protoporfirina, que poderá ser utilizada na segunda seção. Haas e colaboradores³⁰ mostraram que o resultado deste tipo de aplicação é a melhora quanto ao número de lesões com resposta completa (252/262 lesões), utilizando o fracionamento da dose.

Na busca por melhores protocolos para a TFD, um grande número de estudos foi realizado com lâmpadas e sistemas de lasers pulsados. Diferente do regime ON-OFF, os laser pulsados são capazes de emitir, em um único pulso, grande quantidade de energia tornando-os interessantes para um grande número de aplicações. Um sistema de iluminação que tem atraído a atenção para o tratamento com TFD é o uso de sistemas lasers pulsados em regime de pulsos ultracurtos (femtosegundos). O uso destes sistemas atende a proposta de realizar a TFD via dois fótons. Quando ocorre a alta densidade de fótons em uma região do espaço, dois fótons de igual energia podem ser simultaneamente absorvidos pelo cromóforo, excitando um elétron para um nível energético igual a soma da energia dos dois fótons absorvido. Isto exige que o feixe esteja focado em um volume muito pequeno e um grande número de fótons deve estar contido em um intervalo muito pequeno de tempo¹⁵⁻²⁴.

A vantagem do uso desta técnica é o comprimento de onda de excitação na região do infravermelho próximo, alcançando uma profundidade de penetração maior e podendo aumentar o volume tecidual tratado. Lasers de femtosegundos exigem manutenção constante e de difícil operação. Exige um sistema de varredura da região de tratamento e, também, pelo volume tecidual tratado ser muito pequeno, exige longos períodos de irradiação.

Os lasers pulsados de corantes, operando com pulsos de milissegundos, comprimentos de onda na faixa do visível (560 – 595 nm), energia por pulso 5 – 70 J/cm² foram inicialmente designados para problemas de ordem vascular²⁰. Estudos recentes têm mostrado resultados interessantes em tratamento de condições inflamatórias, virais, malignas e colagenosas, apresentando efeitos colaterais como dor, edema e pigmentação pós-inflamatórias bem toleradas e transitórias. Estudos recentes mostram que esse tipo de tratamento induz a expressão de citocinas e formação de colágeno que é de grande interesse na dermatologia³¹.

Outra classe de sistemas de iluminação oferece a possibilidade de aplicação com pulsos curtos (< ns). Devido às altas potências de pico, este sistema pode alcançar profundidades de penetração da luz maiores do que as fontes convencionais, superando o limite da penetração da luz no tecido biológico para a TFD. Estas fontes e duas aplicações serão discutidas na subseção 2.6.

2.6 Pulsos Ultracurtos para Terapia Fotodinâmica

A TFD com a utilização de fontes de luz pulsada tem sido estudada em ensaios laboratoriais e em aplicações clínicas. A eficácia com esse tipo de fonte de luz ainda apresenta algumas controvérsias, provavelmente devido aos parâmetros empregados de irradiância e taxas de repetição do laser, os quais são parâmetros importantes para obter o máximo da citotoxicidade com esse tipo de fonte e que ainda não estão bem determinados.

A penetração da luz no tecido pode ser limitada pelo *self-shielding* da luz que é absorvida pelo fotossensibilizador presente no tecido, dependendo de sua concentração e de seu coeficiente de extinção molar. Luz pulsada de alta irradiância de pico pode alcançar penetrações maiores do que a luz CW, causando um breve decréscimo na absorção do fotossensibilizador durante o tempo de emissão do pulso. Este processo leva a última metade do pulso a passar por um meio com menor atenuação³².

Medidas da penetração da luz realizadas por Pogue e colaboradores²¹, demonstraram um aumento na profundidade de penetração em cerca de duas vezes quando comparado com o laser CW. Foram realizadas medidas em *phantoms* (*modelos*) construídos com a presença de fotossensibilizador (BPD-MA) e iluminados com laser de argônio, bombeando um laser de corante como fonte de luz CW e um Nd:YAG bombeando um oscilador paramagnético óptico, 10ns de largura de pulso, taxa de repetição de 10 Hz e comprimento de onda de 690nm.

Sterenborg e Van Gemert³³, matematicamente, estimaram os efeitos da iluminação pulsada na TFD para a excitação de um fotossensibilizador e na depleção do oxigênio molecular. O mecanismo preciso da depleção do oxigênio pela TFD usando fonte de luz pulsada ainda é desconhecido e associado à alta irradiância e ao alto nível de energia dos lasers pulsados. Eles mostraram que para alta irradiância de pico há uma dose limite onde, acima deste limite, a efetividade cai significativamente. Para irradiâncias abaixo de $4 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$, o laser pulsado se assemelha ao CW. Acima deste valor a efetividade cai. Na prática, este efeito ocorre com lasers pulsados com altas energias de pulso e baixa taxa de repetição.

Em estudos *in vitro* com células de carcinoma renal de camundongos e utilizando PAD-SD31 (13,17 - bis (l-carboxypropionyl) carbamoyl ethyl - 8 - ethenyl - 2- hydroxy- 3- hydroxyiminoethylidene - 2,7,12,18 - tetraethyl porphyrin sodium), um fotossensibilizador de segunda geração, Seguchi e colaboradores³⁴ observaram que um laser de diodo emitindo em

668 nm e uma lâmpada de tungstênio com um filtro passa banda em 669nm mostraram o mesmo resultado enquanto que um laser pulsado Nd³⁺:YAG bombeando um oscilador paramagnético óptico (OPO) emitindo em 670 nm, 5 ns de largura de pulso, 30 Hz e 5 Hz de taxa de repetição, apresentou menor citotoxicidade do que o laser CW e atribuíram este resultado a depleção do oxigênio. O mesmo resultado encontraram Kawauchi e colaboradores³⁵ acrescentando que a TFD com laser pulsado induziu menor decomposição do fotossensibilizador do que o laser CW.

Estudos de fotocitotoxicidade entre laser pulsado e CW realizados por Miyamoto e colaboradores¹⁷, em cultura de células de HeLa e utilizando derivado de hematoporfirina, mostraram que o aumento da dose de luz diminui a viabilidade celular e que para uma mesma dose de luz, a viabilidade celular é menor para o grupo iluminado com o laser CW. Após a terapia, a viabilidade continuou sendo avaliada e o grupo CW não mostrou mudança significativa, enquanto que o grupo pulsado diminui a viabilidade celular gradativamente. Apesar dos efeitos fototóxicos do laser pulsado serem menores do que o CW, o laser pulsado induziu a morte celular por apoptose. Estes resultados sugerem que o tipo de morte celular induzida pela TFD depende do modo de iluminação.

Após realizar experimentos *in vitro* com protoporfirina IX utilizando laser pulsado 30 ns de largura de pulso e 0,5 Hz de taxa de repetição, Karu e colaboradores²³ perceberam que é necessário uma dose menor de energia do laser pulsado para se obter o mesmo efeito do CW. As diferenças entre os rendimentos quânticos das reações fotoquímicas são condicionados principalmente por mecanismos diferentes destas reações. A classe de biomoléculas que podem estar sujeitas a essas reações podem expandir substancialmente.

A fototoxicidade provocada pela iluminação pulsada em regimes de nanossegundos e picossegundos foi avaliada em experimentos *in vitro*. Neste estudo foi avaliada a influência da taxa de repetição (30, 10 e 5 Hz) do laser em estudos de fototoxicidade com fotossensibilizadores de segunda geração (ATX-S10) em células de adenocarcinoma humano de pulmão. Observaram que a fração de sobrevivência diminuía com a redução da taxa de repetição, conseqüentemente, a fototoxicidade aumentou com a diminuição da taxa de repetição. Esta diferença no comportamento foi atribuída aos intervalos entre os pulsos, causado pela dependência da concentração de oxigênio no local. Para taxas mais baixas, ocorre reposição do oxigênio no tecido, pois os intervalos pulso a pulso são mais longos.

A dependência da intensidade de pico com a fototoxicidade e geração de oxigênio singleto foi avaliada por Ohmori e colaboradores³⁶. Eles realizaram estudos com dois fotossensibilizadores um de primeira e outro de segunda geração. Os resultados mostraram

diferença na dependência da potência de pico com a fototoxicidade e a geração de espécies reativas de oxigênio. Os dois fotossensibilizadores têm sítios de localização diferentes no tecido biológico. O fotossensibilizador de segunda geração apresenta maior absorção e tempo de vida no estado excitado maior do que o de primeira geração. O fotossensibilizador de primeira geração apresentou um índice de morte celular de 90%, enquanto que o de segunda geração 60%. Isto mostra a supressão da fototoxicidade quando utilizado fotossensibilizador de segunda geração e que também pode ocorrer depleção do estado fundamental da molécula do fotossensibilizador.

Uma série de estudos *in vivo* mostram divergências quanto à efetividade da terapia fotodinâmica com fontes de luz pulsada. Um grande número de fatores precisam ser considerados como: o tipo celular, o fotossensibilizador empregado e os parâmetros de iluminação adotados.

Rausch e colaboradores⁶ estudaram o efeito da luz pulsada em diferentes graus de carcinoma espinhal humano inoculados em camundongos. O grupo sem fotossensibilizador não apresentou diferença. Iluminação pulsada 630 nm, 20 ns largura de pulso e 30 Hz de taxa de repetição, apresentou um índice de remissão total de 86,4% das lesões tratadas, enquanto o CW apresentou 53,6% para células do tipo HOPC. O outro tipo celular HLaC79, não apresentou diferença significativa, provavelmente pela diferença de concentração de oxigênio ou pela vascularização do tipo tumoral avaliado. O fotossensibilizador utilizado foi um derivado de hematoporfirina.

Também utilizando um derivado de hematoporfirina, Okunaka⁷ e colaboradores avaliaram a terapia fotodinâmica com pulsos curtos, 630nm, 10 ns e 30 Hz em tumores renais de camundongos implantados em ratos. Para doses iguais de energia eles observaram um aumento de aproximadamente 275 % na profundidade de necrose induzida pela terapia e efeitos térmicos.

A comparação entre a fonte de luz pulsada e CW com derivados de hematoporfirina também foi realizada em fibrosarcoma por Andreoni e colaboradores³⁷. As fontes de luz não apresentaram diferença significativa. A associação de luz 630nm e 700nm pulsado apresentou um aumento na resposta da terapia quando colocado um atraso de 16 ns entre os pulsos. Este efeito foi atribuído à fotoativação envolvendo ambos os estados S1 e T1 da porfirina.

Um modesto aumento da profundidade de necrose pode ser observado por Pogue e colaboradores³⁸ com a utilização de luz pulsada, 690 nm e 10 Hz de taxa de repetição em fotossensibilizador de segunda geração (BPD-MA) na concentração de 5 mg.kg⁻¹. Este aumento pode estar associado com efeitos fisiológicos causados pelo laser como a geração de

hipertermia local, ou pela depleção do oxigênio durante a irradiação. Os autores comentam ainda que a diferença não é significativa devido ao fato de que à alta intensidade causa mudança de absorção do fotossensibilizador pela excitação de grandes frações de moléculas para o estado excitado no tempo da largura do pulso. É possível que caminhos alternativos dos mecanismos da terapia fotodinâmica tenham se iniciado com a utilização do laser pulsado. Entretanto, novas espécies oxidativas podem estar em camadas superficiais e podem não ser capazes de causar o aumento da profundidade de necrose.

Os estudos realizados nas últimas décadas tem avaliado o uso de lasers pulsados como fonte de luz alternativa para a terapia fotodinâmica. Contudo, os resultados observados ainda apresentam controvérsias que podem estar relacionados aos parâmetros de aplicação como taxa de repetição e energia do pulso. Com o regime de iluminação em femtossegundos, não foram encontrados na literatura estudos que investiguem efeitos fotodinâmicos.

Com isso, este trabalho avalia o efeito fotodinâmico com laser pulsado no regime de femtossegundos para um fotossensibilizador derivado de hematoporfirina (primeira geração) e um fotossensibilizador derivado de clorina. Foi avaliado neste estudo a fotodegradação destes fotossensibilizadores e a necrose induzida em modelo animal (fígado de ratos saudáveis). Também foi avaliada a dependência da profundidade de necrose para as fontes de luz empregadas com a irradiância média, para uma dose total de 150 J/cm^2 .

3 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo investigar o efeito fotodinâmico induzido com iluminação no regime de pulsos ultracurtos (femtosegundos) com fotossensibilizadores sintetizados a partir de derivados de hematoporfirina (Photogem) e com fotossensibilizadores sintetizados a partir da clorofila (Photodithazine).

Neste estudo foram avaliados:

- I. A fotodegradação do Photogem e do Photodithazine em regime CW e pulsado;
- II. A necrose induzida em fígado sadio de ratos com fontes de luz CW e pulsada quando utilizado Photogem e o Photodithazine como fotossensibilizadores;
- III. A dependência da profundidade de necrose com a irradiância (mW/cm^2) para as fontes de luz CW e pulsado utilizando o Photogem como fotossensibilizador;

4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FOTODINÂMICA COM PULSOS ULTRACURTOS COMPARADOS COM LASER CW UTILIZANDO PHOTOGEM COMO FOTOSSENSIBILIZADOR.

Este estudo avaliou o efeito da fotodegradação do Photogem®, em solução aquosa, via espectroscopia por fluorescência. O estudo da fotodegradação é um relevante parâmetro inicial para a avaliação da TFD. Inicialmente foi realizado experimento *in vitro* onde a fotodegradação foi investigada sob duas condições de iluminação. As amostras foram submetidas à iluminação com fonte de luz pulsada e fonte de luz CW.

Posteriormente foi realizado um estudo *in vivo* da resposta fotodinâmica induzida por fonte de luz CW e pulsado. O estudo foi realizado em fígados saudáveis de ratos e a partir de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina, os perfis de necrose para os regimes de iluminação empregados foram medidos e uma análise qualitativa foi realizada.

4.1 Materiais e métodos:

4.1.1 Estudo *in vitro*

O fotossensibilizador utilizado foi o Photogem® (Photogem, Moscou - Rússia), um fotossensibilizador de primeira geração fabricado a partir de derivados de hematoporfirina. O fotossensibilizador foi utilizado na concentração de 8 µg/mL (Peso molecular médio = 630 g/mol - aproximadamente 12,7 µM) em solução de água destilada³⁹. Nessa concentração, estudos anteriores demonstraram que pouca agregação é observada e nesse regime, a fluorescência emitida pela solução é proporcional à concentração¹⁴.

A fonte de luz pulsada utilizada foi um laser de titânio safira operando no regime de femtossegundos (Libra-S, Coherent, Santa Clara – USA) em associação com um *Optical Parametric Amplifier* (OPA) Opera - VIS (Coherent, Santa Clara – USA). O Libra-S produz um feixe laser de emissão em 801 nm, operando a taxa de 1 kHz e com largura de pulso de cerca de 70 fs. O Opera-VIS, ao ser bombeado com o Libra-S, é capaz de realizar a conversão do feixe, com pulsos da ordem de femtossegundos e em determinados comprimentos de onda de emissão, que podem ser sintonizados de 400 nm à 1150 nm. Para a realização destas medidas, o equipamento foi sintonizado no comprimento de onda de 630 nm (Figura 5) para corresponder à mesma região espectral do laser CW. É possível observar que a emissão do

laser em femtossegundos possui uma largura espectral decorrente do modo de seleção das frequências para de emissão centrada em 630 ± 15 nm.

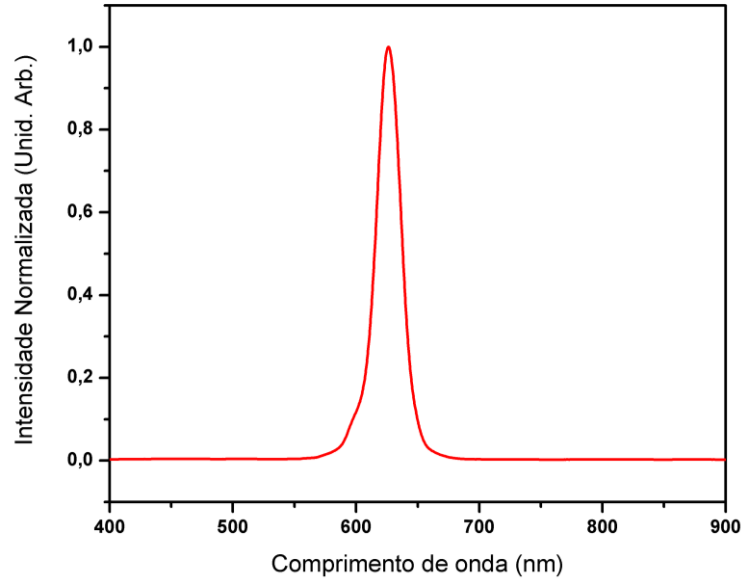


Figura 5 - Espectro de emissão do Opera-VIS, com o máximo de emissão em 630 nm.

4.1.1.1 Caracterização da fonte de luz

O diâmetro do feixe foi medido utilizando o método da faca. Este método consiste em posicionar uma lâmina em frente ao feixe do laser e variar a posição desta lâmina, bloqueando ou possibilitando a propagação do feixe de luz. Com um fotodetector posicionado após a lâmina, faz-se então a leitura das potências emitidas pelo laser. Com estes dados e a partir da construção de um gráfico da potência em função da posição da lente, é possível fazer um ajuste da curva com uma função erro exponencial e a partir dela obter parâmetros necessários para a determinação do diâmetro do feixe (Figura 6)⁴⁰.

Opera SHG - 630 nm

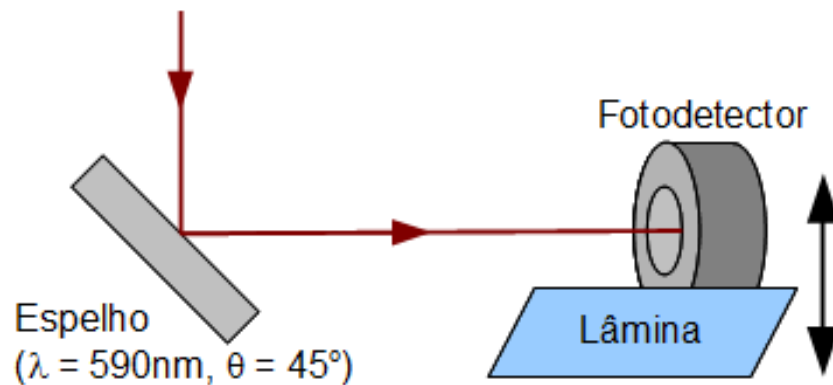


Figura 6 - Desenho esquemático mostrando o sistema para determinação da cintura do feixe pelo método da lâmina.

Para realizar a fotodegradação com uma iluminação uniforme na parede da cubeta, o feixe do laser foi expandido para alcançar um diâmetro de aproximadamente 10 mm, usando uma montagem óptica tipo telescópio, composto por duas lentes. Uma lente DCX 0203 (Edmund Optics, EUA) com distância focal de 20 mm e uma DCX 0203 (Edmund Optics, EUA) com distância focal de 100 mm. Isto resultou em um aumento de cerca de 5x do diâmetro do feixe

O diâmetro do feixe define-se como sendo a largura na qual a irradiância (I) do feixe decai de $1/e^2$ de seu máximo. Sabendo $I \propto$ a derivada da curva de potência em função da posição da lâmina, ajustando a curva de intensidade,

$$I(x) = I_0 \cdot e^{\left\{-\left[\frac{x-x_0}{\omega}\right]^2\right\}} \quad (4.1)$$

Na qual, I_0 é o pico de intensidade no centro do feixe localizado no ponto x_0 , x é a coordenada cartesiana com respeito à origem escolhida no experimento e ω é o raio do feixe medida na posição onde o feixe decresce do valor de $1/e$ do seu valor máximo I_0 , ou na forma:

$$P(x) = \frac{1}{2} \left\{ 1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - x_0}{\omega} \right) \right\} \quad (4.2)$$

Na qual, *erf* é a função erro na curva de potência versus a posição da lâmina, portanto, o diâmetro do feixe pode ser dado por,

$$\text{diâmetro do feixe} = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot \omega \quad (4.3)$$

Das medidas realizadas e dos ajustes das curvas através da Eq.(4.2), foram obtidos os valores para a cintura e o diâmetro do feixe para antes e após a expansão do feixe. Os valores de potência em função do deslocamento da lâmina estão representados na Figura 7.

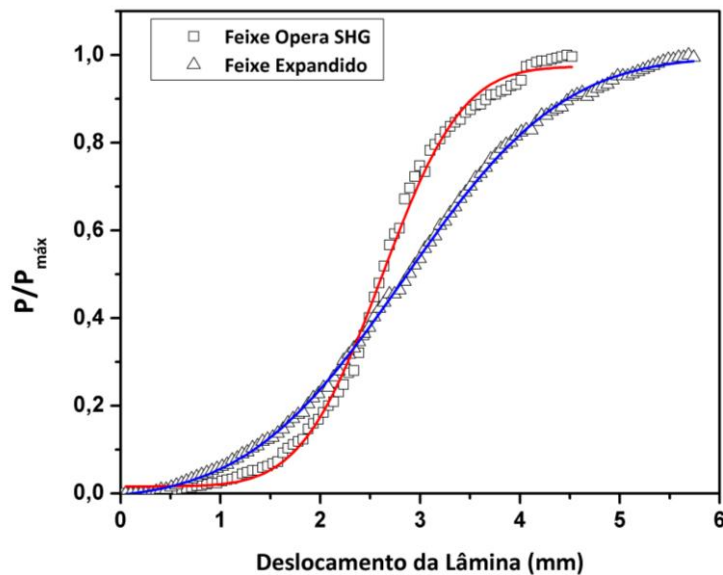


Figura 7 - Gráfico da potência normalizada em função do deslocamento da lâmina para um o feixe do Opera antes (\square) e após (Δ) a expansão do feixe. Os ajustes das curvas (linha vermelha e linha azul) foram realizados utilizando a equação(4.2).

A partir destes dados, o diâmetro do feixe antes da expansão foi medido em $(1,77 \pm 0,01)$ mm e após a expansão em $(10,5 \pm 0,2)$ mm.

4.1.1.2 Fotodegradação

Uma cubeta com caminho óptico de 10 mm foi posicionada em frente ao feixe laser expandido. O volume da solução de fotossensibilizador utilizado foi de 1 mL. Este volume é o suficiente para que toda solução fosse iluminada pelo feixe expandido (Figura 8).

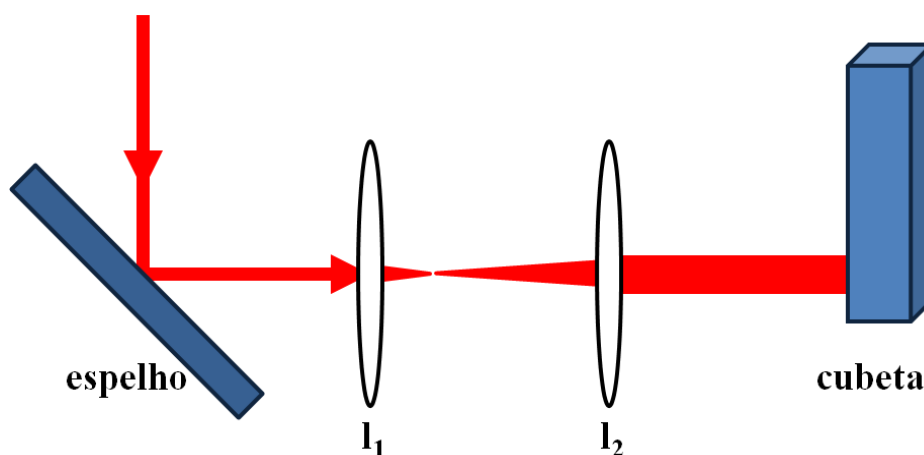


Figura 8 - Diagrama mostrando a expansão do feixe com duas lentes ($f_1 = 20$ mm e $f_2 = 100$ mm).

A degradação foi monitorada em função da dose de luz entregue usando um sistema de espectroscopia composto por um laser de excitação Nd^{3+} : YAG (532 nm, potência de emissão de 10 mW), uma fibra óptica bifurcada para excitação e coleta de fluorescência e um espectrômetro USB (USB 2000, Ocean Optics, EUA). O espectro de fluorescência apresenta uma banda característica de emissão quando excitado com 532 nm. Esta banda de emissão em 614 nm foi utilizada como parâmetro das medidas de intensidade de fluorescência e processamento dos dados. Os tempos de coleta foram em 0, 5, 10, 20, 30 e 40 minutos. O laser de prova era desligado e a leitura dos dados realizada, com duração de aproximadamente 10 segundos, a fim de evitar a degradação da amostra. Após a coleta dos dados, o laser de degradação era ligado e o procedimento de iluminação da cubeta reiniciado.

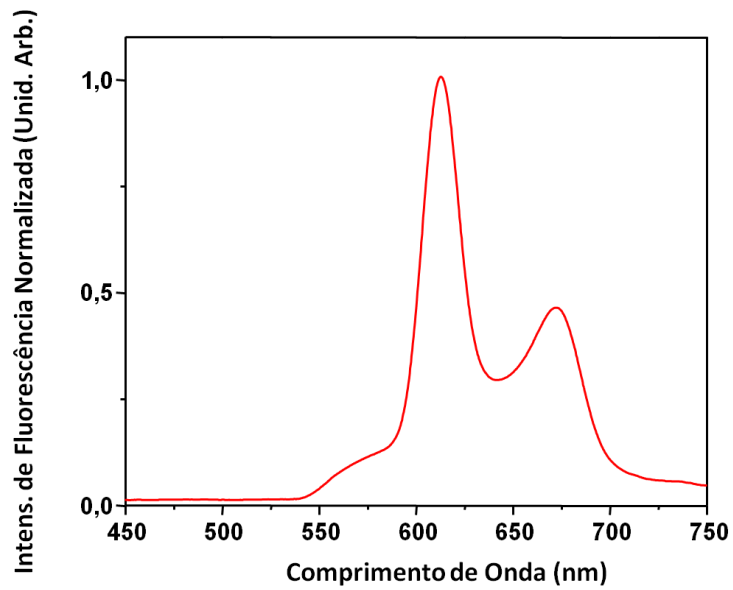


Figura 9 - Espectro da fluorescência normalizada pelo máximo de emissão de fluorescência do Photogem em 614nm em solução de água destilada. O gráfico apresenta duas bandas características, a primeira em 614 nm e outra em 660 nm, quando excitado em 532 nm.

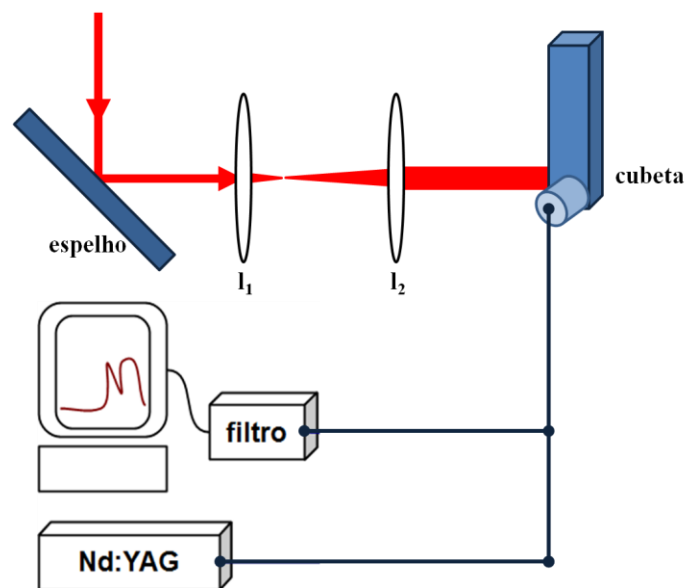


Figura 10 - Diagrama esquemático mostrando o feixe expandido incidindo sobre uma face da cubeta. Uma fibra óptica, tipo Y, posicionada a 90° com o feixe de incidência do laser. A fibra de entrega conectada ao laser de excitação e a fibra de coleta conectada a um filtro passa alta (540nm), este a um espectrofotômetro.

Os valores de intensidade foram normalizados pela amplitude de fluorescência em 614 nm no tempo $t=0$. Esta intensidade corresponde à emissão de uma solução com concentração

molar inicial do fotossensibilizador de aproximadamente 12,7 μM . Neste estudo foram avaliadas a degradação sob as taxas de fluência de energia de 280, 340 e 400 mW/cm^2 . Posteriormente, estas taxas foram convertidas em números de fótons. A dose total de energia entregue por unidade de área na superfície do tecido depois de um tempo de iluminação é dada expressão;

$$D = \frac{P \cdot t}{A} \quad (4.4)$$

Na qual, D é a dose total entregue, P é a potência média, t é o tempo de iluminação e A é a área da superfície iluminada.

Para calcular o número total de fótons por unidade de área, utilizamos a expressão;

$$\frac{n_{\text{fótons}}}{\text{cm}^2} = \frac{P \cdot t}{A \cdot h \cdot \nu} \quad (4.5)$$

onde, h é a constante de Planck ($6,626\ 069 \times 10^{-34}$ Js), ν é frequência de radiação, neste caso para o comprimento de onda de emissão do laser em 630 nm, e n é o número total de fótons emitidos. Com esses dados, foi possível a construção de gráficos da variação da quantidade moléculas de fotossensibilizador em função do número de fótons. As mesmas medidas foram realizadas utilizando um laser de diodo CW em 630 nm, Eagle Heron® (Quantum Tech, São Carlos, SP – Brasil). Destes gráficos foram obtidas curvas de ajustes para determinar o decaimento da intensidade de fluorescência das moléculas em função da quantidade de fótons absorvidos.

4.1.2 Estudos *in vivo*

A investigação do perfil de necrose induzida pela TFD, em fígado sadio, foi realizada em um modelo animal. As diferenças morfológicas entre as necroses causadas pelo regime de iluminação pulsado e CW foram investigadas. O principal objetivo desse estudo é a análise do padrão de necrose induzida, especialmente o volume de tecido e as alterações provocadas.

Neste estudo, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 200 e 250 gramas, divididos em dois grupos experimentais: Grupo I – iluminação com laser CW (9 animais) e Grupo II – iluminação com laser de femtossegundos (9 animais). Um estudo

preliminar com animais não fotossensibilizados mostrou que não foram induzidos efeitos no tecido animal, apenas com a iluminação nos parâmetros empregados.

Os animais foram anestesiados com uma combinação de 100 mg.kg^{-1} de peso corporal de Ketamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP – Brasil) e 6 mg/kg^1 de peso corporal de Xylasine (Coopazine®, Coopers Brasil Ltda, Cotia, SP – Brasil). O Photogem foi injetado via veia cava na dose de $1,5 \text{ mg/kg}$ de peso corporal após uma laparotomia para o acesso direto. Após 30 minutos da injeção do fotossensibilizador (Intervalo Droga Luz)¹², o fígado foi gentilmente exposto e posicionado para a iluminação.

O feixe do laser CW foi entregue via fibra óptica. No caso do laser pulsado, duas lentes foram utilizadas para produzir um feixe equivalente ao laser CW. Para as duas fontes de luz, a área iluminada da superfície foi limitada a 1 cm^2 , a irradiância foi de 74 mW/cm^2 para uma fluência total de 150 J/cm^2 .

Depois do procedimento de iluminação, os tecidos foram aproximados e suturados e receberam, via intramuscular, uma dose de $2,2 \text{ mg/kg}$ de peso corporal de analgésico (Banamine®, Coopers Brasil Ltda, Cotia, SP – Brasil). Os animais foram mortos trinta horas após o término do procedimento de TFD. O fígado foi removido e encaminhado para o procedimento histológico, onde foram corados com HE (hematoxilina e Eosina). A profundidade de necrose foi medida utilizando uma lupa de 40x de aumento, com uma mesa com parafusos micrométrico acoplados nos eixos x e y para realizar as medidas do perfil de necrose.

4.2 Resultados e Discussão

Os dados de fluorescência coletados foram utilizados para a definição da concentração molar em função do número de fótons por unidade de área (cm^2) emitidos durante o processo de iluminação com laser CW (Figura 11) e pulsado (Figura 12).

Quando as moléculas de Photogem absorvem energia luminosa, tem-se início os processos fotoquímicos. Porém, em solução aquosa, o Photogem pode se encontrar em estado de agregação, o que implica em uma intensidade de fluorescência que não é proporcional à concentração. Durante o processo de iluminação, esses agregados estão sendo desfeitos e a molécula passa a emitir uma intensidade de fluorescência, em alguns casos, maiores do que a

inicial. Esta variação da intensidade reflete na oscilação da intensidade representada no desvio mostrado pelas barras de erro (Figura 11 e Figura 12).

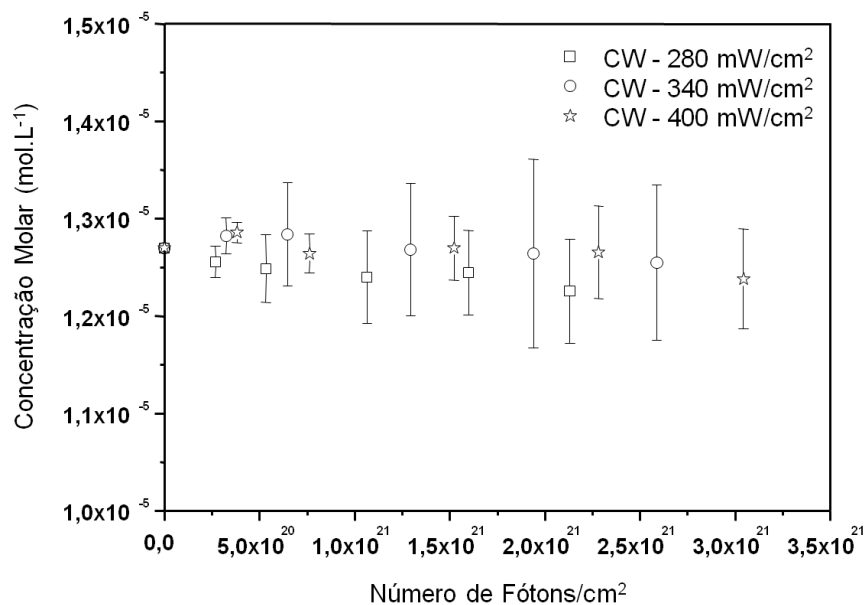


Figura 11 - Gráfico da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm² emitidos utilizando fonte de luz CW nas intensidades de 280 mW/cm² (□), 340 mW/cm² (○) e 400 mW/cm² (☆).

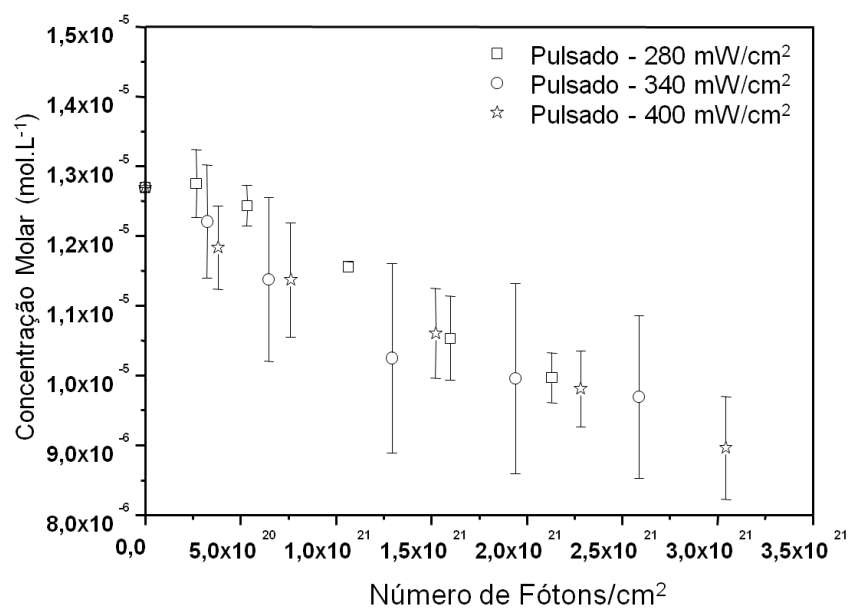


Figura 12 - Gráfico da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm² emitidos utilizando fonte de luz pulsada em regime de femtossegundos nas intensidades de 280 mW/cm² (□), 340 mW/cm² (○) e 400 mW/cm² (☆).

Os dados apresentados mostram claramente mudança do comportamento entre o regime CW e pulsado para o Photogem, utilizando a mesma potência média como comparação. Percebe-se que o laser CW não apresenta variação com a irradiância empregada, enquanto que utilizando o laser pulsado a concentração do FS varia consideravelmente, aumentando a fotodegradação com o aumento da irradiância. Os gráficos comparando os regimes de iluminação para as diferentes intensidades estão apresentados nas figuras a seguir (Figura 13, Figura 14 e Figura 15).

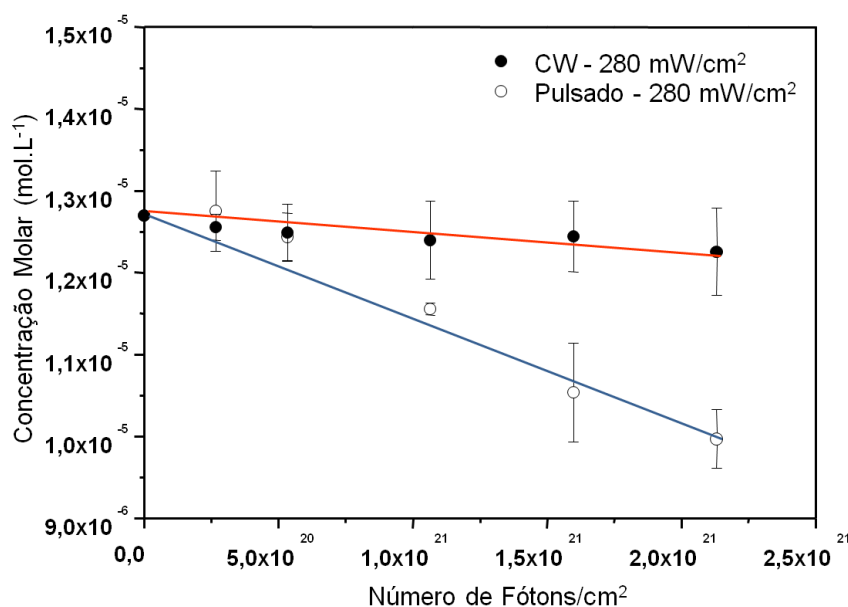


Figura 13 – Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (●) e pulsado (○) com intensidade de 280 mW/cm².

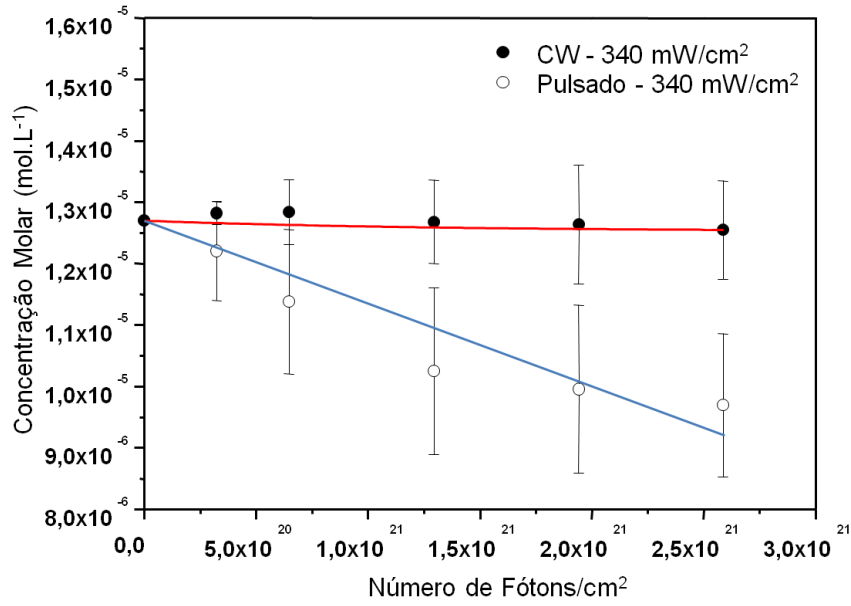


Figura 14 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) do photogem em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (●) e pulsado (○) com intensidade de 340 mW/cm²

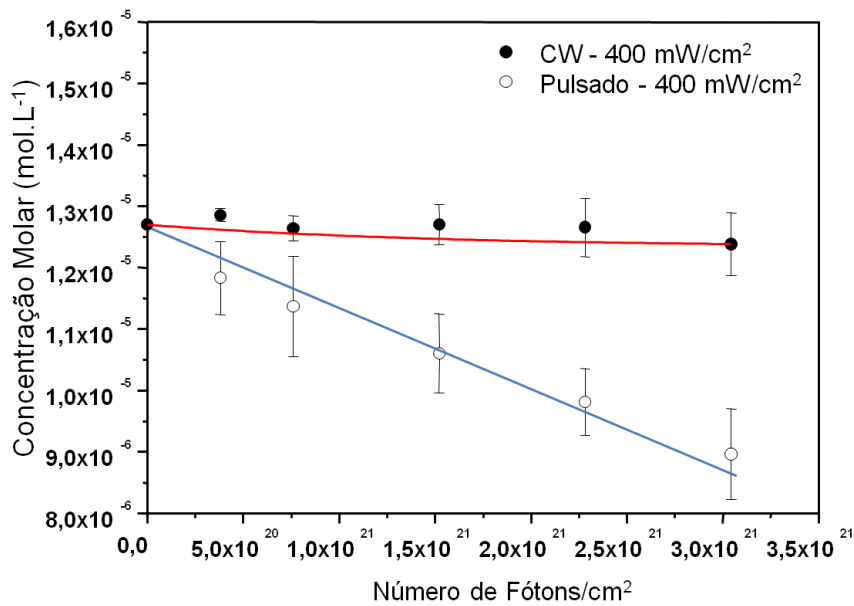


Figura 15 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) do Photogem em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (●) e pulsado (○) com intensidade de 400 mW/cm².

As curvas de degradação para as fontes de luz empregadas foram ajustadas por um modelo de decaimento exponencial que é dada por:

$$[S_0](x) = [S_0]_0 \exp\left(-\frac{x}{\tau}\right) \quad (4.6)$$

sendo, $[S_0]_0$ é a concentração inicial do fotossensibilizador, x é o número de fótons por unidade de área (fótons/cm²), $[S_0](x)$ é a concentração de moléculas que podem emitir fluorescência depois um número de fótons absorvidos e τ é a constante de decaimento.

A função exponencial pode ser escrita como uma série infinita (4.7). Quando a constante de decaimento for muito grande, o argumento da função exponencial é muito pequeno, portanto elementos de ordens mais elevadas na expansão podem ser desprezados e aproximação é uma função linear:

$$e^x = \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{x^n}{n!}\right) = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \dots \quad (4.7)$$

Os ajustes realizados nestas medidas indicam que o melhor ajuste é utilizando esta definição. Os dados experimentais foram ajustados por esta aproximação através de uma curva linear:

$$[S_0](x) = [S_0]_0 - k_{PG}x \quad (4.8)$$

E a taxa de fotodegradação foi calculada pela expressão:

$$-\frac{d[S_0]}{dx} = k_{PG} \quad (4.9)$$

Onde k_{PG} é a taxa de fotodegradação. Os valores obtidos para estas curvas através do ajuste linear estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Taxa da degradação (mol/fótons) calculada a partir do ajuste das curvas de fotodegradação. A coluna 1 mostra as irradiâncias investigadas; coluna 2 apresenta a taxa de fotodegradação com laser CW; coluna 3 o R^2 para os ajustes das curvas; coluna 4 a taxa de fotodegradação promovida pelo laser pulsado e a coluna 5 o R^2 para os ajustes das curvas de degradação com laser pulsado.

Irradiância (mW/cm ²)	CW		Pulsado	
	k_{PG} (mol/fótons)	R^2	k_{PG} (mol/fótons)	R^2
280	$(21 \pm 3) \cdot 10^{-32}$	0,9996	$(1,24 \pm 0,09) \cdot 10^{-30}$	0,9994
340	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-32}$	0,9999	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-30}$	0,9984
400	$(6,0 \pm 3,0) \cdot 10^{-32}$	0,9999	$(1,26 \pm 0,06) \cdot 10^{-30}$	0,9994

O processo de degradação de fluorescência advém de diversos fatores. A primeira possibilidade a se considerar é um processo oxidativo da molécula, que forma uma molécula de características diferentes, do ponto de vista de absorção, resultando na atenuação da absorção e conseqüentemente na fluorescência.

Uma segunda possibilidade é um processo de modificação estrutural da molécula, tornando certas transições proibidas. Tanto a primeira quando a segunda possibilidade depende de um elevado número de fatores. Os fatores mais importantes estão relacionados com a seqüência de eventos que levam aos efeitos que atenuam a fluorescência. De uma forma geral, os passos dos processos que ocorrem da absorção de energia pelo fotossensibilizador estão representados na Figura 16.

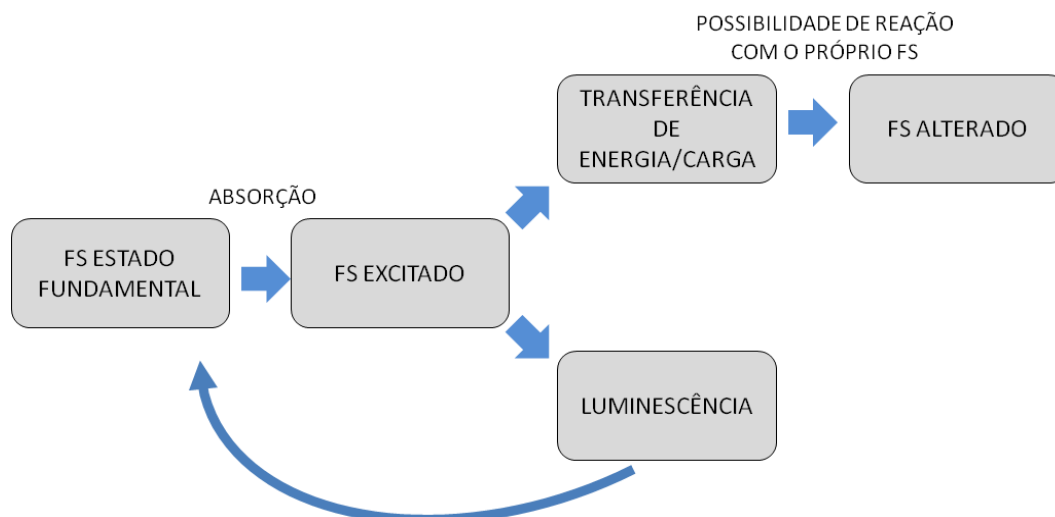


Figura 16 – Desenho esquemático dos processos que podem ocorrer quando o fotossensibilizador absorve energia.

Todos esses processos são dependentes temporalmente, inclusive através do estabelecimento de estados de equilíbrio. Neste ponto, a forma como a luz é entregue ao sistema, pode resultar em mudanças no resultado final. A forma temporal como a energia é entregue pode alterar suas propriedades ópticas (processos não lineares). Pode ainda ocorrer o desbalanceamento das cadeias de eventos, tornando mais rápida ou mais lenta a formação de espécies reativas.

Ao se trabalhar com a entrega de luz de forma contínua, as equações de taxa que governam o processo, atingem o estado estacionário, sendo portanto, determinadas por etapas mais lentas. Por outro lado, na utilização de pulsos curtos, o processo não atinge o estado estacionário, sendo governado majoritariamente por processos dinâmicos.

Expressando a curva em termos de fótons entregues ao sistema, é uma forma adequada de expressar os dados de degradação de maneira comparativa para os dois regimes de luz empregados.

Os experimentos indicam que quando usamos pulsos intensos, a quantidade de fótons necessários para atenuar a fluorescência de cada molécula é menor do que a quantidade necessária com o laser CW (Figura 17). Como estes feixes não estão focados, efeitos lineares são raros. A melhor hipótese que podemos apresentar corresponde a alterações na formação das espécies reativas. Poderia ser alterações intrínsecas das moléculas, e neste caso, a TFD seria menos efetiva. Isto, no entanto, não ocorreu com o Photogem.

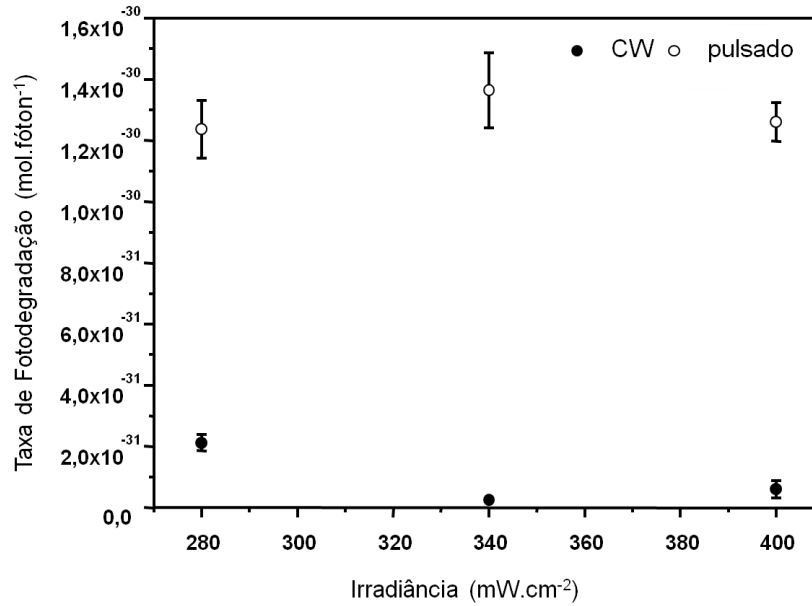


Figura 17 – Gráfico da taxa de fotodegradação do Photogem em função da Irradiância com fonte de luz CW (●) e com laser pulsado (○).

Com relação aos experimentos *in vivo*, o perfil de necrose com laser CW está apresentado na Figura 18A. A região I mostra o tecido sadio e a região II o tecido necrosado. Na Figura 18B, está a interface tecido sadio-necrose. As células na região I são ligeiramente maiores do que os hepatócitos normais indicando que receberam um dano devido a terapia e estão em processo de alteração, contudo, são células que poderão se recuperar. A necrose induzida pelas fontes de luz CW e pulsada foi do tipo coagulativa com a presença do arcabouço celular e de hemácias na região necrosada indicando um processo de congestão vascular. Esses indícios celulares caracterizam o dano celular e vascular da terapia fotodinâmica em tecido hepático.

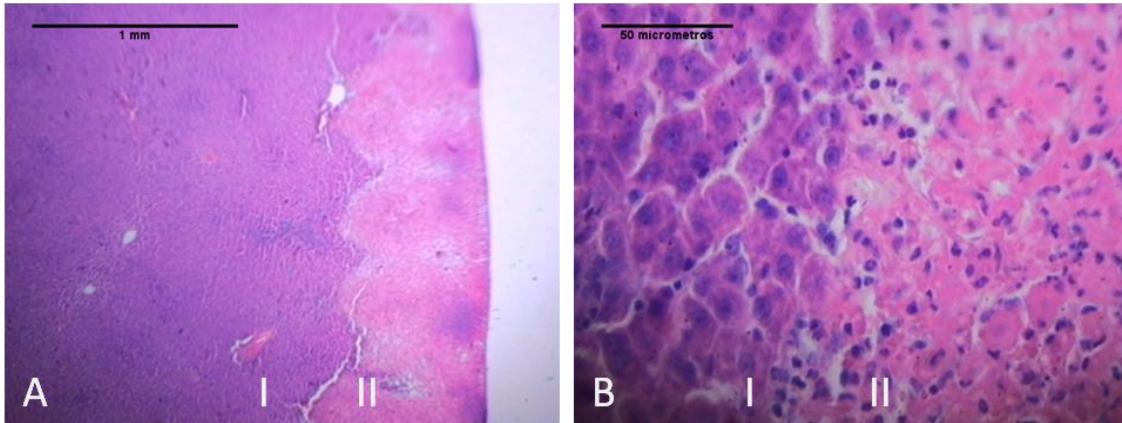


Figura 18 – Corte histológico de fígado de rato 30 horas após a terapia fotodinâmica com laser CW e Photogem como FS. A figura A apresenta o corte do tecido hepático sadio (I) e o perfil de necrose induzida pela terapia (II) com aumento de 32x (barra de escala de 1 mm). A figura B apresenta a interface tecido sadio (I) e necrose (II) com aumento de 400x (barra de escala de 50 μ m).

Outro indicador de que há resposta inflamatória/imune do hospedeiro é a presença em grande quantidade de infiltrado neutrofílico. A lâmina de tecido que foi irradiado com laser pulsado (Figura 19 A e B) mostrou ser muito semelhante qualitativamente à que foi irradiada com laser CW. As mesmas características celulares e tipo de necrose foram observadas em ambas as lâminas. Dessa maneira, o regime de iluminação em femtossegundos não modificou o tipo de resposta fotodinâmica no tecido hepático. A diferença observada no padrão de necrose foi o expressivo aumento da profundidade de necrose do procedimento com laser pulsado, resultando em um maior volume tecidual tratado.

Outra observação de relevância para o tratamento tecidual é a presença de ilhas de células saudáveis ao redor de vasos que alimentam este tecido, encontradas em maior frequência no tecido irradiado com laser CW. No caso do tratamento tumoral, a presença de células neoplásicas remanescentes próximos à vasos significa a grande possibilidade de recrescimento tumoral.

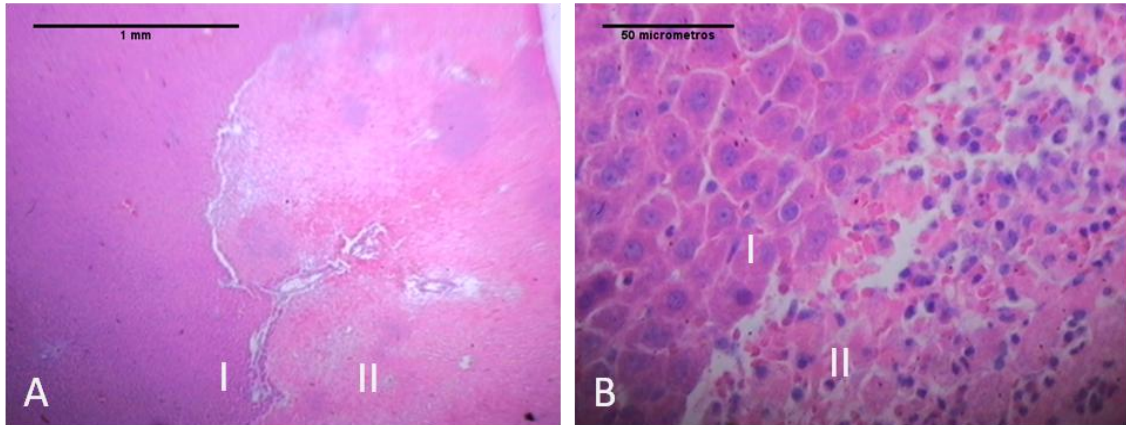


Figura 19 - Corte histológico de fígado de rato 30 horas após a terapia fotodinâmica com laser pulsado e Photogem como FS. A figura A apresenta o corte do tecido hepático sadio (I) e o perfil de necrose induzida pela terapia (II) com aumento de 32x (barra de escala com 1mm). A figura B apresenta a interface tecido sadio (I) e necrose (II) com aumento de 400x (barra de escala 50 μm).

As medidas de profundidade de necrose em função do regime de luz empregado apresentaram um resultado de grande interesse para aplicações da técnica de TFD com fontes de luz em regime pulsado. O valor da profundidade de necrose medida com o laser CW foi de $1,0 \pm 0,3$ mm, enquanto que o perfil de necrose induzida medida no fígado para o laser de femtossegundos foi de $2,0 \pm 0,2$ mm (teste t-student; $p < 0,05$) de profundidade (Figura 20).

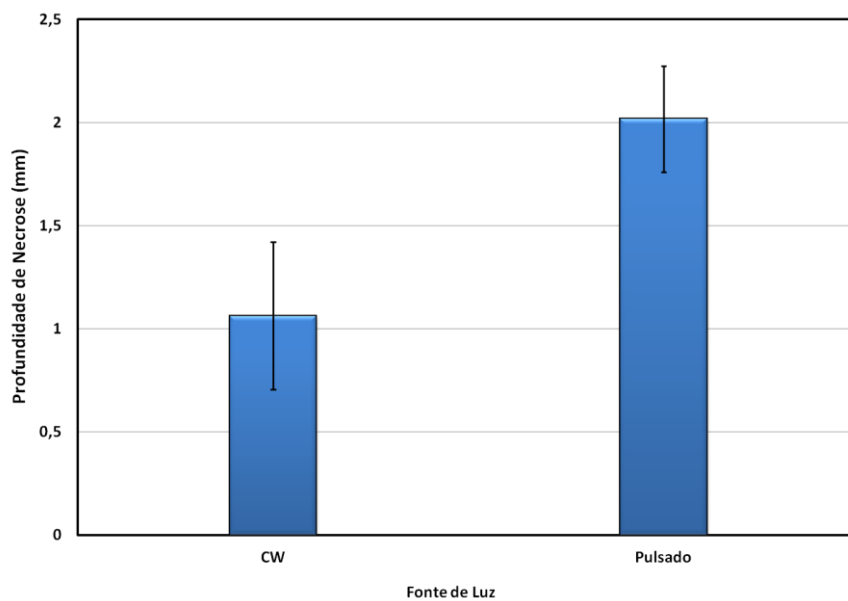


Figura 20 - Gráfico da profundidade de necrose induzida pela terapia fotodinâmica com fonte de luz CW e pulsada e Photogem como FS.

Este é um resultado importante considerando que a mesma quantidade de energia entregue ao tecido usando laser pulsado e CW, promove uma necrose com cerca de duas vezes a profundidade quando utilizado o regime de femtossegundos. Quando consideramos o tratamento de tumores sólidos, este é um achado importante, pois pode ser uma alternativa para superar problemas de tratamentos com respostas parciais, em que, células remanescentes podem apresentar alta probabilidade de recrescimento tumoral, tornando o tratamento mais complexo.

5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FOTODINÂMICA COM PULSOS ULTRACURTOS COMPARADOS COM LASER CW UTILIZANDO PHOTODITHAZINE COMO FOTOSSENSIBILIZADOR.

Este estudo tem como finalidade comparar a ação fotodinâmica promovida por uma fonte de luz pulsada e outra CW, utilizando para isso, um fotossensibilizador derivado de clorinas, sintetizado a partir da clorofila. Neste estudo foi avaliada a fotodegradação do fotossensibilizador em função do número de fótons emitidos. Posteriormente foi realizada a terapia fotodinâmica em fígado de rato sadio e o perfil de necrose foi medido para determinar a profundidade de necrose e os efeitos da terapia fotodinâmica para os diferentes regimes de iluminação empregados.

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Estudo *in vitro*

5.1.1.1 Determinação da concentração de FS

Inicialmente foi realizado o estudo da variação da amplitude de fluorescência em função da concentração do fotossensibilizador (FS), determinando assim a concentração padrão para os estudos de fotodegradação com o mínimo de agregados. Medidas de absorção em função da concentração foram realizadas para validar as medidas de fluorescência. O fotossensibilizador utilizado foi o Photodithazine® (Veta Grand – Moscou, Russia), um fotossensibilizador derivado de clorinas.

A partir de uma solução estoque 5 mg/mL, a solução foi diluída nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 3,12 µg/mL e 1,56 µg/mL. Como fonte de luz de excitação, foi utilizado um laser de Nd³⁺:YAG dobrado (532 nm), acoplado a uma fibra óptica ligada a um espectrômetro USB (USB 2000, Ocean Optics, USA). Antes do espectrômetro, foi colocado um filtro passa alta (540nm) para cortar o comprimento de onda de excitação semelhante ao da Figura 10.

Os dados de fluorescência coletados foram colocados em um gráfico de intensidade de fluorescência do Photodithazine, excitado com 532 nm, em função do comprimento de onda (Figura 21).

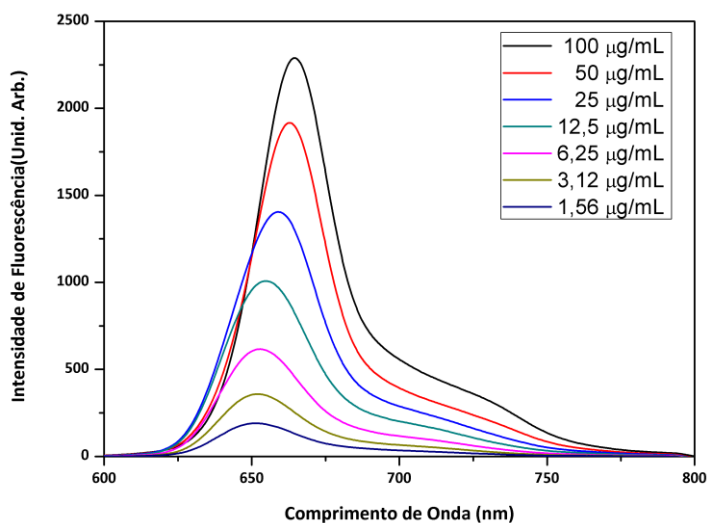


Figura 21 - Gráfico da intensidade de fluorescência do Photodithazine em função do comprimento de onda para várias concentrações, quando excitado com laser de Nd: YAG em 532 nm.

A partir do máximo de intensidade de fluorescência para excitação com 532 nm, foi construído um gráfico da fluorescência em função da concentração (Figura 22). A partir da região onde a intensidade apresenta linearidade, foi escolhida a melhor concentração para o estudo de fotodegradação.

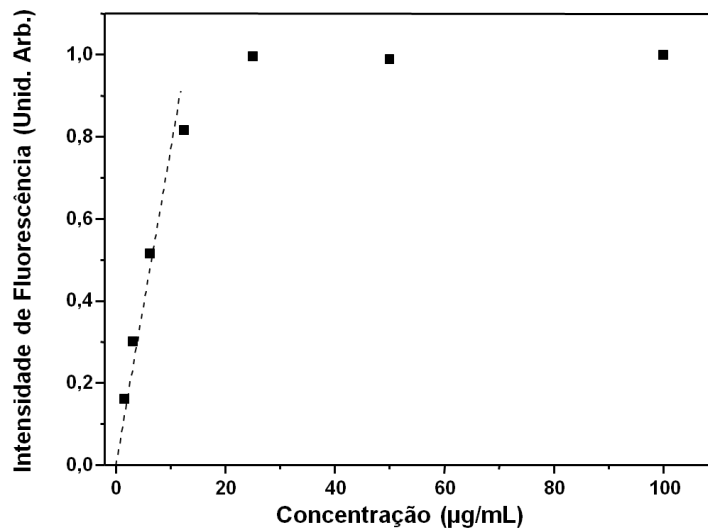


Figura 22 - Gráfico mostrando o máximo de intensidade de fluorescência, quando excitado com 532 nm, em função da concentração. Os Dados foram normalizados em 650nm e a região linear mostra o limite para a escolha da concentração onde a fluorescência emitida pode ser considerada proporcional a concentração.

Para as medidas de absorção foram utilizadas as mesmas concentrações e o espectro característico foi avaliado para as diferentes concentrações. Foi avaliado, particularmente, a forma do espectro e o deslocamento das bandas de absorção para as concentrações estudadas (Figura 23). Foi utilizado um espectrômetro de absorção comercial Cary UV-VIS (Varian, Inc – EUA).

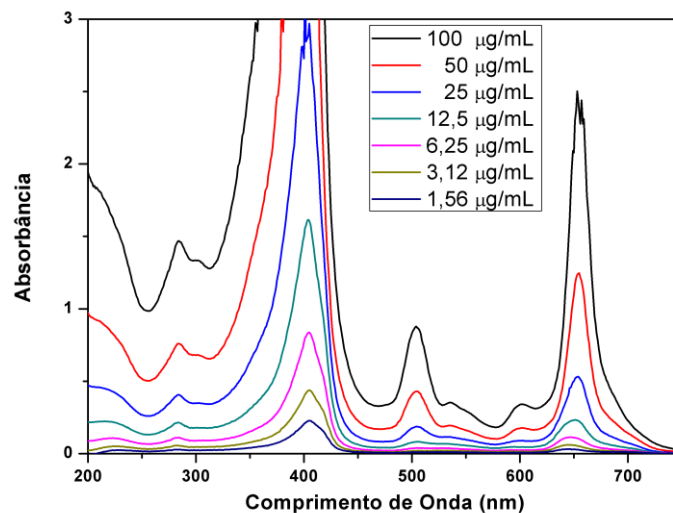


Figura 23 - Espectros de absorção em função do comprimento de onda (λ) do Photodithazine as concentrações de 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, e 1,56 µg/mL.

Baseados nos gráficos de intensidade de fluorescência (Figura 22), podemos perceber que há perda da linearidade a partir da concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$, apresentando indícios da formação de agregados acima desta concentração. Os espectros de absorção (Figura 23) estão apresentados aqui, porém não mostraram alterações significativas na determinação na escolha da concentração que seria utilizada para o estudo de fotodegradação.

5.1.1.2 Fontes de Luz

As fontes de luz pulsada e CW, utilizadas neste estudo, foram as mesmas descritas na seção 4.1.1. Apenas o comprimento de onda sintonizado pelo Amplificador Paramétrico Óptico (Opera) foi ajustado para o comprimento de onda da banda de absorção do fotossensibilizador Photodithazine (em torno de 660nm).

5.1.1.3 Caracterização do feixe de luz pulsada

Para a determinação do diâmetro do feixe de emissão do laser, pode ser utilizado o método da faca como descrito anteriormente (seção 4.1.1).

A corrente do laser Libra foi mantida a 20,9 A, e a potência na saída SHG com comprimento de onda ajustado em 660 nm foi medida em aproximadamente 41 cm da saída do laser, após uma reflexão em um espelho dielétrico ($\lambda = 590\text{nm}$, $\theta = 45^\circ$), como representado na Figura 6 (seção 4.1.1). Um espectro do Opera em 660 nm foi coletado utilizando um espectrômetro USB – 2000 (Figura 24).

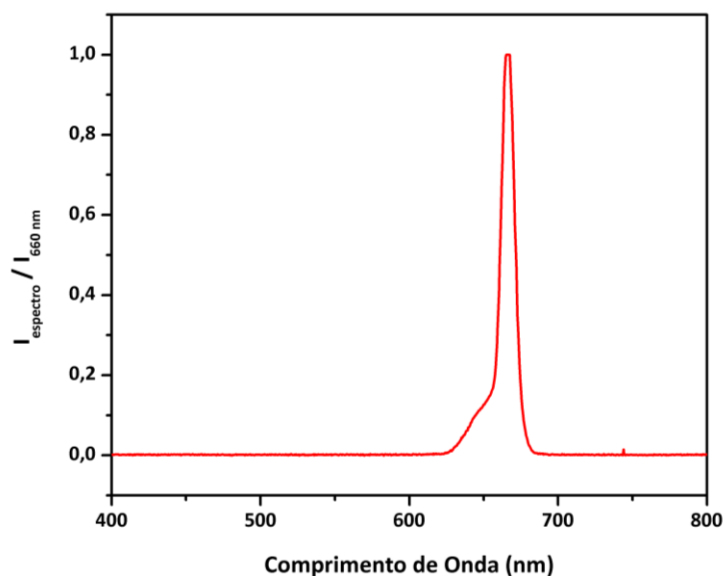


Figura 24 - Espectro de emissão normalizado do laser após o Opera, mostrando o perfil do laser quando sintonizado em 660 nm, comprimento de onda para excitação do Photodithazine.

Pode-se verificar que a emissão do Opera em 660 ± 10 nm está muito bem determinada, apesar de apresentar um alargamento pouco antes da emissão central associado à geração de outros harmônicos no cristal de BBO (Borato de Bório) do sistema Opera

Utilizando um parafuso micrométrico, com escala em polegadas, para o deslocamento da lâmina nos sentido X e Y, foi monitorada a potência com um fotodetector Ophir (3A-SH, Israel). Após esta medida, também foi realizada a expansão do feixe utilizando uma lente DCX 0203 (Edmund Optics, EUA) com comprimento focal com 25 mm em associação com uma lente DCX 0203 (Edmund Optics, EUA) com 75 mm de comprimento focal. Após a expansão foi realizada a medida da cintura como descrito anteriormente (seção 4.1.1).

Através dos dados de potência em função da posição da lâmina, foi construído um gráfico do qual foi realizado um ajuste da curva utilizando a função erro exponencial e, partir desta função, foi possível determinar a cintura do feixe do Opera antes e após a expansão do feixe.

Foi encontrado o valor de $(1,77 \pm 0,01)$ mm para o feixe emitido pela sintonização em 660nm. Após a expansão do feixe, a nova medida do diâmetro do feixe obtido foi de $(4,98 \pm 0,02)$ mm. O diâmetro alcançado é suficiente para iluminar a face de uma cubeta com 4,0 mm de caminho óptico.

5.1.1.4 Medidas da fotodegradação do Photodithazine®

Esta etapa visa verificar a taxa de fotodegradação do Photodithazine em solução aquosa. A fonte de luz pulsada utilizada foi laser Libra-S em associação com o Opera para a sintonia de $\lambda = 660$ nm. Foi utilizada uma cubeta de plástico 10x4 mm, O feixe de luz foi expandido na saída SHG 660 nm, como descrito anteriormente, promovendo um aumento de aproximadamente 3x no diâmetro do feixe ($4,98 \pm 0,01$ mm).

A concentração do fotossensibilizador utilizada foi de 6 $\mu\text{g/mL}$, equivalente à concentração de média de 6,12 μM^{41} . Foi utilizado um volume de 160 μL da solução para cada amostra de fotossensibilizador. Antes de iniciar a coleta, a iluminação foi bloqueada, o laser de excitação acionado, após a coleta, foi dado o prosseguimento da iluminação da amostra. Os tempos de coleta foram de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15 minutos.

O máximo de intensidade em fluorescência em 654 nm foi usado como referência para avaliação do decaimento da intensidade com relação ao número de fótons entregues durante a iluminação. As taxas de fluências avaliadas foram de 15 mW/cm^2 , 56 mW/cm^2 e 112 mWcm^2 para os dois regimes de iluminação CW e pulsado.

A concentração de fotossensibilizador foi convertida em número de moléculas por mL da solução e a energia entregue durante a iluminação foi convertida em número de fótons entregues para a solução para a avaliação dos diferentes regimes de iluminação, como descrito em seção anterior (4.1.1.2).

5.1.2 Estudo *in vivo*

O estudo dos efeitos da TFD com laser CW e pulsado utilizando Photodithazine como fotossensibilizador foram realizados com o intuito de investigar os efeitos fotodinâmicos para os dois regimes de iluminação empregados e posterior comparação com o Photogem. Este estudo foi realizado utilizando como modelo de análise o fígado sadio de ratos após o procedimento de TFD.

O fotossensibilizador utilizado foi o Photodithazine, na concentração de 1,0 mg/kg de peso corporal do animal⁴². O animal foi anestesiado com uma associação de Ketamina e Xilasina na proporção de 1:1 (100 mg/kg de Ketamina, 6 mg/kg de Xilasina – Agener). Para evitar que o animal sofresse dor durante todo o procedimento, recebeu, via intramuscular, um

analgésico (Banamine[®], Coopers Brasil Ltda). Foi realizada uma laparotomia, uma incisão na cavidade abdominal para o acesso ao abdomen. O animal recebeu uma injeção de fotossensibilizador via veia cava, foi mantido sob anestesia por 1 hora e 30 minutos (Intervalo Droga Luz)⁴². Após o tempo de espera para o acúmulo do fotossensibilizador no tecido de interesse, o fígado foi exposto e então teve início o procedimento de iluminação.

Neste procedimento foram utilizados seis ratos da linhagem Wistar, pesando entre 350 e 400 gramas, separados em 2 grupos: CW (3 animais) e pulsado (3 animais). A irradiância entregue com as duas fontes de iluminação foi de 102 mW/cm². A dose total de energia entregue por unidade de área foi de 150 J/cm². Uma máscara com área pra iluminação foi posicionada para garantir a intensidade e a dose total de energia entregue (Figura 25).

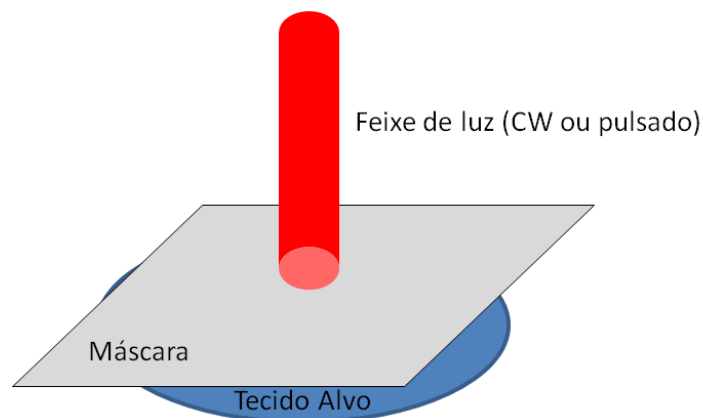


Figura 25 - Esquema do posicionamento dos feixes de luz. A figura mostra como foi posicionada a máscara para as fontes de luz no lobo direito do fígado.

Após o procedimento de iluminação, o animal foi suturado e encaminhado para a gaiola, recebeu água e ração *ad libitum*. O animal ficou em observação durante as próximas 30 horas após o término da iluminação. A eutanásia foi realizada com dose excessiva de anestésico, o fígado foi retirado, fatiado e as amostras de fígado com necrose, colocadas em formal tamponado e encaminhadas para o procedimento histológico, onde receberam coloração HE (Hematoxilina e Eosina). Esta coloração evidencia a morfologia celular e mostra mudanças nas características celulares, revelando locais com presença de necrose.

A partir da confecção destas lâminas histológicas, foi possível visualizar o perfil da necrose induzida para os dois regimes de iluminação empregados. Com o auxílio de uma lupa com aumento de 40x, equipada com uma mesa com parafusos micrométricos, como mostrado em seção anterior (4.1.2), foi possível realizar a leitura da profundidade de necrose.

5.2 Resultados e discussão

Os dados da intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, durante a iluminação com uma fonte de luz pulsada, estão apresentados na Figura 26.

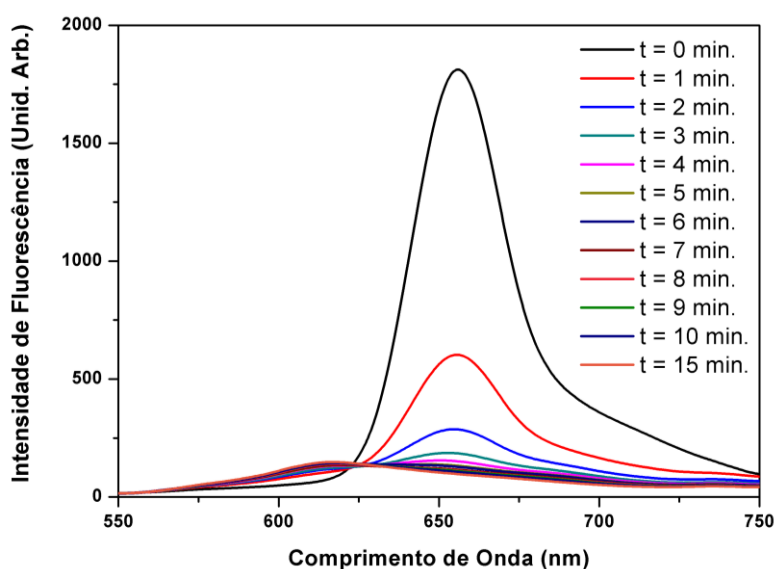


Figura 26 - Espectros da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda mostrado a banda de emissão característica do Photodithazine, quando excitado em 532 nm.

A partir deste gráfico, percebemos que o máximo de intensidade de fluorescência ocorre no comprimento de onda de 654 nm, quando excitado com laser em 532 nm. Na medida em que a amostra está sendo iluminada, a intensidade de fluorescência decresce. Esta variação na intensidade é o objeto deste estudo.

Foi avaliado, portanto, o número de moléculas que deixam de emitir fluorescência ao longo do período de iluminação. Construímos gráficos da concentração molar em função do número de fótons absorvidos por unidade de área (cm^2). Os gráficos construídos a partir destes dados estão apresentados nas Figura 27 e Figura 28.

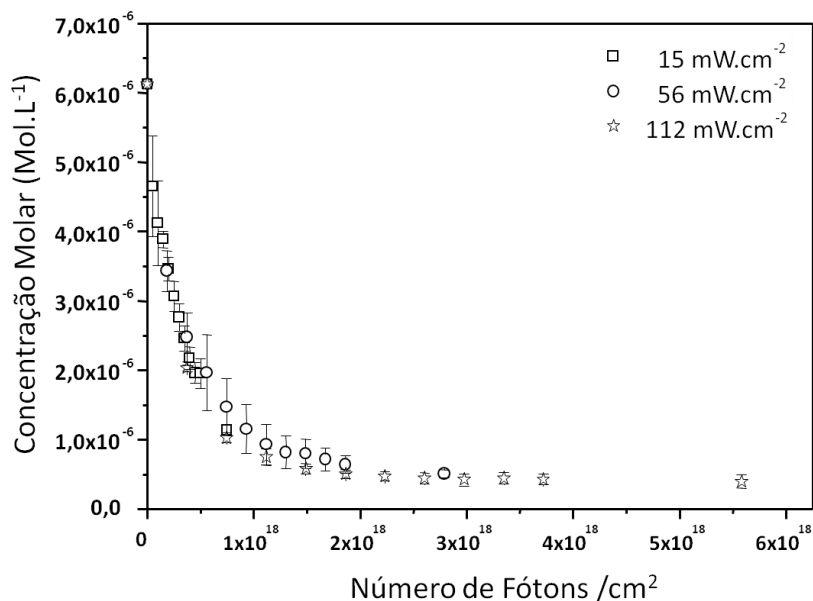


Figura 27 - Gráfico mostrando a variação da concentração molar (mol/L) do PDZ em função do número de fótons/cm². Nesta figura estão apresentados o decaimento para as intensidades de 15mW/cm² (□), 50 mW/cm² (○) e 112 mW/cm²(☆) com laser CW.

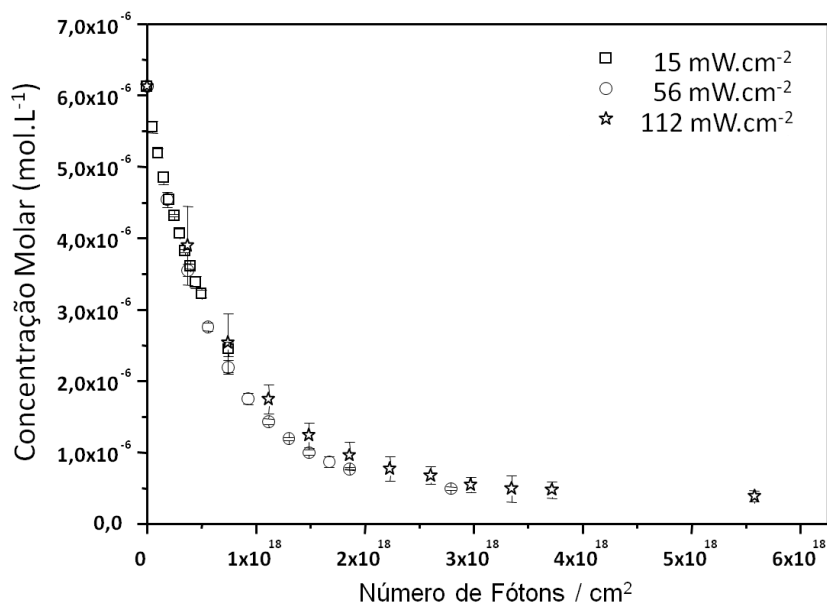


Figura 28 - Gráfico mostrando a variação da concentração molar (mol/L) do PDZ em função do número de fótons/cm². Nesta figura estão apresentados o decaimento para as intensidades de 15mW/cm² (□), 50 mW/cm² (○) e 112 mW/cm²(☆) com laser pulsado.

Os dados apresentados mostram claramente mudança do comportamento entre o regime CW e pulsado para o Photodithazine, utilizando a mesma potência média como comparação.

Percebe-se que o laser CW apresenta grande variação com a irradiância empregada, enquanto que o laser pulsado apresenta grande variação, porém menor do que o CW. Os gráficos comparando os regimes de iluminação para as diferentes intensidades estão apresentados nas figuras a seguir (Figura 29, Figura 30 e Figura 31).

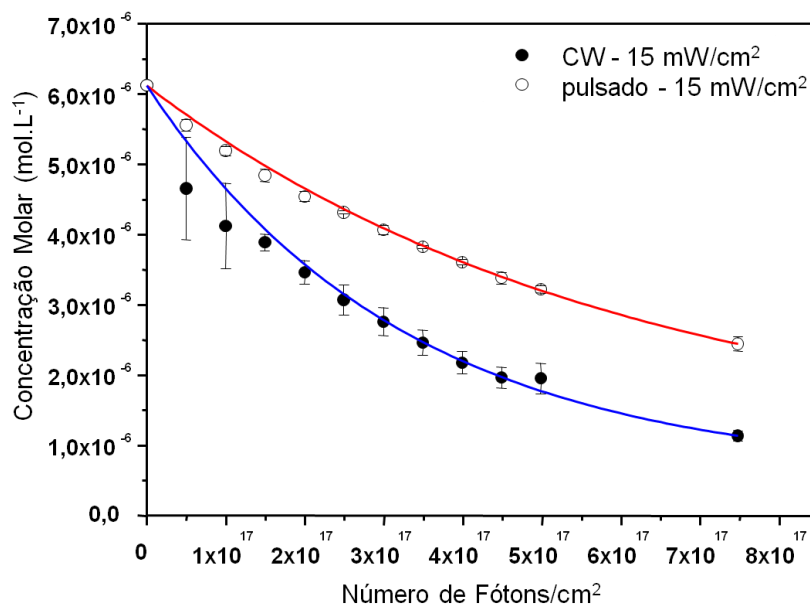


Figura 29 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (○) e pulsado (●) com intensidade de 15 mW/cm², para o fotossensibilizador Photodithazine.

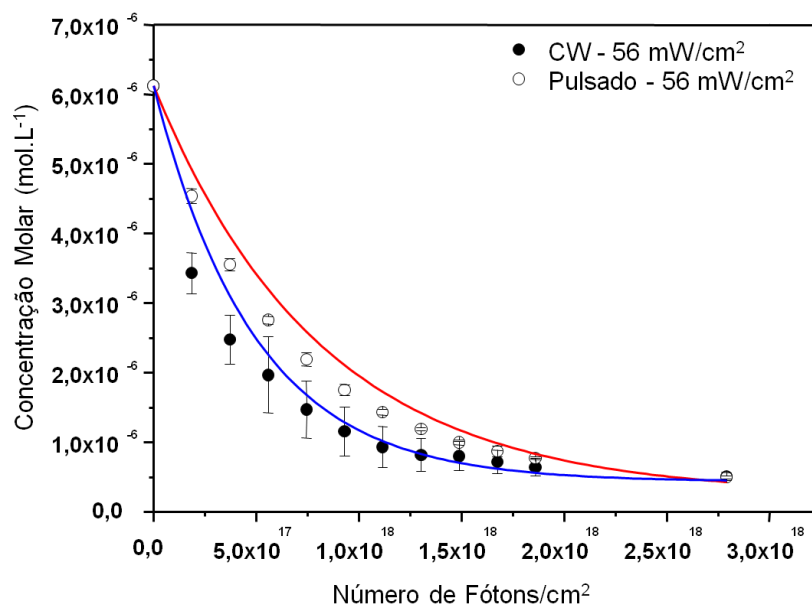


Figura 30 - Gráfico mostrando os ajustes para variação da concentração molar (mol/L) em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (◯) e pulsado (●) com intensidade de 50 mW/cm², para o fotossensibilizador Photodithazine.

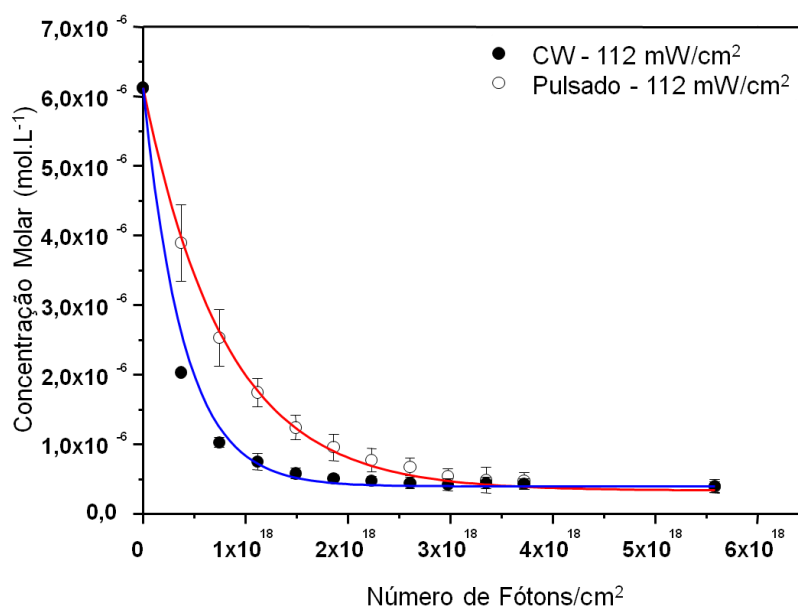


Figura 31 - Gráfico mostrando os ajustes para a variação da concentração molar (mol/L) em função do número de fótons/cm² emitidos com iluminação CW (◯) e pulsado (●) com intensidade de 112 mW/cm², para o fotossensibilizador Photodithazine.

As curvas de degradação para as fontes de luz empregadas foram ajustadas por um modelo de decaimento exponencial dado pela equação (4.6) e a taxa de fotodegradação pode ser calculada pela equação:

$$-\frac{d[S_0]}{dx} = \frac{[S_0]_0}{\tau} \quad (5.1)$$

e os valores calculados da taxa de fotodegradação ($k_{PDZ} = [S_0]_0/\tau$) estão apresentados na

Tabela 2.

Tabela 2 - A tabela mostra o taxa de degradação (mol/fótons) calculado a partir do ajuste das curvas de fotodegradação. A coluna 1 mostra as irradiâncias investigadas; coluna 2 apresenta a taxa de fotodegradação com laser CW; coluna 3 o R^2 para os ajustes das curvas; coluna 4 a taxa de fotodegradação promovida pelo laser pulsado e a coluna 5 o R^2 para os ajustes das curvas de degradação com laser pulsado.

Irradiância (mW/cm ²)	CW		Pulsado	
	k_{PDZ} (mol/fótons)	R^2	k_{PDZ} (mol/fótons)	R^2
15	$(2,0 \pm 0,3).10^{-26}$	0,9774	$(1,10 \pm 0,09).10^{-26}$	0,9974
56	$(1,7 \pm 0,1).10^{-26}$	0,9988	$(0,98 \pm 0,02).10^{-26}$	0,9994
112	$(2,02 \pm 0,07).10^{-26}$	0,9979	$(0,76 \pm 0,04).10^{-26}$	0,9941

Com os valores das taxas calculados, foi construído um gráfico da taxa de fotodegradação em função da irradiância (Figura 32). As taxas de fotodegradação mostram que o laser CW tem uma maior taxa de fotodegradação quando comparado com o laser pulsado para as mesmas irradiâncias médias avaliadas.

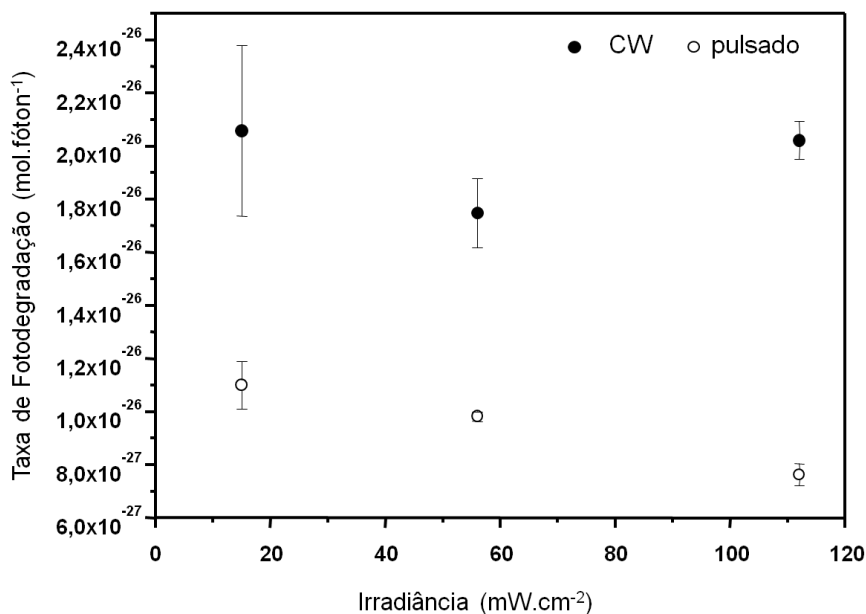


Figura 32 - Gráfico da taxa de fotodegradação do PDZ em função da irradiância com fonte de luz CW (●) e com laser pulsado (○).

As clorinas possuem alto rendimento quântico de geração de oxigênio singleto. Um indicativo desse alto rendimento é a alta taxa de fotodegradação. A fotodegradação com laser CW mostrou que esta molécula tem uma alta taxa de fotodegradação e que pode estar associada à alta absorção em torno do comprimento de onda de excitação aplicado. A atenuação da fluorescência está associada ao *photobleaching* da molécula, ou seja, mudanças acentuadas (quebra da molécula) que levam a alterações no espectro de absorção, ou pela foto modificação⁴³ mantendo a estrutura do composto, porém em uma forma modificada.

O PDZ é um fotossensibilizador que degrada mais rápido do que o Photogem, indicando uma alta taxa de reação e, conseqüentemente, alta taxa de formação de espécies reativas. Além disso, existem estudos que sugerem que os fotoprodutos do PDZ, formados a partir da TFD são altamente fototóxicos, indicando uma melhoria para aplicações clínicas e deve ser levado em consideração para a dosimetria da TFD baseado em entregas de doses de luz fracionadas⁴⁴⁻⁴⁵.

Quando comparado o laser pulsado com o laser CW, percebe-se que a taxa de fotodegradação com o CW é maior do que com o laser pulsado. Esta diferença pode estar associada com o aumento da temperatura local acumulativo na região de iluminação, promovido pela fonte de luz CW. Este aumento da temperatura local pode gerar modificações estruturais na molécula, como a quebra de ligações menos energéticas, levando a uma

situação de supressão da emissão de fluorescência. Enquanto que a fonte de luz pulsada não gera um aumento significativo no local de iluminação.

Apesar de o laser pulsado ter uma grande quantidade de energia em um único pulso, ele não promoveu um aumento na taxa de fotodegradação. Isto pode estar associado às interações com um pulso inicial do laser, que possui uma largura de pulso da ordem de 75 fs. Com a chegada do pulso inicial, uma grande quantidade de moléculas passa do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1). O tempo de decaimento do estado excitado para o fundamental com emissão de fluorescência é da ordem de picossegundos, isto significa que antes da molécula emitir fluorescência, ela tem a possibilidade de absorver energia do mesmo pulso e ir para um estado excitado superior (S_2).

No estado excitado S_1 , a molécula possui outro espectro de absorção (absorção de estado excitado). A absorção de outros fótons depende de quão grande é essa absorção de estado excitado. Trabalhos utilizando clorofila mostram que ela possui uma baixa seção de choque de absorção de estado excitado em 660 nm⁴⁶⁻⁴⁷. Isso é um indicativo de que utilizando alta densidade de fótons o processo não foi mais eficiente. Nestes casos, o regime de entrega de luz, influencia no mecanismo das taxas de formação de espécies reativas podendo levar a uma menor fotodegradação da amostra quando utilizado o laser pulsado.

Para o Photogem, um derivado de hematoporfirinas, a absorção de estado excitado pode ser maior levando a estados singleto de mais alta energia, podendo levar à uma eficiência na produção de oxigênio singleto⁴⁸.

A análise dos cortes histológicos, também revelou que o laser CW apresentou uma profundidade de necrose maior do que o laser pulsado. Na interface tecido sadio-necrose, as células sadias ao longo da interface são ligeiramente maiores do que os hepatócitos normais (Figura 33a), indicando que nesta região, as células receberam dano devido a TFD e estão em processo de degeneração (células saculiformes), contudo, são células que irão se recuperar. A necrose induzida pela fonte de luz pulsado e CW foi do tipo coagulativa com a presença do arcabouço celular e com grande quantidade de hemácias na região de necrose indicando um processo de congestão vascular característicos do dano celular e vascular da TFD em tecido hepático.

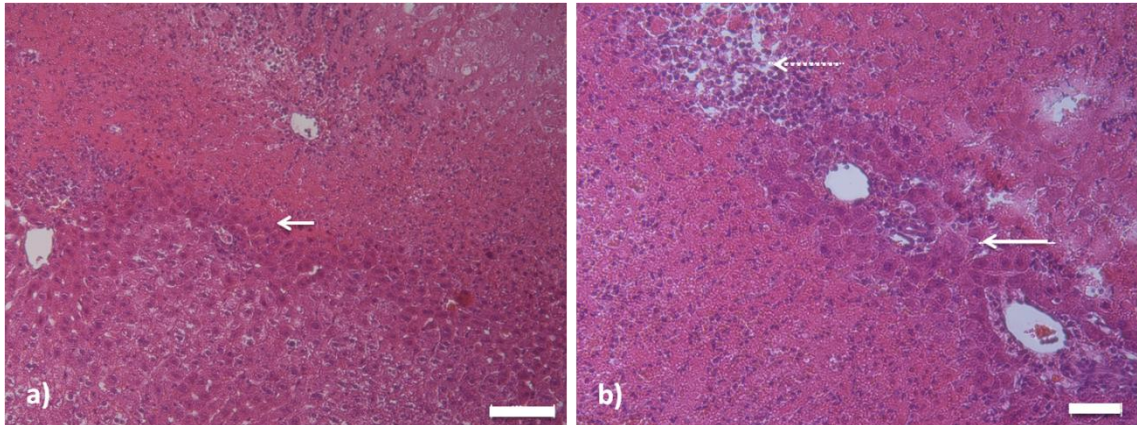


Figura 33 – Corte histológico de fígado de rato extraído 30 horas após o procedimento de terapia fotodinâmica com laser CW. A figura (a) mostra uma região de interface tecido sadio-necrose (seta branca e barra de escala com 100 μm – aumento de 100x). A figura (b) mostra uma região necrótica com a presença de infiltrado neutrofilico (seta tracejada) e ilhas de células ao redor do vaso sanguíneo apontadas pela seta continua (barra de escala de 50 μm).

Outro indicador do dano pela TFD é a presença de infiltrado neutrofilico, evidente nestas lâminas de necrose com laser pulsado e CW. Apesar o alto dano celular e do alcance profundo da necrose com o PDZ, ainda é possível visualizar um grande número de ilhas de células principalmente próximo aos vasos sanguíneos. Estas células ainda estão recebendo nutrientes e oxigênio, podendo entrar em fase de regeneração dessa região necrosada.

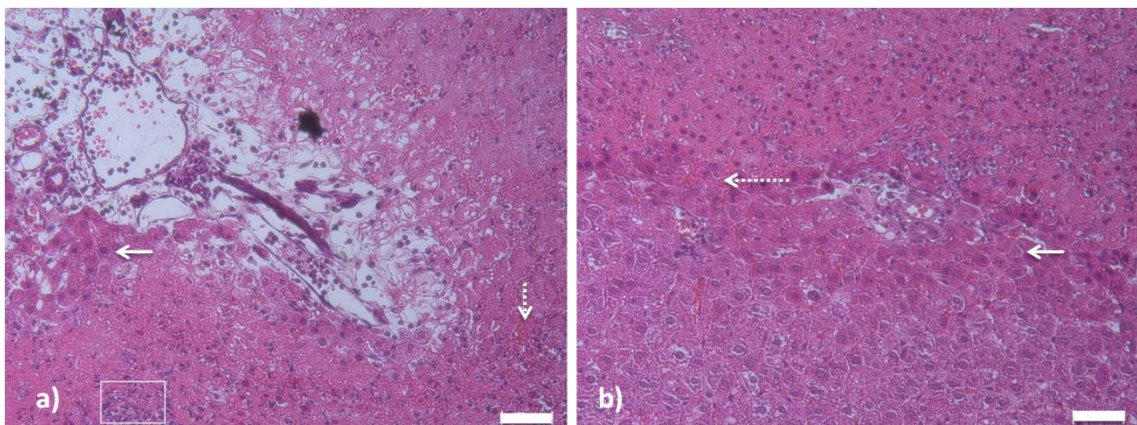


Figura 34 - Corte histológico de fígado de rato extraído 30 horas após o procedimento de terapia fotodinâmica com laser pulsado. A figura (a) mostra o espaço porta com a presença de células viáveis (seta continua) grande quantidade de infiltrado neutrofilico (quadrado) e hemácias (seta tracejada) – barra de escala de 50 μm (aumento de 100x). A figura (b) mostra a interface tecido sadio-necrose, com presença de células saculiformes (seta continua) e hemácias (seta tracejada) -barra de escala de 50 μm .

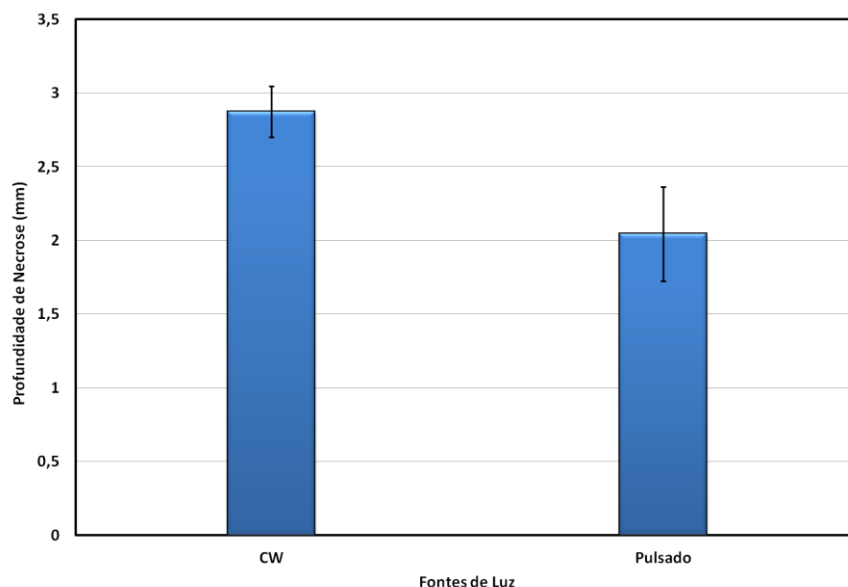


Figura 35 – Gráfico da profundidade de necrose induzida com PDZ pela fonte de luz CW e pulsada utilizando PDZ como fotossensibilizador e entregando uma dose total de energia de 150 J.cm^{-2} em fígado sadio de ratos.

As medidas da profundidade de necrose em função do regime de luz empregado mostram que o laser CW promoveu uma necrose mais profunda e conseqüentemente um volume tecidual tratado maior em comparação com a fonte de luz pulsada. O valor da profundidade de necrose induzida pelo laser CW foi de $2,9 \pm 0,2$ mm, enquanto que o laser pulsado induziu uma necrose de $2,0 \pm 0,3$ mm e estes valores diferem significativamente (teste t-Student; $p < 0,05$).

Esta profundidade de necrose encontrada para o laser pulsado em comparação com o laser CW, pode estar relacionado com a fotodegradação da molécula que é um indicativo dos efeitos da terapia fotodinâmica. No caso do experimento *in vivo*, a alta reatividade do PDZ indicaria uma profundidade de necrose maior, porém, com o laser pulsado pode ter ocorrido danos teciduais acentuados, que poderiam alterar as características ópticas do tecido, impedindo uma iluminação em camadas mais profundas.

A taxa de fotodegradação com laser pulsado foi menor sendo um indicativo de que a necrose poderia ser menor do que a induzida com o laser CW. Estes resultados indicam que pode estar havendo uma saturação nos estados excitados da molécula de PDZ, causando uma diferença na absorção resultando em um menor volume tecidual tratado.

6 AVALIAÇÃO DA DEPENDÊNCIA DA PROFUNDIDADE DE NECROSE COM A IRRADIÂNCIA

Este estudo tem por finalidade avaliar a dependência da taxa de fluência com a profundidade de necrose induzida. Para isto, procedimentos de TFD foram realizados variando a taxa de fluência e comparando a necrose promovida pelos dois regimes de iluminação. Como modelo, foi utilizado fígado sadio de ratos, sendo que, os animais foram divididos em sete grupos experimentais.

6.1 Materiais e métodos

Para este estudo, foram utilizados ratos sadios da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 350 gramas. Foram utilizados 21 animais, divididos em sete grupos, três animais por grupo (Tabela 3). Visando a redução no uso de animais em tais procedimentos experimentais, a área de iluminação foi reduzida de 1cm^2 para um campo de iluminação com diâmetro de 5 mm, para um área de $0,196\text{ cm}^2$. Desta maneira, foi possível realizar dois campos de iluminação em um mesmo animal. Os campos foram preparados para que o animal fosse iluminado com as fontes de luz pulsada e CW ao mesmo tempo (Figura 36).

Os animais foram anestesiados utilizando, para isso, anestésico a base de cloridrato de cetamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A) 100 mg/kg em associação com um sedativo, analgésico e relaxante muscular (Coopazine[®], Coopers Brasil Ltda) 6 mg/kg, via intramuscular. Posteriormente, foi realizada uma incisão na região abdominal (laparotomia) e o tecido alvo foi exposto.

O animal recebeu uma injeção de fotossensibilizador Photogem na concentração de 1,5 mg/kg de peso corporal através da veia cava. Após 30 minutos (tempo de maior concentração do fotossensibilizador no tecido alvo), o fígado foi exposto, a máscara com os campos de iluminação foram posicionadas e teve início o procedimento de iluminação. Após o término da iluminação, o animal recebeu uma dose de analgésico (Banamine[®], Coopers Brasil Ltda) na concentração de 2,2 mg/kg. O animal foi suturado e encaminhado para o alojamento de animais, onde permaneceu durante trinta horas.

Tabela 3 - A tabela mostra os grupos experimentais estudados para cada regime de iluminação. O número de animais por cada grupo. A potência utilizada, a área de iluminação, as taxas de fluências investigadas, o tempo de iluminação para cada taxa e a dose total de energia.

Grupo	Animais	Potência (mW)	Área (cm ²)	Irradiância (mW/cm ²)	Tempo de Iluminação (s)	Dose (J/cm ²)
I	3	12	0,196	61	2454	150
II	3	16	0,196	81	1841	150
III	3	21	0,196	107	1402	150
IV	3	25	0,196	127	1178	150
V	3	27	0,196	138	1091	150
VI	3	37	0,196	188	796	150
VII	3	45	0,196	229	654	150

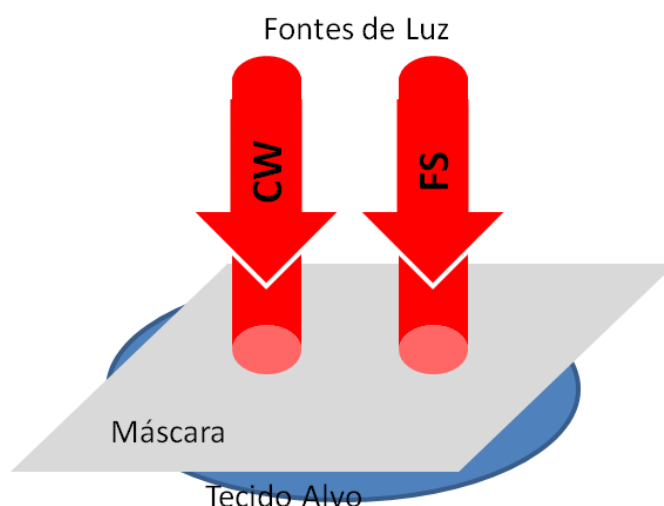


Figura 36 - Esquema do posicionamento dos feixes de luz pulsada e CW. A figura mostra como foi posicionada a máscara para as duas fontes de luz em um mesmo lobo do fígado.

Após o tempo de estabelecimento da necrose, o animal foi morto com overdose de anestésico e o tecido alvo removido e encaminhado para o procedimento histológico. As lâminas confeccionadas com o tecido de interesse foram coradas com corante de HE. Os perfis de necrose foram então analisados com relação aos aspectos microscópicos e macroscópicos e medidos em uma lupa com aumento de 40x equipado com uma mesa de translado com parafuso micrométrico.

Para ter um feixe de luz incidindo com o diâmetro adequado sob a amostra, foi necessário realizar a expansão do feixe (Figura 37), utilizando para isso, uma montagem tipo

telescópio com uma lente com distância focal de 25 mm DCX 0203 (L1) e outra com distância focal de 75 mm DCX 0203 (L2), garantindo um aumento de aproximadamente 3x no diâmetro do feixe. Para deixar o feixe que foi entregue pela fibra óptica o mais paralelo possível, foi colocada uma lente DCX 0203 (L3) com distância focal de 25 mm da ponta da fibra. Para direcionar o feixe até ao tecido alvo, foram utilizados espelhos dielétricos (M1, M2, M3 e M4; $\lambda = 570 \text{ nm}$; $\theta = 45^\circ$).

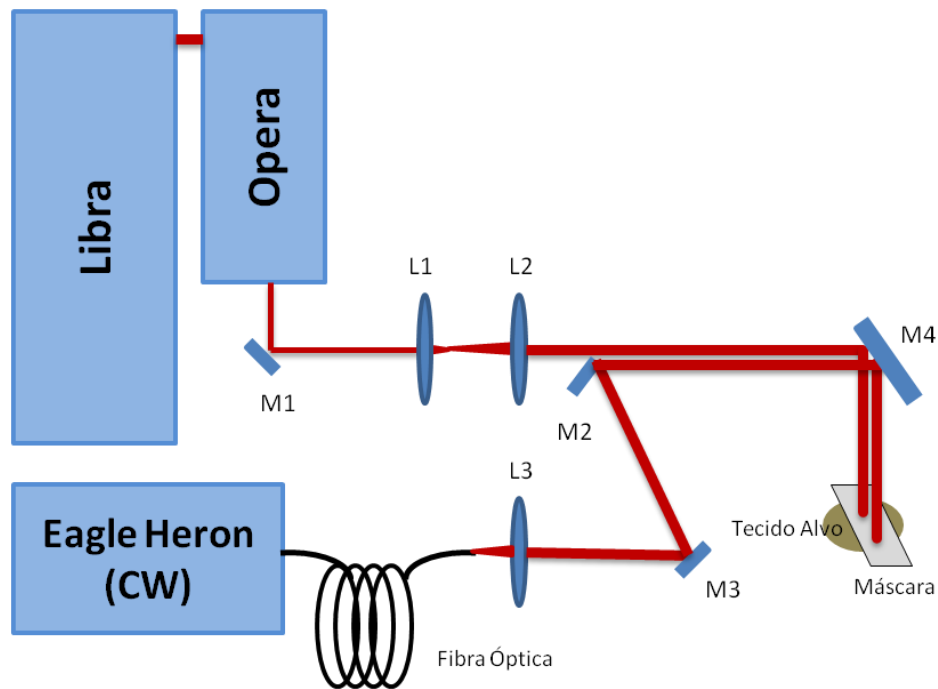


Figura 37 - Desenho esquemático mostrando os sistemas de iluminação empregados (Libra-S, Opera e Eagle Heron). O método para expandir o feixe do laser pulsado (M1, L1 e L2) e manter o feixe CW paralelo (Fibra óptica e L3). A montagem de espelhos para direcionar os feixes de luz para a amostra (M3, M2 e M4).

As fontes de luz pulsada e CW, utilizadas neste estudo, foram as mesmas descritas anteriormente na seção 4.1.1. Com o Opera sintonizando no comprimento de onda de excitação para o Photogem ($\lambda = 630 \text{ nm}$).

6.2 Resultados e discussão

As lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina foram lidas e o gráfico da profundidade de necrose em função das irradiâncias empregadas está apresentado na Figura 38.

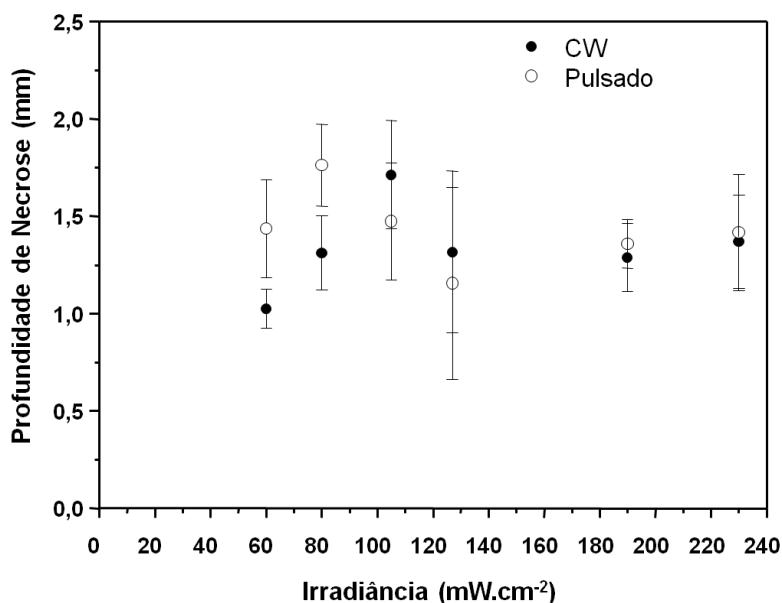


Figura 38 – Profundidade de necrose em função da irradiância (mW/cm²) para o laser CW (●) e o laser pulsado (○) utilizando o Photogem como FS.

O laser pulsado teve maior profundidade de necrose induzida para irradiâncias abaixo de 80 mW/cm² do que o laser CW. Para a irradiância de 60 mW/cm², o laser pulsado induziu uma profundidade de necrose de $1,4 \pm 0,2$ mm, enquanto que o laser CW uma profundidade de necrose de $1,0 \pm 0,1$ mm (test t Student; $p < 0,05$). Para a irradiância de 80 mW/cm², o laser pulsado induziu uma necrose de $1,8 \pm 0,2$ mm de profundidade, enquanto que o laser CW induziu uma necrose de $1,3 \pm 0,2$ mm de profundidade (test t Student; $p < 0,05$). Acima de 80 mW/cm² os regimes de iluminação empregados não tiveram diferença significativa.

Uma hipótese para os resultados observados pode ser a alteração das características ópticas do tecido, quando utilizando intensidades mais altas, limitando a penetração da luz no tecido, fazendo com que as fontes de luz pulsada e CW alcançassem volumes de tratamento semelhantes. Também podem ocorrer danos vasculares devido às altas irradiâncias empregadas, diminuindo o fluxo sanguíneo e reduzindo a oxigenação local.

Em intensidade abaixo de 80 mW/cm^2 , o tempo de iluminação é longo, e a superfície do tecido não sofre alterações significativas devido às mais altas irradiâncias e conseqüentemente menor dano vascular, mantendo o fluxo sanguíneo e suporte de oxigênio.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos prévios com a utilização de luz pulsada para a TFD, em regimes de microssegundos ou nanossegundos^{33,49-50}, ou uso de pulsos ultracurtos, mostraram diferença significativa quando comparado com o laser CW em termos de potência média. Estes estudos não apresentaram um consenso em termos de resultados, assim como não há um entendimento e análise profunda dos fenômenos físicos e químicos que governam a população dos estados excitados e a transferência de energia para a formação de espécies reativas, especialmente de oxigênio singlete.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica com a utilização de fontes de luz pulsada em regime de pulsos ultracurtos (femtossegundos) e taxa de repetição de 1 KHz em comparação com um laser contínuo com mesmo comprimento de onda, potência média e dose total entregue. Para isso, foi realizado o estudo da fotodegradação do PG e do PDZ em solução, bem como foi avaliada a necrose induzida pelas fontes CW e pulsada em fígado sadio de ratos fotossensibilizados com PG e PDZ e foi realizado o estudo da dependência da profundidade de necrose com a irradiância das fontes empregadas.

Os resultados mostram que a taxa de fotodegradação com laser pulsado é maior do que a taxa de fotodegradação com o laser CW quando utilizado o PG como fotossensibilizador. Este é um indicativo de que a fonte de luz pulsada está gerando maior quantidade de espécies oxidativas. Isto se confirmou nos resultados da profundidade de necrose induzida pelo PG. A necrose induzida pelo laser pulsado foi cerca de duas vezes mais profunda do que a do laser CW, indicando que o laser pulsado produz maior quantidade de oxigênio singlete.

Os resultados com o PDZ mostraram um comportamento oposto ao apresentado pelo PG. A taxa de fotodegradação com laser pulsado foi menor do que a promovida pelo laser CW, conseqüentemente, a profundidade de necrose induzida foi menor para o laser pulsado. Estes resultados indicam que alterações nas taxas que relacionam as transições pela absorção de fótons por um fotossensibilizador são afetadas pelo regime de entrega de luz, principalmente quando em regimes ultracurtos (femtossegundos), resultando em efeitos positivos no volume tecidual tratado (PG) ou efeitos negativos (PDZ).

A análise histológica das necroses induzidas quando utilizando PG ou PDZ, mostrou que não houve diferença quanto ao tipo de necrose induzida nos regimes de iluminação empregados para o PG e PDZ. Na análise da profundidade de necrose em função da

irradiância, percebe-se que após um valor limite, as duas fontes de luz apresentam resultados semelhantes para os parâmetros empregados. Esses resultados indicam que o PG associado com a luz pulsada no regime de femtossegundos pode ser empregado para a terapia fotodinâmica, observado os parâmetros adequados para se obter o máximo de volume tecidual tratado, enquanto que o PDZ necessita da avaliação de outros parâmetros de iluminação e um estudo acerca da fotoquímica e das interações com pulsos ultracurtos.

A excitação do fotossensibilizador por pulsos ultracurtos é diferente. A sequência de transferência de energia depende de um sistema de equação de taxas que em condições de equilíbrio, leva para a taxa de produção de oxigênio singlete para uma conhecida concentração de fotossensibilizador e esta taxa depende da intensidade da luz de excitação⁵⁶, sendo este oxigênio altamente reativo oxidando o substrato celular⁵⁵. Um pulso intenso pode promover o rápido crescimento da população para o estado excitado. Este crescimento rápido da população nos níveis excitados causam mudanças nas condições de equilíbrio, que estão envolvidos nos processos de excitação e o decaimento do fotossensibilizador para o estado fundamental. Todo este complexo sistema pode resultar na formação de altas taxas de formação de oxigênio singlete, o que conseqüentemente resultará no perfil de necrose observado para a fonte de luz pulsada utilizando o PG. Este processo pode não ser tão eficiente e resultar na saturação do fotossensibilizador causando assim, limitações na reação fotodinâmica (PDZ).

Esta alteração pode ser percebida nas mudanças promovidas na degradação dos fotossensibilizadores. Esta variação na concentração é um indicativo da taxa produção de oxigênio singlete⁴³. Parte do oxigênio singlete pode interagir com outras moléculas do fotossensibilizador no substrato causando sua degradação¹⁴. Uma grande taxa de degradação da molécula de fotossensibilizador é relatada como uma alta reação fotodinâmica.

Os resultados dos experimentos *in vitro*, mostram como há variação da molécula do Photogem, indicando que nas mesmas condições de iluminação, o laser pulsado mostra uma clara variação do comportamento com relação ao CW mostrando uma alta eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio neste regime de excitação. Isto pode estar relacionado a diferentes fatos, incluindo processos de multiexcitação, bem como a significativas alterações nas equações de taxas de transferência de energia que resultam na produção de oxigênio singlete. Pulsos ultracurtos fornecem energia em um tempo extremamente curto, efetivamente abaixo de qualquer processo de relaxação da transferência de energia. Este sistema está além de qualquer condição estacionária e a dinâmica de formação de oxigênio singlete, neste caso, pode ser realmente complexa.

A formação de outros radicais livres é alternativa a ser considerada graças à excitação do fotossensibilizador devido à alta intensidade local promovido pelo pulso de laser. Neste caso a reação fotodinâmica no tecido é devido a um caminho diferente ao efeito dominante (formação de oxigênio singlete). Este efeito pode causar diferentes características no perfil de necrose estudado.

A interação com pulsos ultracurtos pode resultar também, na interação com outras moléculas absorvedoras (cromóforos) presentes no tecido biológico. Esta interação pode ocorrer em ambos os regimes de operação, CW ou pulsado. Contudo, na condição em que são utilizados os pulsos ultracurtos, uma saturação no local pode ocorrer levando a uma maior penetração da luz bem como a possibilidade de efeitos cruzados entre moléculas altamente excitadas com reações com o fotossensibilizador da reação principal.

Se considerarmos que a atenuação da dose entregue ao tecido é a mesmo para ambos os regimes de iluminação (esta é uma aproximação rude), pode ser criado um modelo simples para determinar qual a dose limite para causar um dano tecidual irreversível no tecido biológico. A ideia básica é que o uso de laser com pulsos ultracurtos pode modificar substancialmente os mecanismos básicos envolvidos na TFD para a produção de radicais livres e, portanto, causa mudanças na dose limite, necessária para causar um dano irreversível ao tecido.

Outro fator importante é a variação da temperatura local durante a TFD, que pode alterar significativamente o resultado da TFD⁵¹. No caso de excessivo aumento de temperatura, o resultado da profundidade de necrose pode ser afetado. Estudos prévios mostram que pode haver aumento na temperatura para os dois regimes de luz empregados durante o procedimento de TFD⁵².

Alterações na oxigenação do tecido podem ser provocadas pela vasoconstrição ou vasodilatação. O oxigênio é um fator importante para o sucesso da terapia, onde, altas concentrações de oxigênio podem provocar altas reações fotodinâmicas. As alterações promovidas pelos regimes utilizados podem causar alterações no tecido alvo, porém, o acréscimo de temperatura (cerca de 4°C), não é suficiente para induzir um aumento de duas vezes mais profundo do que o CW.

Trabalhos recentes mostram que o dobro da intensidade de luz, causa aumento na temperatura, porém, não ao nível de induzir o dobro da profundidade de necrose, quando a dose de luz é mantida constante⁵³⁻⁵⁴. Em consequência disto, o pequeno aumento de temperatura promovido pela fonte de luz de femtossegundos não pode ser a principal razão para os resultados observados para a TFD utilizando o Photogem.

Deste modo, concluímos que além das diferenças físicas de como a luz é entregue ao tecido e as consequências disto o tipo específico de FS empregado e sua interação com a luz também se mostrou extremamente importante para o resultado final da TFD.

8 CONCLUSÕES

Este estudo teve por objetivo investigar o efeito fotodinâmico induzido por fontes de luz pulsadas, no regime de femtossegundos, avaliando a interação destas fontes de luz com diferentes fotossensibilizadores empregados para a TFD. Neste estudo foi avaliada a taxa de fotodegradação do fotossensibilizador Photogem e do Photodithazine com fontes de luz pulsada e comparada com fontes de luz CW. Também foi realizado um estudo da necrose induzida por estes fotossensibilizadores quando iluminados com fontes de luz pulsada e comparada com a CW. Também foi realizado um estudo da profundidade de necrose induzida com laser pulsado com a irradiância e comparada com a induzida com o laser CW.

Foi observado neste estudo que a taxa de fotodegradação do Photogem com o laser pulsado, no regime de femtossegundos é maior do que a taxa com o laser CW, indicando maior produção de espécies reativas. A terapia fotodinâmica com laser pulsado no regime de femtossegundos e utilizando Photogem como fotossensibilizador aumenta o volume tecidual tratado em até duas vezes (para os parâmetros empregados).

A taxa de fotodegradação do PDZ com laser pulsado no regime de femtossegundos, é menor do que a taxa de fotodegradação com o laser CW, indicando menor produção de espécies reativas. A terapia fotodinâmica com laser pulsado, no regime de femtossegundos e utilizando PDZ como fotossensibilizador mostrou um volume tratado menor quando comparado com o laser CW (para os parâmetros empregados).

Os resultados mostram que a terapia fotodinâmica com laser pulsado e Photogem como fotossensibilizador aumenta o volume tecidual tratado para irradiâncias abaixo de $80\text{mW}/\text{cm}^2$ (nos parâmetros empregados). Acima deste valor de irradiância as fontes de luz não mostraram diferenças significativas. Estes resultados indicam que a utilização de fontes de luz pulsada para a TFD pode ser uma alternativa para o aumento do volume tecidual tratado, entretanto deve-se observar o fotossensibilizador adequado e também os parâmetros mais eficientes para se obter o melhor resultado com fontes de luz pulsada e ainda são necessários estudos a respeito da dinâmica de reação fotodinâmica para o melhor entendimento dos resultados observados.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acesso em: 10 ago 2013.
- 2 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 10 ago. 2013.
- 3 INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2013
- 4 LEMOS, F.; LIMA, R.; MELLO, D. Introduzindo a temática. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 12, n. 3, p. 485-493, 2004.
- 5 DOUGHERTY, T.; MARCUS, S. Photodynamic therapy. **European Journal of Cancer**, v. 28A, n. 10, p. 1734-1742, 1992.
- 6 RAUSCH, P. 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. 82-87, 1993.
- 7 OKUNAKA, T. et al. A comparison between argon-dye and excimer-dye laser for photodynamic effect in transplanted mouse-tumor. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 83, n. 2, p. 226-231, 1992.
- 8 NIEMZ, M. H. **Laser-tissue interactions: fundamentals and applications**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2007.
- 9 HAMBLIN, M. R.; MRÓZ, P. **Advances in photodynamic therapy: basic, translational, and clinical**. Noewood: Artech House, 2008.
- 10 HUANG, Y.-Y.; CHEN, A. C.-H.; HAMBLIN, M. Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm. **SPIE Newsroom**, 2009. doi: 10.1117/2.1200906.1669.
- 11 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 9, p. R61-R109, 2008.

12 MELO, C. et al. Pharmacokinetics of photogem using fluorescence monitoring in wistar rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology**, v. 73, n. 3, p. 183-188, 2004.

13 VOLLET, J. et al. Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence for photodynamic therapy outcome. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2010.

14 PRATAVIEIRA, S. et al. Phototransformation of hematoporphyrin in aqueous solution: anomalous behavior at low oxygen concentration. **Laser Physics**, v. 19, n. 6, p. 1263-1271, 2009.

15 BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 173-186, 2002.

16 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. 7257-7269, 1997.

17 MIYAMOTO, Y.; UMEBAYASHI, Y.; NISHISAKA, T. Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology**, v. 53, n. 1-3, p. 53-59, 1999.

18 HAEDERSDAL, M. et al. Long-pulsed dye laser versus long-pulsed dye laser-assisted photodynamic therapy for acne vulgaris: a randomized controlled trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 387-394, 2008.

19 ALSTER, T.; TANZI, E. Photodynamic therapy with topical aminolevulinic acid and pulsed dye laser irradiation for sebaceous hyperplasia. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 2, n. 5, p. 501-504, 2003.

20 CHANNUAL, J. et al. Vascular effects of photodynamic and pulsed dye laser therapy protocols. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 9, p. 644-650, 2008.

21 POGUE, B. et al. Absorbed photodynamic dose from pulsed versus continuous wave light examined with tissue-simulating dosimeters. **Applied Optics**, v. 36, n. 28, p. 7257-7269, 1997.

22 MIMURA, S. et al. Photodynamic therapy for early gastric cancer - its application for wider lesions. **Proceedings SPIE**, v. 2371, p. 522-525, 1995. doi:10.1117/12.203405

23 KARU, T. et al. High quantum yield of photochemical-reactions of protoporphyrin-ix induced by powerful ultrashort laser-pulses. **Applied Physics**, v. 24, n. 3, p. 245-247, 1981.

24 BHAWALKAR, J. et al. Two-photon photodynamic therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 15, n. 5, p. 201-204, 1997.

25 SAWA, M. et al. Application of femtosecond ultrashort pulse laser to photodynamic therapy mediated by indocyanine green. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, n. 6, p. 826-831, 2004.

26 SINGH, G. et al. Metronomic PDT and cell death pathways. **Photodynamic Therapy: methods and protocols**, v. 635, p. 65-78, 2010. doi: 10.1007/978-1-60761-697-9_5.

27 BISLAND, S. et al. Metronomic photodynamic therapy (mPDT) for intracranial neoplasm: physiological, biological and dosimetry considerations. **Therapeutic Laser Applications and Laser-tissue interactions**, v. 5142, p. 9-17, 2003. doi: 10.1364/ECBO.2003.5142_9

28 VAN DEN BOOGERT, J. et al. Fractionated illumination for oesophageal ALA-PDT: effect on blood flow and PpIX formation. **Lasers in Medical Science**, v. 16, n. 1, p. 16-25, 2001.

29 MÜLLER, S. et al. Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 42, n. 1, p. 67-70, 1998.

30 DE HAAS, E. et al. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 12, p. 2679-2686, 2006.

31 LIU, A. et al. Pulsed dye laser and pulsed dye laser-mediated photodynamic therapy in the treatment of dermatologic disorders. **Dermatologic Surgery**, v. 38, n. 3, p. 351-366, 2012.

32 PATTERSON, M. ; WILSON, B. C. A theoretical-study of the influence of sensitizer photobleaching on depth of necrosis in photodynamic therapy. **Proceedings SPIE**, v. 2133, p. 208-219, 1994. doi:10.1117/12.179986

33 STERENBORG, H.; VANGEMERT, M. Photodynamic therapy with pulsed light sources: a theoretical analysis. **Physics in Medicine and Biology**, v. 41, n. 5, p. 835-849, 1996.

34 SEGUCHI, K. et al. Critical parameters in the cytotoxicity of photodynamic therapy using a pulsed laser. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 4, p. 265-271, 2002.

35 KAWAUCHI, S. et al. Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: study of oxygen consumption and photobleaching. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 4, p. 179-183, 2004.

36 OHMORI, S.; MASUDA, K.; ARAI, T. Characteristics of photocytotoxicity with high peak power pulsed irradiation: comparison of photodynamic therapy with two photosensitizers, photofrin (R) and mono-L-aspartyl chlorin e6 on prostate cancer cell in vitro. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, 27., 2005, Shanghai. **Anais...Shanghai: IEEE**, 2005.

37 ANDREONI, A. et al. In vivo photochemotherapy with hematoporphyrin derivative via two-step excitation. In: **EUROPEAN CONFERENCE ON OPTICS, OPTICAL SYSTEMS AND APPLICATIONS**, 1986. doi:10.1117/12.937074.

38 POGUE, B. et al. Transient absorption changes in vivo during photodynamic therapy with pulsed-laser light. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 3-4, p. 344-351, 1999.

39 FERREIRA, J. et al. Comparative study of photodegradation of three hematoporphyrin derivative: Photofrin (R), Photogem (R) and Photosan. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 10, p. 743-748, 2007.

40 DE ARAÚJO, M. A. et al. Measurement of Gaussian laser beam radius using the knife-edge technique: improvement on data analysis. **Applied optics**, v. 48, n. 2, p. 393-396, 2009.

41 UZDENSKY, A. et al. Photodynamic effect of novel chlorin e(6) derivatives on a single nerve cell. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2185-2197, 2004.

42 FERREIRA, J. et al. Necrosis characteristics of photodynamics therapy in normal rat liver. **Laser Physics**, v. 14, n. 2, p. 209-212, 2004.

43 BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, n. 47, p. 9513-9547, 2001.

44 CORREA, J. C., et al. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387-1394, 2012.

45 CORREA, J. C.,. **Fotodegradação do photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser**. 2006.112p.. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

46 DE BONI, L. et al. Excited state absorption spectrum of chlorophyll a obtained with white-light continuum. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 16, 2007. doi: 10.1063/1.2722755

47 CORREA, D. et al. Reverse saturable absorption in chlorophyll a solutions. **Applied Physics B-lasers and optics**, v. 74, n. 6, p. 559-561, 2002.

48 BARBOSA NETO, N. M. et al. Excited-state absorption in oxidized cytochrome c solution. **Applied Physics B-lasers and optics**, v. 79, n. 6, p. 751-754, 2004.

49 PANJEHPOUR, M. et al. Comparative-study between pulsed and continuous-wave lasers for photofrin(r) photodynamic therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 296-304, 1993.

50 STRASSWIMMER, J.; GRANDE, D. Do pulsed lasers produce an effective photodynamic therapy response? **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 1, p. 22-25, 2006.

51 ORENSTEIN, A. et al. Temperature monitoring during photodynamic therapy of skin tumors with topical 5-aminolevulinic acid application. **Cancer Letters**, v. 93, n. 2, p. 227-232, 1995.

52 GRECCO, C. **Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando fontes de luz pulsada no regime de femtossegundos**. 2009. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

53 KELLY, K. et al. Combined photodynamic and photothermal induced injury enhances damage to in vivo model blood vessels. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 407-413, 2004.

54 CAMERIN, M. et al. Metallo-Naphthalocyanines as Photothermal Sensitizers for Experimental Tumours: In Vitro and In Vivo Studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 9, p. 665-673, 2009.

55 STRATONNIKOV, A. A.; DOUPLIK, A. Y.; LOSCHENOV, V. B. Oxygen consumption and photobleaching in whole blood incubated with photosensitizer induced by laser irradiation. **Laser Physics**, v. 13, n. 1, p. 1-21, 2003.

56 FINLAY, J. et al. Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms. **Physics in Medicine and Biology**, v. 49, n. 21, p. 4837-4860, 2004.

57 BOULNOIS, J. L. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. **Lasers in Medical Science**, v. 1, n. 1, p. 47-66, 1986.

58 CARVALHO, V. C. M. **Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do cancer**. 2001. 91 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

59 BONNETT, R. et al. Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). a comparative study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology**, v. 53, n. 1-3, p. 136-143, 1999.

60 VERHOEVEN, J. Glossary of terms used in photochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 2223-2286, 1996.

61 MOAN, J. Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. **Cancer Letters**, v. 33, n. 1, p. 45-53, 1986.

62 MANG, T. et al. Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 4, p. 501-506, 1987.

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de Ética



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 062/2009, sobre o projeto intitulado “*Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando fonte laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Cristina Kurachi** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **08 de junho de 2009**.

(We certify that the protocol nº 062/2009, about “*Comparative study of photodynamic therapy using CW and femtosecond laser source at different intensities and wavelengths*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in **06/08/2009** meeting.

Ribeirão Preto, 08 de junho de 2009.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – Interações da Luz com o Tecido Biológico.

O número de possíveis combinações de parâmetros experimentais é ilimitado, porém, podemos classificar cinco interações da luz com o tecido que são de grande importância para aplicações em foto medicina: interações fotoquímicas, interações térmicas, interações eletromecânicas e fotoablativas^{8,57}.

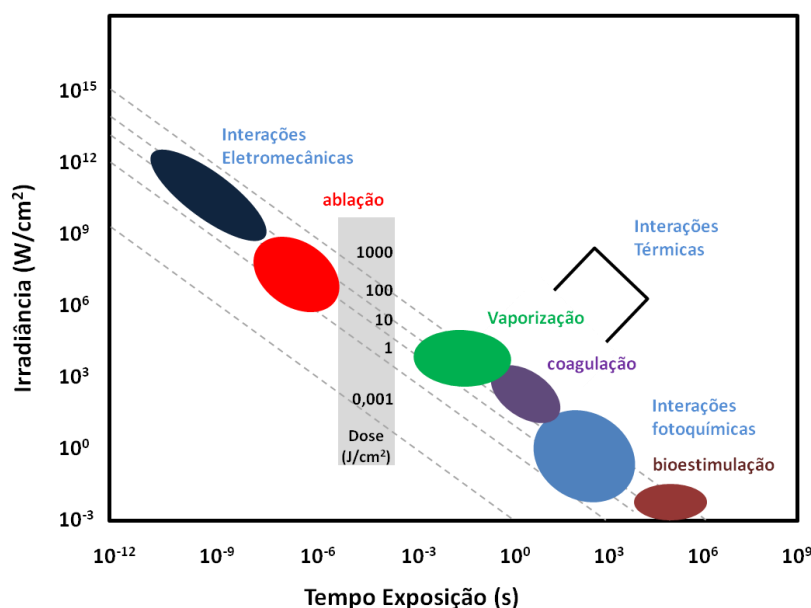


Figura 39 – Mapa de interações de lasers com tecido biológico aplicado a medicina. O eixo das ordenadas mostra a irradiância (W/cm^2) e o eixo das abscissas mostra o tempo de interação da luz. As diagonais pontilhadas apresentam a doses de energia típicas (J/cm^2). As figuras geométricas apresentam os tipo de interação e os parâmetros utilizados em diversos relatos clínicos e aplicações experimentais. (Adaptado de Boulnois, 1986⁵⁵)

Um parâmetro importante, quando se trata de um fluxo de luz incidente em um tecido biológico, os reagentes são os fótons e a dose de energia entregue por unidade de área (J/cm^2) pode mediar transformações macroscópicas, ou o dano biológico, no sentido geral causado pelo tecido exposto a irradiação^{8,57}.

Na escala de tempo de exposição longa e baixa densidade de energia ($< 1\text{W}/\text{cm}^2$) estão os efeitos fotoquímicos. Neste regime de aplicação ocorre a foto ativação de drogas; indução de efeitos químicos e reações com macromoléculas (usualmente para a terapia fotodinâmica). Os comprimentos de onda usuais neste regime estão na região da janela biológica, este tipo de interação está discutido em detalhe na Seção 2.2

As interações térmicas podem ser aplicadas para ablação de material ou para a foto coagulação, onde a energia eletromagnética é convertida em energia térmica. Este efeito é

conseguido com a focalização do feixe de luz o qual alcança altas densidades de energia, alcançando uma região espacialmente confinada de calor que em contato com o tecido alvo resultando em dano térmico, remoção de tecido ou controle de sangramento. A escolha do comprimento de onda determina a profundidade de penetração e conseqüentemente a melhor aplicação. Podem ser utilizados lasers CW ou pulsados onde a diferença de duração do pulso ou a potência de pico contribuirá para diferentes efeitos (coagulação, vaporização, carbonização ou fusão)^{8,57}.

Interações eletro mecânicas ocorrem quando são utilizados lasers pulsados focalizados e com altas potências de pico, gerando altas irradiancias (da ordem de 10^{10} W/cm² com pulsos de nanossegundos ou 10^{12} W/cm² com pulsos de picossegundos) gerando altos campos elétricos locais ($10^6 - 10^7$ V/cm). Estes altos campos elétricos podem causar um rompimento das ligações interatômicas gerando a ejeção de material ionizado (plasma) e a geração de uma onda de choque que se propaga a velocidade do som. Este tipo de interação tem sido utilizado para o tratamento não invasivo de patologias dos olhos, sendo de fácil utilização em ambulatórios^{8,57}.

Outro tipo de interação que desperta interesse para o tratamento de problemas oculares e a interação fotoablativa. Esta técnica utilizada irradiação no UV e promove cortes não necróticos de pequenas dimensões. A fonte de luz é focalizada no tecido e devida a alta absorção de energia das macromoléculas na região do UV, ocorre a foto dissociação, ou seja, a quebra direta de ligações intramoleculares em cadeias poliméricas. Neste tipo de interação há a preservação dos tecidos adjacentes e sem formação de tecido necrótico^{8,55}.

ANEXO C – Propriedades de um Fotossensibilizador Ideal.

Um fotossensibilizador ideal deve ter as seguintes características^{9,58}:

Alto rendimento quântico de transição para o estado tripleto e energia de estado tripleto $> 94 \text{ kJmol}^{-1}$, com eficiência na formação de oxigênio singleto e promover reações fotoquímicas do Tipo II, os principais responsáveis pela morte celular;

Deve ter alto coeficiente de absorção na região do vermelho infravermelho próximo para alcançar maiores profundidades de tratamento. Fotossensibilizadores a base de porfirina possuem forte absorção na região de 400 nm (banda de Soret) e uma banda de absorção (banda Q) próxima de 600 nm. Apenas comprimentos de onda > 600 nm têm sido amplamente utilizados em terapia fotodinâmica;

O fotossensibilizador deve ter baixa toxicidade no escuro, pouca ou ausência de fotossensibilidade na pele;

Deve ter acúmulo seletivo, ou seja, alcançar o máximo de acúmulo no tecido alvo ou micro-organismos, em um tempo curto e ser capaz de ser eliminado do organismo rapidamente a fim de minimizar a fototoxicidade da pele;

É importante que o composto seja anfifílico (solúvel em água, porém, com uma região hidrofóbica) para facilitar a travessia do composto em membrana celular;

Deve ser estável e de fácil dissolução em solventes injetáveis. Entretanto, após a administração, o composto deverá ter alta acumulação no tecido tumoral e rápida eliminação no tecido;

O composto deve ser quimicamente puro e com uma rota sintética curta e com alto rendimento de síntese;

Fotossensibilizadores a base de porfirina cumprem quase todos os requisitos de um fotossensibilizador ideal. A estrutura básica da unidade de porfirina consiste de quatro subunidades pirrólicas ligadas umas às outras, via metileno, para formar um tetraciclo pirrólico (Figura 40). Por causa desta extensiva conjugação, a molécula de porfirina apresenta

fluorescência e pode ser excitada com irradiação na região do visível para produzir estados tripleto. Porfirinas que não estão expostas a luz não causam efeitos tóxicos em pacientes. Por esta razão, um grande número de compostos a base de porfirinas são usados em vários estágios de ensaios clínicos como agentes fotodinâmicos.

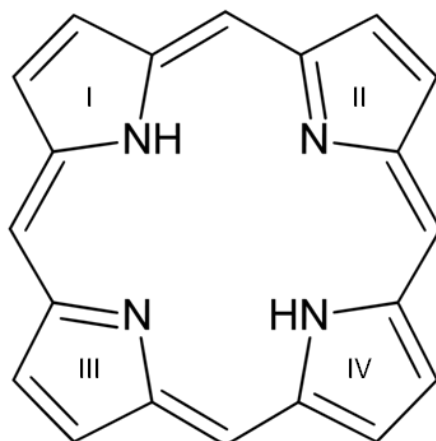


Figura 40 – Estrutura molecular da porfirina, apresentado as subunidades pirrólicas (anéis I, II, III e IV) que compõe a macrociclo tetrapirrólico.

Duas ou mais das duplas ligações periféricas dos anéis pirrólicos são cruzados conjugados e não são necessários para manter o caráter aromático da molécula. A redução de uma ou ambas das duplas ligações cruzadas (geração de clorinas e bacterioclorinas) mantém a aromaticidade da molécula, porém, mudanças na simetria resultam em um deslocamento das bandas Q com aumento do coeficiente de extinção molar (Figura 41)⁹.

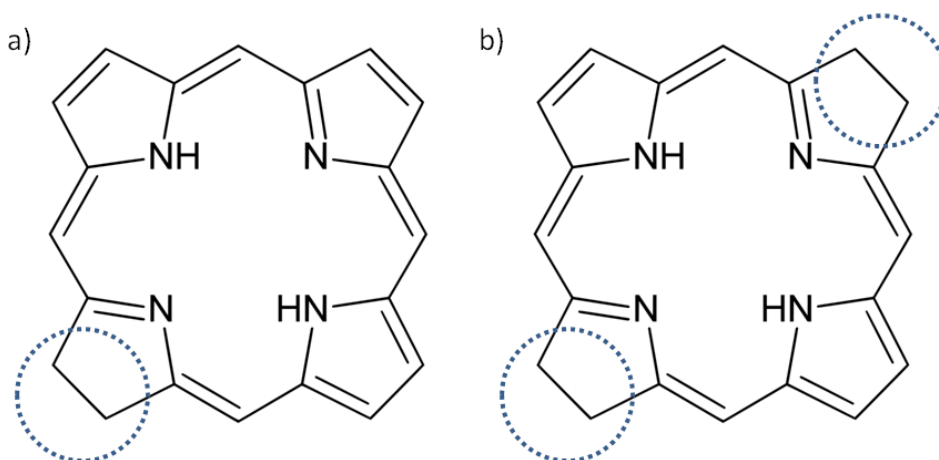


Figura 41 – Estrutura molecular de análogos de porfirina. A figura mostra moléculas que sofreram redução (círculos pontilhados) e geraram a clorina (a) e a bacterioclorina (b).

Estas mudanças de propriedades ópticas são amplamente usadas na natureza, onde ocorre a redução da porfirina na coleta de energia solar durante a fotossíntese com a clorofila e bacterioclorofilas. Estes cromóforos naturais possuem longos comprimentos de onda de absorção, elevando o seu uso como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica.

ANEXO D – Fotodegradação

A fotodegradação de corantes e pigmentos sempre preocuparam os pesquisadores, sendo mais evidente na indústria têxtil. Os efeitos da exposição à luz do sol sobre corantes em tecidos consta nos primeiros livros escritos sobre corantes em 1532 e 1548. No fim do século dezoito foram iniciadas discussões a respeito dos mecanismos de foto desvanecimento e a sugestão de que o processo poderia ser de oxidação ou redução. Os métodos de investigação foram se modernizando com estudos em pigmentos utilizados por artistas em 1866-88⁴³. Poucos anos depois, uma série de estudos foi realizada comparando corantes naturais e corantes sintéticos, os quais foram possíveis após a descoberta da malva por Perkin em 1856. Muitos progressos foram alcançados na procura da compreensão dos mecanismos de fotodegradação. Os mecanismos estão longe de serem simples e a natureza dos fotos produtos muitas vezes tem sido bem determinada⁵⁹.

O efeito do oxigênio como elemento que acelera o processo de degradação, tem sido reconhecido e sugere que o oxigênio singlete e espécies oxidativas são responsáveis pelo desvanecimento de certos tipos de corantes. O interesse na fotodegradação de corantes e pigmentos também compreende outros campos que apareceram nos últimos anos com os avanços da ciência e da tecnologia, que hoje se torna relevante para a variedade de campos desde tecnologias com lasers até a foto medicina.

Na literatura se encontra uma série de termos os quais são empregados para se referir a degradação de corantes e pigmentos sobre irradiação. O mais frequente utilizado é o foto desvanecimento, falta de solidez à luz e *photobleaching*. Na foto química e foto biologia, o termo *photobleaching* ou *bleaching* é amplamente utilizado e é definido como a perda de intensidade de absorção ou perda de intensidade de emissão causada pela luz⁶⁰. Existindo dois tipos de *photobleaching* irreversíveis os quais levam a mudança química do cromóforo⁵⁹:

Foto modificação: ocorre a perda de absorção em alguns comprimentos de onda, mas o cromóforo é mantido em uma forma modificada.

Photobleaching: Mudanças químicas acentuadas, e o resultado são fragmentos os quais não possuem absorção apreciável na região do visível, ou seja, a amostra se torna descolorida.

Ainda é necessário salientar que estes processos ocorrem concomitantemente, ou seja, quando ocorre a foto modificação ocorre também o *photobleaching*.

Em termos mecanicistas, os caminhos para o *photobleaching* ou foto modificação podem ser muito variados. Foto adição e foto ciclização podem ser acompanhadas pela perda do cromóforo; e processos de transferência de elétrons podem levar a formação de bandas largas mostrando deslocamento dos comprimentos de ondas para o vermelho, embora, muitas vezes, este processo pode ser reversível. Processos irreversíveis podem ocorrer na presença de agentes redutores durante o procedimento de irradiação. Na maioria dos exemplos de *photobleaching* na terapia fotodinâmica, quando oxigênio está necessariamente presente, os mecanismos do processo são oxidativos e geralmente envolvem a formação de oxigênio singlete ou espécies reativas de oxigênio⁴³.

No campo da terapia fotodinâmica, as primeiras observações relevantes a respeito do *photobleaching* foram realizadas em 1986 por Moan e colaboradores⁶¹ usando células NHIK 25 incubadas em derivado de hematoporfirina e posteriormente foi observado em pacientes recebendo tratamento com hematoporfirina por Mang e colaboradores⁶². As primeiras observações não foram promissoras, contudo, o potencial benefício do *photobleaching* sobre o tratamento, seria reconhecido em um estágio mais tarde. O controle do *photobleaching* é um parâmetro importante para a terapia fotodinâmica e a complexidade do processo tem sido estudada a fim de melhorar o tratamento.

O *photobleaching* de hematoporfirinas e compostos relacionados têm sido extensivamente estudados em termos de cinética, entretanto, muito pouco é conhecido sobre a estrutura dos fotos produtos.