

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ESTUDO E CORRELAÇÃO DE DIFERENTES DERIVADOS  
DE HEMATOPORFIRINA E CLORINAS NO PROCESSO DE  
TERAPIA FOTODINÂMICA.**

Juliana Ferreira

—RIBEIRÃO PRETO—  
2007

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ESTUDO E CORRELAÇÃO DE DIFERENTES DERIVADOS  
DE HEMATOPORFIRINA E CLORINAS NO PROCESSO DE  
TERAPIA FOTODINÂMICA.**

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

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

Ferreira, Juliana

Estudo e Correlação de Diferentes Derivados de Hematoporfirina e Clorinas no Processo de Terapia Fotodinâmica. / Juliana Ferreira. – 2007

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Sérgio Zucoloto

Co-orientador: Vanderlei Salvador Bagnato

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, dosimetria, porfirina, clorina.

## DEDICATÓRIA

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

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

Dedico a vocês este trabalho

Muito Obrigada!!!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço *in memorium* aos meus avós Leonilda Martins Ferreira, Osvaldo Ferreira e Adélia M. P. Caputo, que mesmo ausentes sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

Agradeço meu avô Francisco Caputo

Por todo amor e carinho que sempre me deu; por acreditar e me apoiar sempre.

À minha irmã Isabelle Ferreira

Mesmo distante, sempre torceu por mim, estando ao meu lado me apoiando e incentivando.

Ao meu namorado Luis Alberto Trivinho Strixino

Pela paciência, compreensão, apoio e incentivo durante esta etapa da minha vida.

**Amo muito vocês!!!**

Às amigas Cristina Kurachi e Priscila F. C. de Menezes

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

Ao amigo Clóvis Grecco

Pela amizade e atenção durante todo este tempo; pelo auxílio e boa vontade em ajudar na realização de mais um trabalho.

A todos os amigos do Laboratório Biofotônica

Alessandra Rastelli, Daniel Bonini, Denis Jacomassi, Emery Lins, Eurico Carvalho, Everton Estracanholti, Fernando Florez, José Dirceu Vollet - Filho, Juçaira S. M. Giusti, Karina M. de Freitas Pontes, Lílian T. Moriyama, Mardoqueu M. da Costa, Rosane Lizarelli, Ruy Mattosinho e Vitória Maciel.

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

À Maristela Dutra - Corrêa

Pela amizade, carinho e ajuda.

À amiga Aida Bebeachibule

Muito obrigada pelo carinho, pela amizade, por sempre estar ao meu lado nos bons e maus momentos. Obrigada por ser minha grande amiga.

*"Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem  
morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se  
morressem todos os meus amigos!"*

Ao Prof. Luiz Eduardo Brumer Rosa

Pela colaboração e contribuição neste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Edna S. Martins

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

Ao Prof. Orlando Castro e Silva Jr.

Pela boa vontade, pelo apoio, pelos ensinamentos. Por acreditar em mim e  
confiar sempre em meu trabalho.

Aos funcionários do Instituto de física de São Carlos, Isabel e Bene e do  
Departamento de Patologia da FMRP, Neide, Rosângela e Edna.  
Agradeço pela atenção e carinho, estando sempre disposta a me ajudar.

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

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

Às funcionárias do Biotério do Departamento de Patologia da FMRP,

Ivone e Cida.

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

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

FMRP

Que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço pela amizade, pelo carinho e pela torcida.

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Zucoloto

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

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

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

Agradeço pela oportunidade de trabalhar com algo novo e maravilhoso; de conhecer o "mundo da física", abrindo meus horizontes e me ensinando o que é fazer ciência. Agradeço pela dedicação, paciência, confiança e amizade durante o momento mais importante da minha formação profissional. Você é um dos grandes responsáveis por esta conquista.

Expresso toda minha admiração e respeito.

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

## DEUS

*Eu pedi Força...*

*e Deus me deu Dificuldades para me fazer forte.*

*Eu pedi Sabedoria...*

*e Deus me deu Problemas para resolver.*

*Eu pedi Prosperidade...*

*e Deus me deu Cérebro e Músculos para trabalhar.*

*Eu pedi Coragem...*

*e Deus me deu Perigo para superar.*

*Eu pedi Amor...*

*e Deus me deu pessoas com Problemas para ajudar.*

*Eu pedi Favores...*

*e Deus me deu Oportunidades.*

*Eu não recebi nada do que pedi...*

*Mas eu recebi tudo de que precisava.*

**"Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como  
único objetivo, obtém, ao cabo, a capacidade de fazer  
qualquer coisa."**

Mahatma Gandhi

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

---

<b>Figura 1</b> - Estimativa para o ano 2006 das neoplasias mais incidentes na população brasileira. São esperados 234.570 casos novos para o sexo masculino e 237.480 para sexo feminino.....	3
<b>Figura 2</b> - Ativação do agente fotossensibilizador pela luz.....	11
<b>Figura 3</b> - Diagrama esquemático dos principais aspectos a serem abordados em dosimetria para TFD.....	15
<b>Figura 4</b> – Estrutura básica das porfirinas.....	21
<b>Figura 5</b> – Estrutura básica do heme .....	21
<b>Figura 6</b> – Estruturas químicas dos FS's: A- Foscan <sup>®</sup> ; B - Radachlorin <sup>®</sup> ; C - Photodithazine <sup>®</sup> .....	25
<b>Figura 7</b> – Dispositivo à base de LEDs, desenvolvidos no Instituto de Física de São Carlos – USP (IFSC).....	34
<b>Figura 8</b> – Sistema de iluminação em detalhes, os arranjos de LEDs planos um em frente para oputro (A); composto por 40 emissores individuais distribuídos em 1,2 cm de diâmetro.....	35
<b>Figura 9</b> – Sistema de iluminação à base de LEDs, cubetas simetricamente iluminadas contendo os fotossensibilizadores em solução . Dois arranjos de LEDs utilizados para o sistema de iluminação produzem uma zona uniforme de intensidade de luz.....	35
<b>Figura 10</b> – Foto do sistema de diagnóstico (A) e desenho esquemático das partes constituintes (B).....	36
<b>Figura 11</b> – Detecção da fluorescência. A fibra óptica inserida dentro da cubeta contendo o FS diluído e os espectros são coletados.....	36
<b>Figura 12</b> – Espectros de absorção para as 3 porfirinas na concentração de 17 mg/l. A – Photogem; B – Photofrin; C – Photosan. Cubeta com 0,5 cm.....	37, 38
<b>Figura 13</b> – Espectros de fluorescência dos três derivados de hematoporfirina. (PG) – Photogem; (PF) Photofrin; (PS) – Photosan.....	39
<b>Figura 14</b> – Espectro de absorção das 3 clorinas na concentração de 17 mg/l. A – Foscan; B – Photodithazine; C – Radachlorin.....	40, 41
<b>Figura 15</b> – Espectros de fluorescência das três clorinas. Foscan; (PDZ) – Photodithazine; (Rada) – Radachlorin. À direita a ampliação do espectro de emissão do Foscan.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

---

<b>Figura 16</b> – Amplitude de fluorescência na banda 610 nm em função da concentração do Photogem.....	43
<b>Figura 17</b> – Espectros de fluorescência típico do PG, em solução excitado em 532 nm.....	44
<b>Figura 18</b> – Espectros e fluorescência típico do PDZ em solução excitado em 532 nm. São mostradas as fluorescências iniciais seguidos de diferentes tempos de iluminação. A diminuição da amplitude está associada com a transformação da massa ativa das moléculas.....	45
<b>Figura 19</b> – Decaimento da fluorescência em função do tempo de iluminação em diferentes comprimentos de onda para o PG. Os níveis de intensidade de todas as fontes foram de 50 mW/cm <sup>2</sup> , exceto em 400 nm o qual foi utilizado 10 mW/cm <sup>2</sup> . As linhas sólidas representam o decaimento exponencial dos dados tratados.....	47
<b>Figura 20</b> – Decaimento da fluorescência em função do tempo de iluminação em diferentes comprimentos de onda para o PDZ. As linhas sólidas representam o decaimento exponencial dos dados tratados.....	47
<b>Figura 21</b> – Taxa da fototransformação para o (A) Photogem <sup>®</sup> , (B) Photofrin <sup>®</sup> e (C) Photosan <sup>®</sup> em função da intensidade de iluminação para todos os comprimentos de onda utilizados.....	49, 50
<b>Figura 22</b> – Taxa da fototransformação para o (A) Foscan <sup>®</sup> , (B) Photodithazine <sup>®</sup> e (C) Radachlorin <sup>®</sup> em função da intensidade de iluminação para todos os comprimentos de onda utilizados.....	50, 51
<b>Figura 23</b> – Parâmetro de fotoestabilidade para as 3 porfirinas (PG, PF e PS).....	53
<b>Figura 24</b> – Parâmetro de fotoestabilidade para as 3 clorinas (Foscan, PDZ e Radachlorin).....	54
<b>Figura 25</b> – Alojamento dos animais montado no Laboratório de Biofotônica no IFSC – USP/São Carlos.....	61
<b>Figura 26</b> – Fontes de luz utilizadas para a TFD. Laser de Diodo em 630 nm utilizado para as porfirinas (A) e Laser de Diodo em 660 nm próprio para as clorinas (B).....	62
<b>Figura 27</b> – Foto do Sistema de Diagnóstico (A) e desenho esquemático das partes constituintes (B).....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

---

<b>Figura 28</b> – Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photogem® .....	72
<b>Figura 29</b> – Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photofrin® .....	73
<b>Figura 30</b> – Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photosan® .....	74
<b>Figura 31</b> – Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Foscan® .....	75, 76
<b>Figura 32</b> – Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photodithazine® .....	77
<b>Figura 33</b> – Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Radachlorin® .....	78
<b>Figura 34</b> – Alteração hepática causada logo após a aplicação da TFD.....	81
<b>Figura 35</b> – Alteração hepática 30h após a iluminação. A área circulada mostra úlcera de fundo esbranquiçado entremeado com áreas escuras, com bordas bem delimitadas.....	81
<b>Figura 36</b> – Photogem – Transição do tecido hepático normal e necrosado. Na transição do tecido hepático normal, nota-se alguns hepatócitos com degeneração saculiforme. Fotomicrografias aumentadas (A) 200x e (B) 400x.....	83
<b>Figura 37</b> - Photofrin – Transição do tecido hepático normal e necrosado (A) 400x.Células necrosadas, presença de hemácias indicando congestão e pontos hemorrágicos (B) 400x.....	84
<b>Figura 38</b> - Photosan – Transição do tecido hepático normal e necrosado (A) 200x. Intenso infiltrado neutrofílico (B) 400x.....	85
<b>Figura 39</b> - Foscan – Transição do tecido hepático normal e necrosado (A) 200x. Intenso infiltrado neutrofílico (B) 400x.....	86
<b>Figura 40</b> - PDZ – Transição do tecido hepático normal e necrosado (A 200x e B 400x). Intenso infiltrado neutrofílico e presença de células saculiformes no tecido normal.....	87
<b>Figura 41</b> - Radachlorin – Transição do tecido hepático normal e necrosado (A 100x e B 200x). Intenso infiltrado neutrofílico, congestão dos sinusóides e presença de células saculiformes no tecido normal.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

---

<b>Figura 42</b> – Espectro de absorbância medido para o Photogem <sup>®</sup> , Photofrin <sup>®</sup> e Photosan <sup>®</sup> na concentração de 17 mg/l com uma cubeta de 0,2 cm.....	96
<b>Figura 43</b> - Espectro de absorbância medido para o Foscan <sup>®</sup> , Photodithazine <sup>®</sup> e Radachlorin <sup>®</sup> na concentração de 17 mg/l com uma cubeta de 0,5 cm.....	97
<b>Figura 44</b> - Espectro de fluorescência medido para o Photogem <sup>®</sup> (PG), Photofrin <sup>®</sup> (PF) e Photosan <sup>®</sup> (PS) na concentração de 17 µg/ml com uma cubeta de 1,0 cm. Excitação em 532 nm.....	98
<b>Figura 45</b> - Espectro de fluorescência medido para o Foscan <sup>®</sup> (FOS), Photodithazine <sup>®</sup> (PDZ) e Radachlorin <sup>®</sup> (RADA) na concentração de 17 µg/ml com uma cubeta de 1,0 cm. Excitação em 532 nm.....	98
<b>Figura 46</b> - Taxa de decaimento em função do tempo de iluminação para o Photogem na concentração de 17 µg/ml (cubeta 1,0 cm) irradiado com LED's 630 nm com intensidade de 50 mW/cm <sup>2</sup> . A linha sólida representa o decaimento exponencial.....	99
<b>Figura 47</b> - Parâmetros de fotoestabilidade para os derivados de hematoporfirina (PG, PF e PS) e clorinas (FOS, PDZ e RADA) na concentração de 17 µg/ml.....	100
<b>Figura 48</b> - Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photogem.....	101
<b>Figura 49</b> - Parâmetro de fotoestabilidade ( $\eta$ ) em função do limiar de dose ( $D_{th}$ ) para os derivados de hematoporfirina (A) e clorinas (B) em altas concentrações nas condições experimentais.....	102
<b>Tabela I</b> – estimativas para o ano de 2006 do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.....	4
<b>Tabela II</b> – Parâmetros de comprimento de onda (nm) e intensidade (mW/cm <sup>2</sup> ) utilizados na iluminação dos FS's.....	33
<b>Tabela III</b> – Limiar de Dose ( $D_{th}$ ) para os derivados de hematoporfirina (HpD).....	79
<b>Tabela IV</b> – Limiar de Dose ( $D_{th}$ ) para os FS's à base de clorinas.....	79

## *ABREVIACÕES*

---

TFD – Terapia Fotodinâmica

FS – Fotossensibilizador

FS's - Fotossensibilizadores

HpD – do inglês, Hematoporphyrin Derivative

LDL – do inglês, Low Density Lipoprotein

LED - do inglês, light emitting diodes

PG – Photogem

PF – Photofrin

PS – Photosan

PDZ – Photodithazine

FOS – Foscan

RADA – Radachlorin

m-THPC – meso-tetrafenilporfirina

$\eta$  - parâmetro de fotoestabilidade

$\mu$  - micro

$\lambda$  - Comprimento de onda

P – Potência da fonte de luz

I – Intensidade da luz

Dth – Limiar de dose (threshold dose)

T – tempo de irradiação

nm – nanômetros

W – Watts

J – Joule

*RESUMO*

---

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica alternativa importante e não invasiva, utilizada no tratamento de vários tipos de neoplasias. A TFD consiste na ação combinada de um fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz, emitindo num determinado comprimento de onda e da presença do oxigênio molecular. Um fato importante relacionado à TFD é a degradação dos FSs, pela luz, o que modifica a concentração deste na neoplasia. A degradação resulta em alterações nas características espectrais, bem como altera a eficiência fotodinâmica. Neste trabalho, estudou-se 3 diferentes derivados de hematoporfirinas (HpDs): Photogem (PG), Photofrin (PF) e Photosan (PS) e 3 diferentes clorinas: Foscan (FOS), Photodithazine (PDZ) e Radachlorin (RADA). Foi analisada a fotodegradação em solução dos FSs iluminados em diferentes comprimentos de ondas e variando a intensidade de luz. As soluções foram colocadas em cubetas plásticas ou de quartzo em volume de 1 cm<sup>3</sup> e simetricamente iluminadas por um dispositivo à base de LEDs. A fluorescência da solução foi periodicamente capturada durante a iluminação. A fluorescência medida foi obtida com um laser de excitação em 532 nm e os espectros coletados através de 6 fibras ópticas. Através da absorbância e dos espectros de fluorescência determinou-se o parâmetro de fotoestabilidade ( $\eta$ ). Pode-se observar que, entre os HpDs, o FS mais fotoestável é o PS, devido ao maior número de agregados; PG e PF apresentam  $\eta$  semelhantes entre si. Entre as clorinas, observa-se que o FOS é o FS mais fotoestável, seguido do PDZ e por último, da RADA. No estudo *in vivo*, utilizou-se fígados de ratos Wistar machos para determinar o limiar de dose (Dth) de cada FS. Os FSs foram diluídos e injetados por via endovenosa, através da veia cava, em diferentes concentrações. Após um período pré determinado, o lobo direito do fígado foi exposto para iluminação com diferentes doses de luz. As fontes utilizadas para iluminação foram laser de diodo: 630 nm para iluminação dos HpDs e 660 nm para iluminação das clorinas. Após 30 h, os animais foram mortos e os fígados removidos para análise macroscópica, microscópica e determinação do Dth. Os resultados sugerem que, com o

aumento da concentração, há uma diminuição do Dth. Para os HpDs, o PG apresentou menor Dth, seguido de PS e PF. O PF apresentou Dth bastante alto, justificável pelas concentrações utilizadas no trabalho. Para as clorinas, o PDZ apresentou menor Dth, seguido de FOS e RADA. Baseado nos estudos *in vitro* e *in vivo*, estudou-se a possibilidade de correlacionar a fotoestabilidade ( $\eta$ ) e o limiar de dose (Dth). Não foi encontrada uma relação entre estes fatores ao se analisar diferentes FS. O PG apresentou uma baixa  $\eta$  e baixo Dth, enquanto o PS apresentou alta  $\eta$  e Dth relativamente baixo, e o PF baixa  $\eta$  e alto Dth. O PDZ, por sua vez, apresentou baixa  $\eta$  e baixo Dth, o FOS alta  $\eta$  e baixo Dth e a RADA baixa  $\eta$  e alto Dth. Estes resultados não permitem afirmar que alta fotoestabilidade indique baixa eficiência fotodinâmica. Pode-se concluir, portanto, que entre os HpDs, o melhor FS foi o PG, e entre as clorinas, o PDZ. Comparar parâmetros *in vitro* e *in vivo* mostrou-se extremamente difícil, pois cada FS apresenta características físico – químicas próprias e diferentes umas das outras. Quando são estudados em solução, apresentam um comportamento que se altera quando inseridos num sistema biológico, devido a interações que ocorrem com o meio (ligação com a membrana plasmática, pH do meio, entre outros). Isto dificulta uma correlação entre a fotoestabilidade e o limiar de dose. Acreditamos que, para observar esta correlação, seja necessário estudar individualmente cada FS e analisar tanto a fotodegradação quanto o limiar de dose *in vivo*.

*ABSTRACT*

---

Photodynamic Therapy (PDT) is an alternative non-invasive technique which has been indicated for the treatment of several tumor lesions. PDT is based on the combined action of a photosensitizer and light emitting at a specific wavelength when in presence of molecular oxygen. An important issue related to PDT dosimetry is the illumination-induced photosensitizer degradation. This photodegradation results in a transformation of the photosensitizer spectral characteristics as well as in its photodynamic efficiency. Three different HpDs – Photogem (PG), Photofrin (PF) and Photosan (PS) – and three different chlorins – Foscan (FOS), Photodithazine (PDZ) and Radachlorin (RADA) – were studied. The photodegradation was analyzed in solution, for different wavelengths and irradiances, via laser-induced fluorescence spectroscopy (532 nm excitation). Through absorbance and fluorescence spectra, a photostability parameter ( $\eta$ ) was established. Photosan showed higher photostability; PG and PF showed a similar photostability. Among chlorins, Foscan showed a higher photostability, followed by PDZ and RADA. *In vivo* studies used male rats Wistar livers to determine the threshold dose (Dth) for each photosensitizer. The photosensitizers were injected into the animals and they were illuminated with diode lasers – 630 nm for HpDs and 660 nm for chlorins. Results suggest that a higher concentration induces a lower Dth. Photogem and PDZ presented a lower Dth. Based on the studies *in vitro* and *in vivo*, a correlation between photostability and Dth cannot be established. It is difficult to compare *in vitro* and *in vivo* parameters, because photosensitizers show different physical chemical characteristics which undergo modifications when they are into a biological system. However, a correlation between photostability and threshold dose could be established individually for each photosensitizer, by performing studies concerning both fotodegradation and threshold dose *in vivo*.

## *SUMÁRIO*

---

## Índice de figuras e tabelas

## Abreviações

## Resumo

## Abstract

<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1. Considerações Gerais.....	02
2. Terapia Fotodinâmica.....	06
3. Mecanismo de Ação.....	09
4. Limitações da Terapia Fotodinâmica .....	13
5. Dosimetria.....	14
6. Fotossensibilizadores.....	17
6.1 Porfirinas.....	20
6.2 Fotossensibilizadores de Primeira Geração.....	22
6.2.1 Photofrin <sup>®</sup> , Photosan <sup>®</sup> , Photogem <sup>®</sup> .....	22
6.3 Fotossensibilizadores de Segunda Geração.....	23
6.3.1 Foscan <sup>®</sup> , Radachlorin <sup>®</sup> , Photodithazine <sup>®</sup> .....	23
<b>II – OBJETIVO.....</b>	<b>26</b>
<b>III – FOTODEGRADAÇÃO.....</b>	<b>28</b>
1. Introdução.....	29
2. Materiais e Método.....	33
2.1 Preparação dos Fotossensibilizadores.....	33
2.1.1 Photogem <sup>®</sup> , Photofrin <sup>®</sup> , Photosan <sup>®</sup> , Foscan <sup>®</sup> , Radachlorin <sup>®</sup> , Photodithazine <sup>®</sup> .....	33
2.2 Fonte de Luz.....	34
2.3 Sistema de Detecção Óptica.....	36
3. Resultado e Discussão.....	37
4. Conclusões.....	55
<b>IV – TERAPIA FOTODINÂMICA E MORTE CELULAR.....</b>	<b>57</b>
1. Farmacocinética.....	58
2. Morte Celular.....	59
3. Materiais e Método.....	61
3.1 Animais.....	61

3.2 Fotossensibilizador.....	61
3.3 Fonte de Luz.....	62
3.4 Sistema de Detecção Óptica.....	63
4. Estudo da Farmacocinética.....	63
5. Estudo da Necrose Hepática pós TFD. ....	65
5.1 Análise Microscópica.....	66
5.2 Morfometria do tecido Hepático.....	67
6. Resultado e Discussão.....	67
6.1 Estudo da Farmacocinética.....	67
6.2 Estudo da Necrose.....	69
6.2.1 Estudo Macroscópico da Necrose.....	81
6.2.2 Estudo Microscópico da Necrose.....	82
7. Conclusões.....	89
<b>V – CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDS E CLORINAS.....</b>	<b>90</b>
1. Introdução.....	91
2. Materiais e Método.....	94
2.1 Fotossensibilizador.....	94
2.2 Fotodegradação dos Fotossensibilizadores.....	94
2.3 TFD em Animais.....	95
2.4 Delineamento Experimental.....	95
3. Resultado e Discussão.....	96
3.1 Degradação dos Fotossensibilizadores: Parâmetros de Fotoestabilidade.....	96
3.2 Profundidade de Necrose e Limiar de Dose.....	100
3.3 Correlação entre os Parâmetro de Fotoestabilidade e Limiar de Dose.....	101
4. Conclusões.....	104
<b>VI – CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>105</b>
<b>VII – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>107</b>
<b>Anexos</b>	

## *I INTRODUÇÃO*

---

## ***I - INTRODUÇÃO***

### **1 – Considerações gerais**

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

O câncer é uma patologia que atinge cerca de dez milhões de pessoas da população mundial. O relatório mundial de câncer, de três de abril de 2003, da Organização Mundial da Saúde (WHO – World Health Organization) alerta que as taxas globais de câncer podem aumentar em 50%, resultando em cerca de 15 milhões de casos em 2020 [1].

A distribuição das taxas de incidência e mortalidade de tumores malignos têm sido, em muitos países, de grande importância para o estabelecimento de diretrizes de políticas públicas e o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer e de assistência paliativa, em âmbito nacional, estadual e municipal. Dados estatísticos representam um componente essencial dos programas de vigilância em saúde pública, pois, permitem estimar a magnitude relativa dos problemas de saúde na população, conseqüentemente facilitando o estabelecimento de prioridades em ações preventivas e terapêuticas [2].

No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontaram que cerca de 472.050 novos casos de câncer foram diagnosticados. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele

não melanoma, foram os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (tabela I).

Em 2006 foram esperados 234.570 novos casos para o sexo masculino e 237.480 para o sexo feminino. Estimou-se que o câncer de pele não melanoma (116 mil casos novos) foi o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (47 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (25 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (19 mil) (figura 1). [2].

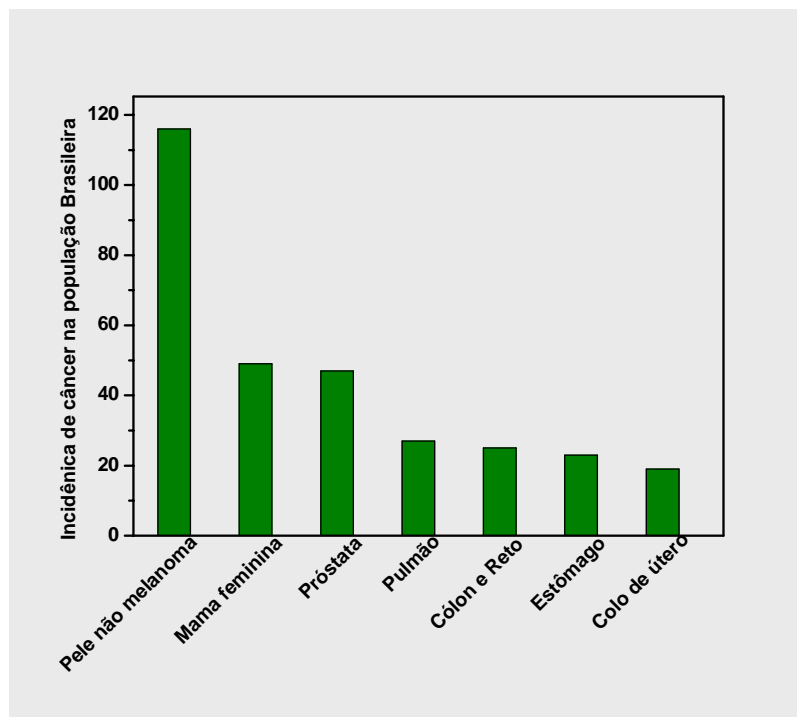


Figura 1 – Estimativa no ano de 2006 das neoplasias mais incidentes na população brasileira.

Foram esperados 234.570 casos novos para o sexo masculino e 237.480 para sexo feminino (fonte: <http://www.inca.gov.br>).

Tabela I - Estimativas no ano de 2006 do número de casos novos por câncer, 234.570 casos novos para o sexo masculino e 237.480 para sexo feminino, segundo localização primária (fonte: <http://www.inca.gov.br>).

<b>Tipos de Neoplasias</b>	<b>Homem</b>	<b>Mulher</b>
Pulmão	17,85	9,32
Estômago	14,97	-----
Cólon e reto	11,39	13,97
Próstata	47,28	-----
Mama feminina	-----	48,93
Colo de Útero	-----	19,26
Pele não melanoma	55,48	61,16

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

O tratamento oncológico envolve eliminação do tumor, seja por via mecânica (remoção cirúrgica), via química (quimioterapia) ou por radiação ionizante (radioterapia), e estas são as bases da maioria dos tratamentos hoje existentes. Todas as terapias têm mostrado

eficiência, principalmente quando a doença é detectada nos seus estágios iniciais. Apesar deste sucesso, ainda temos inúmeros casos onde as técnicas convencionais se mostram bastante limitadas. Para muitos casos, a única opção tem sido a cirurgia radical, comprometendo a função e a anatomia do órgão ou região residual. Isto mostra que o tratamento oncológico ainda tem espaço para muito desenvolvimento e inovação [3]. Atualmente, toda comunidade científica tem realizado esforços no sentido de desenvolver e implementar novas técnicas para tratamentos oncológicos. Uma destas novas alternativas é denominada de Terapia Fotodinâmica - TFD (*Photodynamic Therapy*) [4]. Esta é uma modalidade de tratamento que vem crescendo de forma vertiginosa nos últimos anos.

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

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

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

A TFD tem sido aplicada com os seguintes objetivos: i) Em cânceres no estágio inicial (lesões extensas, lesões múltiplas, localizações de difícil manejo cirúrgico) em cabeça e pescoço, pulmão, esôfago, bexiga (lesões superficiais e múltiplas), órgãos genitais; ii) com objetivo paliativo para a recanalização de traquéia, brônquios, esôfago, cárdia do estômago ou mesmo para conter o rápido avanço de alguns casos de tumores de pele. Em comparação com a fotoablação (vaporização) por laser, a TFD apresenta menores complicações e maior intervalo entre os tratamentos; iii) pode ser utilizada em combinação com técnicas convencionais: para recorrência de câncer de pele, cavidade oral, metástase intradérmica, recorrência de câncer de mama na pele da parede torácica e metástase intradérmica de melanoma. Além disso, a TFD também tem sido utilizada para reduzir o volume do tumor antes de uma intervenção cirúrgica, bem como uma profilaxia após uma intervenção cirúrgica com uma pequena margem de segurança, apresentando bons resultados em ambos os casos. Seu principal inconveniente é a fotossensibilidade da pele, quando da administração sistêmica do fotossensibilizador (FS), o que requer que o paciente não seja exposto à luz solar durante um período de 30 dias após a administração do mesmo. Isto deve ser considerado como um efeito colateral bastante minoritário comparado aos efeitos das demais terapias [3].

## **2 – Terapia Fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica tem sido utilizada na área da saúde para destruição seletiva de neoplasias e na redução bacteriana.

Raab, em 1900, observou a morte de microorganismos quando exposto à luz solar e ao ar, na presença de certos corantes, apresentando uma alternativa para o tratamento de infecções locais contra microorganismos como fungos, bactérias e vírus. A TFD, atualmente, vem sendo amplamente empregada no tratamento de microorganismo, tanto em estudos

laboratoriais como em estudos clínicos, mostrando-se como uma técnica promissora na área de microbiologia.

A terapia fotodinâmica para tratamento do câncer é caracterizada por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem após a administração de um fotossensibilizador, retido exclusivamente em células neoplásicas, seguida pela irradiação local de luz visível.

Fototerapia e Fotoquimioterapia são formas de tratamento, conhecidas desde a antiguidade. Tanto uma como a outra são fundamentadas pela ação da luz sobre componentes químicos do tecido biológico ou retidos neste [5]. Nas últimas décadas, o estudo e uso destas terapias tomaram novo impulso, principalmente com a proposta de tratamento para vários tipos de câncer. A fototerapia tem suas raízes nos tempos pré-históricos. Muitas culturas se beneficiavam das propriedades da luz do Sol sobre o corpo humano (helioterapia). Gregos e Romanos praticavam banho de sol como um tratamento para doenças específicas [5, 6].

A fotomedicina por muito tempo permaneceu focada em estudos dos efeitos nocivos de excessiva exposição à luz do sol enquanto que pesquisas sobre efeitos benéficos da radiação luminosa receberam pouca atenção pela óptica moderna [5, 6].

Nesta última década, pesquisadores americanos e europeus começaram a investigar a possibilidade de utilizar as propriedades da luz laser para a terapia de células neoplásicas [3, 7]. Qualquer fonte de luz que tenha características espectrais apropriadas pode ser utilizada em TFD, tais como lâmpadas de tungstênio ou halogênio, laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e LED (Light Emitting Diode) [8]. Entretanto, os avanços na tecnologia laser têm contribuído muito para o desenvolvimento da terapia fotodinâmica. Sendo uma fonte de luz monocromática, coerente e de alta intensidade, a luz laser permite estimular de modo eficiente os níveis de energia das moléculas do fotossensibilizador. O laser é um dispositivo que foi inventado na década de 60 e apresenta propriedades importantes

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

Sua utilização como fonte de luz em TFD, em substituição às lâmpadas convencionais, tem facilitado os procedimentos e reduzido o tempo de aplicação da luz no paciente. A principal vantagem do laser é a possibilidade de acoplamento a fibras ópticas, o que torna possível irradiar tumores internos localizados em cavidades [9], que são regiões de difícil acesso. Um dos mais recentes avanços é a utilização dos lasers de diodo, pois se trata de um sistema mais compacto, facilitando sua utilização em consultórios e hospitais. Além disso, seu custo atual representa aproximadamente um quarto do custo de um laser de corante, embora esteja restrito a um único comprimento de onda.

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

por todas as células. As células sadias eliminam essa medicação em um período de tempo que varia entre 24 a 36 horas, diminuindo consideravelmente sua concentração. Já as células neoplásicas, por apresentarem um metabolismo e características morfológicas diferentes, retêm esta medicação por um tempo mais prolongado [2]. Assim, esperando mais de 24 horas (normalmente de 24 a 48h) após a administração do fármaco, a substância fotossensível estará mais concentrada nas células neoplásicas, estabelecendo uma diferenciação entre estas células e as demais. Esta substância fotossensível quando iluminada por uma luz laser de cor específica, é excitada (isto significa que os elétrons que constituem as ligações moleculares passarão a um estado energético superior ao normal), e uma vez neste estado energético, provoca uma reação química com o oxigênio molecular abundantemente presente nos tecidos, produzindo uma espécie eletrônica do oxigênio (o estado singleto) altamente reativa para os constituintes celulares e, portanto bastante citotóxica. Como consequência disso, a célula neoplásica e o tecido como um todo são levados à morte, eliminando a lesão [3, 10, 11, 12].

### **3 - Mecanismos de Ação**

O conceito de TFD é a indução da citotoxicidade das células proliferativas através de uma fonte de luz, sendo necessários um agente fotossensibilizador, luz do comprimento de onda adequado e oxigênio molecular [13, 14, 15, 16].

Pelos princípios de ação da TFD, pode-se dizer que ela é uma espécie de foto-quimioterapia. Os fotossensibilizadores são moléculas heterocíclicas grandes, que absorvem luz. Quando estas moléculas são irradiadas com luz visível, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singleto. Este elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou passar para o estado tripleto, de menor energia, através de cruzamento intersistema (do inglês inter-system crossing – ISC) [5, 6, 17, 18, 19, 20]. De acordo com as regras de seleção, este processo não é permitido, pois ele requer uma inversão

de spins e a probabilidade para que ele ocorra é menor do que para os processos permitidos. Entretanto, uma das propriedades desejáveis para um bom fotossensibilizador é a alta eficiência para sofrer cruzamento intersistema. Como o tempo de vida do estado tripleto é relativamente longo ( $10^{-3}$  a 10 segundos) [21], o fotossensibilizador excitado pode interagir com moléculas vizinhas. Esta interação pode ocorrer através de dois mecanismos principais [22]:

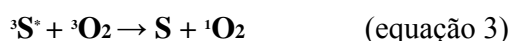
- a) mecanismo tipo I ou via formação de radical: o sensibilizador no estado excitado pode agir abstraindo um átomo de hidrogênio de uma molécula de substrato ou transferindo elétrons. Os radicais assim formados podem reagir com oxigênio, dando origem a uma variedade de produtos oxidados de alta energia ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ou  $\cdot OH$ ) que provocam lesões celulares e a subsequente morte da célula. Representando o substrato biológico como SB, o sensibilizador no estado fundamental com carga positiva como  $S^+$  e com carga negativa como  $S^-$ , pode-se escrever a reação da seguinte forma:



Há uma competição entre os dois mecanismos e os produtos das reações são diferentes. Os dois processos também podem ocorrer simultaneamente, sendo que a proporção entre eles é altamente influenciada pelo sensibilizador, pelo substrato, pela concentração de oxigênio e pela ligação do sensibilizador ao substrato [17].

- b) mecanismo tipo II ou via formação de oxigênio singleto: o fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental, (tripleto) produzindo oxigênio singleto. O oxigênio singleto é uma forma reativa de oxigênio e é considerado o principal mediador do dano fotoquímico causado à célula por muitos fotossensibilizadores. O oxigênio singleto pode se difundir a

uma pequena distância antes de ser desativado e voltar ao estado fundamental ou então sofrer várias reações com substratos biológicos, tais como, oxidação e cicloadição, que são bastante destrutivas aos processos biológicos [9]. Representando o fotossensibilizador no estado tripleto como  $^3S^*$ , o oxigênio molecular como  $^3O_2$  e o oxigênio singlete como  $^1O_2$ , pode-se escrever a reação da seguinte forma:



A eficiência com a qual um fotossensibilizador transfere a energia absorvida da luz para o oxigênio no estado tripleto é definida como o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e constitui uma outra propriedade fotofísica importante [23] (figura 2).

Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do FS, substratos intracelulares e concentração de oxigênio do meio. Na ausência de oxigênio, o efeito é praticamente inexistente. Em condições de anóxia tecidual ou concentração de oxigênio inferior a 2%, as células neoplásicas se mostram resistentes a citotoxicidade induzida pela TFD [4, 6, 24, 25].

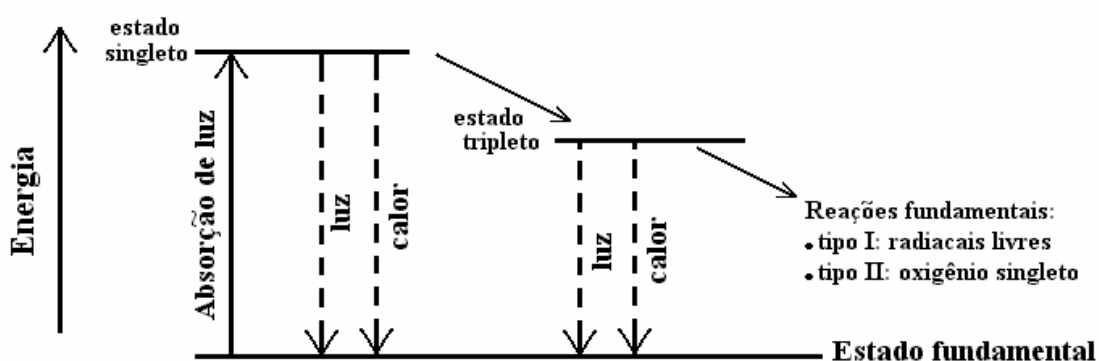


Figura 2 – Ativação do agente fotossensibilizador pela luz [4].

As propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores em solventes puros e em meios biológicos diferem significativamente e o estudo da interação do fotossensibilizador com a célula a nível molecular durante a TFD é difícil. Existem somente evidências da produção de

oxigênio singleto em sistemas biológicos, pois seu tempo de vida é muito curto:  $4 \times 10^{-6}$  segundos em água,  $50 - 100 \times 10^{-6}$  segundos em lipídeos e  $0.6 \times 10^{-6}$  segundos no ambiente celular [21], o que impede sua observação direta. Moan et al [26], demonstraram que o raio de ação do oxigênio singleto é menor que  $0,1\mu\text{m}$ .

Para a maioria dos fotossensibilizadores, com exceção de algumas cianinas, a TFD é fortemente dependente de oxigênio. Desta forma, a disponibilidade de oxigênio local pode se tornar um fator limitante para a produção de oxigênio singleto. Em tecidos nos quais o oxigênio está ausente ou presente em níveis insuficientes, o tratamento por TFD pode ser inadequado, podendo resultar em recorrências do tumor ou no desenvolvimento de metástases. Estudos com derivado de hematoporfirina (do inglês, Hematoporphyrin Derivative, ou HpD) mostraram que quando o oxigênio está presente em quantidade insuficiente, as células são resistentes ao tratamento. Colussi [6] estudou o efeito da oxigenação hiperbárica em associação com a TFD utilizando derivado de hematoporfirina no tratamento de tumores em ratos e verificou a existência de uma proporcionalidade entre o dano celular e o fornecimento de oxigênio

A produção de oxigênio singleto é o mecanismo mais importante para a TFD, porém outros também estão presentes. O fármaco, excitado por si só, é um agente reativo dentro da célula, destruindo vários substratos celulares importantes. A reação fotodinâmica também ocasiona um dano vascular do tumor. A medicação ainda presente nos vasos sanguíneos pode ser excitada promovendo a destruição de pequenos vasos e conseqüentemente a estase sanguínea local [27].

Além da influência fotoquímica direta nas células neoplásicas tratadas por TFD, há outros mecanismos importantes envolvidos na morte celular. A perturbação do suprimento sanguíneo ao tumor devido à destruição do endotélio dos vasos, pode levar a uma isquemia e hipóxia celular. O efeito hipertérmico, condicionado pela absorção ativa da luz pelas células

neoplásicas, também pode causar dano celular. Reações citotóxicas, condicionadas pelo estímulo da produção do fator de necrose tumoral, produzem um infiltrado inflamatório com a migração de macrófagos, leucócitos e linfócitos [3].

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

#### **4 – Limitações da Terapia Fotodinâmica**

A TFD é um caso particular da aplicabilidade da óptica na medicina, destacando-se não só pela possibilidade de caracterização, como também pela possibilidade de tratamento através da absorção óptica [28, 29, 30]. Entretanto a TFD ainda apresenta algumas limitações como:

- Pelo excesso da energia, os estados excitados dos FS's possuem curto tempo de vida. Isso diminui a probabilidade da transferência de energia do FS para o oxigênio;
- A concentração de oxigênio dentro dos tecidos neoplásicos é baixa, dependendo do tipo celular e do tamanho do tumor. Isso diminui também a probabilidade da formação de oxigênio singlete;

- O tempo de vida do oxigênio singlete também é muito curto (nas soluções aquosas), reduzindo a probabilidade das reações entre o oxigênio singlete e as estruturas celulares;
- Os fotossensibilizadores utilizados atualmente em TFD possuem baixa absorção óptica na região da janela terapêutica;
- A maioria dos fotossensibilizadores orgânicos possui alta afinidade para formação dos agregados, que diminui sua eficácia em TFD.

Estes fatores estimulam a busca de novos tipos de FSs mais efetivos para TFD [31] e um maior conhecimento dos corantes já existentes. A compreensão do efeito da TFD no metabolismo celular e as organelas afetadas por este tipo de terapia, são necessárias para um melhor conhecimento e aprimoramento de medicações cada vez mais específicas para células neoplásicas.

## **5 – Dosimetria**

Um aspecto fundamental em toda terapia para o tratamento de câncer consiste no desenvolvimento de uma dosimetria eficiente e segura. Em cirurgia, a eficácia do tratamento está relacionada com a capacidade e experiência do cirurgião, ao analisar os exames patológicos, para a delimitação das margens de segurança. Na quimioterapia a dose de medicamento utilizado está relacionada com a resposta individual de cada paciente e do alvo celular em que o composto químico irá atuar [1, 23]. Em radioterapia existe uma dosimetria bem estabelecida para a aplicação da radiação em diferentes tipos de lesão, sendo avaliados a quantidade de energia usada, o volume do tumor e a assimilação da radiação pelas células [1, 32]. Como a TFD é uma terapia relativamente nova, ainda existem muitos pontos a serem analisados quanto à dosimetria utilizada em casos clínicos. No diagrama abaixo, figura 3,

estão relacionados os principais aspectos a serem considerados no desenvolvimento de uma dosimetria em TFD.

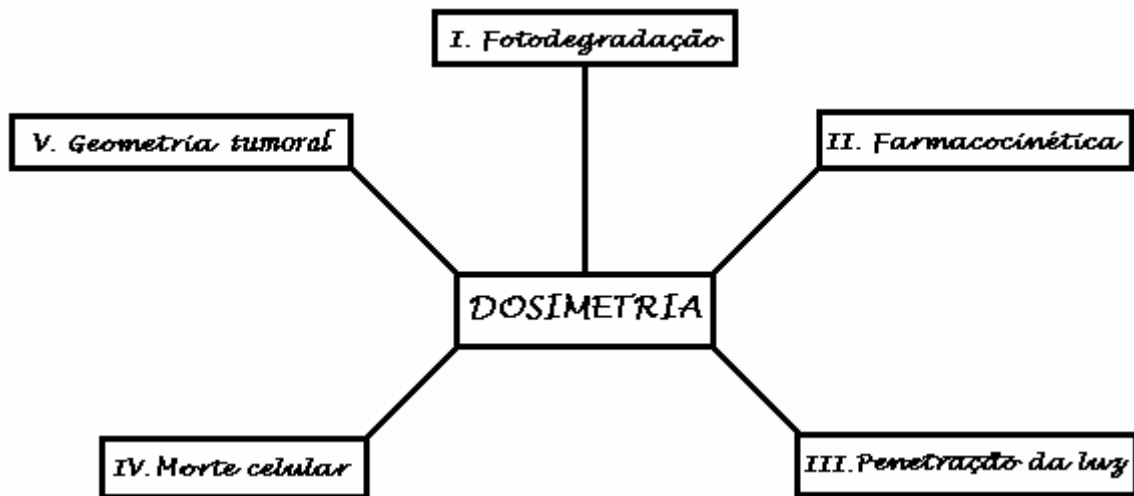


Figura 3 - Diagrama esquemático dos principais aspectos a serem abordados em dosimetria para TFD.

Considerando que o oxigênio não representa um limitante para a reação fotodinâmica, a maior parte das injúrias celulares estão intrinsecamente relacionadas com a concentração do FS e a dose de luz aplicada. Determinar a dose de luz e a concentração do fármaco a serem utilizados nesta terapia, são fatores extremamente importantes; estes dois fatores, quando combinados, devem causar eliminação do tumor com mínimo dano aos tecidos normais adjacentes.

A adequada combinação, luz/fármaco, leva a um completo dano vascular no tumor [1], por isso existe um *threshold* (limiar) de dose de luz, relacionado com a concentração do FS. É de grande valia um estudo sobre a dosimetria relacionando o limiar de dose de luz e a concentração do fármaco, na tentativa de avaliar a profundidade de necrose alcançada através da terapia, a qual apresenta varias vantagens sobre os métodos tradicionais de tratamento de tumores malignos como: dano seletivo às células neoplásicas, possibilidade de repetição do procedimento várias vezes se necessário e os efeitos colaterais controlados e menos adversos.

O sucesso da terapia fotodinâmica dependerá de diversos fatores como: quantidade do medicamento presente na célula neoplásica, iluminação uniforme do tecido, fotoativação e fotodestruição do fármaco e eficiência quântica de formação do oxigênio singleto. Cada um desses fatores será influenciado por uma série de outros fatores e todos eles são interdependentes.

As quantidades aplicadas de medicamento, as características do laser, a potência e o tempo de iluminação dependem da medicação que está sendo utilizada e do tipo e do grau (ou extensão) da doença tratada.

Até o momento, a dosimetria clínica para TFD tem sido restrita apenas à determinação do intervalo entre a administração do medicamento e a iluminação da lesão e da dose de energia a ser entregue ao tecido alvo. No entanto, a dosimetria deve também considerar a quantidade de fármaco presente no tumor e as modificações que ocorrem durante a iluminação para diferentes parâmetros, além da presença do oxigênio e a formação do oxigênio singleto na célula.

Sabe-se que o oxigênio é essencial para promover a produção do oxigênio singleto e conseqüentemente a morte celular. Considerando-se que o oxigênio esteja disponível e não constitua qualquer limitação para a reação do TFD, a quantidade de células destruídas deve estar intrinsecamente relacionada à concentração de porfirina e à dose de luz aplicada [33]. Sabe-se que a intensidade da luz decai através da penetração no tecido, e uma hipótese é que a morte celular só ocorre se uma quantidade de citotoxicidade celular exceder um valor mínimo [7, 33].

Desta forma, como foi estabelecido por Patterson et. al [34], a necrose celular devido a TFD, ocorrerá, se um número de fótons absorvidos pelo fotossensibilizador por uma unidade de volume, exceder um valor crítico. Bown et. al (1986) [35] reportou uma relação logarítmica entre a extensão de necrose e o total de energia aplicada.

O conceito de uma limiar de dose (*threshold dose*) na TFD corresponde à existência de uma dose mínima, em que qualquer dose inferior a esta, não causaria dano celular irreversível à célula. Este conceito é muito importante para estabelecer uma dose de luz na TFD. Foi relatado recentemente por Gossweiner [36] que um limiar de dose foi deduzido, usando um cálculo complexo que envolve um modelo para a interação luz-tecido.

Através dos conceitos e da importância dos fatores envolvidos na dosimetria, consideram-se de grande importância os estudos sobre a mesma na TFD relacionando um limiar de doses de luz e a concentração do fármaco, na tentativa de avaliar a profundidade de necrose alcançada através da terapia, bem como, os outros fatores que interferem e que ocorrem durante a ação e mecanismo da terapia.

## 6 – Fotossensibilizador

Fotossensibilização pode ser definida como um conjunto de processos que induz um sistema a tornar-se sensível à luz. Um fotossensibilizador, é uma substância capaz de absorver fótons, quando integrado a um sistema irradiado (átomo ou molécula), produz efeitos específicos que não ocorrem na ausência da luz [12, 17].

Para que uma substância possa ser utilizada como fotossensibilizador em TFD, é desejável que ela seja hidrossolúvel, apresente composição química definida e seja fluorescente para que possa ser detectada. Um bom fotossensibilizador também deve apresentar mínima toxicidade no escuro, ser retido preferencialmente pelos tecidos tumorais e ser eliminado rapidamente do organismo. A razão entre a quantidade de sensibilizador acumulado no tumor em relação ao tecido normal ao redor, ou distante, deve ser alta [37]. Para a maioria dos sensibilizadores utilizados, a razão tumor/tecido varia de 2/1 a 5/1. Além disso, o fotossensibilizador deve apresentar uma absorção significativa acima de 650 nm,

onde os tecidos são relativamente transparentes à luz e apresentar um elevado rendimento quântico de formação de radicais de oxigênio [28].

O mecanismo envolvido na distribuição preferencial dos sensibilizadores no tecido tumoral ainda não está completamente elucidado. Alguns fatores são descritos como responsáveis, assim: a permeabilidade da membrana das células neoplásicas encontra-se alterada, as fibras de colágeno que integram o tumor são imaturas e semelhantes às observadas em tecidos embrionários e em processo de cicatrização recente. Essas fibras imaturas apresentam grande capacidade de ligação às porfirinas, constituindo um local para retenção e acúmulo do FS [4, 10, 11]. Outros fatores como a rede linfática, pouco desenvolvida, a ligação das porfirinas a lipoproteínas, a presença de macrófagos e o menor pH intracelular, também levam a uma maior concentração do fármaco em células neoplásicas [10, 11, 12].

Além destes fatores, acredita-se que diferenças existentes entre os tecidos neoplásicos e normais contribuam para esta distribuição seletiva. Dentre as propriedades que diferenciam o tecido tumoral do tecido normal pode se destacar [10]:

a) grande número de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (do inglês Low Density Lipoprotein, ou LDL): a captação do sensibilizador é controlada pela hidrofobicidade ou estado de agregação da droga. Sensibilizadores hidrofóbicos (tais como porfirinas ou ftalocianinas monossulfonadas) ou agregados de porfirina (tais como oligômeros de HpD) são transportados por lipoproteínas. Muitos tipos de células tumorais expressam um grande número de receptores de membrana para LDL devido à grande exigência de colesterol para a biossíntese de membrana [38];

b) presença de macrófagos [17, 22]: foi demonstrado que os macrófagos associados a tumores, captam grande quantidade de hematoporfirina e degradam a parte protéica. Os

macrófagos seriam de origem do próprio hospedeiro, em sua maioria, derivados dos monócitos da circulação sangüínea;

c) baixos valores de pH do fluido intersticial [17, 22, 39]: o fluido intersticial é o fluido que circula entre a membrana das células e as paredes dos vasos que irrigam os tecidos. O pH de tecidos tumorais é freqüentemente menor do que o de tecidos normais. No tecido tumoral a microvasculatura está bastante alterada e o fluxo sangüíneo reduzido; conseqüentemente, as células tumorais passam a utilizar a via anaeróbica e produzem grandes quantidades de ácido láctico, diminuindo o pH. O pH dos tecidos normais humanos se situa entre 7,2 e 7,4, enquanto que o pH de tecidos tumorais fica em torno de 6,77;

d) estrutura do estroma tumoral: caracterizado por um grande espaço intersticial, vasculatura interrompida, comprometimento da drenagem linfática, uma grande quantidade de colágeno novo e uma grande quantidade de lipídeos. Além disso, a membrana celular das células tumorais é mais hidrofóbica [17, 40, 41].

Há vários fotossensibilizadores de primeira geração aprovados e sendo utilizados em tratamentos clínicos. Entre eles podemos citar: Photofrin<sup>®</sup> (USA, Canadá), Photosan<sup>®</sup> (Alemanha), HPD<sup>®</sup> (China), Photogem<sup>®</sup> (Rússia), Derivado de Benzoporfirina (Canadá), ácido 5-aminolevulinico (ALA) (Europa e USA). O ALA não é um FS exógeno, mais sim um precursor de FS, pois ele atua nas células induzindo a produção de protoporfirina IX (banda de absorção centrada em 635 nm) [7]. Esta, durante a irradiação, provoca o efeito fotodinâmico nas células. Em geral o ALA é indicado para tumores superficiais de pele (aplicação tópica) e de brônquios (via inalação) [4, 17, 42]. Vários outros FSs estão sendo testados em experimentos com animais. Nestes FS's de segunda geração, o objetivo é obter compostos que sejam excitados com radiação em comprimentos de onda maiores (onde o tecido biológico absorve menos e, portanto a profundidade de penetração é maior), e que apresentem um período de eliminação mais curto [22, 43]. Entre eles encontramos as clorinas:

Photodithazine<sup>®</sup> e Radachlorin<sup>®</sup> (Rada - Pharma) da Rússia – Moscou e Foscan<sup>®</sup> do Reino Unido (Biolitec Pharma), estes FSs são porfirinas que apresentam forte banda de absorção na região entre 640-700 nm (luz vermelha), são encontradas em produtos naturais como a clorofila-a (presente em espécies de *Spirulina*). As clorinas apresentam duas importantes propriedades: alto rendimento quântico de formação do oxigênio singlete e intensa absorção em comprimentos de ondas comparativamente mais altos (650 – 680 nm).

### 6.1 – Porfirinas

As porfirinas compreendem uma classe muito importante de moléculas que estão presentes em muitos sistemas biológicos e têm sido amplamente utilizadas em TFD [44]. Como exemplo, podemos citar a Fe-porfirina (que corresponde a protoporfirina-IX), que constitui o sítio ativo de hemoproteínas, responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio na hemoglobina e mioglobina, respectivamente [44].

As porfirinas e seus derivados desempenham papéis vitais no funcionamento de muitos sistemas bioquímicos como a fotossíntese, a transferência de elétrons na cadeia respiratória, bem como o transporte e armazenamento de oxigênio. As porfirinas podem se ligar a metais formando diferentes complexos, como é o caso da formação do heme, quando esta se liga com o átomo de Fe<sup>++</sup> (Fe-porfirina) e formação da clorofila quando a porfirina se encontra coordenada com o magnésio (Mg-porfirina) [17, 22]. Estas duas porfirinas, a protoporfirina IX e a clorofila, são conhecidas como moléculas vitais, sendo responsáveis pela manutenção, em nível fisiológico, das principais formas de vida, tanto do mundo animal como do vegetal [17, 45].

As porfirinas são derivadas da porfina que contem quatro anéis pirrólicos ligados entre si por átomos de carbono, em um sistema altamente conjugado, diferindo entre si apenas quanto à posição dos seus substituintes no anel [17, 22]. Devido a este tipo de sistema

altamente conjugado, suas transições eletrônicas se encontram na faixa do visível e ultravioleta próximo. A figura 4 mostra a estrutura básica da porfirimina. Os quatro anéis pirrólicos são numerados pelos algarismos romanos de I a IV e os quatro carbonos das metinas (ou também posições meso) são identificados pelas letras  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  [17, 22].

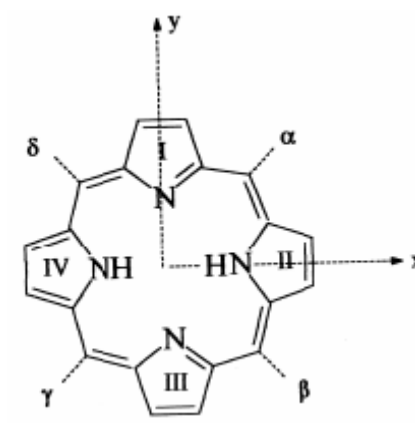


Figura 4 - Estrutura básica das porfirinas [17]

A molécula da hemoglobina é composta de quatro cadeias polipeptídicas ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$ ), unidas de forma não covalente, onde cada cadeia contém um grupo heme, contendo um átomo de  $\text{Fe}^{++}$ . Pode-se dizer que na hemoglobina existem quatro complexos heme-ferro (figura 5) [46].

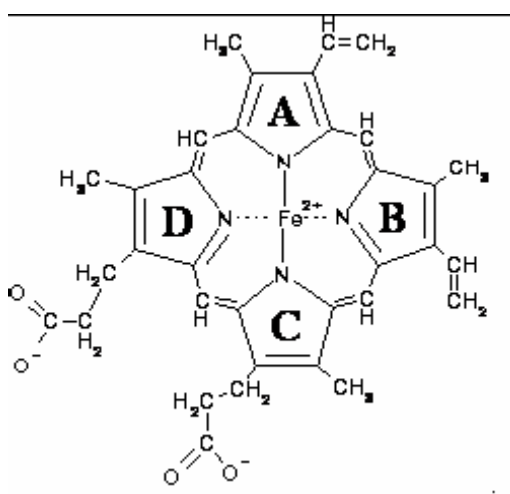


Figura 5 - Estrutura básica do heme [46].

## 6.2 - Fotossensibilizadores de primeira geração

### 6.2.1 - Photofrin<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup>

Os sensibilizadores mais utilizados, até o momento, em estudos clínicos, têm sido os derivados de hematoporfirina (do inglês, hematoporphyrin derivative, ou HpD), que são considerados fotossensibilizadores de primeira geração: Photofrin<sup>®</sup> (de origem norte – americana/canadense), Photosan<sup>®</sup> (de origem alemã) e Photogem<sup>®</sup> (de origem russa). Estes fotossensibilizadores consistem em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirina unidas por ligações éter ou éster [22, 47, 48]. Estes FSs são produzidos de acordo com a tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e de humanos, a partir de hematoporfirina IX (HpIX) existente na circulação sanguínea [7].

Estes FSs apresentam espectro de absorção eletrônica contendo cinco bandas de absorção, sendo uma banda intensa na região de 400 nm, conhecida como banda de Soret e quatro de menor intensidade em comprimentos de onda maiores, conhecidas como bandas-Q. Apesar de eficientes em quase todos os tipos de tumores, estes fotossensibilizadores não são considerados ideais, uma vez que apresentam elevada retenção cutânea, causando um efeito colateral indesejável que consiste na fotossensibilização cutânea do paciente que deve se proteger da exposição à luz solar ou luz brilhante por um período de 4 a 8 semanas, tempo de retenção do HpD na pele [22]. Outro fato importante é que a última banda de absorção destes fotossensibilizadores se encontra na faixa de 620-630 nm com baixo coeficiente de extinção. Deve-se salientar que neste comprimento de onda a penetração de luz nos tecidos não é ideal. Mesmo assim, a irradiação é feita em 630 nm devido a dois principais fatores: em 400 nm vários constituintes do tecido (dentre eles a hemoglobina) absorvem luz e em comprimentos de onda menores que 630 nm a penetração de luz nos tecidos é menor [22]. Estes fotossensibilizadores se apresentam como uma mistura complexa da qual não é possível isolar

um único constituinte; formam agregados em diferentes extensões e diferentes ambientes, o que resulta em alterações na eficácia terapêutica da medicação [22].

Devido a todos os fatores mencionados acima, atualmente existe um grande número de estudos dedicados à obtenção de novos fármacos, tão eficientes quanto os fotossensibilizadores de primeira geração, com cinética de eliminação mais rápida e com absorção de luz em comprimentos de onda maiores [17, 22].

### 6.3 - Fotossensibilizadores de segunda geração

Estes FSs são compostos quimicamente puros, que absorvem luz em comprimentos de onda maiores ou iguais a 650 nm e induzem pouca fotossensibilização cutânea.

A estrutura básica destes compostos é semelhante à das porfirinas. Esses FS's são divididos em diferentes classes: a) ftalocianinas e naftalocianinas, b) clorinas e bacterioclorinas, c) purpurinas [17, 22]

#### 6.3.1- Foscan<sup>®</sup>, Radachlorin<sup>®</sup>, Photodithazine<sup>®</sup>

As clorinas são porfirinas hidrofílicas reduzidas, que apresentam forte banda de absorção na região de 640-700nm (luz vermelha) [49]. Clorinas e bacterioclorinas são encontradas em produtos naturais. As clorinas são encontradas na clorofila-*a* (presente em algumas espécies de *Spirulina*) e as bacterioclorinas (figura 6a) podem ser encontradas em bactérias *Rhodobacter capsulatus* [19]. Vários derivados têm sido estudados, dentre eles a mono-aspartil-clorina-e<sub>6</sub> (Npe6) (figura 6b), que apresenta duas importantes propriedades: um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto (0,70) [49] e uma intensa absorção em comprimentos de onda maiores (650-680 nm) [50]. Algumas clorinas sintéticas também apresentam atividade biológica promissora, tais como a meso-tetrakis (m-hidroxifenil) clorina (m-THPC) e o derivado de benzoporfirina (BPDMA).

O Foscan<sup>®</sup>, uma 7,8-dihidro-5,10,15,20-tetra-(3-hidroxifenil) porfirina, é uma medicação originária do Reino Unido, pertence à classe das clorinas e comercialmente de Termoporphin. É uma droga totalmente sintética, análoga à meso-tetrafenilporfirina, um dos compostos modelos mais simples de porfirinas. Estudos demonstraram que a atividade fotodinâmica para TFD é mais acentuada com o *m*-THPC que com o Photofrin<sup>®</sup>. O *m*-THPC possui maior tempo de vida de estado tripleto (portanto, forma maior quantidade de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>), maior absortividade molar ( $\epsilon_{652} = 2,24 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ), maior hidrofobicidade (levando a uma maior incorporação celular), maior seletividade e pode ser excitado em um comprimento de onda maior (652 nm). Contudo, a fotossensibilidade na pele, causada pelo *m*-THPC, é apenas ligeiramente menor que aquela provocada pelo Photofrin<sup>®</sup>. Devido à sua hidrofobicidade, o *m*-THPC é formulado em polietilenoglicol 400 (PEG): etanol: água, (3:2:5, v:v:v) para usos clínicos. O formulado de Foscan<sup>®</sup>, um pré-dissolvido de *m*-THPC, usa propilenoglicol: etanol, (6:4, v:v) [51]. O Foscan apresenta uma importante banda de absorção centrada em 420 nm e quatro bandas menos intensas em 514, 542, 596 e 652 nm.

A Radachlorin<sup>®</sup> é uma medicação de origem russa, pertencente também à classe das clorinas; constituído de uma solução aquosa de três tipos de clorinas: clorina sódica e6 (90-95%), clorina sódica p6 (5- 7%) e uma terceira clorina não revelada (1-5%). Em relação às outras clorinas, o Radachlorina<sup>®</sup> é o mais avançado tipo de clorina e6 solúvel [52]. É um fotossensibilizador altamente seletivo, acumulando-se nas membranas das células neoplásicas e organelas (lisossomas e mitocôndrias) e utilizado na TFD, é ativado quando iluminado em  $662 \pm 5 \text{ nm}$  e altamente citotóxico. Este FS é facilmente dissolvido em água, sem formação de agregados e é uma molécula anfifílica, atravessando facilmente através da membrana plasmática das células. Apresenta alta eficiência fotodinâmica e uma das suas características é a ausência de citotoxicidade no escuro e rápida eliminação do organismo, não causando dano aos órgãos e tecidos, além da ausência de fotossensibilidade dérmica e ocular.

O Photodithazine<sup>®</sup> (PDZ) é uma medicação de origem russa, pertencente à classe das clorinas. O PDZ é obtido a partir de uma cianobactéria *Spirulina platensis* e sua estrutura foi modificada através da adição de N-metil-D-glicosamina 0,5% como um agente solubilizante e estabilizante [53].

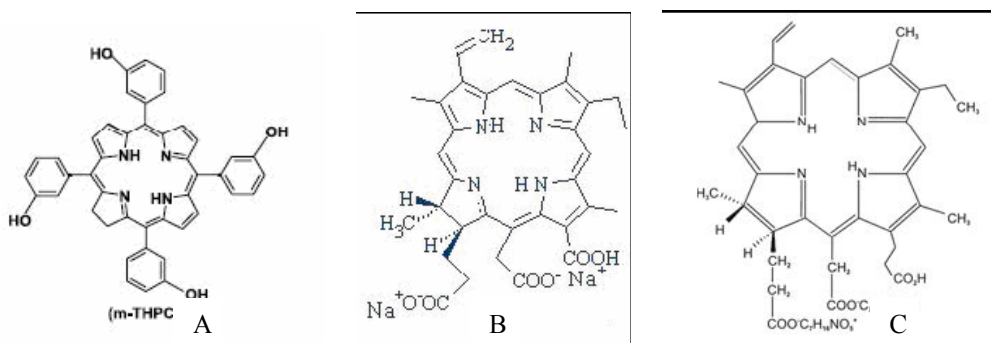


Figura. 6 - Estruturas químicas dos FSs: A - Foscan<sup>®</sup>; B - Radaclorina<sup>®</sup>; C - Photodithazine<sup>®</sup>

As propriedades fototóxicas têm sido estudadas na Rússia, e a alta eficácia fotodinâmica parece estar relacionada com a sua capacidade de penetrar nas células através das membranas biológicas. Estudos *in vivo* mostraram que este composto não apresenta toxicidade no escuro, exceto em concentrações muito elevadas [62, 99]. Além da vantagem em relação aos fotossensibilizadores de primeira geração, de absorver em comprimentos de onda maiores, o PDZ é eliminado rapidamente do organismo, sendo que 94% da eliminação ocorre em 24h e 98% em 48h [65, 99]. O PDZ é também mais estável ao armazenamento e apresenta uma absorção relativamente alta em 663 nm ( $\epsilon = 3,82 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## *II OBJETIVO*

---

**II - OBJETIVOS**

- Contribuir para o desenvolvimento da dosimetria;
- Estabelecer a dosimetria em Terapia Fotodinâmica para diferentes fotossensibilizadores utilizando diferentes parâmetros de iluminação (comprimento de onda, irradiância e fluência). Os resultados terão grande relevância para o entendimento da reação fotodinâmica e otimização da técnica já empregada clinicamente.

**1 - Fotodegradação**

- Estudar a fotodegradação de diferentes fotossensibilizadores em solução: porfirinas e clorinas;
- Analisar a fotoestabilidade e a fototransformação dos diferentes FSs;

**2 – Terapia Fotodinâmica e Morte Celular**

- Observar as diferentes farmacocinéticas, assim como a sua influência na TFD;
- Análise da profundidade de necrose induzida pela terapia fotodinâmica, utilizando diferentes fotossensibilizadores em fígado normal de ratos;
- Determinar o “threshold” (limiar de dose) para cada FS utilizando diferentes concentrações;

**3 - Correlação Entre a Fotoestabilidade e a Eficiência Fotodinâmica**

- Estabelecer uma correlação entre a fotodegradação em solução, com a profundidade de necrose, comparando entre si as diferentes porfirinas utilizadas (Photogem<sup>®</sup>, Photofrin<sup>®</sup> e Photosan<sup>®</sup>) e as diferentes clorinas utilizadas (Photoditazine<sup>®</sup>, Radachlorin<sup>®</sup> e Foscan<sup>®</sup>);
- Investigar a correlação entre limiar de dose e fotoestabilidade;
- Comparação da eficiência fotodinâmica dos diferentes fotossensibilizadores em função da resposta induzida no tecido hepático.

### *III FOTODEGRADAÇÃO*

---

### **III – FOTODEGRADAÇÃO**

#### **1 - Introdução**

A resistência dos corantes à fotodegradação é um tema que vem despertando interesse nos cientistas há décadas. O desaparecimento gradual dos corantes têxteis expostos à luz do dia foi descrito, inclusive, em crônicas romanas. Nos primeiros estudos sobre corantes, a luz do sol foi apontada como responsável pelo desaparecimento gradual de certos corantes têxteis. Os primeiros estudos sistemáticos em corantes sobre sua resistência ao ar e à luz solar foram realizados no início do século XVIII. No final do século XVIII, Seneiber e depois Bancroft [54] iniciaram a discussão sobre os mecanismos químicos envolvidos no “photofading”, e Bancroft sugeriu que os processos de fotoclareamento poderiam ser oxidativos ou redutivos. Outros estudos mostraram que a luz solar, a umidade e a quantidade de oxigênio têm um grande efeito na degradação de corantes têxteis. Desde então, houve progresso no entendimento do mecanismo da fotodegradação de corantes. Estes mecanismos não são simples e a natureza dos produtos da fotodegradação não têm sido frequentemente determinada. De maneira geral, o efeito acelerativo do oxigênio na fotodegradação foi reconhecido e foi sugerido que o oxigênio singlete e espécies associadas sejam responsáveis pelo “photofading” de certos corantes. O interesse na fotodegradação dos corantes e pigmentos em muitos campos, evoluiu através dos anos, com avanços tecnológicos e científicos. Atualmente, essas propriedades são relevantes em uma variedade de campos, incluindo as aplicações terapêuticas envolvendo corantes ou outras substâncias fotossensíveis. Com a utilização do laser em fotomedicina, ficou evidente a importância da fotodegradação de medicamentos terapêuticos, cujo meio de ação ocorre através da incidência de luz [23].

Na literatura, vários termos são empregados na degradação de corantes e pigmentos sob irradiação. Os mais frequentemente usados são “photofading”, e “photobleaching”. Em

fotoquímica e fotobiologia, o termo fotoclareamento (ou clareamento) é amplamente usado e é definido como a diminuição da absorção e intensidade de fluorescência do fotossensibilizador devido ao desaparecimento das estruturas responsáveis por eles, e pode ocorrer *in vitro* e *in vivo*, nos fluidos celulares do corpo, células e tecidos [22]. No entanto, a diminuição da absorbância e da intensidade de fluorescência não ocorrem necessariamente em paralelo [22]. Em sistemas biológicos existem substâncias que absorvem determinados comprimentos de onda, seja para proteção ou para desempenhar suas funções no organismo. Essas substâncias são cromóforos, como exemplo, em vegetais encontramos a clorofila e nos mamíferos a hemoglobina.

Segundo Bonett [54, 55] existem dois tipos irreversíveis de fotodegradação que levam a mudanças fotoquímicas em cromóforos:

1. Fotomodificação: quando a diminuição na intensidade de absorção e emissão de fluorescência ocorrem em alguns comprimentos de onda, mas o cromóforo é mantido em uma forma modificada como mostra a reação 1, com a diminuição da intensidade dos picos de absorção do espectro original e o surgimento de uma nova banda de absorção.



A formação de protoporfirinas isoméricas A e B e a foto-oxidação de séries de etiopurpurina dos fotossensibilizadores em TFD são exemplos deste processo. A fotomodificação redutiva é encontrada em fotoreações de hematoporfirina, onde é evidenciada a formação de clorinas [22, 54, 55].

2. Fotoclareamento verdadeiro: quando as mudanças químicas são profundas e resultam em fragmentos pequenos que não têm mais uma absorção apreciável na região do visível, como mostra a reação 2. A amostra torna-se essencialmente incolor.



Estes fragmentos têm sido comumente identificados: a fotooxidação de bilirrubinas (que ocorre em um dos caminhos da fototerapia neonatal), provém de um exemplo onde as estruturas dos produtos pouco coloridos são conhecidas. Deste modo, pode-se afirmar que quando ocorre fotomodificação, freqüentemente ocorre o fotocclareamento, sendo que o caminho para a fotomodificação ou fotocclareamento pode ser muito variado [22, 54, 55]. Fotoadição e fotoisomerização podem ser acompanhadas pela quebra de cromóforos e processos com transferência de elétrons podem levar à formação de bandas amplas deslocadas para o vermelho, embora essas mudanças possam, freqüentemente, ser reversíveis. Fotoredução irreversível pode ocorrer na irradiação na presença de um agente redutor. Por exemplo, a fotoredução de porfirinas ocorre pela adição de hidrogênio em sítios *meso*,  $\beta$  e nitrogênios, dependendo das condições [23, 54].

Em TFD, a maioria dos estudos da fotodegradação mostra a necessidade do oxigênio, sendo este um processo oxidativo envolvendo o oxigênio singlete ou radicais de espécies reativas de oxigênio. Em solução, fica evidente a obtenção de oxigênio singlete e, fotoquimicamente, o oxigênio singlete é um reagente valioso em síntese química. Em sistemas vivos existe uma grande dificuldade em estabelecer a natureza do mediador. Alguns estudos indicam que a fotodegradação do PHOTOFRIN<sup>®</sup> e da protoporfirina são intermediados via oxigênio singlete [23, 56].

Juntamente com a fotodegradação ocorre a formação de fotoprodutos, evidenciada pela diminuição da intensidade de absorção do fotossensibilizador durante a iluminação, acompanhada do aparecimento de uma nova banda de absorção [22].

Quanto ao princípio da fotoestabilidade, os fotossensibilizadores comportam-se diferentemente uns dos outros em relação à fotodegradação, apresentando-se estáveis ou

instáveis (pela maior ou menor resistência à fotodegradação, respectivamente) frente à iluminação [57]. Em relação à fotodegradação, os fotossensibilizadores utilizados em TFD podem apresentar vantagens e desvantagens, visto que a destruição do tumor pode não ser completa caso o fotossensibilizador sofra rápida fotodegradação durante a iluminação [54, 56, 57].

Esta alta taxa de fotodegradação pode ser corrigida pela diminuição da irradiação de luz, seguida de múltiplas sessões de irradiação, levando as células neoplásicas à necrose [58].

De acordo com a formação dos fotoprodutos em decorrência da fotodegradação, o fotossensibilizador estável pode vir a sofrer reduzida fotodegradação (ou mesmo nenhuma), bem como um fotossensibilizador de baixa fotoestabilidade pode sofrer uma fotodegradação total, não gerando, em ambos os casos, fotoprodutos [57, 58]. A relevância deste efeito reside no fato de que para o desenvolvimento de padrão de dosagem de luz (dosimetria) em TFD durante a iluminação, faz-se necessário bom entendimento do efeito causado por esta degradação [50].

Quando tumores e células fotossensibilizados são expostos à luz de comprimento de onda adequado, são observadas mudanças no espectro de fluorescência da porfirina, que se manifesta como um decaimento na intensidade de emissão. Existem três possíveis explicações para estas modificações: (a) a fotodestruição do macrociclo da porfirina, resultando na diminuição da absorção e da fluorescência; (b) modificações químicas fotoinduzidas nas porfirinas, mantendo o macrociclo da porfirina intacto; (c) deslocamento fotoinduzido da porfirina para localizações diferentes nas células [22, 23].

Em TFD, os sensibilizadores estão tipicamente presentes em altas concentrações nas células tumorais e ao redor das células normais [5, 6]. Desta forma, a fotodegradação dos fotossensibilizadores em taxas apropriadas durante a iluminação na TFD, pode vir a diminuir a concentração destes fotossensibilizadores nos tecidos normais, levando a uma diminuição da

fitotoxicidade, enquanto que quantidade suficiente de fotossensibilizador pode persistir nas células tumorais para posterior fotodestruição, resultando em menor dano para o tecido normal [58, 60]. Deste modo, verifica-se que a fotodegradação dos fotossensibilizadores é o elo fundamental da distribuição da dose de luz nos fluidos biológicos, estando relacionado com a cinética de eliminação do fotossensibilizador do organismo [57].

## **2 - Materiais e Método**

### **2.1 – Preparação dos Fotossensibilizadores**

#### **2.1.1 - Photogem<sup>®</sup>, Photofrin<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup>, Foscan<sup>®</sup>, Radachlorin<sup>®</sup> e Photodithazine<sup>®</sup>**

As soluções dos derivados de hematoporfirina (Photogem<sup>®</sup>, Photofrin<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup>) e soluções de clorinas (Foscan<sup>®</sup>, Radachlorin<sup>®</sup> e Photodithazine<sup>®</sup>) foram diluídas em água destilada na concentração de 17µg/ml, sendo o oxigênio mantido constante na concentração atmosférica. As soluções foram colocadas em cubetas plásticas e irradiadas com dispositivo à base de LEDs, em diferentes intensidades de luz e em diferentes comprimentos de onda. A tabela abaixo descreve os parâmetros utilizados.

Tabela II – Parâmetros de comprimento de onda (nm) e intensidade (mW/cm<sup>2</sup>) utilizados na iluminação dos FSs.

<b>Comprimento de onda</b>	<b>Intensidade (mW/cm<sup>2</sup>)</b>			
<b>λ (nm)</b>				
400	24	44	64	74
470	48	96	158	188
527	61,2	98,6	122	152
590	50,6	69,2	84	100
630	57,2	154,6	230	352

## 2.2 - Fonte de Luz

Um dispositivo à base de LEDs (diodos emissores de luz) para iluminação das soluções em cubetas foi desenvolvido no LIEPO do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos - USP (IFSC). O sistema montado permite a iluminação simultânea de quatro cubetas de lado 1x1x1 cm. Para iluminação de cada cubeta, dois arranjos planos de LEDs (*Norlux* – USA) foram afixados em duas placas distantes (figura 7). Essa distância foi determinada para a obtenção da intensidade luminosa a mais uniforme possível, ao longo do caminho óptico da cubeta. Cinco conjuntos de LEDs com bandas de emissão ao redor de 630, 590, 527, 470 e 400 nm foram utilizados, de maneira a corresponderem às bandas de absorção dos fotossensibilizadores investigados neste estudo (figura 7).

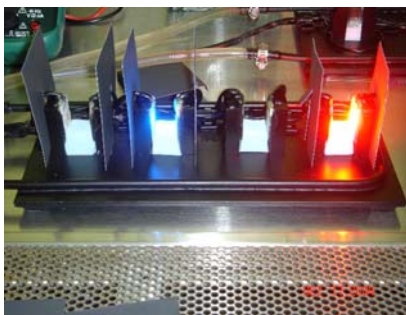


Figura 7 - Dispositivo à base de LEDs, desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos - USP (IFSC)

Cada sistema de iluminação é composto por dois LEDs planos, cada um composto por um emissor central, de frente um para o outro, todos com intensidades variadas (figura 8). Uma idéia importante sobre a geometria é que a intensidade de luz entre os dois emissores é basicamente constante. Os dois arranjos de emissores juntos, e de frente um para o outro, permitiu que a soma de todos os emissores resultasse em uma intensidade constante, uma vez que o espaçamento entre os dois arranjos não é maior que o tamanho do próprio arranjo. Diferentes grupos de arranjo de LEDs foram preparados, abrangendo as principais bandas de absorção das porfirinas e clorinas. A banda de emissão de cada sistema apresenta meia largura máxima de 15 nm. O sistema é alimentado por uma fonte externa que possibilita a variação de

corrente elétrica. A caracterização da intensidade em função da corrente elétrica para cada par de LEDs foi realizada para 4 níveis. Variando a corrente de cada grupo, foi possível variar a intensidade total.

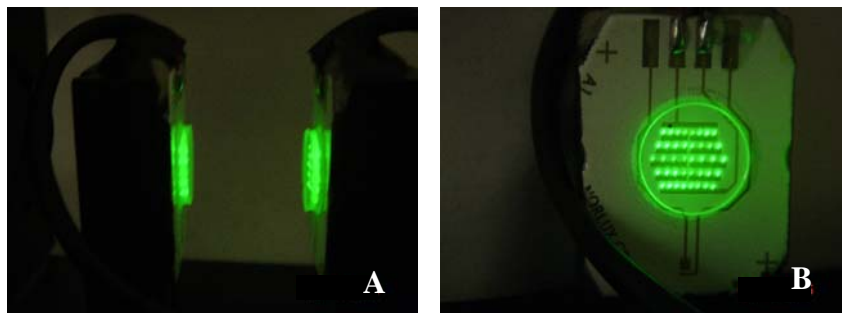


Figura 8 - Sistema de iluminação em detalhes, os arranjos de LEDs planos um de frente para o outro (A); composto por 40 emissores individuais distribuídos em 1,2 cm de diâmetro (B).

A fotodegradação das porfirinas e clorinas foi monitorada através da evolução temporal dos espectros de fluorescência com excitação em 532 nm.

As soluções foram colocadas em cubetas plásticas ou de quartzo (400 nm) em um volume de 1 cm<sup>3</sup>. As cubetas foram simetricamente iluminadas por um dispositivo à base de LEDs (figura 9).

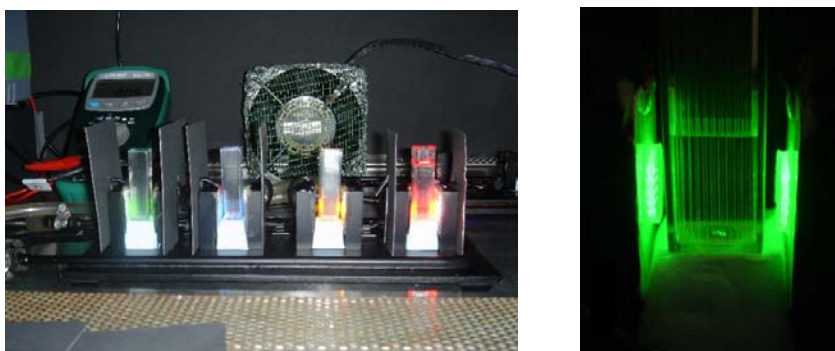


Figura 9 - Sistema de iluminação à base LEDs, cubetas simetricamente iluminadas contendo os fotossensibilizadores em solução. Dois arranjos de LEDs utilizados para o sistema de iluminação produzem uma zona uniforme de intensidade de luz.

### 2.3 - Sistema de Detecção Óptica

O aparato experimental utilizado para a leitura de fluorescência é composto por um laser de excitação (442 nm ou 532 nm), monocromador, computador com o programa de aquisição LightView e uma fibra do tipo Y (figura 10). O laser de excitação, acoplado à fibra óptica, é entregue à superfície a ser analisada, enquanto a fibra deve ser mantida em contato com o substrato e o mais perpendicularmente possível (figura 11). A outra extremidade da fibra é conectada ao monocromador, levando a luz coletada do tecido. A fibra Y é composta por uma fibra central, que leva a luz de excitação, e seis fibras periféricas coletoras da luz emitida pelo substrato avaliado. O monocromador está conectado ao computador e o programa LightView fornece os resultados obtidos da intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Neste trabalho, o laser de excitação utilizado foi no comprimento de onda de 532 nm, na região do verde do espectro eletromagnético.

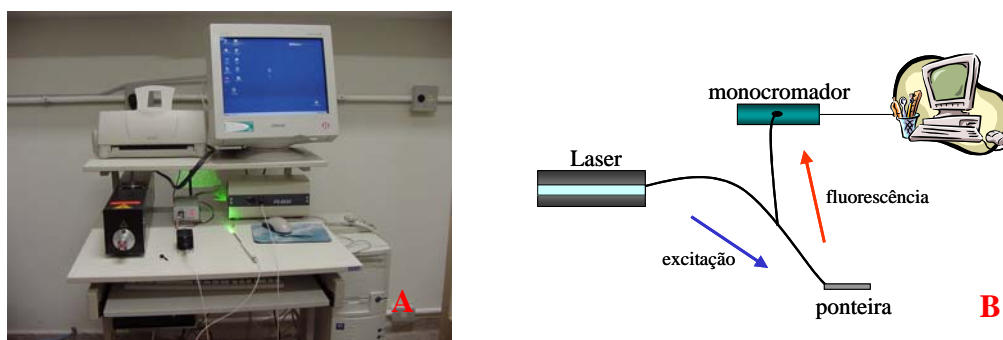


Figura 10 – Foto do Sistema de Diagnóstico (A) e desenho esquemático das partes constituintes (B)

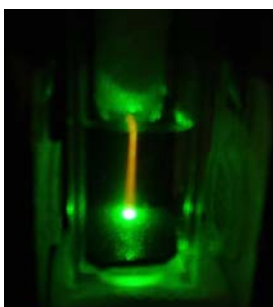
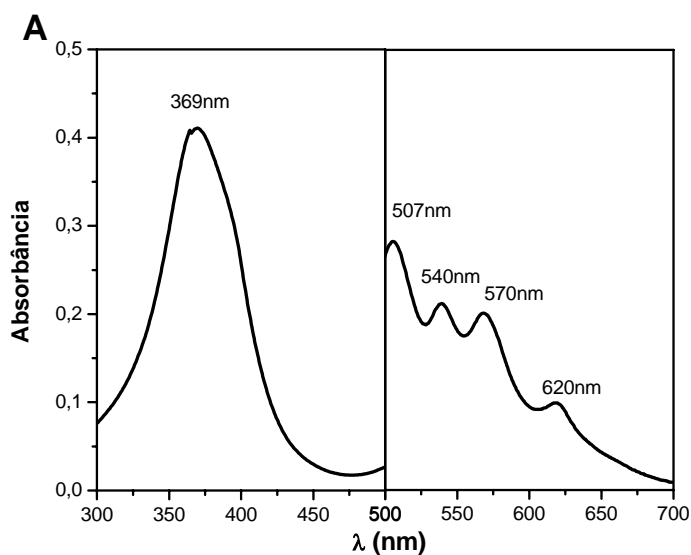


Figura 11 – Detecção da fluorescência. A fibra óptica foi inserida dentro da cubeta contendo o FS diluído e os espectros foram coletados.

### 3 – Resultado e Discussão

Os espectros de absorção dos 6 diferentes fotossensibilizadores, derivados de hematoporfirina (HpDs) e clorinas, FSs de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> gerações diluídos em água são apresentados nas figuras 12 e 13. A figura 12 apresenta os gráficos de absorbância dos HpDs, onde pode-se observar, uma banda de absorção de maior intensidade, para as porfirinas, ao redor de 370 nm, o que corresponde a banda de Soret e 4 bandas Q (em torno de 507, 540, 570, 620 nm) que são espectros típicos das porfirinas [85, 86]. Photofrin, Photogem e Photosan apresentam bandas espectrais de absorção similares, na região do ultra - violeta e no visível. A banda de maior intensidade (Soret) ocorre entre 350 e 400 nm e as quatro bandas distintas ocorrem entre 500 e 630 nm. A última banda de  $\lambda$  620 nm constitui o interesse neste trabalho. A razão disto é que quanto maior o comprimento de onda ( $\lambda$ ) maior a penetração da luz no tecido.



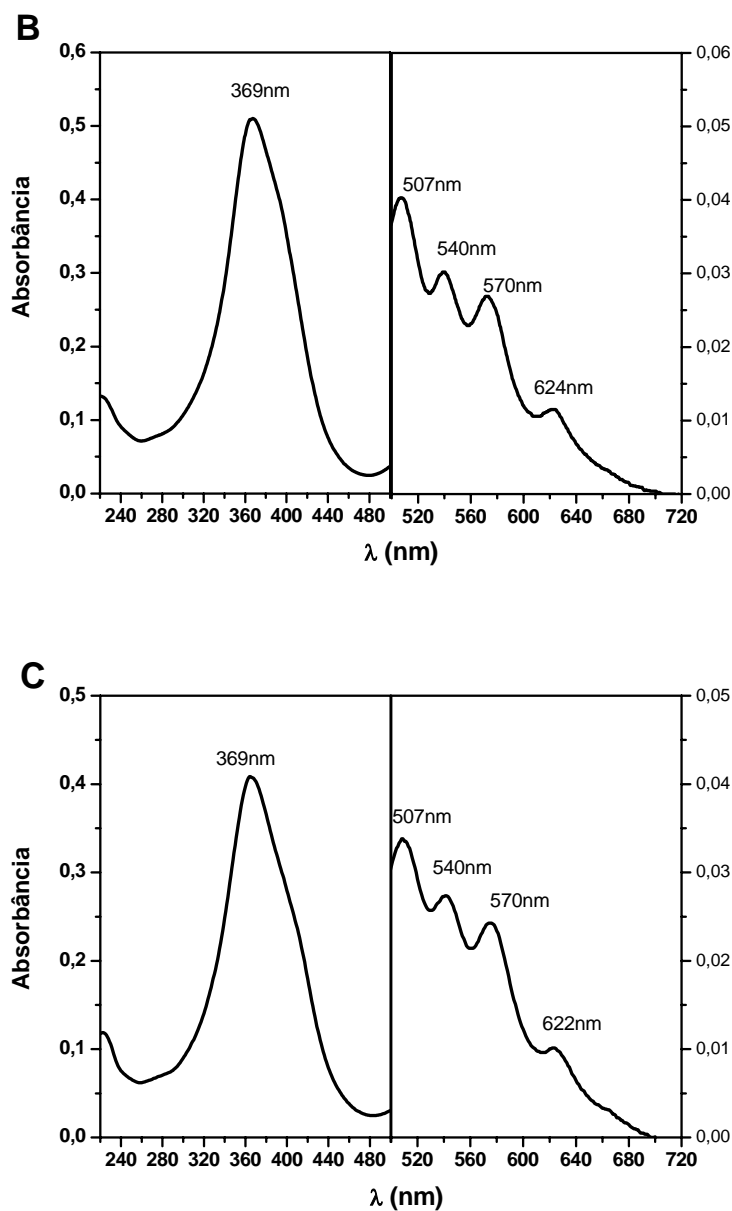


Figura 12 – Espectros de absorção para as 3 porfirinas na concentração de 17 mg/l. A – Photogem. B – Photofrin. C – Photosan. Cubeta com 0,5 cm.

Analisando os espectros de absorção não se verificam diferenças, no entanto os espectros são similares e não idênticos. Já na espectroscopia de fluorescência observa-se que o PG é 2,4 vezes maior PF e 18,9 vezes maior que PS.

A figura 13 apresenta os espectros de fluorescência em solução dos derivados HpDs com excitação em 532 nm, onde se observam 2 picos de emissão de fluorescência bem estabelecidos em 610 nm e 670 nm, sendo o primeiro mais intenso.

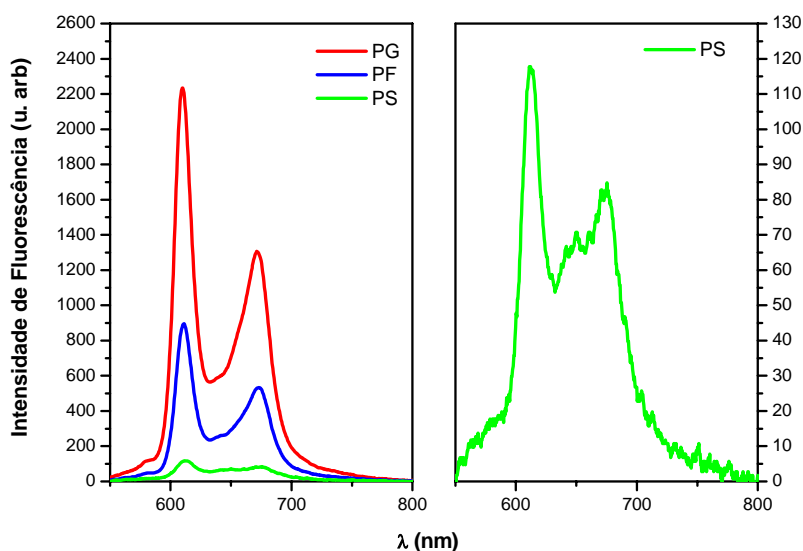


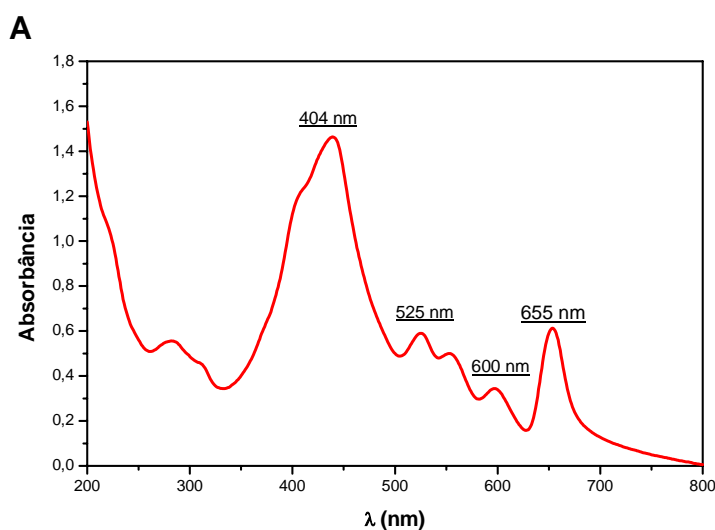
Figura 13 – Espectros de fluorescência dos três derivados de hematoporfirina. (PG) - Photogem; (PF) – Photofrin; (PS) – Photosan. À direita ampliação do espectro de emissão do Photosan.

O Photogem tem espécies monoméricas a oligoméricas na proporção de (17% de monômeros, 22% de dímeros e 61% de oligômeros) contra (14% de monômeros, 19% de dímeros e 67% de oligômeros) do Photofrin [123]. De acordo com a Pharmacopeia, o Photogem apresenta maior facilidade para ser dissolvido em água, 0.9% de solução isotônica de cloridato de sódio e praticamente insolúvel em 95% de álcool e clorofórmio [113]. Tem sido descrito como quimicamente, fotofisicamente, como o Photofrin, apresentando também características idênticas para diagnóstico e terapia [47, 91, 113, 116, 124]. O Photosan de acordo com a literatura é mais fotoestável do que o Photofrin, devido à maior proporção de agregados do que espécies monoméricas e esta composição pode resultar numa baixa

fotosensibilidade dérmica [125]. Esta distribuição de monômeros, dímeros e oligômeros para cada FS podem resultar em diferentes fotopropriedades que podem interferir na ação fotodinâmica [125].

As clorinas são porfirinas reduzidas e apresentam mudanças espectrais em relação às mesmas, como deslocamento das bandas para o vermelho e aumento da intensidade de absorção. Na figura 14 observa-se o espectro de absorção de maior intensidade para as clorinas, onde se encontra uma maior banda ao redor de 400 nm, correspondendo à banda de Soret (banda B) e 3 bandas Q em torno de 500 a 700 nm [95], diferentemente das porfirinas as quais apresentam 4 bandas Q. Foscan, Photodithazine e Radachlorin apresentam bandas do espectro de absorção similares. A banda de maior intensidade (Soret) ocorre entre 400 e 450 nm, e 3 bandas distintas entre 500, 600 e 700 nm, estão presentes para os comprimentos de onda de interesse neste trabalho.

As vantagens das clorinas na TFD, em relação às porfirinas, são muitas. Uma delas é a absorção das clorinas em comprimentos de ondas maiores que os HpDs, uma vez que a luz penetra mais em tecidos biológicos tanto mais próximos da região do infra – vermelho esteja.



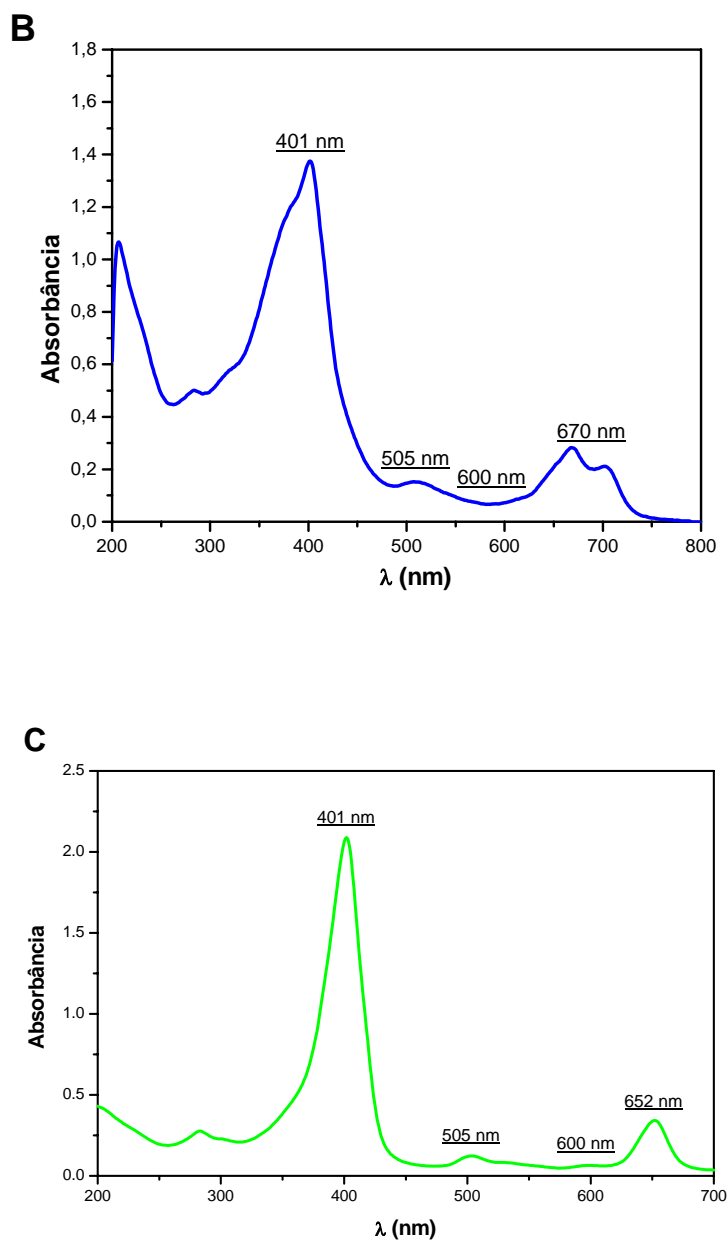


Figura 14 – Espectro de absorção das 3 clorinas na concentração de 17 mg/l. A – Foscan; B – Photodithazine; C – Radachlorin.

A figura 15 apresenta os espectros de fluorescência das clorinas com excitação em 532 nm, onde se observa somente 1 pico de emissão de fluorescência bem estabelecido ao redor de 650 nm.

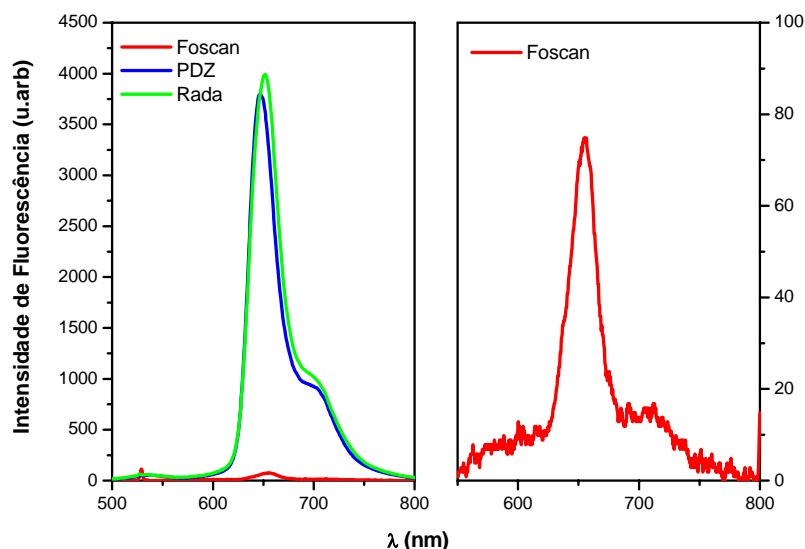


Figura 15 – Espectros de fluorescência das três clorinas. (FOS) Foscan; (PDZ) - Photodithazine; (RADA) – Radachlorin. À direita ampliação do espectro de emissão do Foscan.

Analisando os espectros de fluorescência das clorinas, observa - se que o PDZ e a RADA apresentam espectros semelhantes e são cerca de 52 vezes maior que o FOS.

A figura 16 apresenta as amplitudes da fluorescência em função da concentração do Photogem. Observa-se que a concentração utilizada foi de 17 mg/l e os agregados presentes na solução não interferiram nas medidas [87, 95], devido a encontrar-se na região de linearidade. As amplitudes dos picos de fluorescência são proporcionais à concentração das porfirinas e das clorinas, e a variação da amplitude (utilizando dispositivos à base de LEDs) está associada à variação das características ópticas das moléculas fotodegradadas. Neste trabalho, utilizou-se a amplitude das bandas de fluorescência como medida indireta da concentração das moléculas dos FSs em solução.

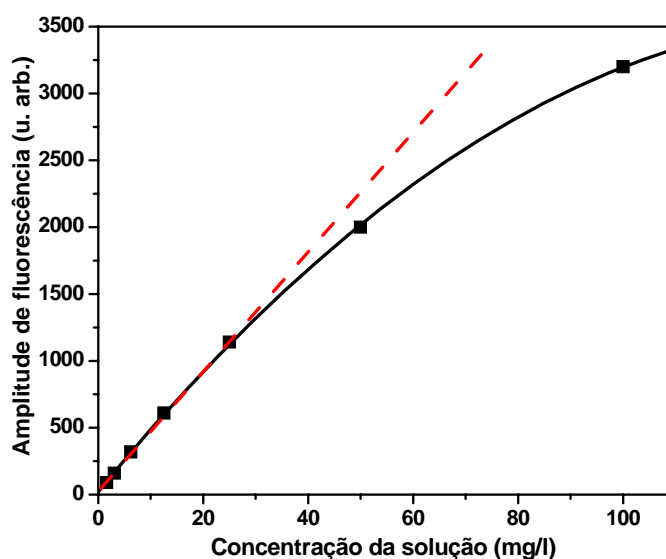


Figura 16 – Amplitude de fluorescência na banda 610 nm em função da concentração do Photogem.

O desvio a partir do comportamento linear começa a ser notado somente a partir de 30mg/l. Para concentrações mais baixas, a fluorescência pode ser diretamente associada com a densidade das moléculas ativas.

As figuras 17 e 18 apresentam espectros de fluorescência típicos do Photogem e do Photodithazine, em solução, após diferentes períodos de iluminação no comprimento de onda de 630 nm. O Photofrin e o Photosan apresentam o mesmo comportamento espectral que o Photogem. Para as clorinas, no entanto, o comportamento varia de acordo com o FS utilizado. Nota-se uma diminuição da amplitude de fluorescência no decorrer da iluminação, principalmente no comprimento de onda em 630 nm. O Foscan apresenta uma degradação mais lenta quando comparado ao PDZ e à RADA. Dependendo do comprimento de onda utilizado, bem como da intensidade, observa-se uma brusca diminuição das amplitudes de fluorescência, indicando degradação, além da formação de outras bandas. Essa diferença entre as clorinas ocorre devido à agregação das moléculas. Desta forma, pode-se dizer que a agregação da RADA é menor que a do PDZ, que por sua vez é menor que a agregação do Foscan. O estado de agregação dos FSs reduz drasticamente a capacidade do composto de

gerar oxigênio singlete. Isto porque os agregados em solução provocam a diminuição do tempo de vida dos estados singlete e tripleto do FS, resultando na diminuição do rendimento quântico do oxigênio singlete, o que diminui a eficiência fotodinâmica do FS. Desse modo, é necessário que o princípio fotoativo se apresente solubilizado e na forma monomérica [51, 97, 98, 99], desta forma os FSs devem apresentar um maior predomínio de espécies monoméricas do que espécies agregadas.

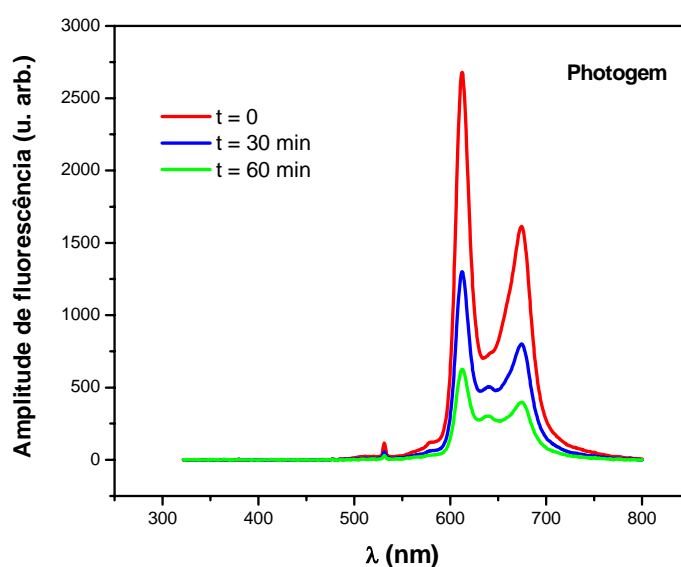


Figura 17 - Espectro de fluorescência típico do PG, em solução excitado em 532 nm.

Os 2 picos de fluorescência caracterizam bem os HpDs. A figura 17 mostra a fluorescência inicial, seguida de diferentes tempos de iluminação. A diminuição da amplitude está associada com a degradação da massa ativa das moléculas.

No decorrer da iluminação das porfirinas, uma nova banda em 640 nm é formada, e relacionada aos fotoprodutos relatados e discutidos por Rotomskis et al. [56] e por trabalhos do nosso grupo [75, 88, 89]. Observa-se na figura 19, a variação da concentração do FS (fluorescência medida) em função do tempo para o PG, onde diferentes comprimentos de onda de iluminação foram utilizados. A mesma análise realizada para o PG foi realizada para o PF e PS.

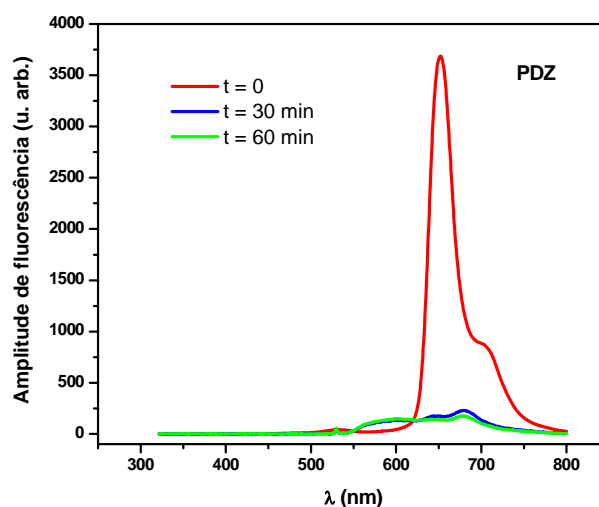


Figura 18 - Espectro de fluorescência típico do PDZ em solução excitado em 532 nm. São mostradas as fluorescências iniciais seguidas de diferentes tempos de iluminação. A diminuição da amplitude está associada à degradação da massa ativa das moléculas.

Durante a iluminação das clorinas (figura 18), observou-se a diminuição da intensidade de fluorescência, seguida da formação de uma nova banda, sugerindo transformações químicas que levam à formação de fotoprodutos. De acordo com Corrêa [99], quando o PDZ é irradiado em 488, 514 e 630 nm, há uma diminuição da intensidade de absorção da banda de Soret (em 401 nm) e das bandas Q, em torno de 505, 600 e 655 nm, seguida do aparecimento de uma nova banda em 668 nm [99].

Estudos descritos na literatura da fotodegradação de vários FSs como HpDs, clorinas e ftalocianinas, mostraram que a clorina  $e_6$  é a menos fotoestável [53, 54, 55, 57, 58, 61, 99]. Tem sido sugerido que um dos possíveis mecanismos da foto-oxidação da clorina  $e_6$  envolve o ataque do oxigênio à unidade de dieno, uma reação que tem sido investigada com detalhes para a protoporfirina IX, considerado um FS muito fotolábil. A clorina  $e_6$  contém um substituinte vinil o qual pode ser suscetível à foto-oxidação. Vários trabalhos estudaram HpDs, clorinas e ftalocianinas para verificar a eficiência da formação de fotoprodutos que absorvem na região do vermelho do espectro eletromagnético e não observaram a formação

de fotoprodutos para a clorina  $e_6$ . Para fotossensibilizadores como HpDs, a eficiência da formação de fotoprodutos está correlacionada com a eficiência do “photobleaching” [57, 99].

Segundo Rotomskis et al. [100] e Bonnet et al. [54], podem ocorrer mudanças espectrais devido à formação fotoinduzida das porfirinas com ou sem quebra do macrociclo. É descrito que a quebra do macrociclo implica no aparecimento de uma banda na região do UV após a irradiação e, ainda, que o não rompimento do macrociclo leva à uma diminuição da absorbância da banda de Soret e da banda Q, associada ao surgimento de uma nova banda Q [54, 55, 101, 102]. Segundo Corrêa, a exposição das clorinas à luz em 488, 514 e 630 nm não causou ruptura do anel, mas apenas provocou a formação de fotoprodutos do tipo bacterioclorinas (absorção em 660 nm) [99]. No caso do PG a degradação induzida causou a diminuição da absorção da banda de Soret e nas bandas Q, e o surgimento de uma nova banda em 640 nm [99], sugerindo que o fotoproduto seja uma clorina que absorve em maior comprimento de onda [54, 99, 100, 103].

Nas figuras 19 e 20 observa-se o decaimento da fluorescência em diferentes tempos de iluminação e em diferentes comprimentos de onda para o PG e para o PDZ, respectivamente.

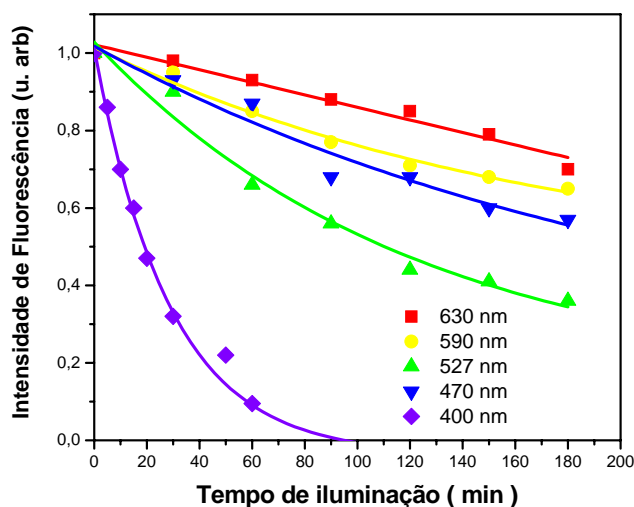


Figura 19 – Decaimento da fluorescência em função do tempo de iluminação em diferentes comprimentos de onda para o PG. Os níveis de intensidade de todas as fontes foram de 50 mW/cm<sup>2</sup>, exceto em 400 nm o qual foi utilizado 10 mW/cm<sup>2</sup>. As linhas sólidas representam o decaimento exponencial dos dados tratados.

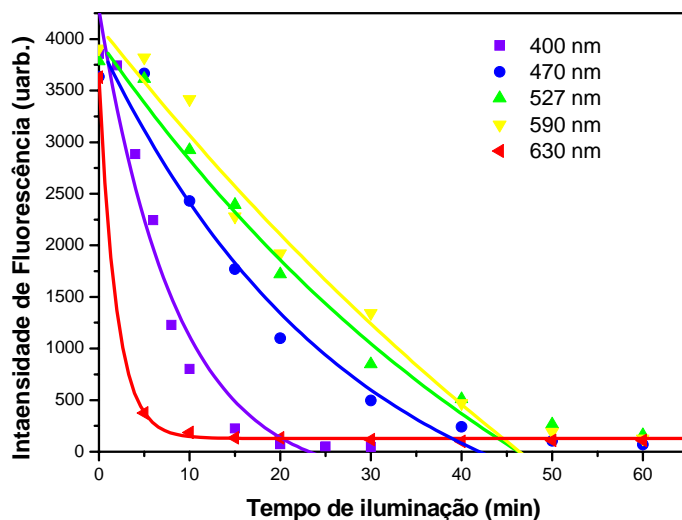


Figura 20 - Decaimento da fluorescência em função do tempo de iluminação em diferentes comprimentos de onda para o PDZ. As linhas sólidas representam o decaimento exponencial dos dados tratados.

As modificações das fotopropriedades podem, também, ser confirmadas pela variação do espectro de absorção (figuras 12 e 14) onde é possível observar que as bandas de absorção para os FSs (PG, PF, PS; FOS, PDZ e RADA) presentes, apresentam comportamentos similares. Diferentes intensidades ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) foram utilizadas para diferentes comprimentos de onda, permitindo a observação dos efeitos das diferentes fluências na fotodegradadas. Assumiu-se que a taxa de moléculas fotodegradadas é proporcional à concentração em cada instante dos FSs. Este resultado está dentro da lei do decaimento exponencial com relação à concentração dos FSs em função do tempo

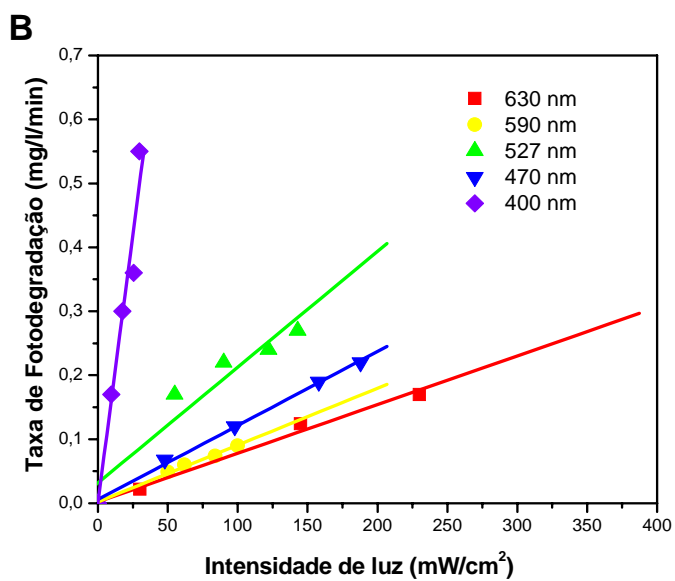
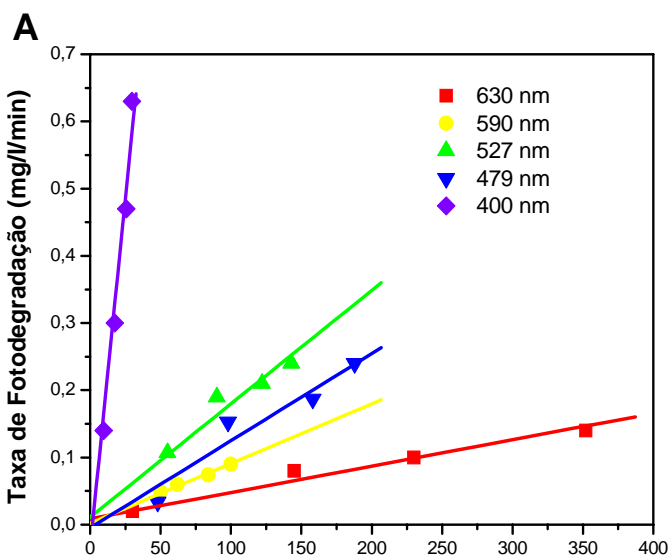
$$C(t) = C_0 \exp\left(-t/\tau\right) \quad (1)$$

Ajustando o decaimento exponencial aos dados, obteve-se a taxa inicial do decaimento como

$$\left|\frac{dc}{dt}\right|_{t=0} = C_0/\tau \quad (2)$$

onde  $C_0$  é a concentração inicial e  $\tau$  é o tempo característico de decaimento  $1/e$  durante a iluminação, determinado pelo ajuste dos dados. Utilizou-se a massa molar da concentração de moléculas ativas, devido, principalmente, à dificuldade em expressar o peso molecular destes FSs, pois, normalmente, são uma mistura complexa de monômeros, dímeros e oligômeros que podem variar substancialmente.

Através do decaimento da fluorescência em função do tempo de iluminação para cada FS irradiado em diferentes comprimentos de onda, é possível obter a taxa de fotodegradação para cada FS, apresentada nas figuras 21 e 22.



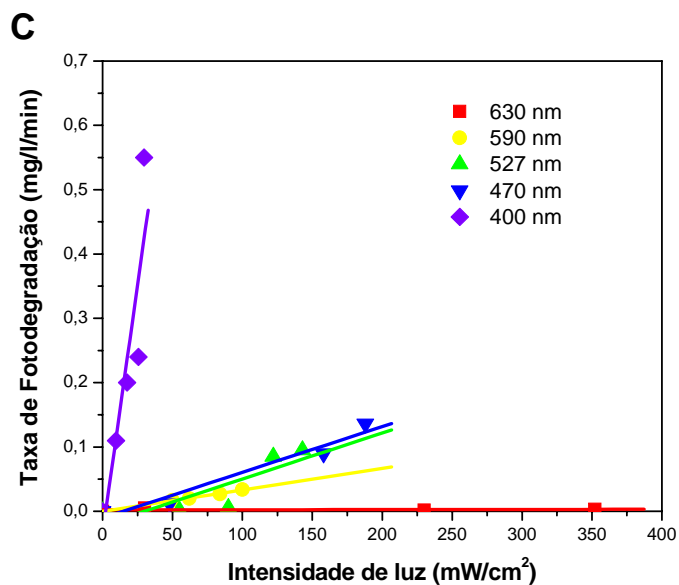
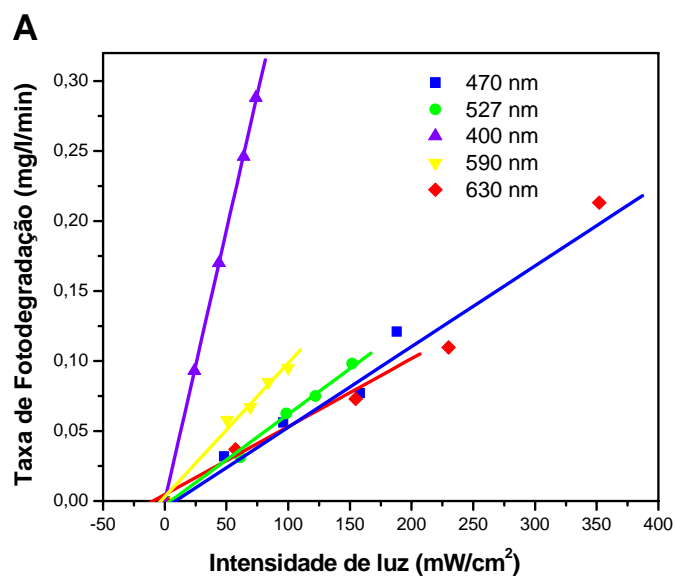


Figura 21 – Taxa da fotodegradação para o (A) Photogem<sup>®</sup>, (B) Photofrin<sup>®</sup> e (C) Photosan<sup>®</sup> em função da intensidade de iluminação para todos os comprimentos de onda utilizados.



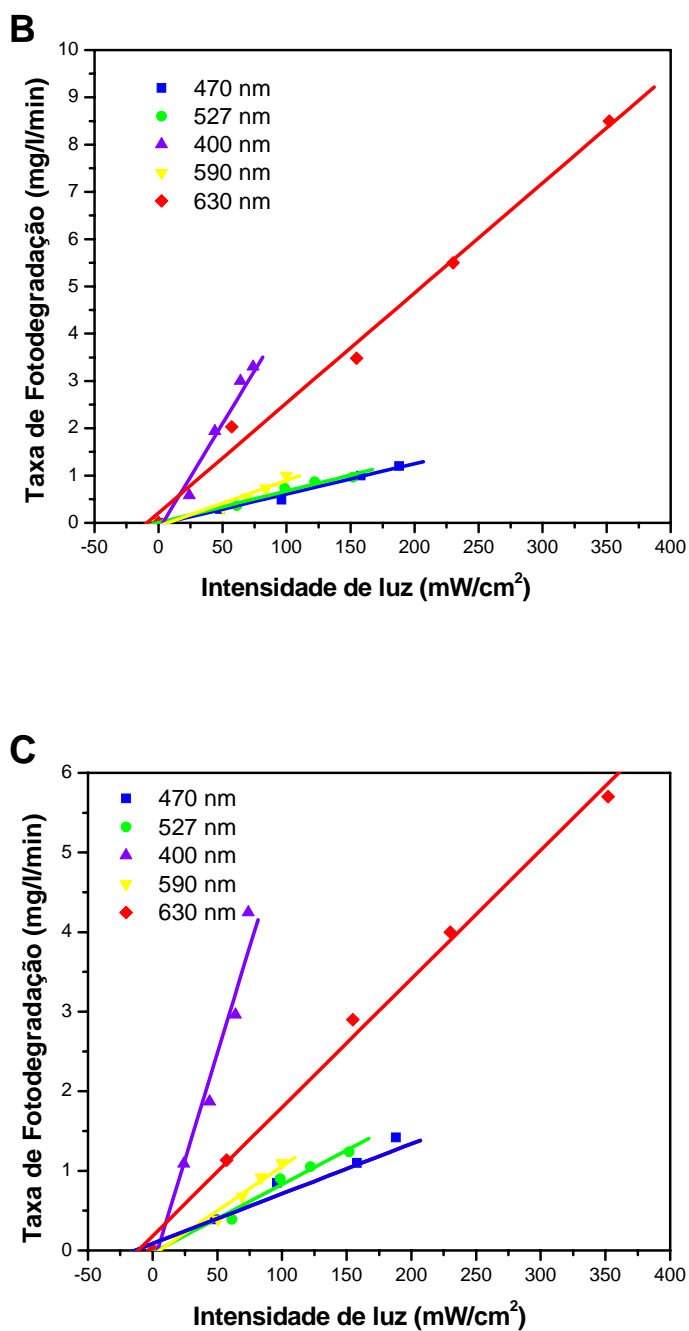


Figura 22 – Taxa da fotodegradação para o (A) Foscan<sup>®</sup>, (B) Photodithazine<sup>®</sup> e (C) Radachlorin<sup>®</sup> em função da intensidade de iluminação para todos os comprimentos de onda utilizados.

A linearidade da taxa de fotodegradação com a intensidade é um indicativo de que a fotodegradação depende principalmente da fluência (produto da intensidade de iluminação e

do tempo) entregue ao sistema e do comprimento de onda utilizado e não da taxa de fluência em si. Determinou-se a quantidade da taxa de fotodegradação por  $\text{mW}/\text{cm}^2$  de luz.

$$\alpha = \frac{(dc/dt)_{t=0}}{I}$$

O valor de  $\alpha$ , caracteriza a quantidade de moléculas, expressas em massa, que são degradadas por unidade de tempo, para cada  $1\text{mW}/\text{cm}^2$  de intensidade de luz utilizada para a iluminação do FS em solução. Esta quantidade de moléculas ( $\alpha$ ) é dependente da absorção de cada comprimento de onda específico usado na iluminação. Compensando as diferentes absorções, definiu-se uma nova quantidade, a qual chamou-se parâmetro de fotoestabilidade ( $\eta$ ).

$$\eta = \frac{(\text{Fração de luz absorvida}) \times (\text{número de fótons}/\text{mW})}{\alpha} \quad (3)$$

A fração de luz absorvida é determinada através de uma medida de absorção em uma cubeta para cada comprimento de onda usado. Uma análise semelhante foi realizada com os dados presentes nas figuras 12 e 14. Os resultados de  $\eta$  para PG, PF e PS estão representados na figura 23 e para as clorinas na figura 24. Estes parâmetros são descritos fisicamente, como o número efetivo de fótons necessários a serem absorvidos pela molécula em solução para promover a fotodegradação de  $1\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , demonstrando a diminuição da estabilidade do FS. Nota-se, obedecendo aos valores médios, que: PF e PG ( $\eta \cong 10$ ) < PS ( $\eta \cong 40$ ), expressos em  $10^{18}$  fótons  $\times \text{cm}^3/\mu\text{g}$ , mostrando que a taxa de fotodegradação para PF e PG é cerca de 4 vezes menor que a taxa do PS. Para as clorinas, obtiveram-se os seguintes valores médios: Radachlorin ( $\eta \cong 6$ ) < PDZ ( $\eta \cong 9$ ) < Foscan ( $\eta \cong 30$ ) também expressos em  $10^{18}$  fótons  $\times \text{cm}^3/\mu\text{g}$ , mostrando que a taxa de fotodegradação do Foscan é aproximadamente 3,33 vezes a taxa do PDZ e 5 vezes a taxa da Radachlorin e a taxa de degradação do PDZ é cerca de 1,5 vezes a taxa de degradação da Radachlorin. Deduziu-se que o baixo valor de  $\eta$  significa que

maior quantidade de fotossensibilizador será facilmente fotodegradado, tendo consequências importantes para o efeito fotodinâmico final. A diferença da taxa de fotodegradação para o PS e para o Foscan pode ser explicada de acordo com a literatura, pela alta proporção de agregados em solução, inibindo o processo foto – oxidativo causado pela interação com o oxigênio, impedindo a formação do oxigênio singleto que é o maior responsável pelo dano no tecido. O principal mecanismo da fotodegradação envolve a produção de oxigênio reativo e, portanto, o valor observado de  $\eta$  deve depender da concentração do oxigênio em solução. Neste estudo, a concentração do oxigênio permaneceu fixo. Rotomskis et al [57] mostra que o PF é menos susceptível à fotodegradação do que o PS. Nossos resultados sugerem a situação oposta com o PS sendo menos susceptível a fotodegradação do que o PF. Spikes [61] mostrou que a forma monomérica do PF parece ser mais susceptível à fotodegradação do que agregados com alto peso molecular. Visto que o PS apresenta uma alta concentração de oligômeros pesados, comparado com o PF ou PG, isto pode justificar a alta fotoestabilidade do PS em solução.

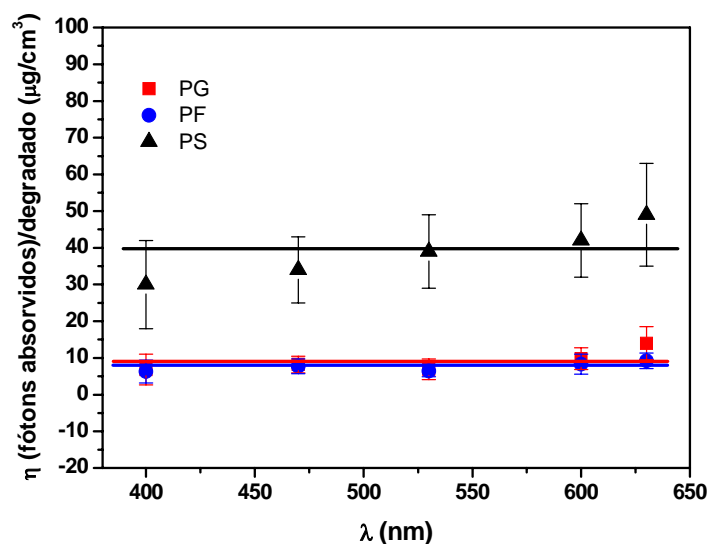


Figura 23 – Parâmetro de fotoestabilidade para as 3 porfirinas (PG, PF e PS).

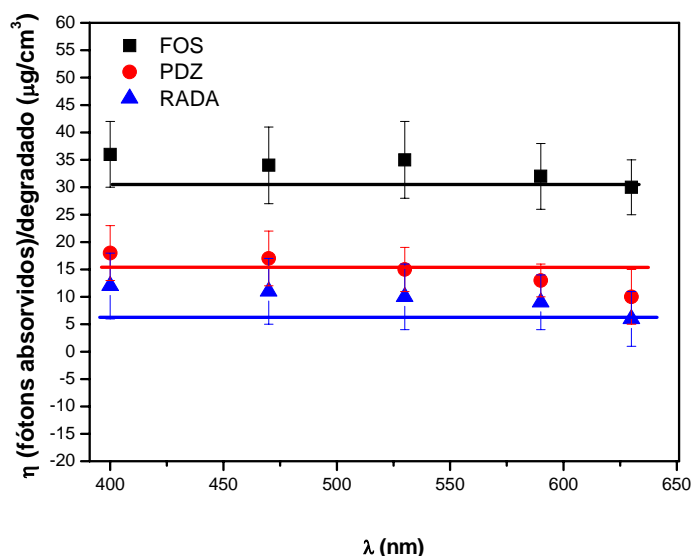


Figura 24 - Parâmetro de fotoestabilidade para as 3 clorinas (FOS, PDZ e RADA).

Porfirinas e derivados de hematoporfirinas em solução aquosa, de acordo com a literatura [53, 54, 55, 61], apresentam um equilíbrio entre os agregados e as espécies monoméricas. Concentrações de FSs usados aqui exibem bandas de absorção e fluorescência em 370 e 610 nm, respectivamente. Na presença de detergentes não-iônicos (surfactante) que mimetiza a membrana celular ou em baixa concentração de FS em solução, ocorre um deslocamento destas bandas para 400 e 625 nm, respectivamente. Este deslocamento indica uma maior proporção de espécies monoméricas em solução, apresentando maior intensidade de fluorescência [90, 91, 92]. Em outro estudo realizado em nosso grupo, foi observado que o estado agregado é maior para o PS do que para o PF e PG, visto que a presença do surfactante na solução do FS leva à desagregação de moléculas, visualizada pelo aumento da fluorescência de 50 vezes para o PS, de aproximadamente 16 vezes para o PF e 6 vezes para o PG.

Segundo Corrêa, o PDZ em solução, quando irradiado, apresentou um deslocamento da última banda (10 nm). Já, na presença de surfactante, diminuiu a intensidade de absorção da fluorescência, o que não ocorreu para o PG. Pode-se dizer que no caso dos derivados de

HpD, a presença de surfactante leva à dissolução dos agregados (maior predomínio de espécies monoméricas); já as clorinas, que apresentam um predomínio de espécies monoméricas na presença de surfactante, ocorre a agregação (diminuição da intensidade de absorção e fluorescência); o mesmo pode-se notar para o FOS e para a RADA [45, 99].

A relevância do conceito de fototransformação na baixa atividade fotodinâmica como resultado da fotodegradação está bem estabelecido [56, 61, 88, 93].

A comparação da fotoestabilidade de diferentes fotossensibilizadores precisa ser feita com cautela. Uma alta mudança espectroscópica não é necessariamente prejudicial. De fato, há fortes razões para acreditar que entre o PG, o PF e o PS, bem como entre o FOS, o PDZ e a RADA, o fotossensibilizador mais fotoestável tem menor poder de causar dano celular [75, 88, 89, 94]. Observou-se que, conforme a  $\eta$  decresce, a  $IC_{50}$  (concentração do FS necessária para promover a morte de 50% das células), medida em cultura celular HEP-2 e iluminada com luz em 630 nm, decresce, indicando uma maior fototoxicidade [75]. A correlação direta entre a fotoestabilidade e a eficácia fotodinâmica foi mostrada em outros trabalhos [75]. Seria interessante expressar o  $\eta$  em termo dos fótons absorvidos por molécula degradada, mas a falta de conhecimento do peso molecular dificulta fazê-lo.

#### **4 – Conclusões**

Através do estudo do estabelecimento de um parâmetro que permite avaliar a fotoestabilidade, pode-se concluir que:

1. Quanto maior o  $\eta$  (número de fótons absorvidos), maior a fotoestabilidade, ou seja, o baixo valor de  $\eta$  significa que uma maior quantidade de fotossensibilizador será facilmente fotodegradação, necessitando de menor quantidade de energia;
2. Uma alta taxa de fotodegradação não implica em um menor rendimento quântico para produção do oxigênio singleto, como esperado;

3. Entre os derivados de hematoporfirinas, pode-se observar que a taxa de fotodegradação para o PG é igual a taxa do PF;
4. O PS apresenta maior fotoestabilidade, indicando grande quantidade de agregados e necessita desta forma, de um maior número de fótons para que ocorra a fotodegradação;
5. Para os FSs à base de clorinas, nota-se um alto  $\eta$  para o FOS e grande quantidade de agregados, bem como baixos valores para PDZ e RADA. O FOS mostrou-se como o FS mais estável entre as clorinas, apresentando lenta fotodegradação.

*IV TERAPIA FOTODINÂMICA E  
MORTE CELULAR*

---

---

*IV - TERAPIA FOTODINÂMICA E MORTE CELULAR***1 – Farmacocinética**

É o estudo da velocidade com que os fármacos atingem o sítio de ação e são eliminados do organismo, bem como dos diferentes fatores que influenciam na quantidade de fármaco a atingir o seu sítio. Basicamente, estuda os processos metabólicos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos fármacos [23].

A localização de medicamentos administrados em seres vivos é extremamente importante, pois possibilita a otimização dos procedimentos terapêuticos adotados nos tratamentos. Uma das técnicas utilizadas para o estudo da farmacocinética é a espectroscopia de fluorescência. Desde que a utilização da espectroscopia de absorção é limitada pela não homogeneidade do sistema investigado, a espectroscopia de fluorescência vem sendo aplicada em estudos fotobiológicos de suspensão de células e em sistemas vivos. Se ambos os comprimentos de onda, de excitação e emissão, dos componentes do sistema em estudo ocorrem em regiões de maiores frequências na região do visível do espectro de radiação eletromagnética, então é possível usar a espectroscopia de fluorescência como uma técnica de investigação - não somente na superfície da amostra, mas em partes internas do sistema vivo. As variáveis que são frequentemente monitoradas em espectroscopia de fluorescência são a intensidade, em um comprimento de onda ou por todo espectro de emissão, e o tempo de vida das espécies emitidas [23].

A espectroscopia de fluorescência é muito usada para detecção, quantificação e localização da posição das espécies emissoras, visto que medidas do tempo de vida do estado excitado estão normalmente relacionadas à reatividade do agente fotossensibilizador. Alguns fluorímetros foram desenvolvidos para registrar espectros de fluorescência de tecidos vivos sensibilizados. Contudo, deve-se registrar inicialmente, a fluorescência natural dos tecidos

vivos em estudo. Vários trabalhos têm mostrado que a fluorescência da porfirina observada *in vivo* é semelhante à observada *in vitro*, em condições preparadas com surfactantes ou proteínas. A fonte da fluorescência observada *in vivo* é frequentemente distribuída em vários tecidos e órgãos de uma maneira heterogênea. Embora a concentração do fármaco em um tecido possa facilmente ser correlacionada com a intensidade de fluorescência observada em um tecido extraído, no modelo *in vivo* é bem mais difícil a correlação da fluorescência com a concentração do fármaco. A concentração absoluta de um sensibilizador é difícil de ser calculada por medidas de fluorescências *in vivo*. Entretanto, a técnica é bem adaptada para monitorar a dinâmica de distribuição do sensibilizador assim que ele é introduzido no ser vivo. Tal método tem duas vantagens: a de ter respostas mais rápidas que o método de extração do fármaco dos tecidos, e a do conjunto completo de dados farmacológicos ser obtido de uma simples amostra viva [23].

A farmacocinética é muito importante para o estudo da dosimetria em TFD, através da determinação do DLI (“drug light interval”), ou seja, do intervalo entre a administração do FS e a iluminação da lesão, já que a quantidade de fármaco na neoplasia terá grande influência na resposta final induzida. Cada FS apresenta uma farmacocinética, bem como o DLI ótimo, variando para cada tipo de órgão (localização anatômica), assim como a identificação individual, dadas as variações inter-pacientes.

## **2 – Morte Celular**

A morte celular é definida como a perda irreversível das atividades integradas da célula com conseqüente incapacidade de manutenção de seus mecanismos de homeostasia, isto é, de equilíbrio da célula com seu meio.

A partir do momento da morte celular, após uma agressão, havendo incapacidade irreversível de retorno à integridade bioquímica, funcional e morfológica, a célula passa a

desencadear uma série de fenômenos bioquímicos e, conseqüentemente, funcionais e morfológicos. A essa seqüência de fenômenos que ocorrem após a morte celular, denomina-se necrose celular.

Um conhecimento completo dos mecanismos envolvidos na TFD pode conduzir à melhor eficácia terapêutica. Tanto estudos *in vitro* quanto *in vivo* mostraram o envolvimento de um processo apoptótico e necrótico durante a morte celular, mediada pela TFD. Estudos realizados por Dahle et al. [63] mostraram diferenças significativas no tipo de morte celular, isto é, necrose/apoptose, em relação a diferentes densidades celulares tratadas com moderadas doses de TFD.

A TFD é baseada na incorporação das moléculas do fotossensibilizador na neoplasia e na destruição das mesmas, após a excitação com a luz. O estresse oxidativo e a indução da formação das espécies reativas do oxigênio (ERO) são fatores que iniciam a morte celular apoptótica ou necrótica na TFD.

A apoptose é um processo pelo qual uma única célula é levada à morte com ausência de resposta inflamatória. Células apoptóticas apresentam núcleo pequeno e fragmentado e corpos de cromatina condensados; como resultado final há a fragmentação do DNA nuclear [64].

Necrose é uma forma patológica de morte celular que é caracterizada por células edemaciadas, floculação de cromatina, perda rápida da integridade da membrana e rápida lise da célula. [65].

Na terapia fotodinâmica, a morte celular/necrose tecidual, é o resultado que se quer atingir, e este pode ser empregado para avaliar o sucesso ou não da terapia.

### **3 – Materiais e Método**

#### **3.1 - Animais**

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



Figura 25 – Alojamento dos animais montado no Laboratório de Biofotônica no IFSC – USP/São Carlos.

#### **3.2 - Fotossensibilizador**

Os fotossensibilizadores (FS) utilizados foram os derivados de hematoporfirina (HpD), FSs de primeira geração: Photogem<sup>®</sup>, Photofrin<sup>®</sup> e Photosan<sup>®</sup>, e fotossensibilizadores à base de clorinas, FSs de segunda geração: Photodithazine<sup>®</sup>, Radachlorin<sup>®</sup> e Foscan<sup>®</sup>. Todos os fotossensibilizadores foram diluídos em solução estéril de cloreto de sódio (0.9%) nas

concentrações recomendadas pelos fabricantes. Os FSs foram protegidos da luz e mantidos à temperatura de  $-4^{\circ}$ . Prepararam-se os HpDs a partir de uma solução estoque de 5 mg/ml, e as clorinas a partir de 5 mg/ml para o PDZ, 0.5 mg/ml para a RADA e 4 mg/ml para o Foscan<sup>®</sup>.

### **3.3 - Fonte De Luz**

A região do espectro eletromagnético de emissão da fonte de luz para TFD foi escolhida levando em consideração as bandas de absorção dos FS's e a profundidade de penetração da luz nos tecidos biológicos. Os lasers utilizados para TFD são: laser de corante bombeado por um laser de argônio (com potência em torno de 3 W), que permite ampla variação de comprimento de onda, o que significa ampla gama de atuação, com praticamente todos os FS's existentes ou os que foram desenvolvidos; laser de diodo com potência em torno de 2 W; este sistema tem a limitação de operar em apenas um comprimento de onda, não possuindo flexibilidade de ajuste de acordo com a medicação a ser utilizada.

Para a aplicação da TFD foram utilizadas duas fontes de luz: 1<sup>o</sup> - laser de Diodo Ceralas 630 Ceramoptec<sup>®</sup>, Alemanha, que produz até 2 W de potência óptica no comprimento de onda de 630 nm, adequado para excitação dos derivados de HpD, que foi acoplado à uma fibra óptica para iluminação direta; 2<sup>o</sup> - o laser de Diodo Eagle Heron 660 Quantum Tech<sup>®</sup> que produz até 2 W de potência óptica no comprimento de onda de 660 nm, adequado para a excitação das clorinas, também acoplado a uma fibra óptica para iluminação direta (figura 26).

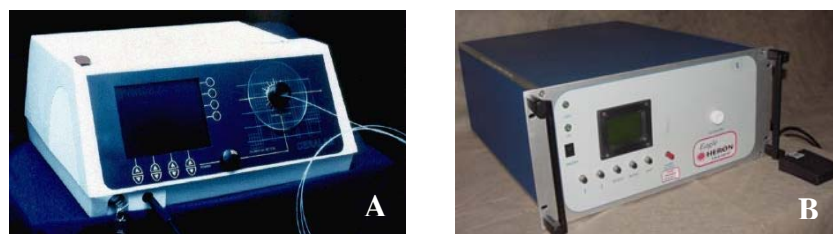


Figura 26 – Fontes de luz utilizadas para a TFD. Laser de Diodo em 630 nm utilizado para as porfirinas (A) e Laser de Diodo em 660 nm próprio para as clorinas (B).

### **3.4 - Sistema de Detecção Óptica**

O aparato experimental utilizado para a leitura da autofluorescência é composto por um laser de excitação no comprimento de onda de 442nm ou 532nm, monocromador, computador (Cluster – Rússia) com um programa de aquisição (LightView - Med<sup>®</sup> - lightview. Exe.) e uma fibra do tipo Y (figura 27). O laser de excitação, acoplado à fibra óptica, é entregue à superfície do tecido a ser analisada. A fibra deve ser mantida em contato com o tecido e o mais perpendicularmente possível. A outra extremidade da fibra é conectada ao monocromador e, levando a luz coletada do tecido. A fibra Y é composta por uma fibra central, que conduz a luz de excitação ao tecido, e seis fibras concêntricas coletoras da luz emitida pelo tecido avaliado. O monocromador está conectado ao computador e o programa LightView<sup>®</sup> fornece os resultados obtidos da intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Neste trabalho, o laser de excitação utilizado foi no comprimento de onda de 532 nm, na região do verde do espectro eletromagnético.

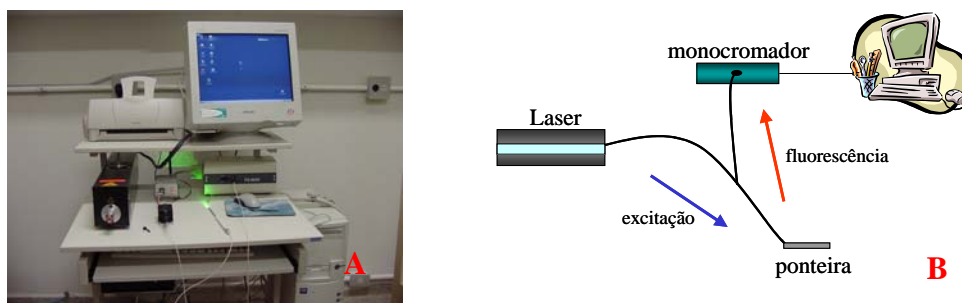


Figura 27 - Foto do Sistema de Diagnóstico (A) e desenho esquemático das partes constituintes (B)

### **4 - Estudo da Farmacocinética**

Foram utilizados 12 animais para a realização deste experimento, divididos em 6 grupos, cada um com 2 animais. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas, tendo livre acesso à água. Em seguida foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução estéril de *Cloridato de Ketamina a 5%* (Vetanarcol<sup>®</sup> - Konig), na dose de 0.08 ml/100g de massa corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e

sedativo de *Xilazina* 2 g (Coopazine<sup>®</sup> - Coopers), na dose de 0.04 ml/100g. Foi realizada uma incisão mediana, o lobo direito do fígado foi retirado da cavidade abdominal e isolado com gaze de algodão embebida em soro fisiológico.

Os FSs foram diluídos em soro fisiológico 0.9%. Os animais foram fotossensibilizados por injeção endovenosa, através da veia cava. Três grupos, cada um com 2 animais, foram fotossensibilizados com os diferentes derivados de hematoporfirina nas concentrações 2.0 mg/kg e a fluorescência acompanhada durante 24 horas. Os outros três grupos, também com 2 animais cada, foram fotossensibilizados com as diferentes clorinas, sendo que a concentração utilizada para o Foscan foi de 0.3 mg/kg e a concentração utilizada para o PDZ e Radaclorina foi de 1.0 mg/kg e a fluorescência para as clorinas também foi acompanhada durante 24 h. Este estudo foi realizado para determinar o tempo ótimo entre a injeção do FS e o intervalo de iluminação.

A medida da fluorescência foi realizada em vários intervalos de tempo. Primeiramente foram coletados espectros da autofluorescência do fígado. Após a administração do FS, foram realizadas medidas nos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min, e após este período, as medidas foram realizadas de hora em hora. Utilizou-se o laser Nd:YAG dobrado em 532 nm para excitação do tecido alvo. Em cada tempo da investigação, foram realizadas 5 leituras, para obtenção dos valores médios. A extremidade de leitura da sonda, protegida com filme de PVC, foi posicionada em contato e o mais perpendicularmente possível à superfície do lobo hepático.

## **5 - Estudo da necrose hepática pós TFD**

O mesmo procedimento foi utilizado para a preparação dos animais e para a preparação dos FSs (ver item 4).

**1ª Etapa:** Na primeira etapa do estudo, o intervalo de tempo entre a injeção dos FSs e a iluminação foram fixados para todos os derivados de hematoporfirina. Utilizaram-se 27 animais para realização deste experimento, divididos em 9 grupos com 3 animais. Os animais foram fotossensibilizados com derivados de hematoporfirina por injeção endovenosa, através da veia cava, nas concentrações de 1.0, 1.5 e 2.0 mg/kg e iluminados, após o período de tempo de 30 min, com laser de diodo de 630 nm, com doses de 100, 150 e 200 J/cm<sup>2</sup>, 200 mW de potência e com intensidade de 250 mW/cm<sup>2</sup>, durante 400, 600 e 800 s, respectivamente.

**2ª Etapa:** Na segunda etapa do estudo, o intervalo de tempo entre a injeção dos FSs e a iluminação foram variados de acordo com o estudo da farmacocinética. Foram utilizados 147 animais para realização deste experimento, divididos em 49 grupos com 3 animais. Vinte e quatro grupos, cada um com 3 animais, foram fotossensibilizados com os diferentes derivados de hematoporfirina nas concentrações de 1.0 e 2.0 mg/kg, e iluminados após o período de tempo pré-determinado (PG – 30 min, PF – 2 h e PS – 12 h) com laser de diodo de 630 nm, com doses de 20, 50, 100 e 200 J/cm<sup>2</sup>, 200 mW de potência e com intensidade de 250 mW/cm<sup>2</sup>, durante 80, 200, 400 e 800 s, respectivamente. Vinte e cinco grupos, cada um com 3 animais, foram fotossensibilizados com as diferentes clorinas. As concentrações utilizadas para o Foscan foram 0.1, 0.2 e 0.3 mg/kg, utilizou-se estas concentrações devido a alta toxicidade deste FS e os animais foram iluminados com doses de 10, 20 e 30 J/cm<sup>2</sup>, 100 mW de potência e com intensidade de 127 mW/cm<sup>2</sup>, durante 79, 158 e 237 s. As concentrações utilizadas para o PDZ e Radachlorina foram 0.5 e 1.0 mg/kg, e com doses de iluminação de 10, 50, 100 e 200 J/cm<sup>2</sup>, 157 mW de potência e intensidade de 200 mW/cm<sup>2</sup>, durante 100, 250,

500 e 1000 s. As iluminações ocorreram após um período pré-determinado (Foscan - 9 h, PDZ - 1h e 30 min e Radachlorina – 7 h).

O diâmetro irradiado foi de 1.0 cm. Para proteção do restante do lobo, foi feita uma máscara de papel alumínio envolta por gaze com um orifício de 1.0 cm de diâmetro; esta máscara evitou a iluminação das demais áreas e delimitou a área desejada. Após a iluminação, os animais foram suturados e mantidos no alojamento do laboratório até a próxima etapa.

Após 30 horas do tratamento, os animais foram anestesiados e o fígado retirado da cavidade abdominal. Os animais anestesiados foram mortos por administração excessiva de anestésico; o lobo direito do fígado foi removido da cavidade abdominal e a área necrosada cortada em fatias de aproximadamente 1mm de espessura com o auxílio de um bisturi. As fatias foram colocadas em frascos plásticos contendo uma solução de formaldeído a 40% (Formol - Merck®) misturada a uma solução tampão de monofosfato de sódio hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  - Merck®) e difosfato de sódio hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - Merck®), diluídos em água destilada, durante 24 horas para fixação do material; após este período, o material foi colocado em solução de álcool 70% e levado ao Departamento de Patologia de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP para preparação de lâminas histológicas.

### **5.1 - Análise microscópica**

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

## **5.2 - Morfometria do Tecido Hepático**

Nas mesmas preparações histológicas usadas no estudo da microscopia óptica, foi analisado morfometricamente o epitélio hepático alterado, medindo-se a profundidade de necrose, a distância entre o tecido necrosado e o tecido normal. As medidas foram obtidas com uma ocular micrométrica de 2 aumentos (2x) Zeiss Kpl em microscópio de rotina Zeiss RA-18. Para calibração da ocular foi utilizada uma lâmina micrométrica, calculando-se a distância em micra entre 2 traços consecutivos na ocular (M) pela fórmula abaixo [66].

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

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

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

c = constante (10 micra)

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

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

## **6 – Resultados e Discussão**

### **6.1 – Estudo da farmacocinética**

Utilizando a técnica de fluorescência, foram realizados experimentos para determinação do tempo ótimo entre a injeção dos FSs e a iluminação. Através da análise dos espectros de fluorescência obtidos, foi possível determinar, indiretamente, a concentração dos

FSs no fígado [7, 23, 76]. As intensidades dos espectros variaram no decorrer do tempo, mostrando o tempo de maior acúmulo dos FSs no tecido hepático. A consideração inicial é que a quantidade de luz emitida pela fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de emissores no tecido. Esta consideração é tão mais verdadeira quanto menor for a concentração relativa das moléculas investigadas e menos ligadas às moléculas que fazem parte do tecido [7]; também pode-se dizer que moléculas de FSs ligadas à membrana apresentam fluorescência diferente. A diluição utilizada neste estudo foi considerada baixa, podendo descartar os efeitos de reabsorção; no entanto, é preciso levar em consideração os efeitos de agregação. Observando os espectros de fluorescência, nota-se que há uma variação entre os FSs. Apesar dos derivados de hematoporfirina apresentarem estruturas químicas semelhantes, os picos de fluorescência no fígado aparecem em tempos diferentes. Existem diferenças na proporção de monômeros, dímeros e oligômeros destes FSs, o que lhes confere propriedades químicas diferentes. Analisando os dados obtidos através dos espectros de fluorescência, observa-se que o Photogem (PG) apresenta um tempo de acúmulo menor quando comparado ao Photofrin (PF) e do Photosan (PS). Em cerca de 30 min observa-se uma alta concentração do PG, enquanto para o PF isso ocorre após 2 h e para o PS após cerca de 12 h. O mesmo é observado quando se analisam os espectros dos FSs à base de clorinas, sendo 1h e 30 min o tempo de acúmulo para o Photodithazine, 7 h para a Radachlorin e 9 h para o Foscan. Após estes intervalos de tempo, acredita-se que os FS's atinjam o pico de concentração no fígado devido à fluorescência observada [23], porém isto não significa que indefinidamente haverá aumento da quantidade acumulada no órgão alvo.

Esta diferença de tempo de acúmulo entre os FSs pode ser devido às diferenças nas proporções de espécies agregadas, uma vez que deve ser decorrente do maior predomínio. Quanto mais agregado for um fotossensibilizador, maior será o tempo de acúmulo no tecido.

Apesar da membrana mimetizar uma micela, agindo na desagregação dos FSs, um grande número de moléculas permanecem agregadas, dificultando a sua absorção pelas células.

Como já observado no capítulo 3, o estudo dos FSs em solução, mostrou que, para os derivados de hematoporfirina, o PS é o FS mais fotoestável, ou seja, apresenta um maior número de moléculas agregadas, seguido do PF e do PG. No estudo das clorinas, o FS mais fotoestável é o Foscan, seguido da Radachlorin e do PDZ. Esses resultados estão de acordo com os resultados da farmacocinética, pois quanto maior a fotoestabilidade, maior o tempo de absorção pelas células, ou seja, maior o tempo necessário para ocorrer o acúmulo no tecido.

A aquisição dos dados de fluorescência foi feita através do programa LightView, que forneceu os dados da relação da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda. Para análise desses resultados, realizou-se a normalização de todo o espectro pelos máximos de intensidade no comprimento de onda de excitação do laser em 532 nm. A análise espectral da intensidade versus o tempo de espera, foi realizada no pico de maior amplitude para cada FS.

## **6.2 – Estudo da necrose**

A principal ação da TFD é a necrose. Assim, a investigação da fotorreação causada pela luz em um tecido fotossensibilizado depende, fortemente, da adequada quantidade de luz que atinge o tecido em consideração. Como demonstram vários estudos, a penetrabilidade da luz é um fator dominante em qualquer tipo de estudo em TFD [7, 28, 74].

O FS presente no fígado absorve uma grande quantidade de luz, diminuindo a profundidade de penetração luminosa no tecido. Grande parte desta energia absorvida é dissipada em forma de calor [7], mostrando que o tecido hepático normal, na presença do FS, tem suas características ópticas alteradas, o que se reflete na profundidade de necrose.

A morte celular depende da taxa de excitação do FS, deste modo, se o FS for excitado poucas vezes, ter-se-á um dano tecidual menor, não causando necrose celular. Desta maneira, para que a ativação dos FSs pela luz induza o tecido à necrose, é necessária uma quantidade mínima de excitação, sendo que, abaixo desta, o tecido deva se recuperar após aplicação da TFD e acima, a necrose predomine.

Diante destas observações, há muitos estudos na literatura sobre o limiar de dose ou “threshold dose” [29, 33, 34, 36, 72, 74, 77, 78, 83]. O conceito de limiar de dose em TFD corresponde à existência de uma dose mínima capaz de induzir o tecido à necrose.

Neste estudo, adotou-se a incidência perpendicular para evitar variações que levariam à mudanças nas quantidades refletidas, absorvidas e transmitidas, as quais dependem do ângulo. Observa-se que a luz incide em uma área pré-determinada, mas que, quando a luz penetra no tecido, o processo de espalhamento faz com que uma região muito maior seja atingida. Isto é constatado pela área necrosada superior à região irradiada.

Um modelo simples é proposto para o estudo da profundidade de necrose, bem como para determinar o limiar de dose. Este modelo é similar ao proposto por outros autores [29, 34, 73, 77, 79], já realizados em trabalhos anteriores em nosso grupo [7, 83, 84].

Foi assumido que a intensidade da luz decai exponencialmente [23] com a penetração no tecido [7], e esta penetração depende da concentração do FS. Estas considerações e definições da dose de luz são: produto da intensidade da luz local pelo tempo de exposição, levando a uma relação entre a dose de luz na superfície ( $D_0$ ), a profundidade de necrose ( $dnec$ ) e o limiar de dose ( $D_{th}$ )

$$dnec = \delta \ln \frac{D_0}{D_{th}} \quad (1)$$

onde  $\delta$  é a profundidade efetiva de penetração da luz, o qual contém muitas contribuições já discutido na literatura [8, 34, 35].  $\delta$  pode ser diretamente medido como já descrito em

trabalhos anteriores [76] ou pode ser usado como parâmetro na eq. 1, quando  $d_{nec}$  é medido em função do  $D_0$ .

Para comparar a determinação do Dth obtido no presente estudo com os valores existentes na literatura, foi calculado o limiar de dose fotodinâmico (T) como produto do limiar de dose (Dth) e o coeficiente efetivo de absorção  $\alpha$ ,

$$T = \alpha Dth$$

e dividindo pela energia de fótons ( $\epsilon_{fótons}$ ), o resultado pode ser expresso em fótons / volume absorvido.

Através da análise da profundidade de necrose em função da dose de luz (figuras 28, 29, 30, 31, 32 e 33) foram obtidos os valores do Dth para cada FS em diferentes concentrações, como se pode observar nas tabelas III e IV.

Analisando-se os dados, observou-se que as curvas apresentaram um comportamento exponencial. Notou-se que com aumento da concentração do FS há um aumento na profundidade de penetração da luz e consequentemente um aumento da profundidade de necrose. Este comportamento foi observado no estudo de todos FSs.

Analisando a figura 28, observa-se que, o Photogem em ambas as concentrações apresentaram necrose a partir de 20 J/cm<sup>2</sup> e a partir de 100 J/cm<sup>2</sup> não há alteração na profundidade de necrose.

Na figura 29, observa-se que, para o Photofrin, na concentração de 1.0 mg/Kg há necrose a partir de 100 J/cm<sup>2</sup>, enquanto para a concentração de 2.0 mg/Kg há necrose a partir de 50 J/cm<sup>2</sup>. A ausência de necrose na concentração de 1.0 mg/Kg e dose de 50 J/cm<sup>2</sup> pode ser justificada pela baixa concentração de FS utilizada. Este resultado está de acordo com a literatura, que cita o uso de PF no intervalo de 2.0 – 3.0 mg/Kg.

Para o Photosan, nota-se necrose a partir de  $50 \text{ J/cm}^2$ , para ambas as concentrações. Analisando os dados, observa-se que há uma tendência de não existir aumento na profundidade de necrose a partir de  $200 \text{ J/cm}^2$  para ambas as concentrações.

### PHOTOGEN

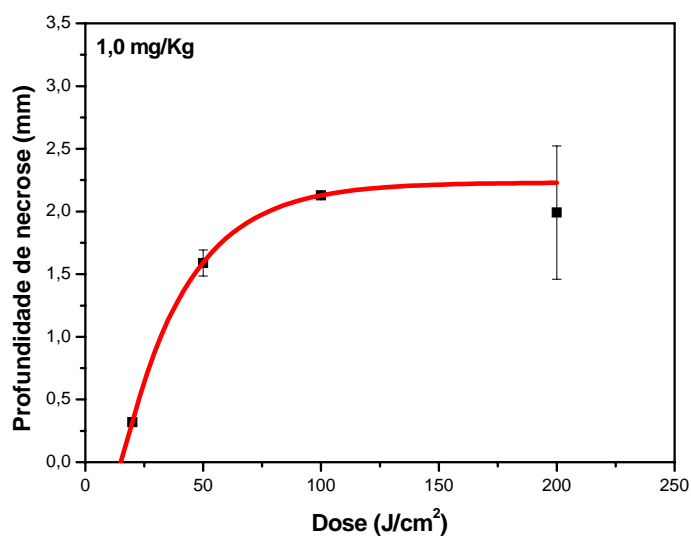
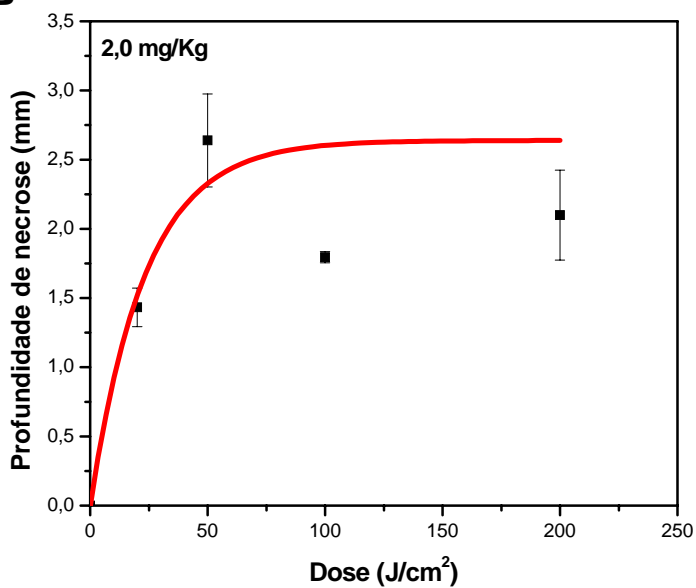
**A****B**

Figura 28 - Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photogem<sup>®</sup>. (A) concentração de 1.0 mg/Kg e (B) concentração de 2.0 mg/Kg.

## PHOTOFRIN

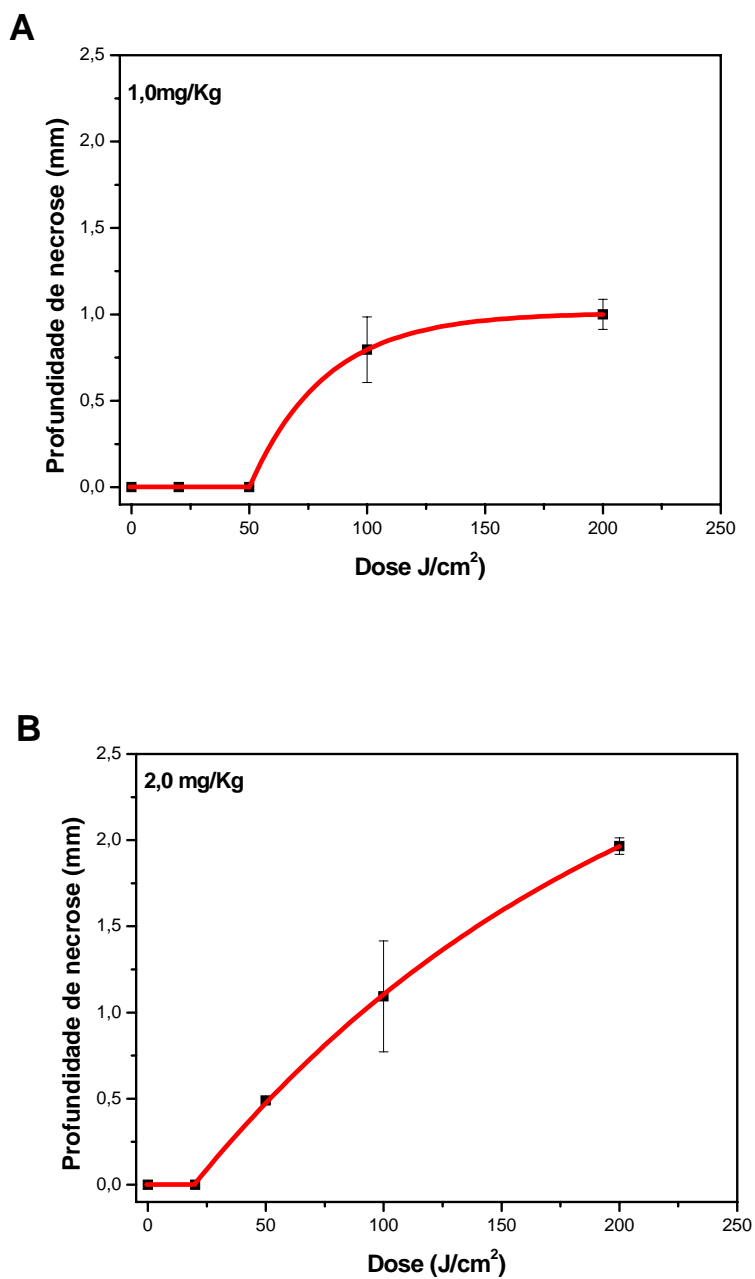


Figura 29 - Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photofrin<sup>®</sup>. (A) concentração de 1.0 mg/Kg e (B) concentração de 2.0 mg/Kg.

## PHOTOSAN

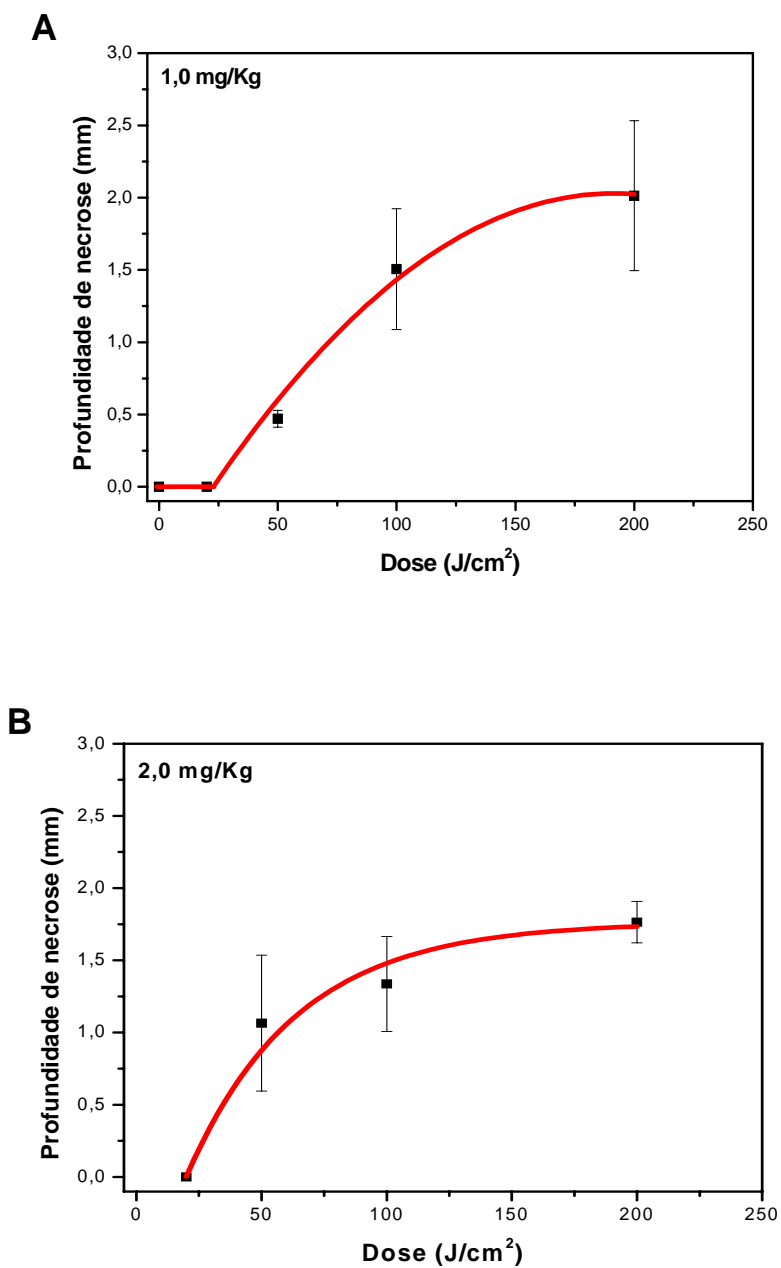


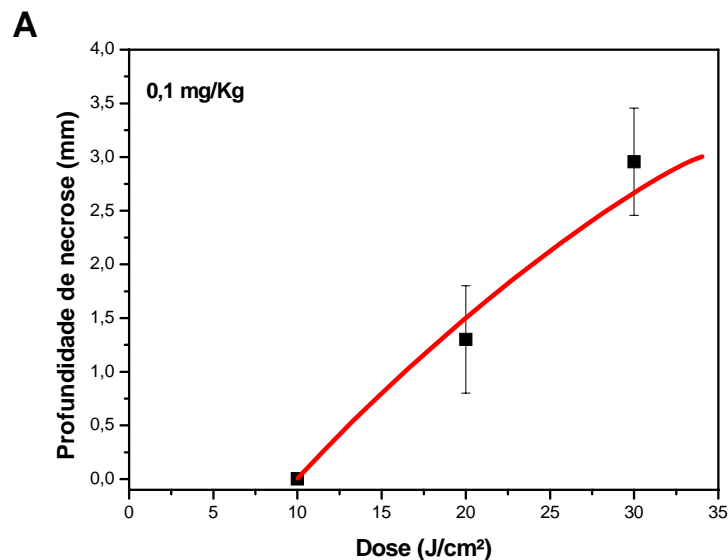
Figura 30 - Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photosan<sup>®</sup>. (A) concentração de 1.0 mg/Kg e (B) concentração de 2.0 mg/Kg.

Na figura 31, observa-se que para o Foscan, as concentrações de 0.1 e 0.2 mg/Kg apresentam necrose a partir de 20 J/cm<sup>2</sup>. Para a concentração de 0.3 mg/Kg há necrose a partir de 10 J/cm<sup>2</sup> e há pouca variação da profundidade de necrose quando se comparam as doses de luz.

Analizando o Photodithazine (figura 32), observa-se necrose a partir de 20 J/cm<sup>2</sup> para ambas as concentrações. Na concentração de 0.5 mg/Kg, não há variação na profundidade de necrose a partir de 100 J/cm<sup>2</sup> e na concentração de 1.0 mg/Kg a partir de 50 J/cm<sup>2</sup>.

Para a Radachlorin (figura 33) na concentração de 0.5 mg/Kg, observa-se necrose apenas para a dose de 200 J/cm<sup>2</sup> e para a concentração de 1.0 mg/Kg observa-se necrose a partir de 100 J/cm<sup>2</sup>. Este fato pode ser justificado pelas baixas concentrações utilizadas, sendo indicado pelo fabricante concentrações entre 0.8 – 1.2 mg/Kg.

### FOSCAN



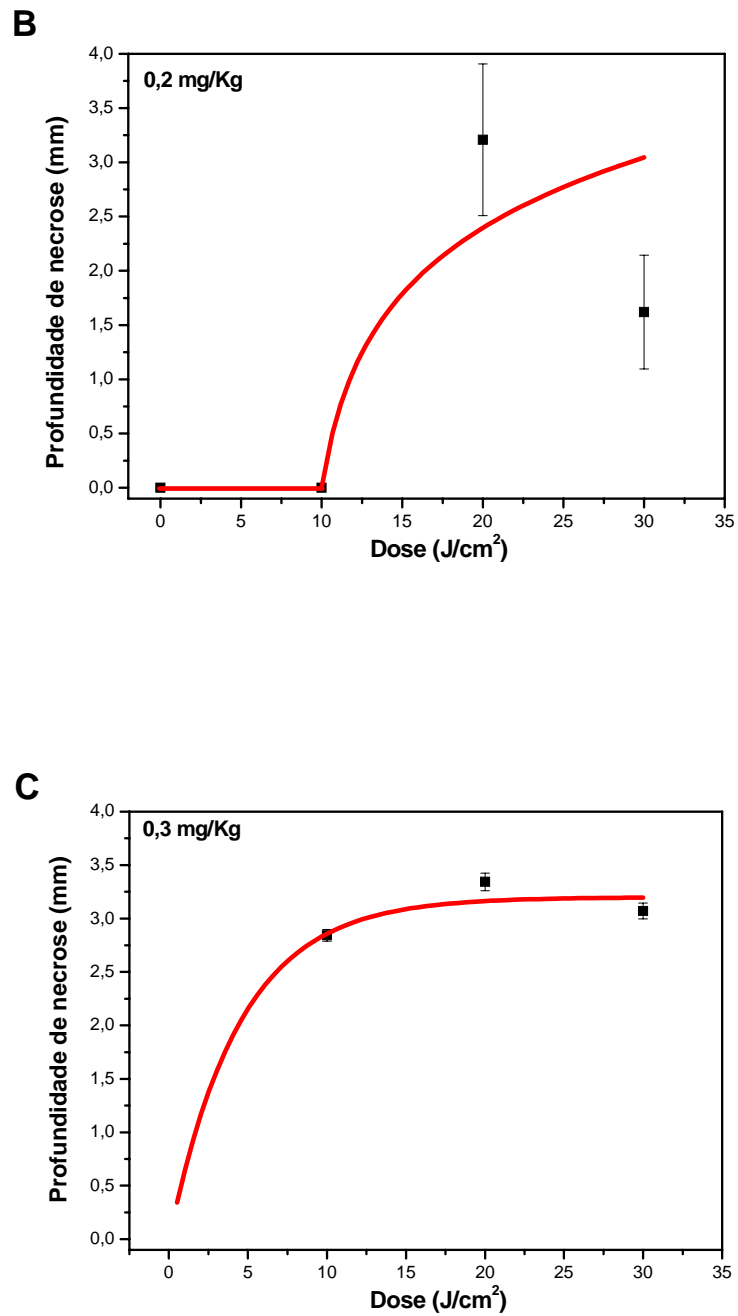


Figura 31 - Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Foscan<sup>®</sup>. (A) concentração de 0.1 mg/Kg; (B) concentração de 0.2 mg/Kg e (C) 0.3 mg/Kg.

## PHOTODITHAZINE

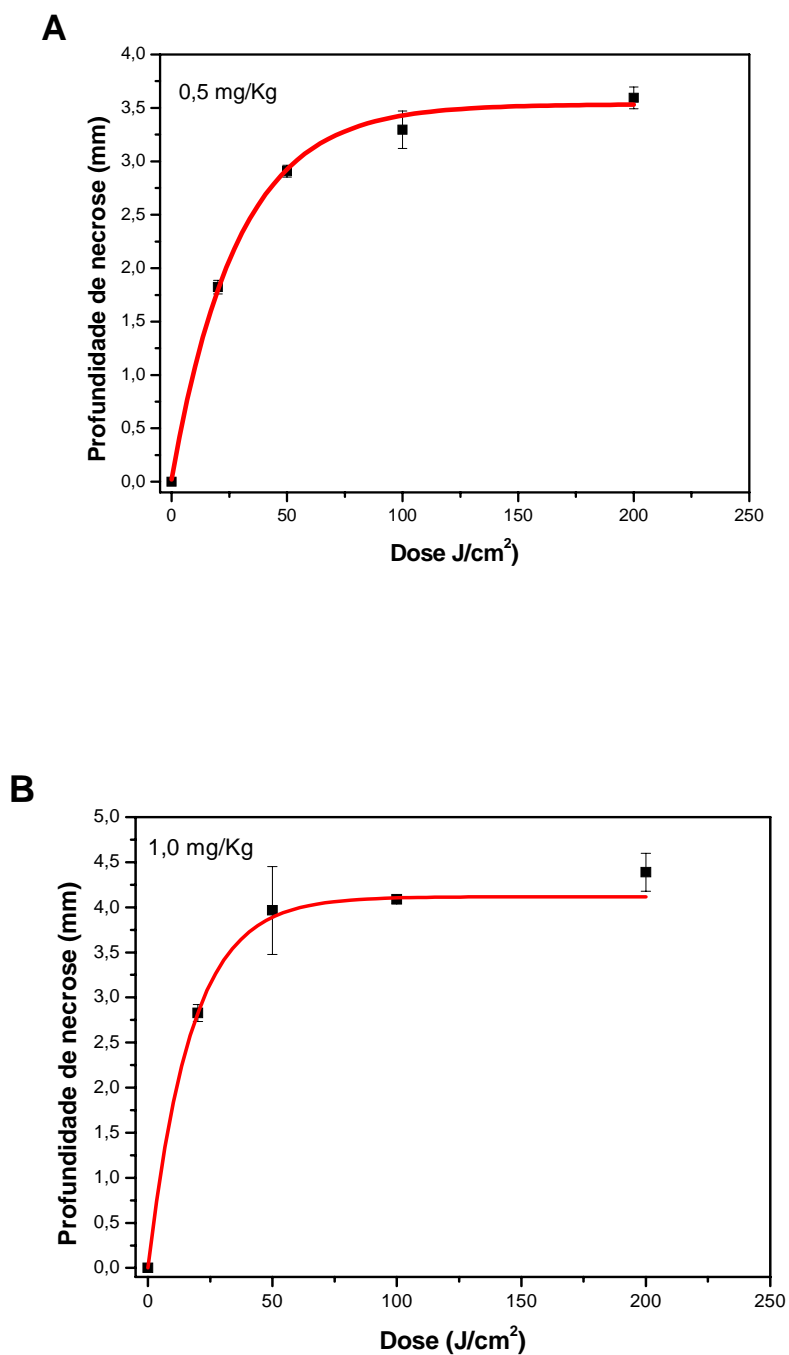


Figura 32 - Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photodithazine<sup>®</sup>. (A) concentração de 0.5 mg/Kg e (B) concentração de 1.0 mg/Kg.

## RADACHLORIN

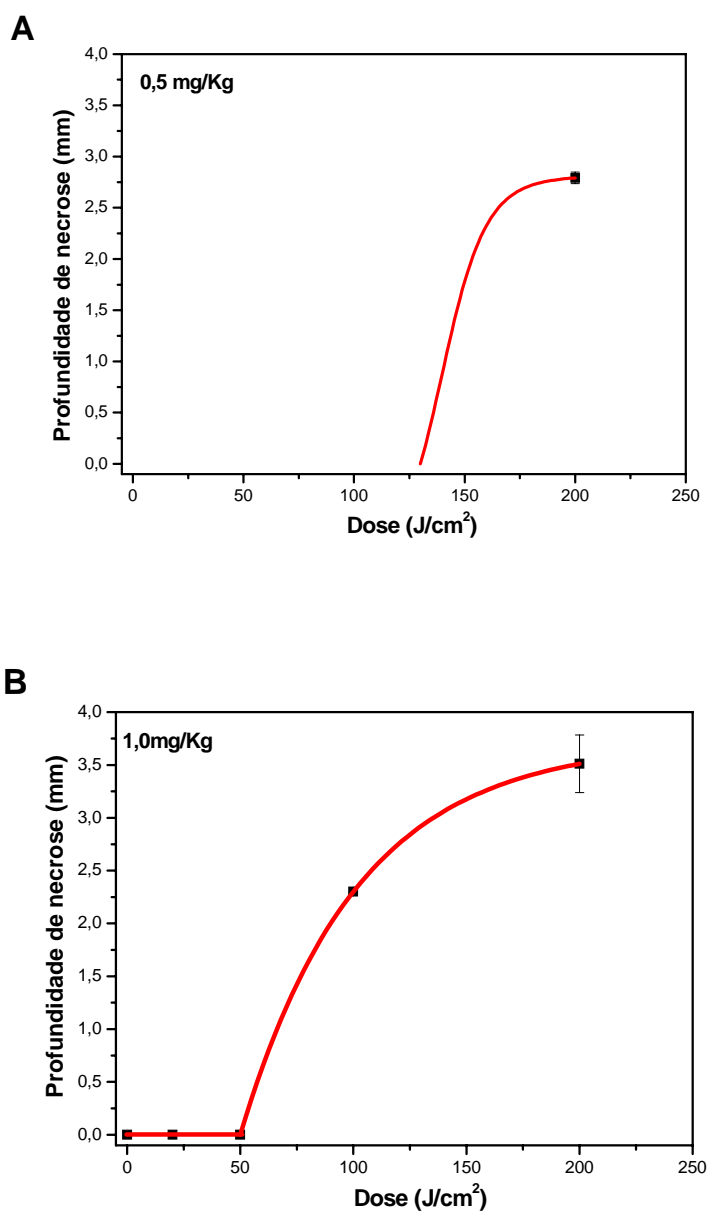


Figura 33 - Profundidade de necrose em função da dose de luz para a Radachlorin<sup>®</sup>. (A) concentração de 0.5 mg/Kg e (B) concentração de 1.0 mg/Kg.

# TERAPIA FOTODINÂMICA E MORTE CELULAR

A tabela III apresenta os valores de Dth para os derivados de hematoporfirinas. Verifica-se que o Photogem apresenta menor limiar de dose, seguido pelo Photosan. PG e PS não apresentaram grandes variações de Dth em relação à concentração, diferentemente do PF. Além disso, o Photofrin apresentou maior valor de Dth, que pode ser justificado pelas concentrações utilizadas neste trabalho (1.0 e 2.0 mg/Kg).

Tabela III – Limiar de Dose (Dth) para os derivados de hematoporfirina (HpD)

Concentração do FS (mg/Kg)	Dose (J/cm²)	PG		PF		PS	
		mg/Kg					
		1,0	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0
Profundidade de necrose (mm) ± desvio padrão	20	0,319	1,433	0,000	0,000	0,000	0,000
	50	1,589	1,795	0,000	0,490	0,470	1,066
	100	2,139	2,639	0,796	1,044	1,506	1,337
	200	2,789	3,023	1,000	1,966	2,014	1,925
Dth (J/cm²) ±SD		15± 2	11± 2	55± 2	28± 2	26± 4	21 ± 4

A tabela IV apresenta os valores de Dth para os fotossensibilizadores à base de clorinas. Observa-se que o Photodithazine apresentou menor Dth, seguido pelo Foscan. O PDZ não apresentou diferença significativa no Dth em função da concentração, para o FOS verificou-se pouca diferença entre os Dth. A Radachlorin, por sua vez, apresentou maior limiar de dose, sendo necessárias altas doses de energia para induzir o tecido à morte, bem como uma alta variação entre os valores de Dth em relação à concentração. Este fato pode ser atribuído a baixa concentração de fotossensibilizador utilizado (0.5 e 1.0 mg/Kg).

Tabela IV – Limiar de Dose (Dth) para os FSs a base de clorinas

Concentração do FS (mg/Kg)	Dose (J/cm <sup>2</sup> )	RADA		PDZ		FOS			
		mg/Kg							
		0,5	1,0	0,5	1,0	Dose (J/cm <sup>2</sup> )	0,1	0,2	0,3
Profundidade de necrose (mm) ± desvio padrão	20	0,000	0,000	1,814	2,828	10	0,000	0,000	1,324
	50	0,000	0,000	2,825	3,965	20	1,301	2,268	2,735
	100	0,000	2,301	2,877	4,089	30	2,957	2,957	3,422
	200	2,881	3,511	2,840	4,388	----	-----	-----	-----
Dth (J/cm <sup>2</sup> ) ±SD		200± 2	52,6± 2	1,5± 0,5	1,1± 0,5		11,7± 2	9,7 ± 2	5,3± 2

Observa-se que, com o aumento da concentração do FS, há uma redução da dose de luz necessária para causar dano tecidual e aumento da profundidade de penetração, os quais combinados com a área irradiada e com a concentração excedem o nível do “threshold”. A subsequente redução da profundidade de necrose com altas concentrações do FS é devido à redução da penetração óptica causada pela maior absorção da luz na presença do FS [72]. Desta maneira, pode-se dizer que a profundidade da necrose aumenta e os valores dos limiares de dose (Dth) diminuem com a maior concentração de FSs.

Como em trabalhos anteriores, observamos uma abrupta linha delimitando a área de tecido necrosado com relação ao tecido sadio. A necrose do tecido é resultado da criação de produtos citotóxicos gerados por oxigênio singlete através da ativação pela luz. A quantidade de reações de oxigênio singlete nas regiões limítrofes entre áreas tratadas e não tratadas define o limiar de dose. O conceito foi validado anteriormente e foi mostrado que a destruição do tecido ocorreu a uma concentração específica dos FSs, derivando assim a relação entre os diferentes parâmetros fotodinâmicos. Para um dado fotossensibilizador, a concentração de oxigênio singlete dependerá da taxa de fluência de luz, da concentração do FS e da concentração de oxigênio molecular. Se a concentração de oxigênio é uniforme ao longo do tecido e a concentração de oxigênio molecular permanece estável durante a TFD, a concentração de oxigênio molecular singlete será proporcional ao produto do coeficiente de extinção do FS, de sua concentração e da fluência da luz. O modelo de limiar de dose estabelece que a necrose tecidual induzida por TFD ocorre se o número de fótons absorvido pelo FS por unidade de volume, exceder um valor crítico [96].

Nota-se que há uma diferença significativa no limiar de dose entre os FSs utilizados neste estudo. Fatores que podem ser levados em conta para a variabilidade dos valores da profundidade de necrose incluem a insuficiência da penetração da luz, baixo acúmulo de FS e/ou pequena disponibilidade de oxigênio.

### 6.2.1 - Estudo Macroscópico da necrose

Na análise macroscópica de todos os animais, observaram-se, imediatamente após irradiação do fígado, alterações significativas na cápsula de Glisson quando comparada à região adjacente não irradiada, sendo esta última considerada parênquima normal. A área iluminada apresentou aspecto enrugado, com uma coloração vermelho intenso, facilmente diferenciada da região não irradiada, como mostra a figura 34. Após 30 horas, esta área iluminada tornou-se esbranquiçada, marchetada por pequenas áreas escuras, com aspecto de úlcera, também de fundo irregular, de forma mais ou menos circular (figura 35).

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

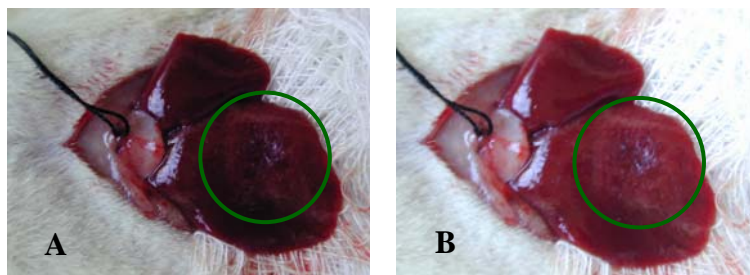


Figura 34 – Alteração hepática causada logo após aplicação da TFD. (A) Área iluminada apresentando coloração vermelho intenso. (B) Região bem delimitada com aspecto enrugado.

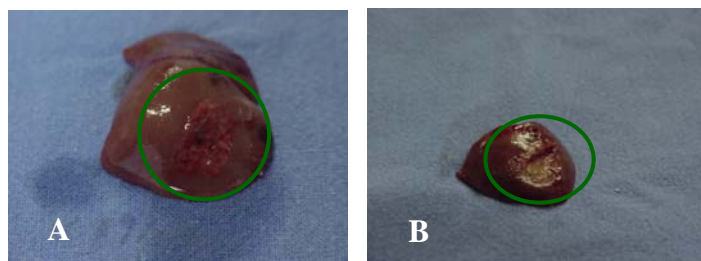


Figura 35 - Alteração hepática 30h após iluminação. (A) Lesão hepática com fundo esbranquiçado entremeado com áreas escuras. (B) Úlcera de fundo, com bordas bem delimitadas, mostrando uma necrose coagulativa.

### **6.2.2 - Estudo microscópico da necrose**

A lesão hepática induzida pela TFD causou necrose coagulativa com graus variados de severidade. Em todos os fígados, na análise microscópica, houve infiltrado inflamatório linfocitário discreto e a nítida separação entre os parênquimas necrosado e normal. Observou-se áreas preservadas na periferia dos espaços portais, localizados na região necrosada e necrose da veia centrolobular, bem como grande quantidade de neutrófilos e áreas congestionadas com presença de hemácias.

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

Algumas das principais alterações microscópicas hepáticas, acima referidas, podem ser visualizadas nos quadros de fotomicrografias (36 – 41).

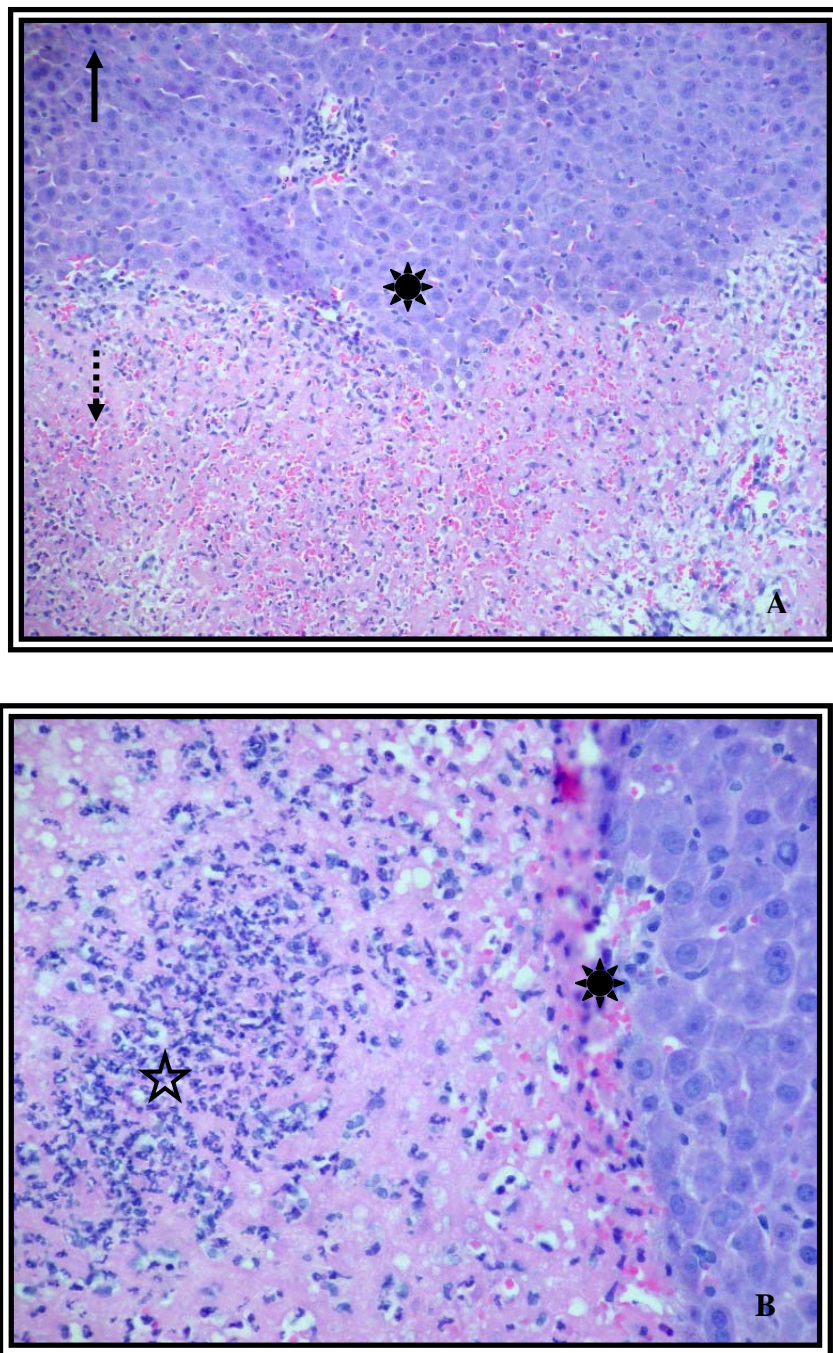


Figura 36 – Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal. Photogem – Transição do tecido hepático normal (↑) e necrosado (↓). Na transição, no tecido hepático normal, notam-se alguns hepatócitos com degeneração saculiforme (\*). Na figura B observa-se concentrado neutrofilico (☆). Fotomicrografias aumentadas (A) HE 200x e (B) HE 400x.

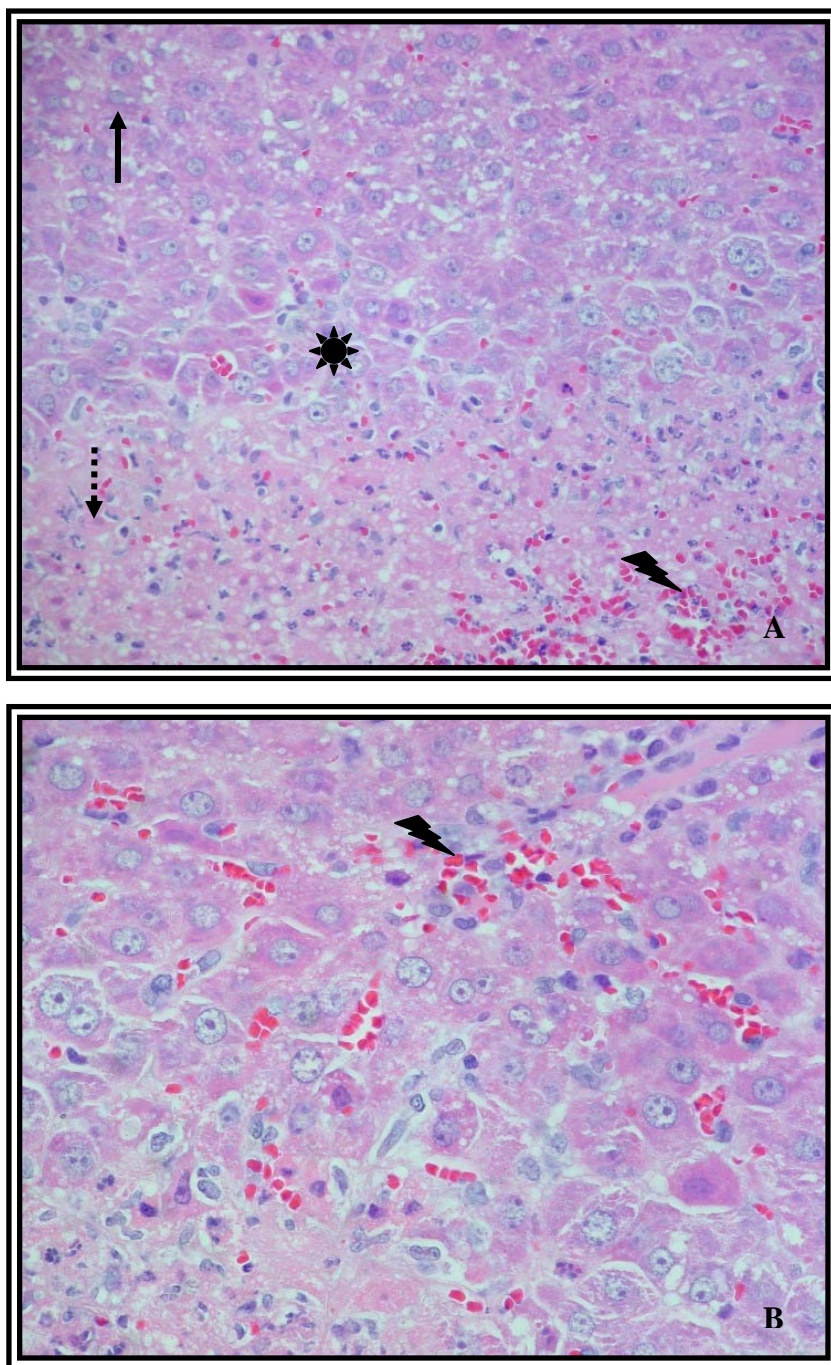


Figura 37 – Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal. Photofrin – Transição do tecido hepático normal (↑) e necrosado (↓), presença de células saculiformes (\*) e concentração de hemácias (⚡) (A) HE 400x. Presença de hemácias (⚡) indicando congestão e pontos hemorrágicos (B) HE 400x.

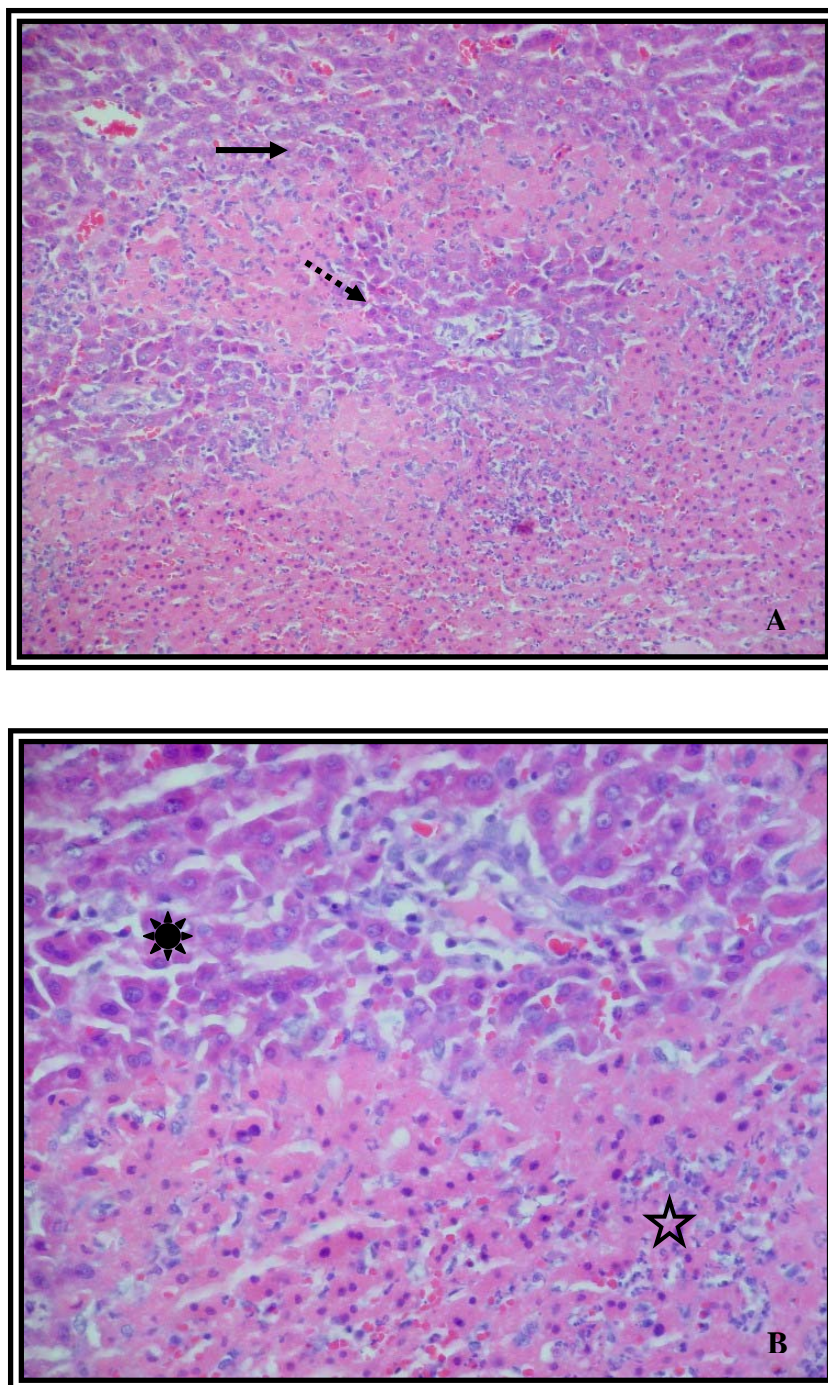


Figura 38 – Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal. Photosan – Transição do tecido hepático normal e necrosado ( → ), observa-se áreas preservadas na periferia dos espaços portais na região necrosada ( ↘ ) (A) 200x. Células saculiformes (★) e intenso infiltrado neutrofílico (☆) (B) 400x.

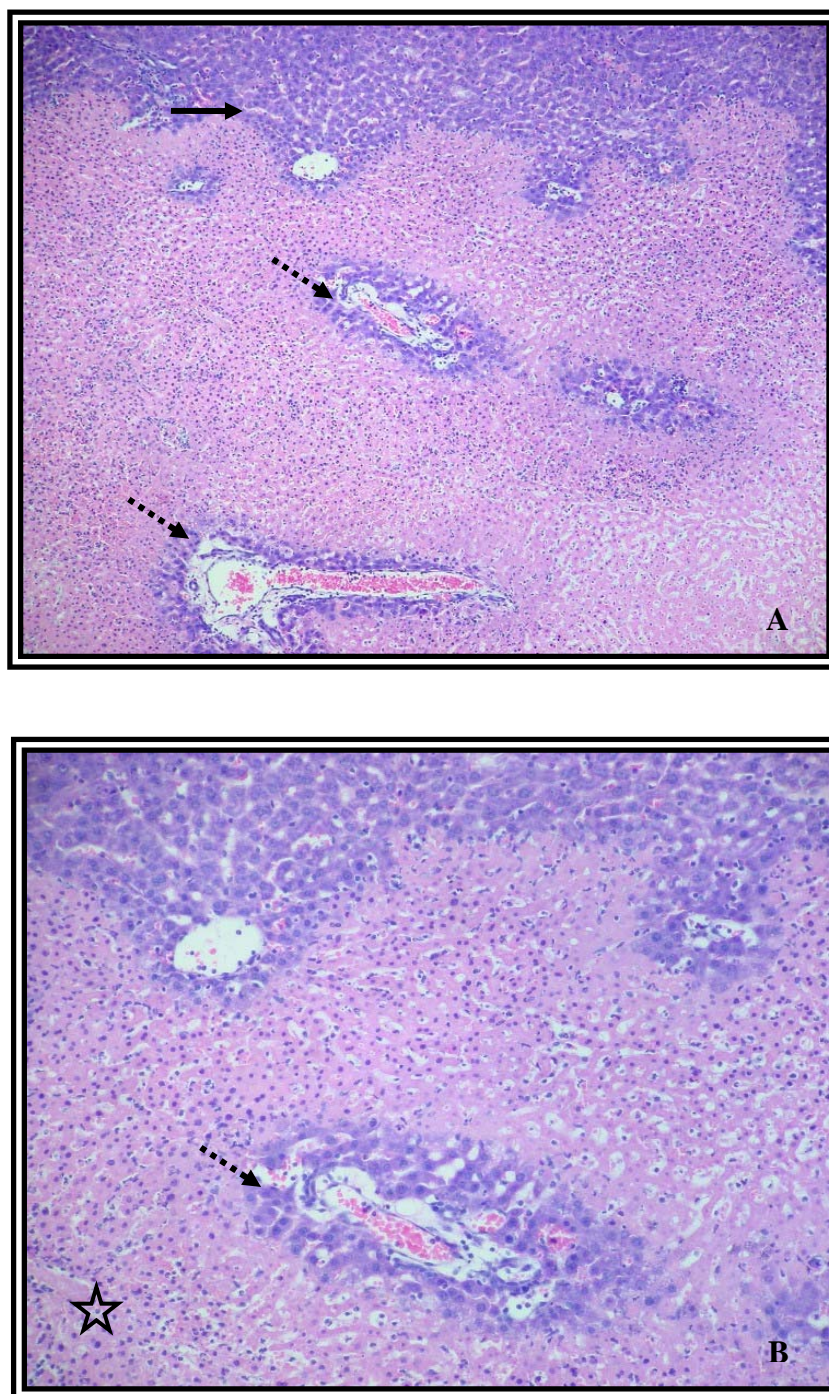


Figura 39 - Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal. Foscan – Transição do tecido hepático normal e necrosado (→), presença de áreas preservadas na periferia dos espaços portais na região necrosada (↯) (A) HE 200x. Intenso infiltrado neutrofílico (☆), presença áreas preservadas na periferia dos espaço porta (↯) (B) HE 400x.

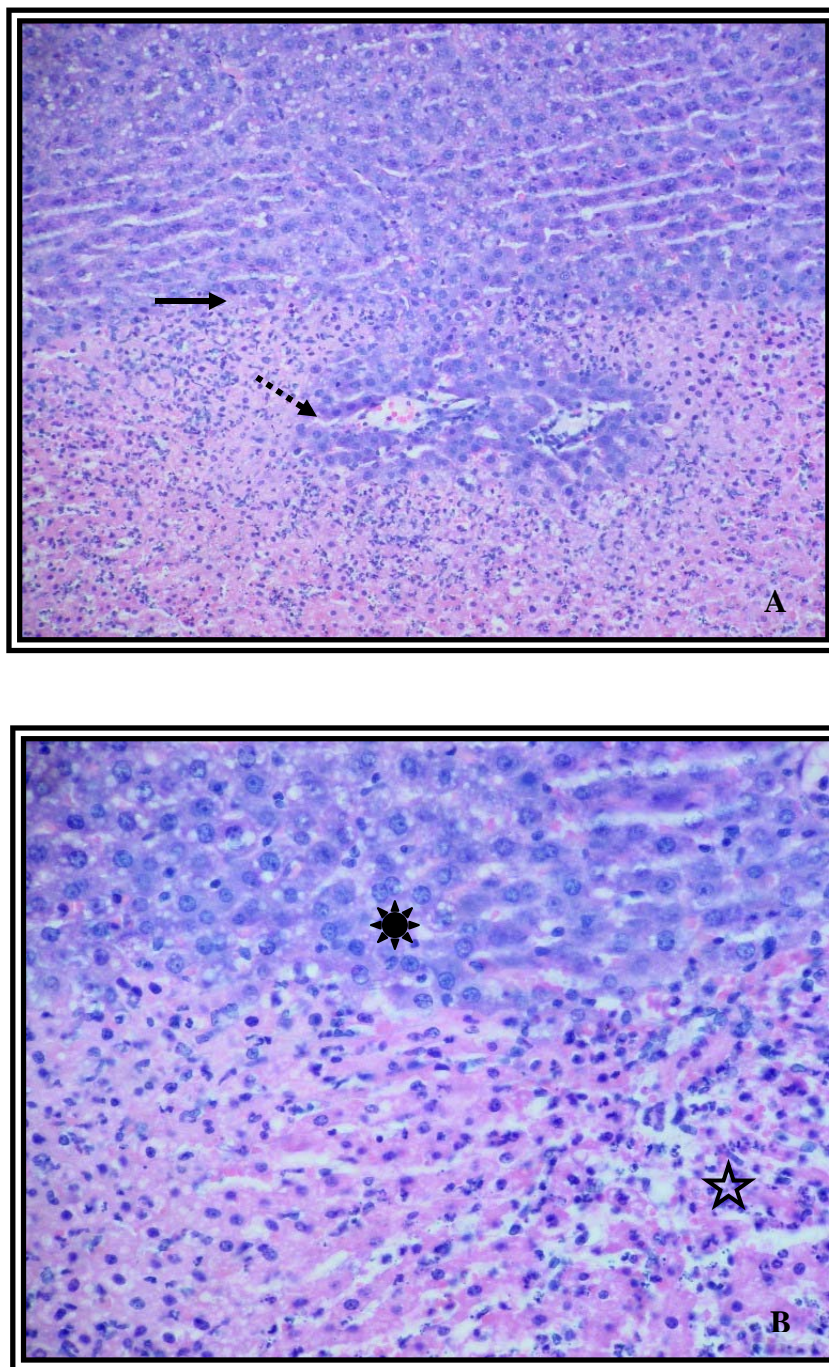


Figura 40 - Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal. PDZ – Transição do tecido hepático normal e necrosado (→), presença de áreas preservadas na periferia dos espaços portais na região necrosada (⇢) (A) HE 200x e. Intenso infiltrado neutrofílico (☆) e presença de células saculiformes no tecido normal (★) (B) 400x.

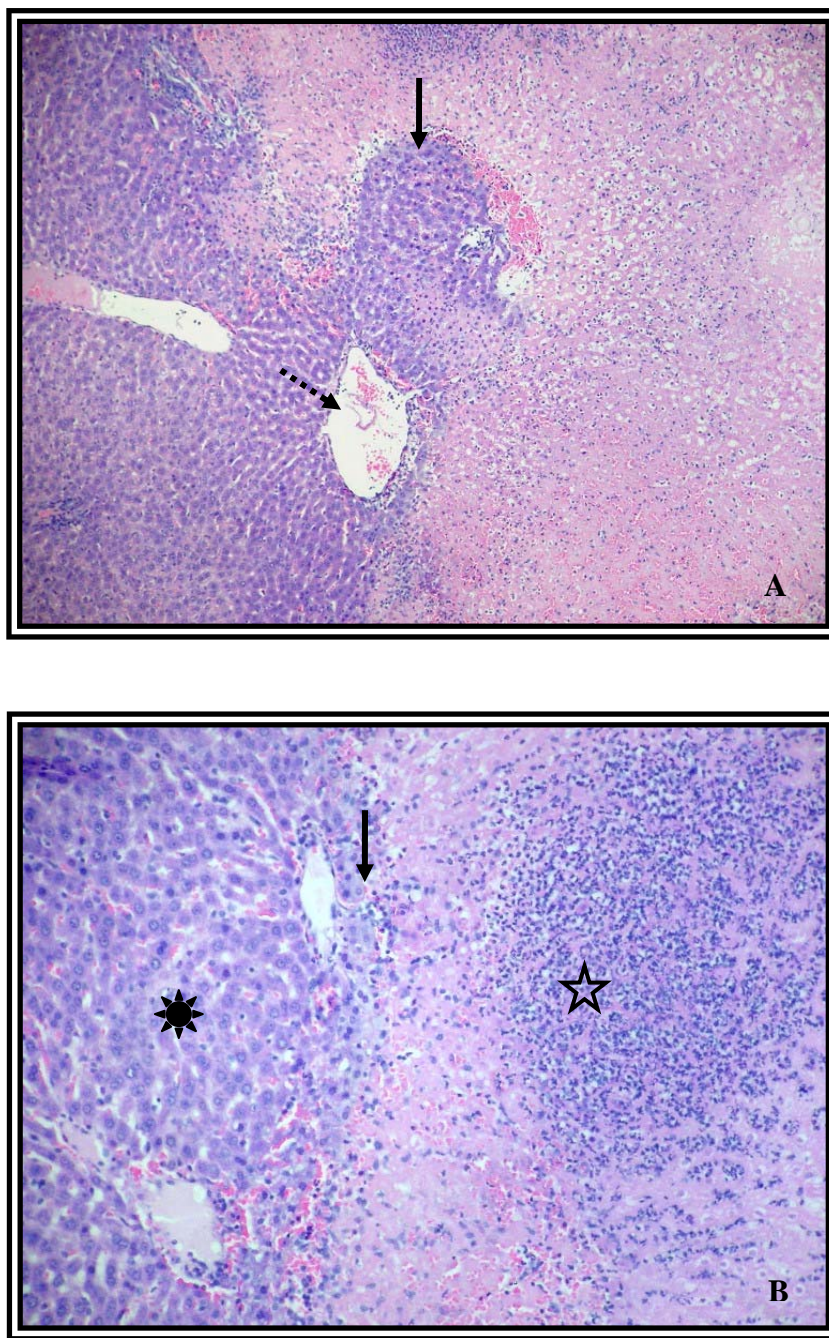


Figura 41- Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal. Radachlorin – Transição do tecido hepático normal e necrosado (↓) HE (A 100x e B 200x). Intenso infiltrado neutrofílico (☆), congestão dos sinusóides (••▶) e presença de células saculiformes no tecido normal (★).

Observou-se a preservação do endotélio ao redor do espaço porta e necrose das veias centrolobulares no tecido hepático necrosado, com intenso infiltrado inflamatório neutrofílico.

## **7– Conclusões**

1. Há diferenças significativas entre os FSs em relação à farmacocinética, o que pode ser confirmado pelas propriedades moleculares e fotoestabilidade diferentes.
2. A profundidade da necrose aumenta e os valores dos limiares de dose (Dth) diminuem com a maior concentração de FSs.
3. O limiar de dose de luz varia para cada FS e conforme as concentrações utilizadas.
4. A profundidade da necrose causada pela TFD em fígado normal de rato, pode ser explicada usando-se um modelo simples de limiar de dose. Através deste modelo, pode-se produzir uma expressão analítica para a profundidade de necrose em função da concentração do FS.
5. No planejamento da TFD é necessário, primeiro, entender como a luz se distribui ao longo do tumor, em regiões adjacentes e em regiões mais distantes, as quais recebem uma dose de luz abaixo do limiar.
6. A delimitação abrupta da necrose, e os diferentes valores de profundidade confirmam a idéia de um limiar de intensidade necessário para causar tal efeito.
7. A TFD causou, no fígado, uma necrose coagulativa difusa, com presença de infiltrado inflamatório neutrofílico predominante, necrose total da veia centrolobular e áreas preservadas na periferia do espaço porta, localizado na região necrosada.

*V CORRELAÇÃO ENTRE  
FOTOESTABILIDADE E  
EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA*

---

***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

***V – CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

**1 – Introdução**

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma importante técnica alternativa e não invasiva no tratamento de vários tipos de neoplasias. Pode ser aplicada antes ou depois da quimioterapia, da radioterapia ou da cirurgia. Diferentemente da radioterapia ela pode ser aplicada inúmeras vezes, por utilizar radiação não ionizante [104, 105, 106].

A TFD consiste na combinação da ação de uma droga fotossensível (fotossensibilizador), uma fonte luz, emitindo num determinado comprimento de onda e da presença do oxigênio molecular. O fotossensibilizador (FS) absorve a energia da luz sendo excitado e resultando na formação de espécies reativas como radicais livres e o oxigênio singleto, o qual reage rapidamente com substratos celulares induzindo o tecido a morte [68, 105, 106, 107, 108].

A primeira geração de FSs são os derivados de hematoporfirinas (HpD). Estes têm sido os mais usados entre na TFD. O Photofrin (PF) é a versão mais purificada dos derivados de hematoporfirinas, é um complexo de oligômeros e foi aprovado, especificamente, para aplicação clínica no tratamento de lesões malignas e não malignas em vários países da Europa, América e Ásia [109, 110, 111, 112]. A principal característica dos HpDs foram discutidas recentemente em dois artigos de revisão [67, 68].

Photosan (PS) e Photogem (PG) são FSs produzidos na Alemanha e Rússia, respectivamente. De modo que o PG é o fotossensibilizador utilizado no Brasil. Acredita-se que as características químicas, fotofísicas presentes e as características terapêuticas e de diagnóstico são idênticas ao PF [48, 113, 114, 115].

## ***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

Entretanto, o número de problemas relatados com o uso do Photofrin, como a fotossensibilização dérmica e ocular prolongada e a baixa absorção e penetração da luz no tecido biológico, tem levado ao desenvolvimento de novos fotossensibilizadores com características mais favoráveis, com absorção específica em comprimentos de onda maiores, os quais apresentam uma maior penetração no tecido biológico e uma rápida eliminação [117].

A segunda geração de fotossensibilizadores tem curtos períodos de fotossensibilização, comprimentos de onda de ativação maiores, alto rendimento do oxigênio singlete e maior seletividade tumoral [112]. Clorinas e bacterioclorinas apresentam bandas de absorção na região do vermelho e infra-vermelho, permitindo melhor penetração de luz no tecido [112, 118].

Photodithazine (PDZ), Radachlorin (RADA) e Foscan (FOS) são fotossensibilizadores de segunda geração. O PDZ é um sal de glucosamina de clorina e6, é um FS hidrossolúvel [119, 120]. A Radachlorin apresenta em solução aquosa uma mistura de 3 clorinas, incluindo clorina sódica e6 (90 – 95%), clorina sódica p6 (5 – 7%) e uma terceira clorina desconhecida (1 – 5%). A constituinte clorina (chamada substância ativa de clorina) forma 98% do peso molecular da droga [122]. PDZ e RADA (RADA-FARMA, LTD.) são produzidos na Rússia [121]. O Foscan é uma m-tetra(hidroxifenil) clorina (m-THPC ou termoporfin), foi recentemente aprovado pela European Medical Agency (EMA) para uso de tratamento de carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço [118].

Muitos FSs como as porfirinas, clorinas, ftalocianinas, que são utilizadas na TFD no tratamento de neoplasias não são drogas fotoestáveis. Um importante fato descrito é a modificação molecular durante a iluminação dos FSs utilizados na TFD. A luz induz modificações dos FSs provocando uma mudança das características espectrais na diminuição da absorbância inicial e da intensidade de fluorescência, bem como a eficiência fotodinâmica.

## ***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

O processo de degradação é usualmente chamado de “photobleaching” ou fotodegradação e significa transformação química das moléculas dos FSs quando irradiados pela luz (fototransformação de moléculas) levando à formação de novos fotoprodutos que absorvem no vermelho [54, 56].

A fotodegradação dos HpDs e clorinas em solução tem sido investigado por vários autores [69, 70]. E estudos comparativos têm sido realizados por Rotomkis et.al [57, 58] bem como por outros grupos [71].

Convencionalmente, a fotodegradação está associada às modificações ocorridas nas bandas de absorção ou de fluorescência. Acredita-se que a fotodegradação ocorrida durante a iluminação do FS presente no tecido, modifique a eficiência fotodinâmica. A reação fotodinâmica é normalmente avaliada investigando a ação fotodinâmica em culturas celulares ou através do estudo da profundidade de necrose.

Muitos autores têm estudado o aspecto da profundidade da necrose em tecido normal e observado a ocorrência de uma área bem delimitada entre o tecido normal e área de necrose [35, 54, 56, 72, 73, 74, 75, 76, 83, 94, 122]. Como os resultados geram o conceito de limiar de dose de luz, implicam que a morte celular ocorre somente se a energia absorvida excede o valor mínimo. Altos valores para o limiar de dose implicam em baixa eficiência fotodinâmica, desde que é necessária a absorção de muitos fótons para causar um dano celular irreversível.

Neste trabalho, investigamos a possibilidade da correlação entre as características da fotodegradação e da eficiência fotodinâmica. Foi realizada uma análise correlacionando a profundidade de necrose medida, expressa por limiar de dose e os parâmetros de fotodegradação, obtidos a partir da investigação em solução dos três principais HpD: Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> e Photosan<sup>®</sup> e dos FSs a base de clorinas: Foscan<sup>®</sup>, Photodithazine<sup>®</sup> e Radachlorin<sup>®</sup>.

## ***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

---

### **2 – Matérias e Método**

#### **2.1 – Fotossensibilizadores**

Três derivados de hematoporfirinas e 3 clorinas, comercialmente utilizados na TFD foram investigados: Photofrin<sup>®</sup> (PF), obtido da AXCAN (Canadá), Photogem<sup>®</sup> (PG), preparado pela Companhia Photogem (Moscou – Rússia) e Photosan<sup>®</sup> (PS), obtido pela Seehof Laboratórios (Alemanha); Foscan<sup>®</sup> (FOS) (reino Unido), Photodithazine<sup>®</sup> (PDZ) e Radachlorin<sup>®</sup> (RADA-FARMA, Moscou – Rússia). De acordo com as informações dos fabricantes, os FSs são considerados diferentes em relação à distribuição de monômeros, dímeros e oligômeros. Estas diferenças afetam fortemente as propriedades ópticas.

Os fotossensibilizadores foram diluídos em água destilada na concentração de 17 mg/l, sendo uma concentração quase transparente (menos de 10% de atenuação através da cubeta de 1 cm<sup>3</sup>), confirmando que nesta concentração os agregados em solução não interferem nas medidas. As porfirinas e clorinas em solução apresentaram um equilíbrio entre agregados e as espécies monoméricas. As soluções apresentavam cerca de 4 mg/l de O<sub>2</sub> determinada através de uma sonda de oxigênio.

#### **2.2 – Fotodegradação dos Fotossensibilizadores**

A fotodegradação dos FSs em solução, colocados em cubetas de 1 cm<sup>3</sup>, foi induzida através da iluminação por um dispositivo à base de LEDs (diodos emissores de luz) emitindo em 630 nm variando a intensidade. O espectro de absorbância foi obtido utilizando um espectrofotômetro Hitachi U-2000. Durante a iluminação foram realizadas medidas periódicas de fluorescência da solução. A fluorescência foi medida utilizando um laser de excitação em 532 nm e um espectrofotômetro coletando e emitindo luz através de 6 fibras ópticas. A luz coletada é filtrada através de um filtro passa banda, minimizando o espalhamento da luz. O espectro de fluorescência foi obtido com a sonda imersa cerca de 1 mm da solução. O

## ***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

espectro de fluorescência foi coletado em períodos menores do que 10 s, evitando um longo tempo de exposição da luz na solução.

### **2.3 – TFD em animais**

Ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 250g, foram utilizados para este estudo, eles foram mantidos de acordo com a Comissão de Ética de Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

### **2.4 – Delineamento Experimental**

Para indução da necrose no fígado, os animais foram divididos em 2 grupos:

I – derivados de hematoporfirinas: PG, PF e PS;

II – Clorinas: FOS, PDZ e RADA

Os FSs foram injetados via endovenosa através da veia cava em diferentes concentrações e a presença destes no tecido, confirmada pela fluorescência. O intervalo de tempo entre a administração do FS e a iluminação, foi obtido através de um prévio estudo de farmacocinética. A área iluminada foi de 1 cm<sup>2</sup> com laser de 630 nm para as porfirinas com intensidade de 250 mW/cm<sup>2</sup> e 660 nm para as clorinas, sendo FOS 127 mW/cm<sup>2</sup> e para o PDZ e RADA 200 mW/cm<sup>2</sup>.

Após 30 h os animais foram mortos por overdose de anestésico e o fígado removido para análise macroscópica e para preparação de lâminas histológicas para análise microscópica. Foi analisado o aspecto, a extensão e profundidade da necrose.

### **3 – Resultado e Discussão**

#### **3.1 – Degradação dos fotossensibilizadores: parâmetros de fotoestabilidade**

Os espectros de absorção para os derivados de hematoporfirina (PG, PF e PS) em solução aquosa são apresentados na figura 42. A maior banda de absorção ao redor de 370 nm corresponde à banda de Soret e quatro bandas Q, que são típicos espectros das porfirinas [34, 87]. Photogem, Photofrin e Photosan apresentam bandas de absorção semelhantes (figura 42).

A figura 43 apresenta o espectro de absorbância para as clorinas e é possível observar a banda de Soret ao redor de 400 nm e uma banda de maior absorção na região do vermelho.

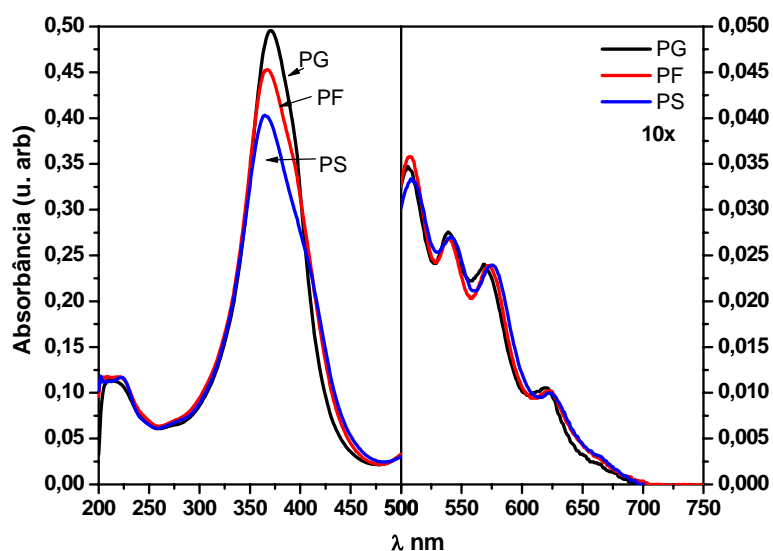


Figura 42 – Espectro de absorbância medido para o Photogem<sup>®</sup> (PG), Photofrin<sup>®</sup> (PF) e Photosan<sup>®</sup> (PS) na concentração de 17 µg/ml com uma cubeta de 0,2 cm.

***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA  
PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

---

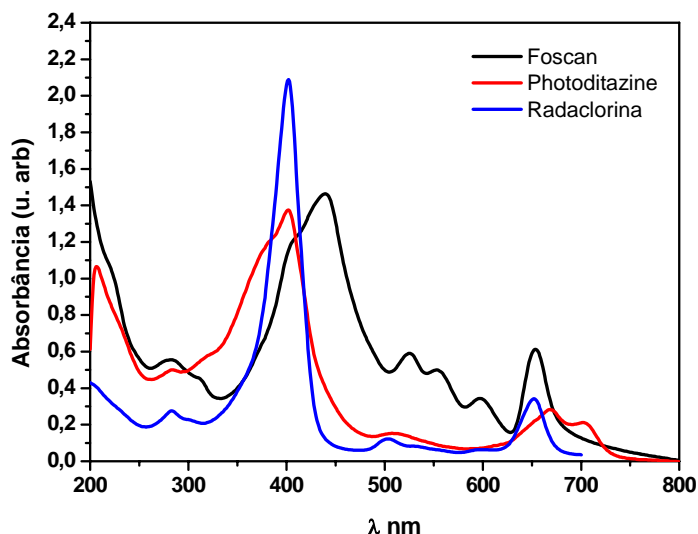


Figura 43 - Espectro de absorvância medido para o Foscan<sup>®</sup> (FOS), Photodithazine<sup>®</sup> (PDZ) e Radachlorin<sup>®</sup> (RADA) na concentração de 17 µg/ml com uma cubeta de 0,5 cm.

O espectro de fluorescência para as porfirinas é observado na figura 44, é possível visualizar a maior banda em 610 nm e outra em 670 nm. O Photogem apresenta uma banda de fluorescência maior que a banda do Photofrin seguido pelo Photosan (20x). No caso das clorinas na figura 45, o Photodithazine e a Radachlorin apresentam intensidades de fluorescência similares, entretanto o Foscan apresenta uma fluorescência menor. A amplitude dos picos de fluorescência típicos em 610 nm para porfirinas ativas e pico de fluorescência típico em 650 nm para moléculas ativas de clorinas foram monitorados. A figura 46 apresenta a taxa de decaimento da fluorescência (decaimento da concentração) em função do tempo de iluminação para o Photogem irradiado com LEDs em 630 nm. A mesma análise foi realizada para todos os fotossensibilizadores utilizados neste trabalho.

***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

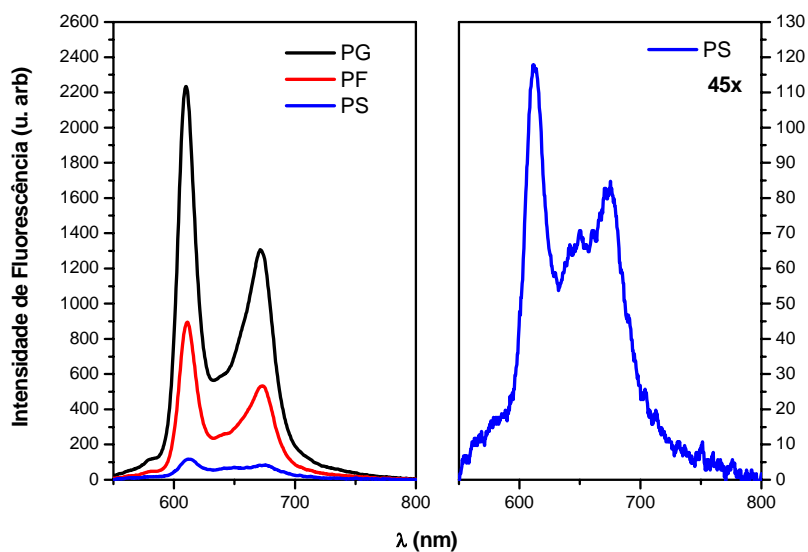


Figura 44 – Espectro de fluorescência medido para o Photogem<sup>®</sup> (PG), Photofrin<sup>®</sup> (PF) e Photosan<sup>®</sup> (PS) na concentração de de 17  $\mu\text{g/ml}$  com uma cubeta de 1,0 cm. Excitação em 532 nm.

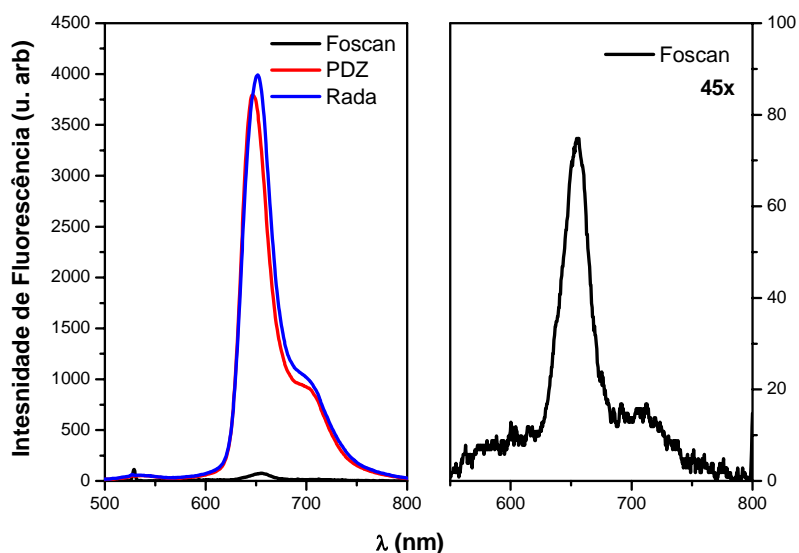


Figura 45 - Espectro de fluorescência medido para o Foscan<sup>®</sup> (FOS), Photodithazine<sup>®</sup> (PDZ) e Radachlorin<sup>®</sup> (RADA) na concentração de 17  $\mu\text{g/ml}$  com uma cubeta de 1,0 cm. Excitação em 532 nm.

***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

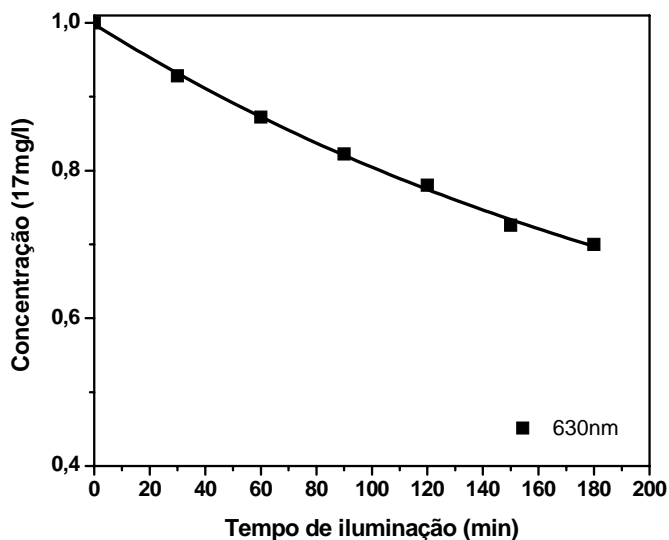


Figura 46 – Taxa de decaimento em função do tempo de iluminação para o Photogem na concentração de 17  $\mu\text{g/ml}$  (cubeta 1,0 cm) irradiado com LEDs 630 nm com intensidade de 50  $\text{mW/cm}^2$ . A linha sólida representa o decaimento exponencial.

Desde que a amplitude de fluorescência é proporcional à concentração de moléculas ativas não agregadas no sistema, o tempo de fluorescência dependente é também dependente da concentração. A partir dos dados foram obtidos os valores da variação da taxa de concentração para:

$$t = 0, \left( \frac{dc}{dt} \right)_{t=0}$$

Normalizando pela intensidade utilizada (I) determinou-se:

$$\alpha = \frac{\left( \frac{dc}{dt} \right)_{t=0}}{I},$$

o qual corresponde à taxa de fotodegradação por  $\text{mW/cm}^2$  de luz. Este coeficiente normalizado pela seção de choque ( $\sigma$ ), é obtido através da lei de Beer's e usado para o comprimento de onda, definido pelo parâmetro:

***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

$$\eta = \sigma/\alpha,$$

chamado de parâmetro de fotoestabilidade. Os parâmetros foram definidos em outros trabalhos [34, 75, 76, 83, 86, 87, 94, 122]. Altos valores de  $\eta$  significam alta habilidade para o FS ser fotodegradado e menor fotoestabilidade.

A figura 47 apresenta os parâmetros de fotoestabilidade para as porfirinas e clorinas. Portanto foi observado entre as porfirinas que o Photosan é mais fotoestável que o Photofrin e que o Photogem e entre as clorinas, que o Foscan apresenta maior fotoestabilidade que o Photodithazine e que a Radachlorin. Estas diferenças podem ser correlacionadas com as características químicas de cada fotossensibilizador.

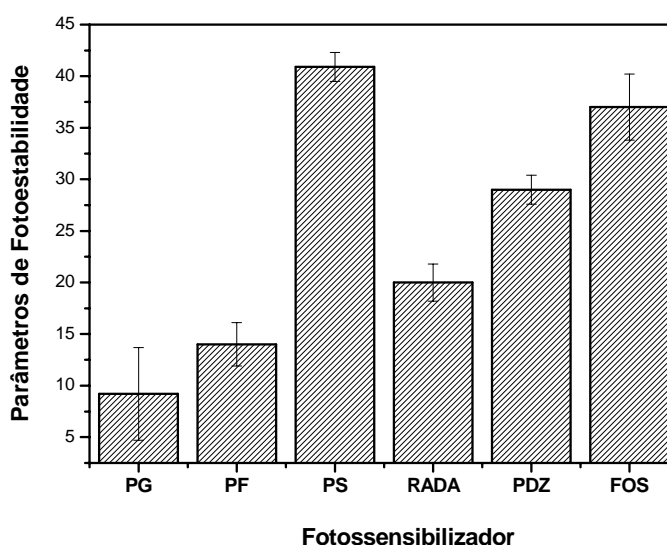


Figura 47 – Parâmetros de fotoestabilidade para os derivados de hematoporfirina (PG, PF e PS) e clorinas (FOS, PDZ e RADA) na concentração de 17  $\mu\text{g/ml}$ .

### **3.2 – Profundidade de necrose e Limiar de Dose**

A área irradiada foi macroscopicamente avaliada e amostras foram preparadas para análise histológica considerando, principalmente, os aspectos e profundidades de necrose

## ***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

( $d_{nec}$ ). Utilizando o modelo de decaimento exponencial [77, 78, 79], foi determinado o limiar de dose (Dth) em  $J/cm^2$ , o qual corresponde à dose de luz entre a interface do tecido normal e a do tecido necrosado. Os valores obtidos para o Dth para todos os fotossensibilizadores nas condições avaliadas neste estudo estão na tabela III e IV, no capítulo IV. A eficiência fotodinâmica revelada pelo limiar de dose é maior para o Photogem seguido pelo Photosan e finalmente pelo Photofrin e, para as clorinas, o limiar de dose é maior para o Photodithazine seguido pelo Foscan e o limiar mais baixo é apresentado pela Radachlorin. Baixos valores para Dth significam maior habilidade para induzir o tecido a necrose e, então, maior eficiência fotodinâmica. A figura 48 mostra a curva característica da  $d_{nec}$  pela dose de luz, para o Photogem.

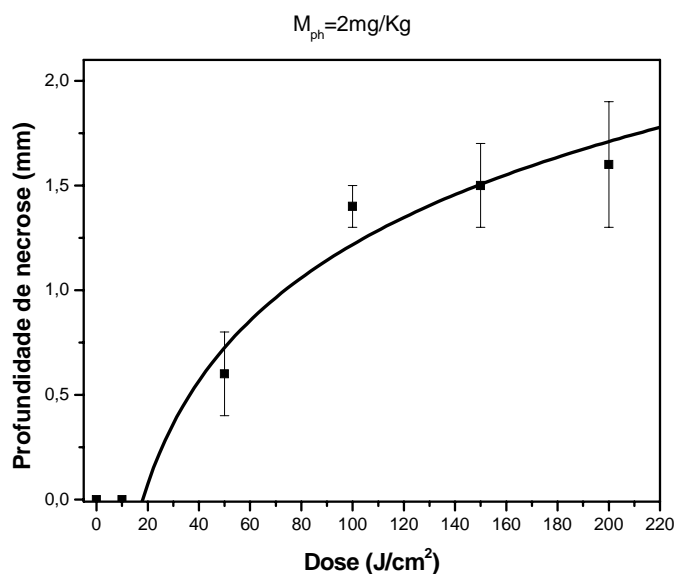


Figura 48 – Profundidade de necrose em função da dose de luz para o Photogem

### **3.3 – Correlação entre os Parâmetros de Fotoestabilidade e Limiar de Dose**

Os mecanismos envolvidos na fotodegradação dos fotossensibilizadores são muito complexos e ainda um assunto que necessita de um estudo intenso. Sendo composto de uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros, variações das características espectrais dos FSs

***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

não são relatadas facilmente e nem seus mecanismos fotodinâmicos. As mudanças observadas são associadas, normalmente, com fotorreações envolvendo o macrociclo tetrapirrólico. Recentes artigos [80, 81, 82] mostram que a principal responsável pela fotodegradação da molécula é o oxigênio singleto que tem tempo de vida curto, e os subprodutos da molécula excitada que reagem com a própria molécula em um forte processo oxidativo. Baseados nestes mecanismos, se o FS apresentar um alto rendimento quântico para produção do oxigênio singleto, este também apresentará uma forte fotodegradação. Por outro lado, a produção do oxigênio singleto é essencial para a eficiência fotodinâmica na morte celular, então, um alto rendimento quântico para produção do oxigênio singleto parece trabalhar em ambas as propriedades: fotodegradação e a eficiência fotodinâmica. Deve existir uma correlação entre as duas propriedades analisando-se os FSs individualmente. Quando se analisa diferentes FSs, o parâmetro de fotoestabilidade e limiar de dose não apresentam uma correlação, que pode ser observada na figura 49.

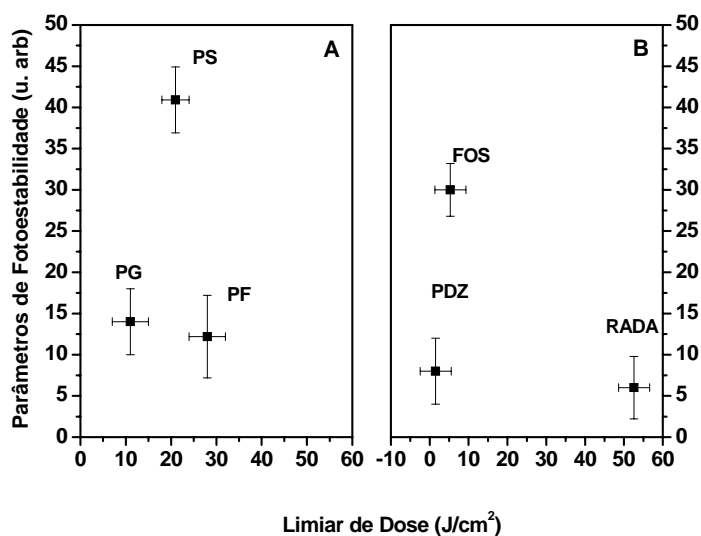


Figura 49 – Parâmetro de fotoestabilidade ( $\eta$ ) em função do limiar de dose ( $D_{th}$ ) para os HpDs (A) e clorinas (B) nas maiores concentrações utilizadas neste estudo.

***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

---

Altos valores de  $\eta$  significam uma maior fotoestabilidade do FS durante a iluminação e um baixo limiar dose (Dth) significa alta eficiência fotodinâmica. Observando a figura 49 podemos dizer que não há uma correlação entre  $\eta$  e Dth.

Analisando a figura 49 observa-se que há uma semelhança entre os derivados de hematoporfirinas e as clorinas. O Photosan e o Foscan apresentam alta fotoestabilidade, no entanto, um baixo Dth quando comparado ao Photofrin e a Radachlorin, respectivamente. Isso pode ser explicado devido ao PF e RADA serem pouco estáveis e quando iluminados degradam rapidamente gerando produtos de baixa toxicidade, necessitando de uma maior concentração da droga para que o valor do Dth diminua.

A existência da correlação é importante porque pode gerar um caminho para prever a extensão da necrose no tecido durante a iluminação, no entanto deve-se levar em conta que os FSs apresentam propriedades físico-químicas diferentes entre si.

Neste sentido, se a aplicação da luz durante o procedimento da TFD induziu à fotodegradação de um FS em quantidade local suficiente, é porque a dose de luz esta acima do Dth, e a necrose é, de alguma forma, garantida naquele local. Desde de que seja possível correlacionar a degradação do FS (variação da concentração do FS) utilizando espectroscopia de fluorescência, pode-se deduzir, através de uma medida óptica, como será a extensão da necrose tecidual.

A proposta parece interessante, mas ainda é necessário muito estudo experimental. Nós estudamos a fotoestabilidade em solução, é necessário realizar o mesmo tipo de estudo em tecido.

## ***CORRELAÇÃO ENTRE FOTOESTABILIDADE E EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA PARA DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES: HpDs E CLORINAS***

---

### **4 – Conclusões**

Estes resultados indicam que não há uma correlação entre a fotoestabilidade *in vitro* e a eficiência fotodinâmica *in vivo* para diferentes FSs, uma vez que estes apresentam diferentes características físico-químicas.

Esta correlação deve existir quando analisada individualmente para cada FS: a fotoestabilidade *in vivo* e a eficiência fotodinâmica.

A produção do oxigênio singleto, determina a eficiência fotodinâmica bem como a causa da fotodegradação do FS. Deve-se levar em conta os parâmetros de concentração e do tempo de acúmulo para cada FS.

## VI CONCLUSÕES GERAIS

---

## VI – CONCLUSÕES

A partir dos resultados e discussões apresentados conclui-se que, entre os derivados de hematoporfirinas, o Photogem é um fotossensibilizador com grande potencial para ser utilizado na TFD, pois apresenta uma baixa fotoestabilidade e um baixo limiar de dose de luz. Para os fotossensibilizadores a base de clorinas, o PDZ apresentou um grande potencial para a TFD, com baixa fotoestabilidade e baixo limiar de dose.

O estudo da fotodegradação mostrou a diferença do parâmetro de fotoestabilidade entre os FSs. Observa-se que, apesar dos HpDs serem considerados FSs similares, apresentam diferenças físico-químicas em solução; o mesmo pôde ser observado para as clorinas. Isso pode ser atribuído características intrínsecas de cada composto.

Analisando o limiar de dose de luz (Dth), observou-se que aumentando a concentração dos FSs houve uma diminuição do Dth. Entre os HpDs, observou-se que o PG apresentou menor Dth e, entre as clorinas, o PDZ.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre a fotoestabilidade e o limiar de dose. Comparar parâmetros *in vitro* e *in vivo* mostrou-se extremamente difícil, pois cada FS apresenta características físico-químicas próprias e diferentes umas das outras. Quando os FSs são estudados em solução, apresentam um comportamento que se alteram quando inseridos num sistema biológico, devido a interações que ocorrem com o meio (ligação com a membrana plasmática, pH do meio, entre outros). Isto dificulta uma correlação entre a fotoestabilidade com o limiar de dose de luz. Acreditamos que, para observar esta correlação, seja necessário estudar individualmente cada FS e analisar a fotodegradação e o limiar de dose de luz *in vivo*.

## VII REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

**VII – REFERÊNCIAS**

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER / INCA. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. *Ministério da Saúde*, 2003.
2. MARCASSA, L.G.; CESTARI, G.A.; MARCASSA, J.C.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Tumores. 1ª. Edição, novembro de 2002.
3. KURACHI, C.; MELO, C.A.S.; MARCASSA, L.G.; ZÍLIO, S.C.; BAGNATO, V.S.; CESTARI, G.A.; JAVARONI, A.; BERTO, J.C.; PASSERI, C.; BONILHA, V.S.; SILVA, M.; FERREIRA, J.; VERISSÍMO, F.M.; SOUZA, C.S. Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Breve Histórico e Resultados Alcançados. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*, ano V, nº 20, p. 33-41, 4º Trimestre 2002.
4. TOREZAN, L.A.R. Avaliação da Eficácia da Terapia Fotodinâmica com Ácido 5-Delta Aminolevulínico (ALA) Tópico no Carcinoma Basocelular. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Medicina, 2000.
5. COLUSSI, V.C.; NICOLA, E. M.; NICOLA, J.H. Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 42, n. 4, p. 229-236, 1996.
6. COLUSSI, V.C. Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos. 1997. 100 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
7. J. FERREIRA. Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica – estudo *in vivo*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de

- 
- Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, 2003.
8. WILSON, B. C. and PATTERSON, M. S. The physics of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.*, v.31, n 4, p. 327 – 360, 1986.
9. PROFIO, E. A. and DORION, D. R. Transport of light in tissue in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, v. 46, p. 591 – 599, 1987.
10. LUI, H., BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy. In: GOLDMAN, M.P.; FITZPATRICK, R.E., ed. *Cutaneous Laser Surgery*. 2<sup>o</sup> edição Saint Louis, Mosby, p.437-58, 1999
11. NELSON, J.S.; MCCULLOUGH, J.L.; BERNIS, M.W. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. In: ARDNT, K.A.; DOVER, J.S.; OLBRIGHT, S.M. *Laser in Cutaneous and Aesthetic Surgery*. Philadelphia, Lippincott-Raven, p.349-82, 1997
12. SPIKES, J.D. The original and meaning of the term “Photodynamic” (as used in “Photodynamic Therapy”, for example). *J. Photochem. Photobiol. B.*, v.9, p.369-74, 1991.
13. FRITSCH, C.; GOERRZ, G.; RUZICKA, T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch. Dermatol.*, v.134, p.207-14, 1998.
14. KALKA, K.; MERCK, H.; MUKTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.42, p.389-413, 2000.
15. LUI, H.; ANDERSON, R.R. Photodynamic therapy in dermatology [Editorial]. *Arch. Dermatol.*, v.128, p.1631-5, 1992
16. WILSON, B.D.; MANG, T.S.; STOLL, H.; JONES, C.; COOPER, M.; DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, v.128, p.1597-601, 1992.

- 
17. CARVALHO, V. C. M. Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep – 2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer. 2001. 91f. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, apresentada no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
  18. ZECELL, D.M. Hematoporfirina e derivados: propriedades ópticas e terapia fotodinâmica do câncer. 1987. 97f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.
  19. ZECELL, D.M. Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores. 1991. 145f. Tese (Doutorado) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
  20. BRAULT, D. Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 6, n. 1-2, p. 79-86, 1990.
  21. HENDERSON, B. W. and DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy works? *Photochem. Photobiol.*, v. 55, n. 1, p. 145 – 157, 1992.
  22. MENEZES, P. F. C. DE,. Estudo espectroscópico e citotóxico do Photogem<sup>®</sup> fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser. 2006. Tese de Doutorado em Química Analítica, apresentada no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
  23. MELO, C. A. S. Desenvolvimento dos conceitos básicos para dosimetria e aplicação em Terapia Fotodinâmica. 2003. Tese de Doutorado em Física Aplicada, apresentada no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
  24. GOMER, C.J.; RAZUM, N.J. Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochem. Photobiol.*, v.40, p.435-9, 1984.

25. GROSSMAN, M.C. What's new in cutaneous laser research? *Dermatol. Clin.*, v.15, p.1-8, 1997.
26. MOAN, J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 14, p. 159 – 176, 1992.
27. WIEMAN, T.J.; MNAG, T.S.; FINGAR, V.H.; HILL, T.G.; REED, M.W.R.; COREY, T.S. NGUYEN, V.Q.; RENDER, E.R., Jr. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*, v.104, p.512-7, 1988.
28. MELO, C.A.S.; IMA, A.L.L.A.; BRASIL, I.R.C.; CASTRO E SILVA, O.Jr; MAGALHÃES, D.V.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. Characterization of light penetration in rat tissues. *J. Clin. Laser Medicine & Surgery*, v.19, n°4, p.175-79, 2001.
29. GROSSWEINER, L.I. PDT light dosimetry revisited. *Photochem. Photobiol. B.*, v.38, p.258-68, 1997.
30. REIS, E. R. et.al. Avaliação do efeito fotodinâmico através do monitoramento da fluorescência da PpIX de glândula harderiana submetidas ao laser de He:Ne. In *Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações. Aspectos Físicos, Químicos, Biológicos e Médicos*, 2002. São Pedro, SP. Anais...p. 67 – 68. 2002.
31. BORISSEVITCH, I. E. Fotoquímioterapia: mecanismos alternativos da fototoxicidade. In: *Encontro Nacional em Moléculas Fotoativas e suas Aplicações em Terapia Fotodinâmica*, 1., São Pedro, SP. Anais IM - 2 p. 33 – 34. 2002.
32. PINTO, A. C. L. C. e LEITE, M. T. T. Radioterapia em oncologia, São Paulo, cap. 2.
33. FINGAR, V.H.; HENDERSON, B.W. Drug and light dose dependence of photodynamic therapy: a study of tumor and normal tissue response. *Photochem. Photobiol.*, v.46, n°5, p.837-41, 1987.

- 
34. PATTERSON, M. S., WILSON, B.C. AND GRAFF, R. *In Vivo* tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.* 51: 343 – 349.1990.
35. BOWN, B. G., C. J. TRALAU, P. D. COLERIDGE, D. AKDEMIR AND T. J. WIEMAN. Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitization: Quantitative studies in normal rat liver. *Br. J. Cancer.* **54**, 43. 1986.
36. GROSSWEINER, L.I. PDT light dosimetry revisited. *Photochem. Photobiol. B.*, v.38, p.258-68, 1997.
37. BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.*, p. 19 – 33. 1995.
38. MAZIERE, J. C., SANTUS, R., et. al. Cellular uptake and photosensitizing properties of anticancer porphyrins in cell membranes and low and high density lipoproteins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 6, p. 61 – 68, 1990.
39. POTTER, R., KENNEDY, J.C. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents towards neoplastic tissue. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 8, n. 1, p. – 16, 1990.
40. PASS, H. I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 85, n. 6, p. 443-456, 1993.
41. TOMINAGA, T. T., YUSHMANOV, V. E., BORISSEVITCH, I. E., IMASATO, H., TABAK, M. Aggregation phenomena in the complexes of iron tetraphenylporphine sulfonate with bovine serum albumin. *J. Inorg. Biochem.*, v. 65, n. 4, p. 235 – 244, 1997.
42. FELICIO, L. B. A. DE. A terapia Fotodinâmica como modalidade de tratamento das neoplasias cutâneas não – melanoma. Dissertação apresentada à Faculdade de

- 
- Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Clínica Médica. 2005.
43. PAGEM, C. P., CURTIS, M. J., WALKER, M. J., HOFFMAN, B. B. *Farmacologia Integrada*. São Paulo: manole, p. 606, 1999.
44. WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E. L. *Principles of Biochemistry*. 4 ed. New York: Academic Press, p. 1187, 1968.
45. SANTIAGO, P. S. Estudos espectroscópicos da interação de porfirinas catiônicas com modelos de membrana biológica. Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Química Analítica, 2004.
46. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Hemoglobina. Disponível em: [www.ufrgs.br/bioquímica/galmolec/proteinas/hemoglobina](http://www.ufrgs.br/bioquímica/galmolec/proteinas/hemoglobina).
47. DOUGHERTY, T. J. Studies on the structure of porphyrins contained in photofrin II. *Photochem, Photobiol.*, v. 46, p. 569 – 573, 1987.
48. MIRONOV, A. F., NIZHNIK, A. N., NOCKEL, A. Y. Haematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. *J. Photochem. Photobiol.B.*, v. 4, p. 297 – 306, 1990.
49. WOODBURN, K. W., FAN, Q., KESSEL, D., WRIGHT, M., MODY, T. D., HEMMI, G., MAGDA, D., SESSLER, J. L., DOW, W. C., MILLER, R. A., YOUNG, S. W. Phototherapy of cancer and atheromatous plaque with texaphyrins. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v. 14, n. 5, p. 343 – 348, 1996.
50. COLUSSI, V. C., FEYES, D. K., MUKTAR, H. Perspectives of photodynamic therapy for skin diseases. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, v. 11, n. 6, p. 336 – 346, 1998.

- 
51. SIMPLICIO, F. I., MAIONCHI, F., HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim. Nova*, v. 25, n. 5, p. 801 – 807, 2002.
52. PRIVALO, V. A., LAPP, A. V., SELIVERSTOVA, O. V., FAIZRAKHMANOVA, S. B.; YAROVOYA, N. N.; KOCHNEVAA, E. V.; EVNEVICH, M.V., ANIKINAB, A. S., RESHETNICOV, A. V., ZALVSKYD, I.D.; KEMOV, Y.V. Clinical trials of a new chlorin photosensitizer for photodynamic therapy of malignant tumours. *Proceedings of SPIE*, V. 4612, p. 178 – 189, 2002.
53. ROMANKO, YU. S., TSYB, A. F., KAPLAN, M. A., POPUCHIEV, V. V. Effect of photodynamic therapy with photodithazine on morphofunctional parameters of M-1 Sarcoma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 6, p. 584 – 589, 2004.
54. BONNET R. and MARTÍNEZ G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, v. 57, p. 9513 – 9547, 2001.
55. BONNET, R., MARTÍNEZ, G. Photobleaching studies on azabenzoporphyrins and related systems: a comparison of the photobleaching of the zinc(II) complexes of the tetrabenzoporphyrin, 5-azadibenzo(b, g)diporphyrin and phthalocyanine systems. *J.Porphyrin and Phthalocyanines*, v. 4, n. 5, p. 544 – 550, 2000.
56. ROTOMSKIS, R., BAGDONAS, S., STRECKYTE, G., et.al. Phototransformation of sensitizers: 3. Implications for clinical dosimetry. *Lasers Med. Sci.*, 1998.Vol. 13, p. 271–278.
57. ROTOMSKIS, R., STRECKYTE, G., BAGDONAS, S. Phototransformation of sensitizers: 1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 39, n. 2, p. 167 – 171, 1997.

- 
58. HADJUR, C., LANGE, N., REBSTEIN, J., MONNIER, P., BERGH, H. VAN DEN., WAGNIERES, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta (tetrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. *J. Photochem. Photobiol.*, v. 45, p. 170 – 178, 1998.
59. SPIKES, J. D., BOMMER, J. C. Photobleaching of mono-L-aspartyl chlorine e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem. Photobiol.*, v. 58, n. 3, p. 346 – 350, 1993.
60. OCHSNER, M. J. Photophysical and photobiological process in the photodynamic therapy of tumor. *Photochem. Photobiol. B.*, v. 39, n. 1, p. 1 – 18, 1997.
61. SPIKES, J. D. Quantum yields and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin photofrin II, tetra (4-sulfonatophenyl) - porphyrin and uroporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, v. 55, 797-808, 1992.
62. MENEZES, P. F. C., BAGNATO, V. S., SIBATTA, C., IMASATO, H. AND PERUSSI, J. R. Photo-cytotoxicity of Photogem submitted to photobleaching. *Proceedings of SPIE* ( contribution 5689-44) – San Jose – CA, 22-27 January 2005.
63. DAHLE, J., STEEN, H. B. and MOAN, J. The model of cell death induced by photodynamic depends on cell density. *Photochem. Photobiol.*, v. 70, n. 3, p. 363 – 367, 1999.
64. MARTINES, N. S. Avaliação do Processo de Morte Celular após Terapia Fotodinâmica. Dissertação apresentada a Faculdade de Educação da Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Biomédica 2003.
65. MARTINKOVICS, A. T. Ação de Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal no Processo de Morte Celular após Terapia Fotodinâmica. 4ff. Trabalho de graduação

- 
- apresentado a Faculdade de Educação da Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, SP. 2002.
66. ROULET, I. Methoden der athologischen histologie. *Springer* – Verlag, Wien, 1948.
  67. DETTY M. R., GIBSON S. L., WAGNER S. J. Current clinical and prediclinal photosensitizer for used in PDT. *J. Med. Chem*, v. 47, p. 3897-3915, 2004.
  68. ALLISON R. R., DOWNIE G. H., CUENCA R., HUX-H, CLULDS C. J. AND SIBATA C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodig. Photodynamic therapy*, v.1, p. 27-42, 2004.
  69. W. R. POTTER, T. S. MANG AND T. J. DOUGHERTY. The theory of photodynamic therapy dosimetry: consequences of photodestruction of sensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, v. 46, n.1, p. 97-101, 1987.
  70. IRENE GEORGAKOUDI, MICHAEL G. NICHOLS AND THOMAS H. FOSTER. The mechanism of Photofrin<sup>®</sup> photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochemistry and Photobiology*, v. 65, n.1, p. 135-144, 1997.
  71. J. FERREIRA, C. KURACHI, C.H. SIBATA, C. BONNERUP, R.R. ALLISON and V.S. BAGNATO. Determination of Quantum efficiency of Phototransformation of Three Different Photosensitizer: Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> and Photosan<sup>®</sup>. Submitted to *Laser Medical Scienc*, in 2007.
  72. BRIAN C, WILSON, MICHAEL S. PATTERSON, DIANE M. BURNS. Effect of photosensitizer concentration in tissue on the penetration depth of photoactivation light. *Laser in Medical Science*, v. 1, p. 235-244, 1986
  73. LOTHAR LILGE AND BRIAN C. WILSON. Photodynamic therapy of intracranial tissues: A preclinical comparative study of four different photosensitizers. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 16, n. 2, p. 81-91, 1998.

- 
74. J. FERREIRA, C. KURACHI, C. A. S. MELO, L.T. MORIYAMA, S. ZUCOLOTO and V.S. BAGNATO. Necrosis characteristics of photodynamic therapy in normal rat liver. *Laser Physics*, v. 14, n. 2, p. 209 – 212, 2004.
75. J. FERREIRA, C. KURACHI, L. T. MORIYAMA, P. F. C. MENEZES, J. R. PERUSSI, C.H. SIBATA, S. ZUCOLOTO, O. CASTRO E SILVA and V.S. BAGNATO. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy in PDT for different photosensitizers. *Laser Phys. Lett.*, v. 3, n. 2, p. 91 – 95, 2006.
76. MELO, C. A., C. KURACHI, G. CLOVIS, C. H. SIBATA, O. CASTRO E SILVA AND V. S. BAGNATO. Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 73, p. 183-188, 2004.
77. MICHAEL S. PATTERSON, BRIAN C. WILSON AND RONALD GRAFF. *In vivo* tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. *Photochemistry and Photobiology*, v. 51, n. 3, p. 343-349, 1990.
78. QUN CHEN, BRIAN C. WILSON, MARY O. DERESKI, MICHAEL S. PATTERSON, MICHAEL CHOPP AND FRED W. HETZEL. Effects of light beam size on fluence distribution and depth of necrosis in superficially applied photodynamic therapy of normal rat brain. *Photochemistry and Photobiology* v. 56, n. 3, p. 379-384, 1992.
79. THOMAS J. FARREL, BRIAN C. WILSON, MICHAEL S. PATTERSON AND MALINI C. OLIVO. Comparison of the *in vivo* photodynamic threshold dose for photofrin, mono – and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine using a rat liver model. *Photochemistry and Photobiology*, v. 68, n. 3, p. 394-399, 1998.

- 
80. T. H. FOSTER, R. S. MURANT, R. G. BRYANT, R. S. KNOX, S. L. GIBSON AND R. HILF. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat. Res.*, v. 126, n. 3, p. 296-303, 1991.
  81. B. W. HENDERSON, T. M. BUSCH, L. A. VAUGHAN, N. P. FRAWLEY, D. BABICH, T. A. SOSA, J. D. ZOLLO, A. S. DEE, M. T. COOPER et. al. Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinoma during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Reserch*, v. 60, n. 3, p. 525-529, 2000.
  82. H. W. WANG, M. E. PUTT, M. J. EMANUELLE, E. GLATSTEIN, A. G. YODH AND T. M. Busch. Treatment induced changes in tumor oxygenation predict photodynamic therapy outcome. *Cancer Reserch*, v. 64, n. 20, p. 7553-61, 2004.
  83. J. FERREIRA, L. T. MORIYAMA, C. KURACHI, C. SIBATA, O. CASTRO E SILVA JR., S. ZUCOLOTO and V. S. BAGNATO. Experimental determination of Threshold Dose in Photodynamic Therapy in Normal Rat Liver. *Laser Physics Letter*, 2007 (in press).
  84. J. D. VOLLET. Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre Física Básica, 2007.
  85. GOUTERMAN, M. The porphyrins. Vol. 206. 1978, New York: Academic Press.
  86. EHRENBERG, B., MALIK, Z., AND NITZAN, Y. Photocehm. *Photobiol* . 1985, 41, p.429-435.
  87. GOUTERMAN, M., GOUTERMAN, M. The porphyrins. Vol. II. 1978, New York: Academic Press
  88. MENEZES, P.F.C., et al. Dark cytotoxicity of the photoproducts of the photosensitizer photogem after photobleaching induced by a laser. *Laser Physics*, 15 (3): p. 435-442, 2005.

- 
89. MENEZES, P.C., et al. Photocytotoxicity of Photogem® Submitted to Photobleaching. Proceedings of SPIE, 5689: p. 244-254, 2005.
90. STRECKYTE, G. AND R. ROTOMSKIS. Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media. *J Photochem Photobiol B*, 18 (2-3): p. 259-63, 1993.
91. ANNEMARIE TEN WOLDE, B.A.M., WIM A. PIETERSON, W. NICO SPECKAMP. Stability and scanning electron microscopy of Photofrin-H and Photosan-3. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36: p. 139-142, 1996.
92. ROTOMSKIS, R., et al. Fluorescence spectra of hematoporphyrin and hematoporphyrin-diacetate aggregates in buffer solution. *J Photochem Photobiol B*, 3(3): p. 369-77, 1989.
93. BEZDETNYA, L., et al. Spectroscopic and biological testing of photobleaching of porphyrins in solutions. *Photochem Photobiol*, 64(2): p. 382-6, 1996.
94. MENEZES, P.F.C., FERREIRA, J., BAGNATO, V. S., IMASATO, H., PERUSSI, J. R. Correlation of Cytotoxicity and Depth of Necrosis of the Photoproducts of Photogem. *Laser Physics*, 17(4), p: 461-467, 2007.
95. ANA PAULA J. MAESTRIN, ANDERSON O. RIBEIRO, ANTONIO CLÁUDIO TEDESCO, CLÁUDIO R. NERI, FÁBIO S. VINHADO, OSVALDO A. SERRA\*, PATRÍCIA R. MARTINS, YASSUKO IAMAMOTO, ANA MARGARIDA G. SILVA, AUGUSTO C. TOMÉ, MARIA G. P. M. S. NEVES AND JOSÉ A. S. CAVALEIRO. A Novel Chlorin Derivative of *Meso*-tris(pentafluorophenyl)-4-pyridylporphyrin: Synthesis, Photophysics and Photochemical Properties. *J. Braz. Chem. Soc*, Vol. 15, No. 6: p. 923-930, 2004.
96. AIME M. GLOI, ELSA BECK, DMV. Threshold Dose of Photosensitizers in Dogs with Spontaneous Tumors. *Veterinary Therapeutics*, Vol. 4, No 3: p. 269-278, 2003.

- 
97. DAZIANO, J. P.; STEENKEN, S.; CHABANNON, C. et al. Photophysical and redox proprieties of a series of phthalocyanines: Relation with their photodynamic activities on TF-1 and Daudi leukemic cells. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 64, No 4: p. 712-719, 1996.
98. CROUCH, A. M.; LANGFORD, C. H. Photophysical behavior of zinc tetraphenylporphyrins in solutions and polymer-films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A – Chemistry*, Vol. 52, No1: p. 55-64, 1990.
99. CORRÊA, J. C. Fotodegradação do Photodithazine e Citotoxicidade dos Fotoprodutos formados após irradiação com Laser 2006. Dissertação de Mestrado em Ciências Químicas (Química Analítica), apresentada no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
100. ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformation of sensitisers: 2. Photoproducts formed in aqueous solution of porphyrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Vol. 39, p. 172– 175, 1997.
101. BONNET, R.; DJELAL, B. D. HAMILTON, P. A.; MARTINEZ, G.; WIERRANI, F. Photobleaching of 5, 10, 15, 20 – tetrakis (m- hydroxyphenyl) porphyrin (m- THPP) and the corresponding chlorine (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology*, Vol. 53, p: 136-143, 1999.
102. ROTOMSKIS, R., BAGDONAS, S., STRECKYTE, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photo product formation of porphyrins used in tumor therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology*, Vol. 33, p. 61– 67, 1996.
103. MENEZES, P. F.C.; MELO, C.A.S.; BAGNATO, V.S.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct of the photosensitizer Photogem during intense illumination. *Laser Physics*, Vol. 14, N° 9, p: 1-5, 2004.

- 
104. HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 1: p. 212-9, 2000.
  105. BROWN, S.B., E.A. BROWN, AND I. WALKER. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol*, 5(8): p. 497-508, 2004.
  106. KUBLER, A.C. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 20: p. 37-45, 2005.
  107. BRANCALEON, L. AND H. MOSELEY. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*, 17(3): p. 173-86, 2002.
  108. SPORRI, S., et al. Effects of 5-aminolaevulinic acid on human ovarian cancer cells and human vascular endothelial cells in vitro. *J Photochem Photobiol B*, 64(1): p. 8-20, 2001.
  109. SOPHIE MARCHAL, A.F., ESTELLE MAUGAIN, MARIE-ANGE D'HALLEWIN, FRANÇOIS GUILLEMIN, LINA BEZDETNAYA\*. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan1 photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochemical Pharmacology*, 69: p. 1167-1176, 2005.
  110. CHWILKOWSKA, A., et al. Uptake of photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells in vitro. *Acta Biochimica Polonica*, 50(2): p. 509-513, 2003.
  111. SIBATA, C.H.C., V. C.;OLEINICK, N. O.;KINSELLA, T. J. Photodynamic Therapy in Oncology. *Expert Opin. Pharmacother*, 2(6): p. 917-927, 2001.
  112. BANFI, S., et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem*, 12(18): p. 4853-60, 2004.
  113. CHISSOV, V.I., et al. Photodynamic Therapy and Fluorescent Diagnosis of Malignant-Tumors with the Preparation Photogem. *Khirurgiya*, (12): p. 3-6, 1994.

- 
114. SOKOLOV, V.V., et al. Clinical fluorescence diagnostics in the course of photodynamic therapy of cancer with photosensitizer Photogem®. *SPIE*, 2325: p. 375-380, 1995.
  115. V.V. SOKOLOV, V.I.C., E.V. FILONENKO, G.M. SUKHIN, R.I. YAKUBOVSKAYA, T.A. BELOUS, N.N. ZHARKOVA, D.N. KOZLOV, V.V. SMIRNOV. Photodynamic therapy of cancer with the photosensitizer Photogem. , *SPIE*, 2325 367-374,1995.
  116. IVANOV, A.V.R., A,V.; PONOMAREV, G,V. One more PDT application of Chlorin e6. *SPIE*, 3909: p. 131-137, 2000.
  117. DOLMANS, D.E., D. FUKUMURA, AND R.K. JAIN. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(5): p. 380-7, 2003.
  118. ANGOTTI, M., et al. Characterization by matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of the major photoproducts of temoporfin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). *J Mass Spectrom*, 36(7): p. 825-31, 2001.
  119. STRAKHOVSKAYA, M.G., et al. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiology*, 71(3): p. 298-301, 2002.
  120. STRAKHOVSKAYA, M.G., et al. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. *Dokl Biochem Biophys*, 384: p. 155-8, 2002.
  121. VARGAS, F., DIAZ, Y., YARTSEV, V. et al. Propiedades fotofísicas del nuevo fotosensibilizador Radaclorin en diferentes medios. *CIEN*, 12(1): p. 70-77, 2004.
  122. LILGE, L. AND B.C. WILSON. Photodynamic therapy of intracranial tissues: A preclinical comparative study of four different photosensitizers. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 16(2): p. 81-91, 1998.

123. Russia, M.d.S.d., Photogem. Farmacopéia Russa nº 47.10/02/1999, Russia.
124. Byrne, C.J., L.V. Marshallsay, and A.D. Ward, The composition of Photofrin II. *J Photochem Photobiol B*, 1990. 6(1-2): p. 13-27.
125. Coxand, G.S., Whitten, D. G., Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin IX in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982. 104: p. 516-521.



---

**Publicações**

1. C. S. Souza; A. B. S. Neves; FELÍCIO, L. B. A; J. Ferreira; C. Kurachi; BAGNATO, V. S. Optimized Photodynamic Therapy with Systemic Photosensitizer Following Debulking Technique for Nonmelanoma Skin Cancers. *Dermatologic Surgery*, v. 33, p. 194-198, 2007.
2. J. Ferreira; MORIYAMA, Lilian T; C. Kurachi; C. H. Sibata; SILVA, Orlando Castro e; S. Zucoloto; BAGNATO, V. S. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. *Laser Physics Letters*, v. 4, p. 1-7, 2007.
3. P. F. C. Menezes; J. Ferreira; BAGNATO, V. S.; H. Imasato; PERUSSI, Janice. Correlation of Cytotoxicity and Depth of Necrosis of the Photoproducts of Photogem. *Laser Physics*, v. 17, p. 461-467, 2007.
4. J. Ferreira; C. Kurachi; L. T. Moriyama; P. F. C. Menezes; J. R. Perussi; SIBATA, Cláudio; ZUCOLOTO, Sérgio; O. de Castro e Silva Jr; BAGNATO, Vanderlei Salvador. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy for different photosensitizers. *Laser Physics Letter*, Rússia, v. 3, p. 91-95, 2006.
5. J.C. Marcassa ; J. Ferreira ; ZUCOLOTO, Sérgio ; O. de Castro e Silva Jr ; L. G. Marcassa ; BAGNATO, Vanderlei Salvador . Detection of Hepatocarcinoma in Rats by Integration of the Fluorescence Spectrum: Experimental Model. *Laser Physics*, Rússia, v. 16, n. 5, p. 827-832, 2006.
6. I. Ferreira; S. C. Rahal; J. Ferreira; T. P. Corrêa. Terapêutica no carcinoma de células escamosas cutâneo em gatos. *Ciência Rural*, Brasil, v. 36, p. 1027-1033, 2006.
7. BAGNATO, Vanderlei Salvador; C. Kurachi; J. Ferreira. Dermatological PDT in Brazil: An Emerging Reality. *Clinical Photodynamics*, Reino Unido, v. 1, p. 4-6, 2006.
8. SANKARANKUTTY, Ajith Kumar; O. Castro e Silva Jr; J. Ferreira; M.E.J.Souza; M.C. Gomes; C. Kurachi; BAGNATO, Vanderlei Salvador. Use of laser auto-

- 
- fluorescence for evaluating liver grafts. *Laser Physics Letters*, Rússia, v. 3, p. 539-545, 2006.
9. BAGNATO, Vanderlei Salvador; C. Kurachi; J. Ferreira; SANKARANKUTTY, Ajith Kumar; ZUCOLOTO, Sérgio; SILVA, Orlando de Castro e. New photonic for the treatment and diagnosis of hepatic diseases. An overview of the experiment work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. *Acta Cirurgica Brasileira*, Brasil, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2006.
  10. OLIVEIRA, Alexandre Ferreira; SILVA, Tiago Castro e; SANKARANKUTTY, Ajith Kumar ; PACHECO, Eduardo Garcia ; J. Ferreira ; BAGNATO, Vanderlei Salvador ; ZUCOLOTO, Sérgio ; SILVA, Orlando de Castro e . The effect of laser on remanescant liver tissue after 90% hepatectomy in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, Brasil, v. 21, n. 1, p. 29-32, 2006.
  11. TARLA, Marissa Rabelo; RAMALHO, Fernando Silva; RAMALHO, Leandra Naira Zambelli ; SILVA, Tiago Castro e ; BRANDÃO, Daniel Ferracioli ; J. Ferreira ; SILVA, Orlando Castro e ; ZUCOLOTO, Sérgio . A molecular view of liver regeneration. *Acta Cirurgica Brasileira*, Brasil, v. 21, n. 1, p. 58-62, 2006.
  12. TARLA, Marissa Rabelo; RAMALHO, Fernando; RAMALHO, Leandra Naira Zambelli ; SILVA, Tiago Castro e ; BRANDÃO, Daniel Ferracioli ; J. Ferreira ; SILVA, Orlando Castro e ; ZUCOLOTO, Sérgio . Cellular aspects of liver egeneration. *Acta Cirurgica Brasileira*, Brasil, v. 21, n. 1, p. 63-66, 2006.
  13. C. Kurachi; J. Ferreira; L. G. Marcassa; G. A. Cestari Filho; C. S. Souza; BAGNATO, Vanderlei Salvador. Clinical Experience of PDT in Brazil: a 300 patient overview. *Proceedings of Spie, SPIE*, v. 5689, p. 218-226, 2005.
  14. J. Ferreira; L. T. Moriyama ; C. Kurachi ; O. Castro e Siva Jr ; SIBATA, Cláudio ; BAGNATO, Vanderlei Salvador . Photobleaching of Photogem: A Spectroscopic Study in Solution. *Proceedings of Spie, SPIE*, v. 5689, p. 227-234, 2005.

15. BAGNATO, Vanderlei Salvador; C. Kurachi; J. Ferreira; L. G. Marcassa; C. H. Sibata ; R. R. Allison . PDT experience in Brazil: A regional profile. Photodiagnosis And Photodynamic Therapy, Estados Unidos, v. 2, p. 107-118, 2005.
16. J. Ferreira; BASTOS, Marta M F; PELIZON, Ana Claudia; PERES, Camila M; CAVALCANTI, D P; SARTORI, Alexandrina. Assessment of the neutralizing potency of ovine antivenom in a swiss mice model of Bothrops jararaca envenoming. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, UNIFESP, v. 11, n. 03, p. 336-349, 2005.
17. J. Ferreira; C. Kurachi; MELO, C. A. S.; L. T. Moriyama ; ZUCOLOTO, Sérgio ; BAGNATO, V. S. . Necrosis Characteristics of Photodynamic Therapy in Normal Rat Liver. Laser Physics, Rússia, v. 14, p. 209-212, 2004.
18. C. Kurachi ; MELO, C. A. S. ; L. G. Marcassa ; S. C. Zílio ; BAGNATO, V. S. ; G. A. CESTARI FILHO ; A. JAVARONI ; J. C. BERTO ; C. PASSERI ; V. S. Bonilha ; M. Silva ; J. Ferreira ; F. M. Veríssimo ; SOUZA, C.S. . Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Breve Histórico e resultados Alcançados. Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia, Brasil, v. 20, p. 33-41, 2002.
19. BAGNATO, Vanderlei Salvador; L. G. Marcassa; C. Kurachi; C. A. S. Melo; J. Ferreira; G. A. Cestari Filho. PDT in Brazil. Photodynamics News, v. 04, n. 03, p. 02-05, 2001.

### **Capítulos de livros publicados**

1. J. Ferreira ; RASTELLI, Alessandra Nara Souza . Outras aplicações clínicas do LED azul em odontologia e em fisioterapia. In: Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli; José Eduardo Pelizon Pelino; Fernando Luis Esteban Flores. (Org.). Clareamento Dental Fotoativado pos LEDs Azuis. 1 ed. São Carlos: , 2006, v. 1, p. 28-32.

2. J. Ferreira. Interação do Laser com o Tecido Biológico. In: Vitória Maciel;. (Org.). Protocolos Clínicos para Aplicação do LASER de Baixa Intensidade nos Procedimentos Fisioterapêuticos. 1a ed. São Carlos: , 2006, v. , p. 13-16.

### **Produtos tecnológicos**

J. Ferreira ; C. Kurachi ; L. G. Marcassa ; BAGNATO, V. S. . DISPOSITIVO À BASE DE LEDs (LIGHT EMITTING DIODES) PARA BANHO DE LUZ NO TRATAMENTO NEONATAL DE ICTERÍCIA. 2002.