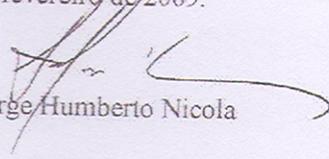


**JOÃO WAGNER RODRIGUES HERNANDEZ**

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas Área de concentração Ciências Biomédicas do (a) aluno(a) **João Wagner Rodrigues Hernandez**.

Campinas, 27 de fevereiro de 2009.

  
Prof(a). Dr(a). Jorge Humberto Nicola  
Orientador(a)

**"ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COMO  
MÉTODO PARA MONITORAMENTO DE PORFIRIA  
INDUZIDA POR DIETA DE GLICOSE"**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2009**

**JOÃO WAGNER RODRIGUES HERNANDEZ**

**“ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COMO  
MÉTODO PARA MONITORAMENTO DE PORFIRIA  
INDUZIDA POR DIETA DE GLICOSE”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

**ORIENTADOR:** PROF. DR. JORGE HUMBERTO NICOLA

**CO-ORIENTADORA:** PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ESTER MARIA D. NICOLA

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

H43e Hernandez, João Wagner Rodrigues  
“Espectroscopia de fluorescência como método para  
monitoramento de porfiria induzida por dieta de glicose” / João  
Wagner Rodrigues Hernandez. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Jorge Humberto Nicola, Ester Maria Danielli Nicola  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Porfirias. 2. Fluorescência. 3. Fotodiagnóstico. I. Nicola,  
Jorge Humberto. II. Nicola, Ester Maria Danielli. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : “Fluorescence spectroscopy as a method for diagnosis of  
porphyria induced by glucose diet of 5%”**

**Keywords:** • Porphyrias  
• Fluorescence  
• Photo diagnostic

**Titulação: Ciências Médicas**  
**Área de concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola**  
**Prof. Dr. Reinaldo Jordão Gusmão**  
**Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan**  
**Profa. Dra. Denise Zezell**  
**Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro**

**Data da defesa: 26-02-2009**

---

# Banca examinadora de Tese de Doutorado

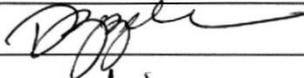
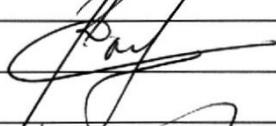
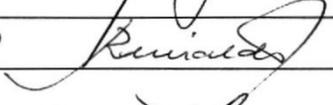
---

João Wagner Rodrigues Hernandez

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Jorge Humberto Nicola**

---

<b>Membros:</b>	
Professor (a) Doutor (a) Denise Maria Zezell	
Professor (a) Doutor (a) Antonio Luiz Barbosa Pinheiro	
Professor (a) Doutor (a) Roberto José Maria Covolan	
Professor (a) Doutor (a) Reinaldo Jordão Gusmão	
Professor (a) Doutor (a) Jorge Humberto Nicola	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 27/02/2009**

---

## **DEDICATÓRIA**

*"Dedico este trabalho à todos aqueles que sabem que a busca deve ser feita com passos certos".*

*Aos meus orientadores - Dr Jorge e Dra Ester;*

*Aos meus Pais- pelos caminhos certos que me levaram;*

*A minha esposa- companheira de Jornada;*

*Aos meus filhos - Ana Luisa, Rodrigo e Isabela  
- pelos ensinamentos de vida, sempre!*

*Aos meus bons amigos, que me incentivaram e me apoiaram nesta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à Deus pela oportunidade da vida!

Agradeço aos meus Orientadores Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola, pelos ensinamentos, incentivo e amizade e a Dra Ester M. D. Nicola, pela mão amiga, pelo carinho e amizade;

Ao meu companheiro do Laboratório Laser - Dr. Edmyr Rosa dos Reis, pelo auxílio, dedicação e amizade;

A minha esposa, Rosanna, pela renúncia e pelo caminhar seguro junto à mim;

Aos meus filhos - Ana Luisa, Rodrigo e Isabela, por entenderem a falta e os "não posso" de seu pai;

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental - NMCE -UNICAMP, pelo apoio e ajuda;

A Sra Maria Dionísia, técnica aposentada do Lab. Laser, pelo apoio e paciência no início dos experimentos;

A Dra Renata Fiorotti, pelo incentivo;

Aos meus alunos do curso de Fisioterapia, pelos constantes ensinamentos;

Aos meus Pais - João e Therezinha, pelos ensinamentos de humildade, humanidade e amor ao próximo.

A Babi e o Arthur, pelo auxílio na formatação deste trabalho;

Aos amigos Rickson Mesquita e Zenner Pereira da Silva, pela colaboração na confecção dos gráficos da Tese;

Ao Jorge Airton Cicala, pela ajuda nos momentos difíceis na tabulação da Tese,

E a todos que me incentivaram, mesmo que de longe, Obrigado!

*"Se eu pudesse deixar algum presente a você,  
deixaria aceso o sentimento de  
amor à vida dos seres humanos.  
A consciência de aprender tudo o que nos  
foi ensinado pelo tempo afora.  
Lembraria os erros que foram cometidos,  
como sinais para que não mais se  
repetissem a capacidade de escolher novos rumos.  
Deixaria para você, se pudesse, o respeito,  
aquilo que é indispensável:  
além do pão, o trabalho e a ação.  
E, quando tudo mais faltasse,  
para você eu deixaria, se pudesse, um segredo:  
O de buscar no interior de sí mesmo a resposta para  
encontrar a saída".*

**(GANDHI)**

A pesquisa de fluorescência nativa em tecidos biológicos tem despertado grande interesse na Biologia e Medicina. A fluorescência óptica tornou-se instrumento indispensável aos diagnósticos, sendo um método eficiente e não invasivo.

Neste trabalho investigamos a presença de fluorescência nativa em áreas corpóreas de ratos Wistar, subdivididos em dois grupos: um com alimentação normal e outro com dieta de glicose 5%. Em áreas internas (experimento 1), não ficou evidenciada a fluorescência nativa em animais com alimentação normal de água e ração. Nos animais submetidos à dieta de glicose, observamos a presença de fluorescência nativa vermelha, captada por espectroscopia, alcançando um pico máximo de emissão luminosa em 120 horas de dieta e retomando valores iniciais, quando sua dieta voltou ao normal.

O conteúdo do lúmen intestinal foi analisado espectroscopicamente e por prova bioquímica. O gráfico obtido foi semelhante ao da PpIX e o teste bioquímico (Eales modificado ) resultou positivo à presença de substância porfirínica.

A fluorescência em áreas externas, bolsa escrotal, focinho, pata e cauda, também foi pesquisada nas mesmas condições de dieta (normal e glicosada), evidenciando que animais com dieta normal, não apresentaram fluorescência e nos de dieta de glicose, deparamos com pico máximo de fluorescência em 120 horas de dieta e retomando valores iniciais, quando sua dieta voltou ao normal.

A fluorescência nativa encontrada nos animais submetidos à dieta glicosada, evidencia uma nova condição fisiopatológica e que se assemelha a um quadro de porfíria reversível, bem identificada e documentada pelo experimento 2.

Os resultados mostram a importância da espectroscopia óptica como um método de diagnóstico precoce, simples e confiável, para uso em diversos tipos de doenças ou disfunções com acúmulo de pigmentos fotossensíveis. Chama, ainda, a atenção para situações em que fluorescências nativas possam ser tomadas como diagnóstico falso-positivo de alterações patológicas ou não.

The research of native fluorescence in biological tissues has aroused great interest in Biology and Medicine. The optic fluorescence became an important instrument for the diagnosis, being an efficient and non-invasive method. In this work we investigated the presence of native fluorescence in corporal areas of Wistar rats, subdivided in two groups: one with normal feeding and another one with glucose diet 5%. In the intestinal tract (Experiment 1), there was no evidence of fluorescence in animals with normal feeding of water and ration. In the animals submitted to the glucose diet, we observed the presence of red native fluorescence, caught by spectroscopy, reaching a maximum peak of luminous emission in 120 hours of diet with the return to normal values after the re-introduction of normal diet.

The content of the intestinal lumen was analyzed spectroscopically and by biochemical test. The obtained graph was similar to the one of the PpIX and the test modified by Eales resulted positive to the presence of porfirinic substance.

For Experiment 2, a group of 30 animals were kept at the same diet conditions (normal and glucose 5%) up to 120 hours. Four external areas were selected for the study (paw, tail, nose and scrotum). The group of animals under glucose diet presented a marked fluorescence on the selected areas with a maximum pick at 120hours. After 24 and 48 hours of reestablishment of the regular solid diet the fluorescence decreased disappearing totally at 48 hour.

The native fluorescence found in the animals submitted to the glucose diet, evidences a physiopathological condition and it is similar to a condition of reversible porfiria, well identified and registered by Experiment 2. The results show the importance of the optic spectroscopy as a method of precocious, simple and trustworthy diagnosis, for use in diverse types of illnesses or dysfunctions with accumulation of photosensitive pigments. It also calls attention, for situations where native fluorescence can be taken as false-positive diagnosis of malignant alterations.

## LISTA DE ABREVEATURAS

---

ALA	Ácido amino levulínico
CEMIB	Centro de Bioterismo UNICAMP
CEP	Porfíria Eritropoiética Congênita
DP	Deuteroporfirina
EF	espectroscopia de fluorescência
EPP	Porfíria Eritropoiética
Hp	Hematoporfirina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NMCE	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
PAI	Porfíria Aguda Intermitente
PDD	Diagnóstico Fotodinâmico
PDT	Terapia Foto dinâmica
PpIX	Protoporfirina IX
S <sub>0</sub>	Estado fundamental de energia
SPF	Specific Pathogen Free
UV	Ultra Violeta

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Máxima excitação e emissão de fluoróforos endógenos.....	51
<b>Tabela 2-</b> Classificação dos tipos e manifestações clínicas de Porfirias relatadas na literatura.....	58

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Espectro da luz visível.....	48
<b>Figura 2-</b> Diagrama dos níveis de energia para moléculas fotoluminescentes.....	50
<b>Figura 3-</b> Biópsia óptica por meio da luz de fluorescência no tecido e as várias formas de leitura óptica sobre a radiação transmitida, espalhada e absorvida na amostra.....	52
<b>Figura 4-</b> Gráfico característico da Protoporfirina IX (PpIX).....	53
<b>Figura 5-</b> Molécula representativa do heme porfírico.....	56
<b>Figura 6-</b> Esquema da via Biosintética do grupo Heme, indicando as principais vias de produção e de inibição de Porfirina..	57
<b>Figura 7-</b> Fotos referentes a animais tratados com dieta líquida por glicose. Em A, animal iluminado com luz branca e em B com luz UV, evidenciando-se a presença de fluorescência vermelha.....	67
<b>Figura 8-</b> Fragmentos de intestino de rato tratado com dieta normal (A) e com dieta de glicose (B), iluminados com luz UV.....	68
<b>Figura 9-</b> Animal anestesiado e iluminado com luz UV, para a captação de áreas com fluorescência externa.....	72
<b>Figura 10-</b> Aspecto macroscópico de laparotomia mediana realizada no abdome de rato tratado previamente com dieta normal de ração e água “ <i>ad libitum</i> ”, demonstrando o trato gastrintestinal, excretor e urinário.....	75

<b>Figura 11-</b>	Laparotomia mediana em abdome de animal com 120h de dieta líquida de glicose a 5%. Observa-se a depleção do conteúdo intestinal devido à dieta, apresentando sinais de esvaziamento completo.....	76
<b>Figura 12-</b>	Animal tratado com dieta normal, onde o trato gastrointestinal apresenta-se com ausência total de fluorescência.....	77
<b>Figura 13-</b>	Animal tratado com 48h de dieta líquida de glicose a 5%, onde se observa que o trato gastrointestinal apresenta-se com presença de fluorescência vermelha em um único ponto em alça intestinal e ausência nas demais áreas e órgãos.....	78
<b>Figura 14-</b>	Animal tratado com 72h de dieta líquida de glicose a 5%, onde se observa que o trato gastrointestinal apresenta-se com fluorescência vermelha em alguns pontos, destacando-se algumas alças intestinais e ausência nas demais áreas e órgãos.....	79
<b>Figura 15-</b>	Animal tratado com 96h de dieta líquida de glicose a 5%, onde se observa que o trato gastrointestinal apresenta-se com presença de fluorescência vermelha em diversos pontos (alças do íleo e jejuno) e ausência nas demais áreas e órgãos.....	80
<b>Figura 16-</b>	Animal tratado com 120h de dieta líquida de glicose a 5%, onde se observa no trato gastrointestinal a presença de intensa fluorescência vermelha generalizada em todas as alças intestinais e ausência nas demais áreas e órgãos. Nota-se o extravasamento de parte do material fecal fluorescente para a gaze que recobre o animal.....	81

<b>Figura 17-</b>	Espectro típico, de materiais identificados nas situações das figuras 13 – 16, de emissão fluorescente da região vermelha, mostrando pico bem definido (máximo em 636nm +/- 2nm) e, banda no infravermelho próximo, sugerindo a presença de, pelo menos, dois máximos em 695 e 708 nm.....	82
<b>Figura 18-</b>	Fragmentos de alças intestinais expostos a luz normal, onde em (A) animal com dieta normal e em (B), animal com dieta de glicose a 5% por 120 horas.....	83
<b>Figura 19-</b>	Fragmentos de alça intestinal iluminados com luz UV, onde (A) é de animal mantido com dieta normal. O fragmento (B), pertence ao animal mantido com dieta de glicose a 5% por 120 horas.....	84
<b>Figura 20-</b>	Lúmen intestinal exposto com material fecal de ratos com dieta de glicose a 5% por 120 horas, apresentando intensa fluorescência vermelha. Abaixo o seu respectivo espectro de fluorescência com banda centrada em 636 nm.....	85
<b>Figura 21-</b>	Material fecal de ratos com dieta normal, coletado e diluído em 10ml de soro fisiológico, distribuídos em tubos do tipo “eppendorfs” sob iluminação por luz UV. O espectro coletado mostra ausência de fluorescência.....	86
<b>Figura 22-</b>	No material fecal fluorescente de ratos com dieta de glicose por 120 horas, contidos em “eppendorfs”. Observa-se a presença de fluorescência vermelha, vista sob ação de luz UV. A espectrometria mostra curva com pico de 636 nm.....	87

<b>Figura 23-</b>	Tubo de ensaio (A) com material fecal colhido de animal com dieta normal e (B) animal submetido à dieta de glicose por 120 horas, fotografado com luz branca, preparado segundo a técnica de Eales.....	88
<b>Figura 24-</b>	Tubos de ensaio com material fecal preparado segundo a técnica de Eales. Em (A) material colhido de animal com dieta normal e (B), de animal submetido à dieta de glicose por 120 horas, fotografados com UV. Os espectra demonstram a ausência de fluorescência em (A) e presença de intensa fluorescência em (B), com pico em torno de 636 nm.....	89
<b>Figura 25-</b>	Animal submetido à dieta líquida de glicose – 5%, iluminado com luz branca.....	90
<b>Figura 26-</b>	Animal da figura 25, fotografado com luz UV, evidenciando a presença de fluorescência vermelha disseminada em várias áreas, como: focinho, patas, cauda e bolsa escrotal.....	90
<b>Figura 27-</b>	Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência nas patas traseiras, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições: (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F) representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Em média foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal.....	92

**Figura 28-** Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência na cauda, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições: (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F) representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Em média foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal..... 93

**Figura 29-** Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência focinho, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F) representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Em média foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal..... 94

**Figura 30-** Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência bolsa escrotal, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições: (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F) representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Em média foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal..... 95

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvii</i>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	41
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	45
Absorção óptica e fluorescência.....	47
Espectroscopia de fluorescência.....	49
Substâncias fluoróforas.....	50
Caracterização da espectrometria de fluorescência.....	52
Classificação das porfirias.....	58
Pigmentação animal.....	59
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	61
Amostragem.....	63
Materiais e equipamentos.....	63
Metodologia.....	65
Metodologia específica ao experimento I.....	66
Metodologia específica ao experimento II.....	70
<b>RESULTADOS</b> .....	73
<b>Experimento 1</b> .....	75
1- Laparotomia abdominal mediana – observação com luz branca...	75

2- Laparotomia abdominal mediana – observação com luz ultra violeta.....	77
3- Espectrometrias do material fluorescente.....	82
3.1- Espectrometrias do material fluorescente encontrado no trato intestinal de animais sob dieta de glicose.....	83
4- Resultados relativos ao material coletado do trato intestinal de animais mantidos sob dieta e de glicose 5%.....	86
5- Teste de detecção de porfirinas modificado por EALES e Cols....	88
<b>Experimento 2</b> .....	90
1- Avaliação com lâmpada de ultra violeta - (UV) (áreas fluorescentes x espectrometria).....	91
<b>DISCUSSÃO</b> .....	97
<b>CONCLUSÃO</b> .....	105
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	109
<b>ANEXO</b> .....	119
<b>APÊNDICE</b> .....	123
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO APÊNDICE</b> .....	137

# INTRODUÇÃO



É comum encontrarmos relatos na literatura da presença de fluorescência endógena, geralmente provocada por luz UV, em estruturas e tecidos biológicos, como no tecido dentário normal (1), fibras colágenas (2), nas glândulas harderianas de certos roedores (3;4), nas artérias (5), músculo cardíaco (6;7) mitocôndrias (1;6) . Tais fluorescências são, em última análise, provenientes de substâncias, fluoróforos, como o NADH (Nucleotídeo de Adenosina Monofosfato), algumas proteínas, riboflavinas, flavoproteínas, lipofuccinas e porfirinas (1;6;8).

Diferentes áreas do estudo médico têm demonstrado grande interesse clínico por métodos ou técnicas não invasivas de diagnóstico, visando tomadas de decisões terapêuticas e de diagnóstico preventivos. Por outro lado, cada vez mais a ciência se utiliza da fluorescência endógena, produzida por UV, como um método seguro e não invasivo para mapear e diagnosticar condições patológicas inerentes de alguns tecidos. Sempre que ocorrerem alterações na constituição destes tecidos, decorrentes ou não de estados patológicos, a autofluorescência ou fluorescência endógena, poderá também alterar-se, nos levando a concluir que este fenômeno óptico pode ser considerado como um método de diagnóstico apropriado e pouco invasivo. (9;10 e 11).

Em um estudo experimental piloto com ratos Wistar, submetidos a dieta líquida com glicose, observamos a emissão de fluorescência endógena no trato gastrointestinal e em algumas áreas corpóreas externas dos animais. O padrão observado a olho nu aproxima-se muito do padrão de emissão fluorescente da Protoporfirina IX (PpIX), sendo comprovado por técnica espectrométrica (12).

As porfirinas são compostos cíclicos formados pela ligação de quatro anéis pirrólicos por pontes de metileno. São exemplos as porfirinas férreas, como o Heme da hemoglobina, e a clorofila, uma porfirina que contém magnésio e é o pigmento fotossintético das plantas (13).

Uma condição patológica em que a síntese de porfirina está envolvida em seres humanos e certos animais, a Porfíria, sendo relatada pela literatura (14; 15; 16; 17 e 18). As Porfirias são patologias de origem genética ou adquirida,

caracterizadas por um aumento na excreção de coproporfirina e uroporfirina, precursores na síntese das porfirinas, observados tanto nas fezes, como na urina, quando suas concentrações encontram-se elevadas no sangue. Isto ocorre por uma considerável diminuição da atividade catalásica do fígado. Esta perturbação metabólica que as produz ainda é pouco estudada (19 ; 20).

A presença de fluorescência endógena, encontrada tanto em áreas internas (no trato gastrointestinal), como em áreas corpóreas externas (patas, focinho, bolsa escrotal e cauda) de ratos submetidos à dieta líquida, evidencia uma condição nova por não ser patológica propriamente dita. Sendo assim, o seu estudo confere ao presente estudo uma característica peculiar, que é a de tentar associar o padrão de fluorescência observada no estudo piloto de Nicola et al (21), a uma condição de stresse e alteração metabólica levada a extremos, diferindo de estados patológicos em que se necessite ter uma restrição alimentar, o que poderia ser interpretado como um achado de diagnóstico falso-positivo.

# OBJETIVOS



## **Objetivo geral**

Investigar o comportamento de fluorescências nativas obtidas de diferentes regiões tegumentares externas, como patas, focinho, cauda e bolsa escrotal, bem como, internamente, no trato gastrointestinal de ratos Wistar, visando contribuir à investigação e entendimento das fluorescências nativas, em especial aquelas relacionadas à presença de PpIX, quando os animais são mantidos em condições de *stress*, no caso, confinamento e dieta líquida de glicose 5%, por tempo prolongado.

## **Objetivos específicos**

- 1-** Identificar, por intermédio de espectroscopia de fluorescência óptica o fluoróforo, produzido e encontrado tanto externamente, quanto internamente em ratos Wistar, quando submetidos a dieta líquida de glicose 5%.
- 2-** Identificar bioquimicamente a substância encontrada no trato gastrointestinal de ratos wistar, quando sob alimentação líquida.
- 3-** Monitorar por meio de registro fotográfico e espectral, o surgimento de fluorescência vermelha nas áreas externas selecionadas: cauda, patas, focinho e bolsa escrotal.
- 4-** Observar a intensificação do espectro da protoporfirina (PpIX) nos gráficos registrados, relacionando-os a uma situação de porfiria reversível, nesses animais.

## **JUSTIFICATIVA**

A endoscopia e identificação óptica por autofluorescência ou fluorescência nativa de tecidos biológicos constituem-se em método de diagnóstico não invasivo e de fácil aplicabilidade, objetivando verificar alterações estruturais e químicas das células, indicando a presença, ou apenas a probabilidade de desenvolvimento de alterações patológicas.

Atualmente, o Diagnóstico Fotodinâmico (PDD) está sendo muito utilizado como técnica para diagnóstico minimamente invasivo, favorecendo futuros tratamentos para vários tipos de patologias, que vão desde uma simples acne até a presença de tumores malignos, o que sugere a necessidade, cada vez mais, de entender este processo de interação biológica de luz, drogas fotossensibilizadoras e seus possíveis mecanismos de reações.

Portanto, métodos experimentais que sirvam para diagnósticos pouco invasivos, com o objetivo de localizar e observar lesões e/ou alterações nos seus estágios iniciais, devem ser criados para auxiliar nas respostas a uma utilização mais segura desta nova situação terapêutica, visando um ganho na qualidade de vida ou mesmo sobrevida de pacientes.

# **REVISÃO DA LITERATURA**

---

---



As investigações científicas e aplicações de técnicas físicas, em especial a óptica com a utilização do fotodiagnóstico e da fototerapia, nas áreas médica e biológica, têm despertado interesse e alcançado um forte desenvolvimento (1; 8;9; 10; 11; 22; 23; 24; 25).

A fotoquimioterapia pode ser definida como terapia obtida com o uso combinado da luz e de substâncias químicas, sendo utilizada como prática de tratamento para vários estados patológicos. Dentro desta prática destaca-se a Terapia Fotodinâmica (PDT), do inglês Photodynamic Therapy, que se baseia na fotooxidação de tecidos biológicos induzida pela presença endógena ou exógena de substâncias conhecidas como fotosensibilizadoras. Tais substâncias se localizam seletivamente em certos tipos de tecidos patológicos, de forma que, quando iluminadas por uma fonte de luz adequada, causam uma fotooxidação tecidual, causando a morte deste tecido. Atualmente, a PDT é largamente utilizada, principalmente para o tratamento de tumores malignos de áreas de fácil acesso para iluminação. Aspectos teóricos e práticos da PDT estão relativamente bem explorados (13).

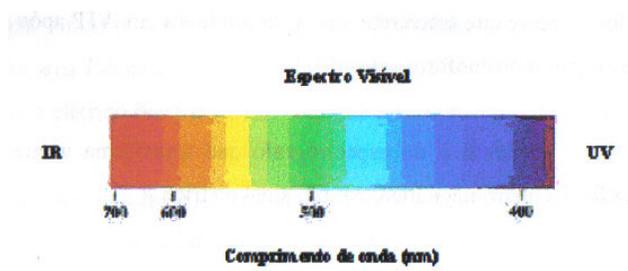
Embora a importância da luz como parte de processos terapêuticos em Medicina e Odontologia, seja muito grande, a sua utilização, visando diagnósticos minimamente invasivos também ocupa um lugar de destaque como ciência e como tecnologia. Efeitos como Raman e Brillouin, refletância, absorção e fluorescência óptica são utilizados para tal, sendo que a fluorescência óptica, geralmente excitada por ultravioleta, é a técnica de eleição para diferentes situações diagnósticas.

### **Absorção óptica e fluorescência**

A refletância, a absorção óptica e a fluorescência são fenômenos, físicos, ópticos, amplamente utilizados em diversas áreas do conhecimento como pela própria Física, pela Química, pela Engenharia em Geral, pela Biologia e pela

Medicina como métodos físicos não invasivos que possibilitam a caracterização de sólidos, líquidos e gases e, em particular, de tecidos biológicos (26).

A luz visível é radiação eletromagnética de comprimento de onda entre 400 a 700 nm. Comprimentos de ondas próximos destes valores e menores do que 400 nm constituem o ultravioleta, enquanto que comprimentos de ondas maiores e nas proximidades de 700 nm correspondem ao infravermelho (27). A figura 1 mostra a distribuição de cores (comprimento de onda) do espectro visível.



**Figura 1-** Espectro da luz visível

A capacidade de uma substância química de absorver, refletir, ou mesmo reemitir luz, depende do estado intrínseco dos elétrons, átomos ou íons constituintes das moléculas da substância estudada (27).

Chamamos de espectro de absorção de uma substância o conjunto de frequências (ópticas) que são absorvidas pelo composto. Da mesma forma, chamamos de espectro de emissão fluorescente o conjunto de frequências emitidas por uma substância, quando excitada por luz, geralmente, UV. Tanto o espectro de emissão como os de absorção podem caracterizar a substância em estudo, servindo, portanto como método de identificação da mesma (27; 28).

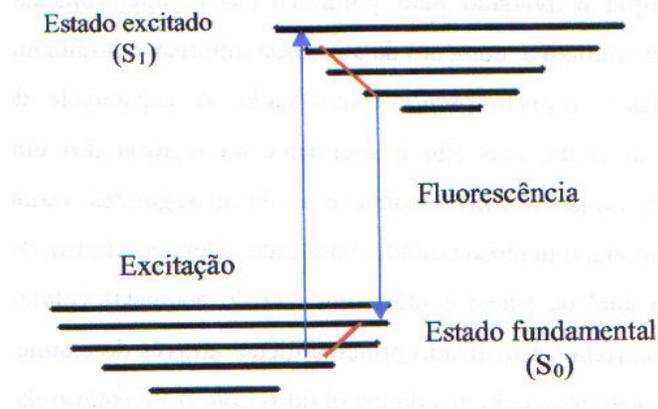
Quando um sistema emite ou absorve radiação, está ocorrendo uma transição de um estado de energia para outro. Se o sistema passar de um estado de maior energia para um estado de menor energia, um fóton de luz será emitido, caracterizando, portanto, uma “emissão” (sabemos que ocorrem transições não

radiativas, entretanto estas não importam para o presente trabalho). No caso contrário, isto é, em que o estado inicial é o de menor energia, e o final é o de maior energia, o fenômeno será o de absorção de fótons, caracterizando a chamada “absorção óptica” (27; 28).

Em condições normais, a “autofluorescência”, ou fluorescência de substâncias endógenas, pode ser observada em inúmeras substâncias naturais, animais e vegetais, quando excitadas com luz ultravioleta. Sendo assim, muitos tecidos biológicos, como os tecidos dentários, mucosas e peles apresentam fluorescências características tanto da sua condição normal como patológica. Isso confere, sem dúvida, ao estudo de fluorescências uma importância diagnóstica muito grande (9; 10;11;29).

### **Espectroscopia de fluorescência**

A técnica de Espectroscopia de Fluorescência baseia-se na excitação do tecido por uma radiação luminosa, estimulando a resposta da autofluorescência dos fluoróforos endógenos presentes no local, permitindo assim a caracterização e, mesmo, a quantificação desses fluoróforos. Por meio de interpretações dos níveis de energia, podem-se deduzir informações detalhadas a respeito das estruturas das moléculas que originam os espectros. A fluorescência é produzida quando as espécies excitadas regressam ao estado fundamental. A figura 2 ilustra um diagrama de nível de energia para moléculas fotoluminescentes. A energia de uma molécula no seu estado fundamental está associada ao estado designado como  $S_0$ . Uma excitação pode levar a molécula a um determinado estado excitado vibracional no interior de um mesmo estado eletrônico ou, ainda, no caso da fluorescência no processo de decaimento. O tempo de absorção de um fóton por uma molécula é da ordem de  $10^{-14}$  a  $10^{-15}$  s; sendo que no processo de decaimento o tempo é, em geral, da ordem de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  s.



**Figura 2-** Diagrama dos níveis de energia para moléculas fotoluminescentes

É importante esclarecer que este fenômeno óptico observado nos tecidos biológicos é obtido pela presença das substâncias químicas que os constituem. Desta forma, entende-se que, caso ocorra uma alteração no tecido, patológica ou não, mas que não interfira na constituição química da substância autofluorescente pré-determinada, o novo espectro de fluorescência certamente não será alterado, caracterizando neste caso, uma limitação intrínseca do método de fluorescência como método diagnóstico (1;8;23;29).

## **Substâncias fluorófaras**

### **Cromóforos e fluoróforos endógenos**

São considerados cromóforos todas as moléculas que absorvem luz, sendo os mesmos, moléculas que absorvem e reemitem luz em frequência diferente. Temos como exemplo de fluoróforos, entre outros, alguns com emissão na região do visível e que podem contribuir para a detecção de alterações teciduais, sendo destacados na tabela 1, abaixo:

**Tabela 1-** Máxima excitação e emissão de fluoróforos endógenos. Fonte: Adaptação de Ramanujam, 2000.

Fluoróforos Endógenos	Excitação máxima (nm)	Emissão máxima (nm)
<b>Aminoácidos</b>		
Triptofano	280	350
<b>Proteínas estruturais</b>		
Colágeno	325-360	400- 405
<b>Enzimas e coenzimas</b>		
FAD, flavina	450	535
NADH	290 - 351	440 – 460
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina A	327	510
Vitamina K	335	480
Vitamina D	390	480
Vitamina B12	275	305
<b>Lipídios</b>		
Fosfolipídios	436	540- 560
Porfirinas	400-450	630, 690

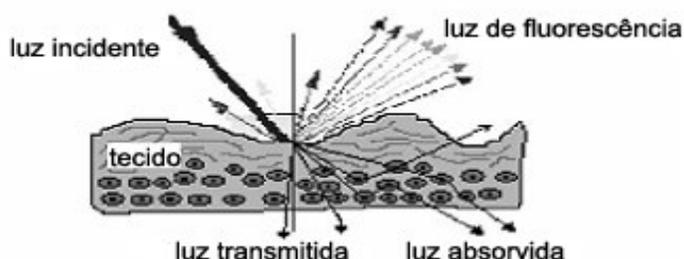
Dougherty et al. (30), considera como principais fluoróforos em seus estudos de identificação de lesões neoplásicas o colágeno, as porfirinas e Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A primeira descrição do NADH em sua forma reduzida  $NAD^+$ , como fluoróforo de alta intensidade de fluorescência, foi feita por Chance et al. (6), que através de um laser de nitrogênio monitorou a oxidação *in vivo* desta molécula.

A principal biomolécula observada nos tecidos biológicos é a hemoglobina e a maioria das biomoléculas apresenta bandas de absorção na região do visível ao UV. É bom salientar que a hemoglobina não é considerada um fluoróforo, pois não fluoresce, entretanto, é uma substância fortemente absorvedora de luz, sendo, portanto, um cromóforo (31).

## Caracterização da espectroscopia de fluorescência (EF)

Através da espectroscopia de fluorescência, é possível caracterizar alterações morfológicas e funcionais intracelulares a partir das interpretações espectrais obtidas, tais como frequência e intensidade. Os primeiros estudos da espectroscopia de fluorescência (EF), em tecidos biológicos, começaram em 1924, descritos por Policard et al. (32), que utilizaram radiação na região do violeta e do ultravioleta e conseguiram detectar a presença de uma emissão luminosa no tecido pesquisado, na faixa espectral do vermelho, em torno de 600 nm, que foi reconhecida como sendo da Porphirina.

As técnicas espectroscópicas obtêm informações dos sistemas biológicos em faixas de radiação que vão das ondas de rádio aos raios gama, analisando basicamente a radiação que é transmitida, absorvida, espalhada e emitida na amostra (fig.3) (24).



**Figura 3-** Biópsia óptica por meio da luz de fluorescência no tecido e as várias formas de leitura óptica sobre a radiação transmitida, espalhada e absorvida na amostra. Fonte: Ramanujam, 2000.

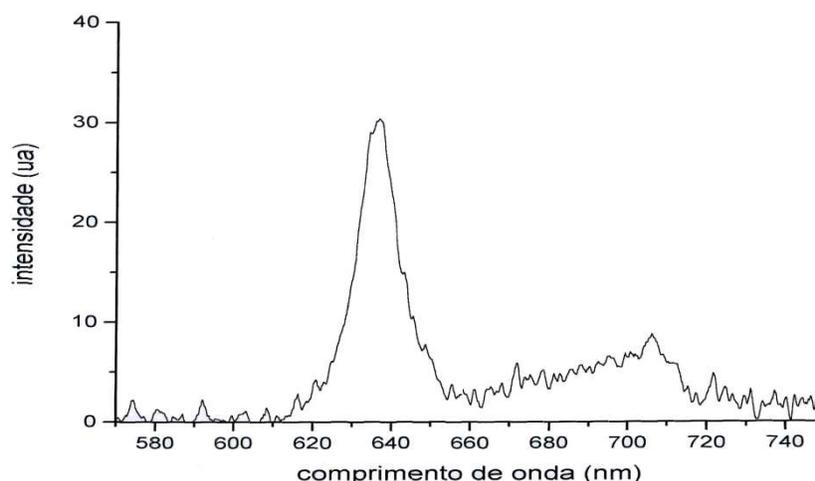
Já em 1978, Dougherty et al. (30) demonstrou em seu trabalho o acúmulo de Hematoporfirina (Hp) em alguns tipos de câncer e dessa forma puderam determinar uma nova classificação para as porfirinas. O primeiro trabalho que realmente demonstrou a diferenciação entre tecido neoplásico e tecido normal foi relatado por Alfano e Yeo (33), num estudo *“in vitro”* de amostras de biópsias

obtidas de tecido renal e prostático de camundongos. Os autores utilizaram um laser de Argônio com emissão em 488nm, onde ficaram caracterizadas as diferenças espectrais por emissões na faixa de 520 a 590 nm e 600 nm, sendo atribuídas, respectivamente à fluorescência de riboflavinas e porfirinas endógenas.

A caracterização de porfirinas foi novamente citada por Heyerdahl et al. (34), em estudos com cerca de 50 peças neoplásicas de vários órgãos, nos quais os autores relatam que após excitação com 365 nm, houve a predominância de um pico de emissão dessas amostras, na faixa do vermelho (630-690nm).

Este espectro de emissão foi identificado (figura 4), mais uma vez, pela presença de porfirinas endógenas em cerca de 89% das peças estudadas (35).

Reis et al. (36) em trabalhos experimentais com ratos Wistar, estudaram a glândula harderiana, descrevendo morfológicamente sua localização, função e ação. Quando essa estrutura foi iluminada com luz UV, constatou-se a presença de fluorescência vermelha, com dois picos de emissão luminosa captados por espectroscopia, sendo de 632,8 nm e 705 nm e identificada como protoporfirina IX (PpIX). (figura 4)



**Figura 4-** Gráfico característico da Protoporfirina IX (PpIX) - Fonte: Reis, Nicola e Nicola, 2005.

No trabalho de Leunig et al. (37) determinou-se o melhor arranjo de excitação para detecção de neoplasias orais, resultando em um elevado índice de sensibilidade (100%) e especificidade (90%), com a utilização dos comprimentos de onda de excitação de 350, 380 e 400nm. Outros autores relatam a aplicabilidade de espectroscopia de fluorescência como técnica de diagnóstico precoce em diversas áreas e tipos de lesões, como: laringe (34; 38) esôfago de Barret (39), mama (40), trato urinário (41). A maioria dos trabalhos evidenciados demonstra que a Espectroscopia de Fluorescência apresenta um indiscutível potencial para o diagnóstico precoce de diversas patologias em diferentes órgãos e tecidos.

Uma extensão da técnica diagnóstica de autofluorescência é a que utiliza fluoróforos exógenos que, por questões metabólicas, se fixam em sítios tumorais. O diagnóstico de lesões malignas e a delimitação da margem de ressecção tumoral são descritas por Alfano e Kats (42), por meio da quantificação da fluorescência em função do tempo. Nas lesões de pele, foi observada máxima intensidade de fluorescência entre 5 e 8 horas após a administração da droga fotossensível sendo que, neste caso, utilizou-se o ácido  $\delta$ -aminolevulínico, ou seja o ALA, com pico de emissão na região de 635nm. Estudos realizados em tumores de bexiga, descritos por Baugartner et al. (43), relatam que o uso de fluoróforo exógeno leva a um índice de 100% de eficiência na demarcação de áreas tumorais, confirmadas histologicamente.

Atualmente, a utilização do Diagnóstico Fotodinâmico, como método de diagnóstico, está estruturada, para situações em que se utiliza injeção de substâncias fluoróforas exógenas, ou seja, derivados de Hematoporfirina (Hp); ou quando esse diagnóstico é assistido por ALA, ou outras drogas exógenas, gerando a formação de fluoróforos endógenos (ALA  $\rightarrow$  PpIX) e, finalmente, na exploração dos fluoróforos de componentes naturais de tecidos normais.

Já no trato gastrointestinal, utiliza-se o método de identificação de displasia e estágios iniciais de carcinomas de esôfago, através da endoscopia e evidências de autofluorescência, por iluminação com luz UV. Estudos compararam

a intensidade da fluorescência endógena de tecido normal, com a emitida por tecidos patológicos, mostrando uma especificidade nos acertos dos diagnósticos, entre 86 a 95%, quando comparados aos resultados de biópsias posteriores (44; 45).

Durante a fase de excitação luminosa, a Porphirina e seus derivados exibem uma característica de fluorescência, na faixa de emissão da luz vermelha, do espectro luminoso, com pico de emissão em torno de 632,8nm (4).

Por outro lado, alguns tecidos ou órgãos biológicos apresentam substâncias endógenas, as quais fluorescem e absorvem radiações ópticas, mantendo uma semelhança muito parecida com o processo físico da PDD (29; 46).

A emissão luminosa de UV pela lâmpada de Wood representa uma técnica clássica para estudos e diagnósticos por fluorescência em dermatologia (47).

O conhecimento e a utilização do fotodiagnóstico, por fluorescência na pele e anexos, tem se mostrado um fator preponderante para o diagnóstico de alterações tumorais malignas nesses tecidos. A aquisição e o mapeamento de uma fluorescência endógena característica destes tecidos, possibilitou estabelecer um padrão normal de fluorescência, servindo de referência para a comparação e o diagnóstico das áreas de tumores malignos (48).

Zeng et al. (49), após iluminar lesões de pele com luz de Wood (UV), sem a aplicação de um fotossensibilizador, observou a presença de uma fluorescência intensa na faixa de emissão do vermelho, semelhante a da PpIX.

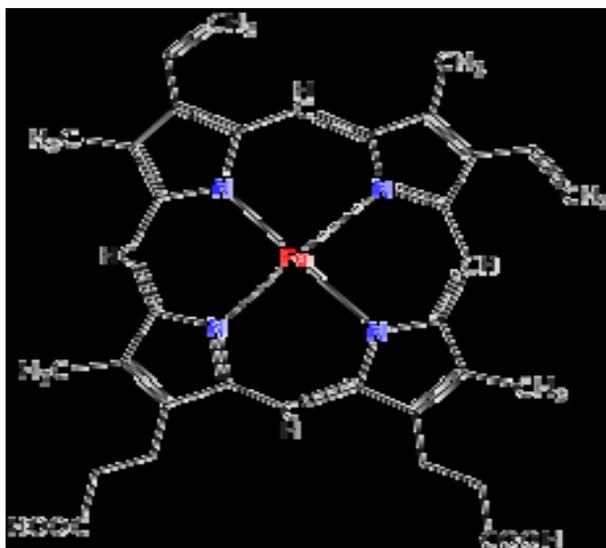
Bissonette et al. (50), ao avaliarem as propriedades de autofluorescência de áreas de pele normal e com lesões, notaram que as áreas lesionadas podiam emitir uma fluorescência vermelha, quando a pele era iluminada com luz azul próximo ao UV. Os mesmos autores com auxílio da Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) procuraram isolar e identificar a

substância causadora da fluorescência nos sítios das lesões, identificando-a como a PpIX, a qual apresenta pico de emissão luminosa em torno de 635 nm.

Uma condição patológica em que a síntese de porfirina está envolvida com seres humanos e alguns animais, a Porfiria, é relatada na literatura (15; 16; 17; 18; 19).

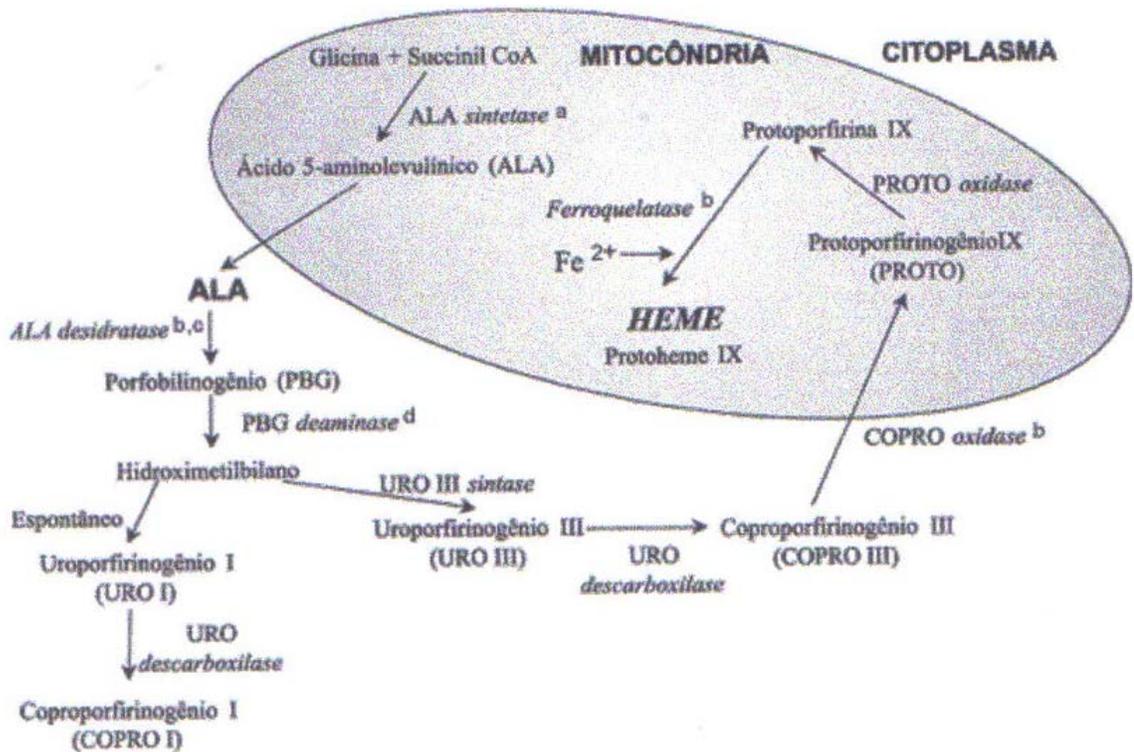
Isso provavelmente a torna uma doença instigante, de difícil compreensão, pois é acarretada por uma única sequência fisiológica, na síntese do grupo heme, e possui manifestações muito variáveis e diagnóstico difícil (18; 51).

O grupo heme é um composto químico que realiza o transporte do oxigênio e confere a cor vermelha ao sangue. É um componente fundamental das hemoproteínas (17). O acúmulo dos precursores do grupo heme é extremamente tóxico ao organismo (18).



**Figura 5-** Molécula representativa do heme porfirínico. Fonte: Jorge, 2007.

Oito enzimas diferentes participam das etapas da síntese do grupo heme, onde a deficiência de uma dessas enzimas gera o acúmulo dos precursores químicos, as porfirinas, que podem se depositar nos tecidos, especialmente na medula óssea e no fígado. As porfirinas em excesso aparecem então no sangue e são excretadas na urina ou nas fezes (17).



**Figura 6-** Esquema da via Biossintética do grupo Heme, indicando as principais vias de produção e de inibição de Porfirina. Fonte: Onuki et al., 2002.

Os intermediários do ciclo, de formação do heme, são mantidos dentro das células, por isso são excretados em pequenas quantidades. O ALA, o porfirinogênio e o uroporfirinogênio são solúveis em água e excretados pela urina. A coproporfirina é excretada pela urina, pelas fezes e pela bile e a protoporfirina é pouco solúvel em água, sendo excretada pela bile e pelas fezes (52).

## Classificação das porfirias

As porfirias são classificadas baseadas no órgão que produz os metabólitos porfirínicos em excesso, em Eritropoiéticas e Hepáticas, na ocorrência ou não de ataques agudos e nas lesões cutâneas e/ou neurológicas produzidas (16; 51).

A tabela 2 mostra a classificação das porfirias eritropoiéticas sendo composta por Porfíria Eritropoiética Congênita (CEP) e Porfíria Eritropoiética (EPP); e o grupo das hepáticas por: Porfíria Aguda Intermitente (PAI), Porfíria Variegata (PV), Porfíria deficiente em ALA desidratase, Coproporfíria hereditária (HCP) e Porfíria cutânea tardia (PCT) (53).

**Tabela 2-** Classificação dos tipos e manifestações clínicas de Porfirias relatadas na literatura. Fonte - Onuki et al., 2002.

Tipo de Porfíria	Aguda	Hepática	Cutânea
Porfíria deficiente em ALA desidrase	x		
Porfíria Aguda Intermitente (PAI)	x	x	
Coproporfíria Hereditária (HCP)	x	x	x
Porfíria Variegata (PV)	x	x	x
Porfíria Cutânea Tardia (PCT)		x	x
Porfíria Eritropoiética Congênita (CEP)			x
Protoporfíria Eritropoiética (EPP)			x

A fisiopatogênese das porfirias demonstra que as características bioquímicas são comuns a todas os tipos de manifestação da doença, onde há uma maior atividade da enzima ALA-sintetase, conseqüentemente levando a uma superprodução de ALA e deficiência hepática do heme (51).

São fatores que predis põem aos surtos da doença o consumo de álcool, fumo, jejum, *stress*, infecções e alterações nos níveis de hormônios esteróides (54; 55).

O diagnóstico está baseado em achados clínicos e em testes laboratoriais em sangue, fezes ou urina, com provas quantitativas para detecção de alterações nos níveis de complexos porfirínicos, como Porfobilinogênio (Uroporfobilinogênio e Coproporfobilinogênio) e Protoporfirinas (15;56).

Até o presente momento não há um tratamento eficaz. A conduta resume-se ao tratamento de certos sintomas apresentados pela doença.

### **Pigmentação animal**

A pesquisa e o entendimento da presença de certos pigmentos em animais roedores, especialmente os ratos tipo Wistar, é destacada na literatura, uma vez que os mesmos são aceitos como modelos apropriados para pesquisa científica (4; 57; 58; 59; 60; 61; 62).

Estudos sobre a glândula harderiana relatam a produção de uma substância, especialmente em alguns roedores, dentre eles os ratos Wistar, que quando iluminada com luz UV, a mesma apresentava uma emissão fluorescente na faixa do vermelho, com pico em torno de 635 nm, que foi caracterizada como sendo da PpIX (3;4).

Anteriormente a este estudo McElroy et al (60), apud Rimington (62), já relatavam a importância dos estudos dos pigmentos característicos de certos animais, pois, ao estudarem ratos Wistar que foram mantidos sob dieta com restrição alimentar severa, de água e alimentos, em que estava presente a excreção de uma substância gelatinosa em torno dos olhos, bigodes e focinho. Ao serem iluminados com luz UV, apresentavam fluorescência vermelha, que se assemelhava a banda de emissão luminosa da Protoporfirina.

Estudos demonstram que a glândula harderiana, anatomicamente localizada posteriormente aos globos oculares dos ratos Wistar, que sabidamente produz em grandes concentrações, porfirina (36), poderia drenar essa secreção

aos olhos. O animal na sua higiene passaria as patas sobre os olhos e as esfregaria sobre o nariz e nos bigodes, gerando assim o aparecimento de fluorescência vermelha nessas áreas (57; 58; 59).

Já Solomon e Figge (63), aproveitando esta explicação, dissecaram o trato naso-lacrimal de ratos Wistar, expondo a glândula harderiana e encontraram uma ligação desta glândula com o trato naso-lacrimal, onde parte da secreção dessa glândula passaria à cavidade nasal e, depois, ao tubo digestivo, o que poderia explicar a presença de substância fluorescente vermelha nas fezes desses animais. Policard (32) demonstrou a existência de fluorescência em tumores intestinais de ratos, atribuindo-a ao acúmulo de porfirina endógena em tais tumores, devido a uma infecção secundária por bactérias hemolíticas.

Em um estudo piloto no Laboratório de Laser do NMCE da FCM / Unicamp, foi constatado que no trato gastrintestinal de ratos albinos Wistar (12), surge fluorescência, observável a olho nu, vermelho-alaranjada, quando este órgão é iluminado com luz ultravioleta. Ao ser feita a dissecação do lúmen intestinal, a massa fecal demonstrou a mesma característica, bastante fluorescente. Cabe ser esclarecida a origem desta fluorescência, que pode ser decorrente de um ajuste metabólico imposto, por exemplo, por condição de dieta líquida, ou mesmo uma manifestação da Porfíria, uma patologia relacionada à síntese e à degradação das porfirinas, intensificada por eventual stress a que os animais foram submetidos na ocasião, ou ainda, devido ao acúmulo de resíduos metabólicos, resultantes do metabolismo das copro e uroporfirinas.

Certamente o conhecimento de aspectos químicos e físicos das porfirinas é de enorme importância para o entendimento de grande parte das fluorescências de tecidos na região do vermelho, por esta razão no Apêndice I é apresentado um resumo de tais propriedades.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

## **Amostragem**

Para o desenvolvimento experimental da presente Tese, foram utilizados 65 ratos albinos Wistar, adultos, machos, criação SPF (Specific Pathogen Free), com massa corpórea entre 250 e 300g, cedidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos em condições ambientais no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) - UNICAMP, até o início do experimento.

Cabe ressaltar que os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA – IB - UNICAMP, com o Protocolo nº 587-1, em reunião de 05 de setembro de 2003 (Anexo 1).

O total de animais a serem utilizados foi dividido em dois grupos:

- Grupo I: contendo 35 animais, dos quais cinco foram utilizados como grupo controle e os 30 animais restantes utilizados como grupo de estudo propriamente dito.
- Grupo II: composto por 30 animais, constituiu o grupo de estudos do Experimento II.

## **Materiais e equipamentos**

Os materiais e equipamentos utilizados na parte experimental deste trabalho estão relacionados como se segue

Equipamentos:

Espectrofotômetro tipo “plug-in” (PC2000-S, da Ocean Optics Inc.®);

Fonte de luz Ultra Violeta próxima (UV),  $\lambda$  300nm, da marca Phillips – (lâmpada UV TL 4W/08);

Fibras ópticas;

Centrífuga;

Software para interpretação dos resultados (OI BASE) e construção dos gráficos (ORIGIN 7.0);

Câmera Nikon D50, objetiva AF-S Nikkor 18-55 mm, 1:3. 5,5.6 ED (pertencente ao Apoio Didático e Audiovisual da FCM-UNICAMP )

Materiais:

Gaiolas individuais, tipo metabólica;

Ração Comercial marca Purina®;

Soro glicosado a 5%;

Algodão e Hastes flexíveis (tipo cotonetes);

Placa de Pétre;

Becker;

Tubos de ensaio e tubos tipo “ependorffs”;

Anestésico Hypnol 3% (Pentabarbital Sódico);

Bastão fino de vidro para mexer a mistura;

Ácido Acético Glacial;

Éter;

Ácido Clorídrico diluído a 1,5N.

Materiais para procedimentos cirúrgicos:

Soro fisiológico;

Prancha cirúrgica para a contenção dos animais;

Paramentos Cirúrgicos: luvas, campo, avental e máscara;

Seringas de 10 ml e 1,0 ml (tipo insulina) e agulhas;

Cabo nº 5 e lâmina de bisturi;

Tesouras cirúrgicas Mayo-Stille (ponta grossa) e Quinelato (ponta fina);

Pinças tipo Anatômicas - “dente de rato” e Dietrich;

Pinças hemostáticas – modelos Kelly e Crile;

Afastadores tipo “Farabeuff”;

Gaze;

## **Metodologia**

O presente trabalho contou com uma metodologia geral, comum aos dois experimentos e outra específica a cada um dos experimentos.

Até o início de cada experimento específico, todos os animais selecionados para comporem o grupo de estudo, receberam alimentação normal, com água e ração comercial, marca Purina®, “*ad libitum*”, alojados em gaiolas comuns, contendo um número de cinco animais em cada gaiola e mantidos no biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (NMCE/FCM-UNICMP).

No momento do início de cada sessão de trabalho experimental, um ou mais lotes de cinco animais era transferido para o Laboratório Laser do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (Lab. Laser/NMCE), alojados individualmente em gaiolas do tipo metabólicas e mantidos em ambiente escuro.

O procedimento anestésico, em todos os animais, foi realizado através da injeção intraperitoneal de Hypnol 3% (Pentobarbital Sódico), na dose de 0,3 ml/100g.

A detecção e registro da fluorescência foram realizados através da excitação dos órgãos e tecidos com lâmpada Ultravioleta próxima (UV),  $\lambda$  400nm, da marca Phillips, potência de 4,0 W (lâmpada UV TL 4W/08), inócua ao tecido biológico vivo. A lâmpada foi sempre posicionada a uma distância de 5 cm do tecido observado, garantindo a constância no valor da densidade luminosa no local de observação.

Para o registro dos espectros de fluorescência, foi utilizado um espectrômetro tipo “plug-in” (PC2000-S, da Ocean Optics Inc.®), instalado em computador tipo PC, e fibra óptica, conectada em um terminal de entrada do espectrômetro para a região de  $\lambda = 300$  a 850nm, com resolução de  $\pm 1,7$ nm.

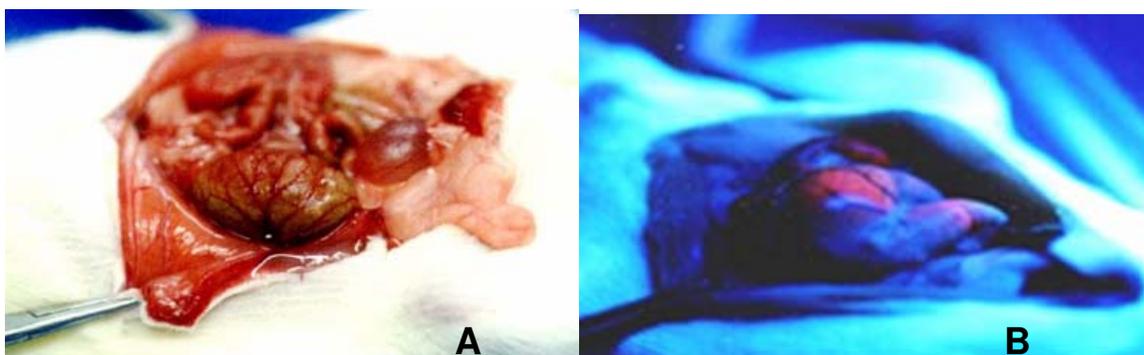
Após ter sido efetuado o registro dos espectros de emissão de fluorescência, os sítios foram fotografados sob iluminação de luz UV e luz branca, utilizando-se, para isso, uma máquina fotográfica digital.

## **Metodologia específica ao experimento I**

Os 35 animais foram subdivididos em sete grupos de cinco animais cada, rotulados como grupos 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07, sendo que o grupo 07 foi mantido como controle e os demais constituíram o grupo de estudo propriamente dito. Os animais do grupo controle receberam alimentação normal, com água e ração comercial, marca Purina®, “*ad libitum*” e os animais do grupo de estudo

foram submetidos somente à dieta líquida com soro glicosado a 5% “*ad libitum*” por períodos que variaram de 48 até 120 horas. Em ambos os grupos, os animais foram individualmente mantidos em gaiolas do tipo metabólicas e acondicionados em sala escura.

As pesquisas de fluorescências foram realizadas nos seguintes intervalos de tempo: 48 horas para o grupo 01; 72 horas para o grupo 02; 96 horas para o grupo 03 e 120 horas para o grupo 04. Nestes quatro grupos os animais foram anestesiados via injeção intraperitoneal, na dose de 0,3 ml/100g de Hypnol 3% (Pentobarbital Sódico). A seguir, tiveram toda a região ventral tricotomizada e foram submetidos à laparotomia ampla. Após, as vísceras foram adequadamente expostas, iluminadas com luz UV, em sala totalmente escura e fotografadas com câmara digital, tanto sob luz UV como luz Branca. Nas áreas em que ficou evidenciada fluorescência vermelha, foram realizados, tanto o registro espectrofotométrico, como o fotográfico das mesmas.

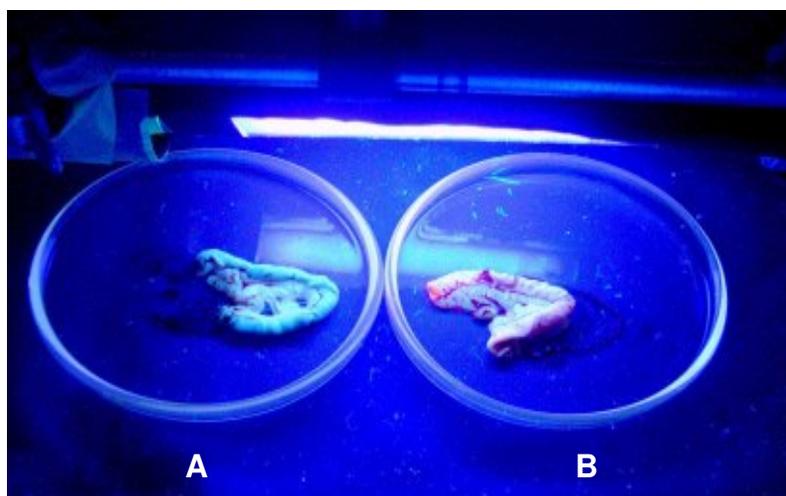


**Figura 7-** Fotos referentes a animais tratados com dieta líquida por glicose. Em A, animal iluminado com luz branca e em B com luz UV, evidenciando-se a presença de fluorescência vermelha.

Os animais dos grupos 05 e 06, após o período de dieta exclusiva de glicose 5% pelo intervalo de 120 horas, voltaram a receber alimentação normal, respectivamente por 24 horas (grupo 05) e 48 horas (grupo 06) quando foram, então, submetidos ao mesmo procedimento de anestesia, laparotomia, registro fotográfico e espectrofotométrico das respectivas fluorescências, conforme descrito para os grupos 01, 02, 03 e 04.

Empregou-se este procedimento para verificação das possíveis alterações no padrão da fluorescência encontradas, quando os animais estiveram sob dieta de glicose e compará-las ao padrão encontrado, quando os mesmos retornaram à alimentação normal.

Na sequência do experimento, foi realizada a ressecção das alças intestinais que apresentavam áreas de fluorescência em todos os grupos de animais e coletado o material fecal de seu lúmen para identificação espectrofotométrica e bioquímica desse conteúdo.



**Figura 8-** Fragmentos de intestino de rato tratado com dieta normal (A) e com dieta de glicose (B), iluminados com luz UV.

O material fecal apresentando fluorescência foi coletado e acondicionado em cubetas do tipo “ependorffs” para centrifugação em 3000 rpm, por 01 minuto, com o objetivo da separação do material sólido do sobrenadante. A seguir, as amostras foram iluminadas com lâmpada UV e registrados seus respectivos espectros.

No material sobrenadante, foi aplicado o teste de detecção de porfirinas, modificado por Eales e colaboradores em 1966 (56), com o objetivo de identificar a presença de porfirinas e, assim, confirmar os dados encontrados nos espectros de fluorescência medidos.

A ação do éter, que é um solvente orgânico, agiria na separação da mistura diluída (massa fecal e Ácido acético glacial) em duas fases, denominadas no experimento de fase líquida (sobrenadante) e fase do éter (decantado).

Na fase do éter, este estaria agregado ao material sólido fecal e na presença de compostos porfirínicos, teria o poder de precipitá-los.

Em caso de resultado positivo para detecção de porfirinas, ao iluminarmos a substância decantada no fundo do tubo de ensaio com luz UV, esse precipitado emitiria uma fluorescência vermelha.

Prova da Detecção de porfirinas no material fecal fluorescente - teste modificado por Eales et al (56).

Procedimentos:

- 1- Num tubo de centrifugação, misturou-se o material fecal, cerca de 4,0g, a 1,0 ml de Ácido acético glacial a mistura foi homogeneizada;
- 2- Acrescentou-se à mistura inicial cerca de 5,0 a 7,0 ml de éter e foi realizada a centrifugação;

- 3- Decantou-se o material sobrenadante, com pipeta em um tubo de ensaio, e agregou-se 1,0 ml de ácido clorídrico diluído a 1,5N (Normal).
- 4- O composto foi agitado e aguardou-se a separação da fase aquosa, da do éter;
- 5- Com lâmpada UV, o material líquido foi iluminado e, sendo observada a presença de fluorescência de aspecto rosado, ou avermelhada, isso seria indicativo de presença de composto porfirínico, no material pesquisado.

Ao final de cada sessão do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia através da injeção de maior quantidade de anestésico via intraperitoneal, com dose de 2,5 ml/100g.

### **Metodologia específica ao experimento II**

Os 30 animais selecionados para o experimento foram subdivididos em seis grupos de cinco animais cada, alojados em gaiolas comuns e mantidos no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM-UNICAMP até o momento de sua utilização. A divisão dos animais em seis grupos teve como finalidade apenas a facilitação do manuseio, acompanhamento e execução do trabalho experimental de acordo com o seguinte protocolo:

- inicialmente os animais, ainda em condições normais de alimentação “ad libitum”, foram transferidos para o Laboratório. Laser/NMCE, anestesiados com injeção via intraperitoneal, de Hypnol 3% (Pentabarbital Sódico) na dose de 0,3ml/100g e pesquisadas possíveis áreas de fluorescência nativas externamente em seu corpo, utilizando-se Luz UV em ambiente totalmente escuro.

- a seguir, foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais, alimentados exclusivamente com soro glicosado 5% “*ad libitum*” e mantidos em sala escurecida. Após 48 horas do início desta dieta, os animais foram novamente anestesiados e investigada a presença de áreas de fluorescência cutânea. Foram assim, identificadas 04 áreas significativamente mais fluorescentes: focinho, patas, bolsa escrotal e cauda, as quais passaram a ser acompanhadas em todo o experimento em relação à variação de sua fluorescência. Neste intervalo de tempo (48 horas), foi realizado o registro fotográfico e espectrográfico das 04 áreas selecionadas, em todos os animais. Após o procedimento, os animais foram devolvidos às suas gaiolas individuais e retornaram à dieta de glicose 5%.
- este procedimento foi repetido em 72, 96, e 120 horas após o início da dieta. Em 120 horas, foi finalizado o período da dieta com glicose e os animais voltaram a receber dieta normal de ração purina® e água “*ad libitum*”. Após, com 24 e 48 horas do retorno à dieta normal, foram registradas novas medidas espectrométricas, visando verificar as possíveis alterações nos padrões de fluorescência encontradas, quando da utilização da dieta de glicose e compará-los ao padrão encontrado, quando da retomada da dieta normal.



**Figura 9-** Animal anestesiado e iluminado com luz UV, para a captação de áreas com fluorescência externa.

Em todos os animais e para cada intervalo de tempo, foram registrados 05 espectros de cada uma das áreas identificadas com maior fluorescência, o que significou 20 espectros registrados em cada animal por sessão, ou seja, em cada grupo, 25 espectros de cada área estudada.

Ao final do experimento, foi colhido um total de 125 espectros de cada área, os quais foram avaliados quanto a suas características e similaridade.

Todos os 30 animais que compuseram este grupo retornaram às suas atividades fisiológicas normais, sendo, portanto mantidos vivos.

# RESULTADOS



## Experimento 01

### 1- Laparotomia abdominal mediana - observação com luz branca.

A figura 10 mostra resultado de laparotomia abdominal mediana de rato tratado com dieta normal de ração e água “*ad libitum*” (alças intestinais, fígado, estômago, bexiga e rins), observada macroscopicamente com iluminação por luz branca. Notam-se as alças intestinais repletas de material fecal sólido.



**Figura 10-** Aspecto macroscópico de laparotomia mediana realizada no abdome de rato tratado previamente com dieta normal de ração e água “*ad libitum*”, demonstrando o trato gastrointestinal e urinário.

A figura 11 mostra o resultado de laparotomia abdominal mediana de rato tratado com dieta de glicose a 5%. O trato intestinal apresenta alças intestinais colabadas, ausência de material fecal sólido e presença de muco, quando seu lúmen foi exposto. O esvaziamento das alças intestinais é completo, sem a presença de material fecal, o que garante também que a presença de bactérias é mínima.



**Figura 11-** Laparotomia mediana em abdome de animal com 120h de dieta de líquida de glicose a 5%. Observa-se a depleção do conteúdo intestinal, devido à dieta, apresentando sinais de esvaziamento completo.

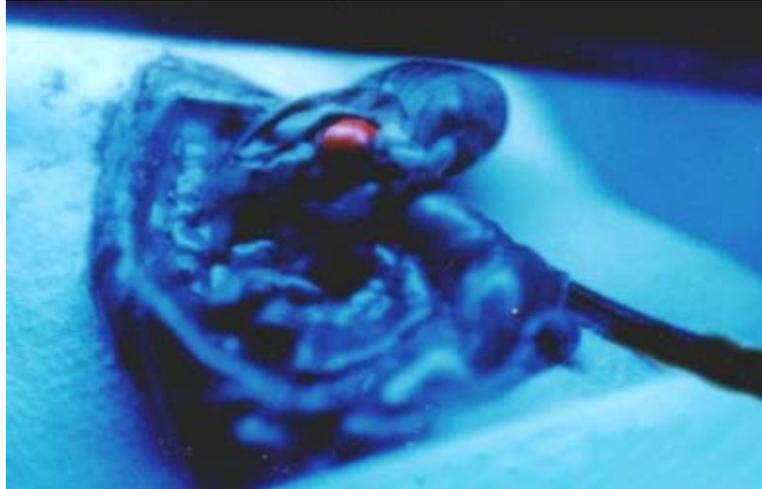
## 2- Laparotomia abdominal mediana - observação com luz ultravioleta (UV)

Na sequência dos experimentos, procurou-se aplicar a mesma metodologia para o grupo de animais com dieta normal, onde os mesmos tiveram seus tratos gastrointestinais iluminados com luz UV. (Figura 12)



**Figura 12-** Animal tratado com dieta normal, em que o trato gastrointestinal apresenta-se com ausência total de fluorescência.

A figura 13 mostra o registro fotográfico do trato intestinal de animal submetido à dieta de glicose 5% em 48h. A área de alças intestinais está destacada por um único ponto de fluorescência vermelha.



**Figura 13-** Animal tratado com 48h de dieta líquida de glicose a 5%, em que se observa que o trato intestinal apresenta-se com presença de fluorescência vermelha em um único ponto em alça intestinal e ausência nas demais áreas e órgãos.

A figura 14 mostra o registro fotográfico do trato intestinal de animal submetido à dieta de glicose 5% em 72h. Áreas de alças intestinais estão destacadas pela presença de alguma fluorescência vermelha.



**Figura 14-** Animal tratado com 72h de dieta líquida de glicose a 5%, em que se observa que o trato intestinal apresenta-se com fluorescência vermelha em alguns pontos, destacando-se algumas alças intestinais e ausência nas demais áreas e órgãos.

A figura 15 mostra o registro fotográfico do trato intestinal de animal submetido à dieta de glicose 5% em 96h. Áreas das alças intestinais estão destacadas por diversos pontos de fluorescência vermelha.



**Figura 15-** Animal tratado com 96h de dieta líquida de glicose a 5%, onde se observa que o trato intestinal apresenta-se com presença de fluorescência vermelha em diversos pontos (alças do Íleo e do jejuno) e ausência nas demais áreas e órgãos.

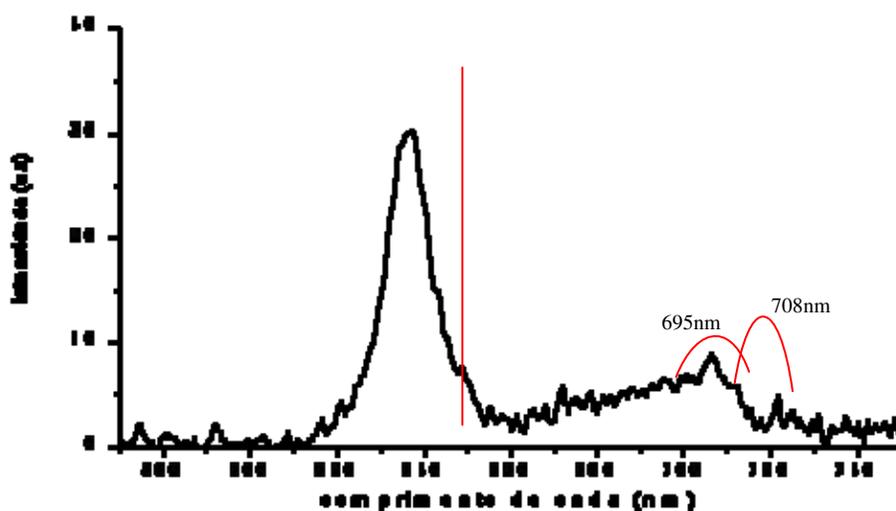
A figura 16 mostra o registro fotográfico do trato intestinal de animal submetido à dieta de glicose 5% em 120h. Áreas de alças intestinais estão destacadas por intensa fluorescência vermelha.



**Figura 16-** Animal tratado com 120h de dieta líquida de glicose a 5%, em que se observa no trato intestinal a presença de intensa fluorescência vermelha generalizada em todas as alças intestinais e ausência nas demais áreas e órgãos. Nota-se o extravasamento de parte do material intestinal fluorescente para a gaze.

### 3- Espectrometrias do material fluorescente

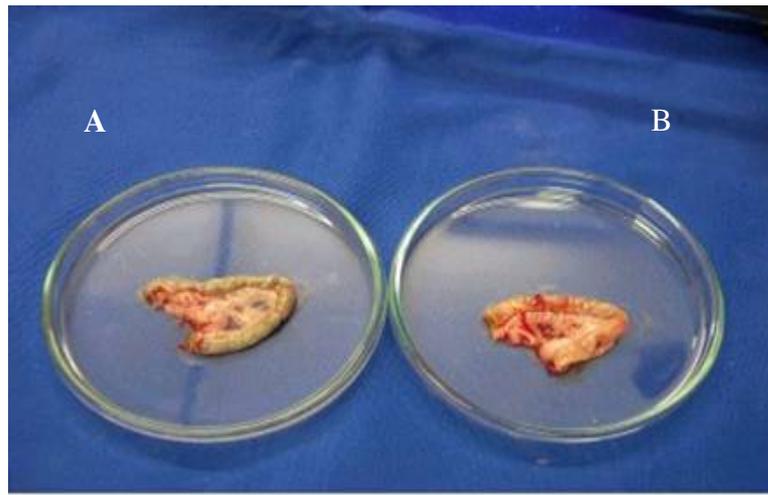
O espectro mostrado na figura 17, obtido com o uso do Espectrômetro tipo “plug-in” (PC2000-S, da Ocean Optics Inc.®), com resolução melhor do que 2 nm, se refere à emissão fluorescente das regiões vermelhas observadas macroscopicamente no trato intestinal, mostradas nas figuras 13 - 16. O pico de maior intensidade se encontra em 636 nm +/- 2nm.



**Figura 17-** Espectro típico, de materiais identificados nas situações das figuras 13 – 16, de emissão fluorescente da região vermelha, mostrando pico bem definido (máximo em 636nm +/- 2nm) e, banda no infravermelho próximo, sugerindo a presença de, pelo menos, dois máximos em 695 e 708 nm.

### 3.1- Espectrometrias do material fluorescente encontrado no trato intestinal de animais mantidos sob dieta de glicose

A figura 18 mostra fragmentos de alça intestinal fotografados com luz branca, sendo (A) proveniente de animal mantido com dieta normal e (B) proveniente de animal mantido por 120 horas, até o sacrifício, com dieta de glicose a 5%. Na figura 19, é mostrado o resultado fotográfico das mesmas peças, agora iluminadas com luz UV.

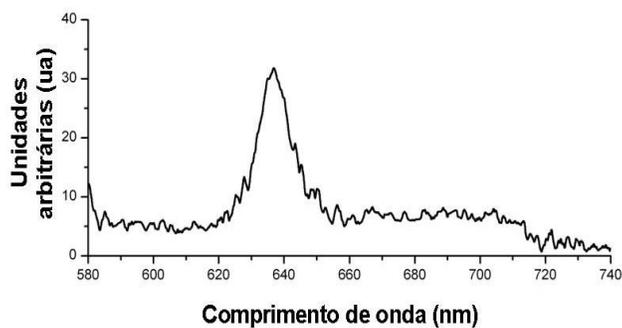


**Figura 18-** Fragmentos de alças intestinais expostos à luz normal, onde, em (A) animal com dieta normal e, em (B), animal com dieta de glicose a 5% por 120 horas.



**Figura 19-** Fragmentos de alça intestinal iluminados com luz UV, onde (A) é de animal mantido com dieta normal. O fragmento (B) pertence ao animal mantido com dieta de glicose a 5% por 120 horas.

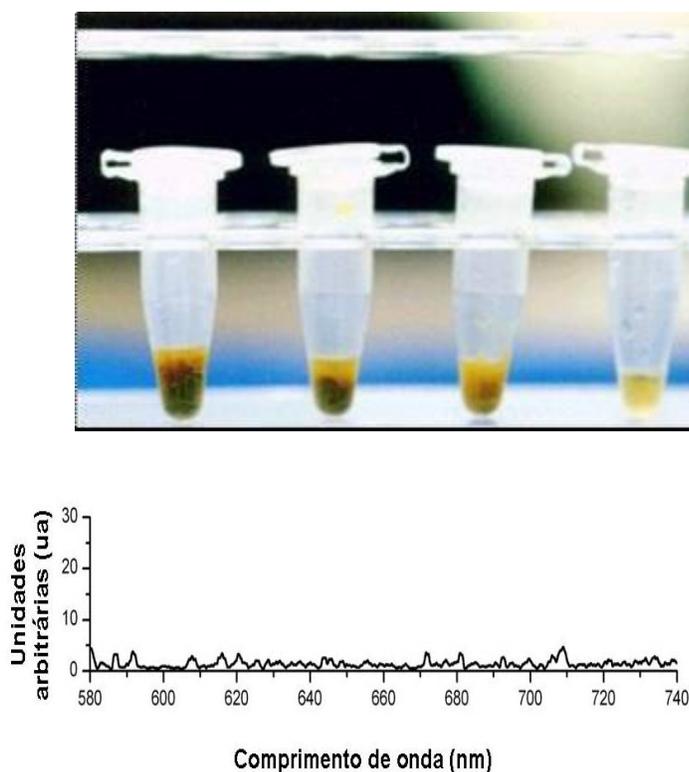
Na figura 20, é mostrado o lúmen de alça intestinal aberto fotografado com iluminação luz UV e o registro do espectro correspondente obtido por intermédio do uso do espectrômetro tipo “plug-in” (PC2000-S, da Ocean Optics Inc.®).



**Figura 20-** Lúmen intestinal contendo material fecal em ratos com dieta de glicose a 5% por 120 horas sob luz UV, apresentando intensa fluorescência vermelha. Abaixo o respectivo espectro de fluorescência com banda centrada em 636nm.

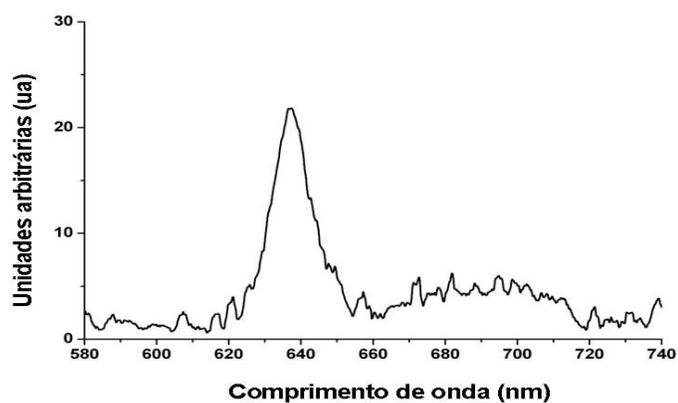
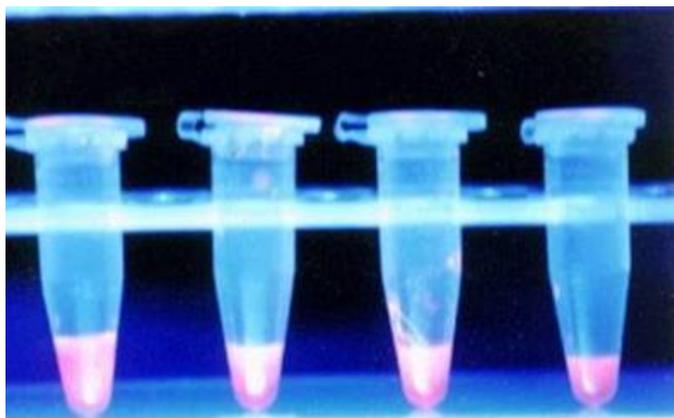
#### 4- Resultados relativos ao material coletado do trato intestinal de animais mantidos sob dieta normal e de glicose 5%

A substância colhida do trato intestinal, com consistência de muco, foi preparada e analisada conforme descrito em materiais e métodos. Na figura 21, é mostrada fotografia do material fecal de ratos com dieta normal preparado em tubo *ependorfs* e o espectro correspondente com iluminação por luz UV.



**Figura 21-** Material fecal de ratos com dieta normal, coletado e diluído em 10 ml de soro fisiológico, distribuídos em tubos do tipo “ependorfs” sob iluminação por luz UV. O espectro coletado mostra ausência de fluorescência.

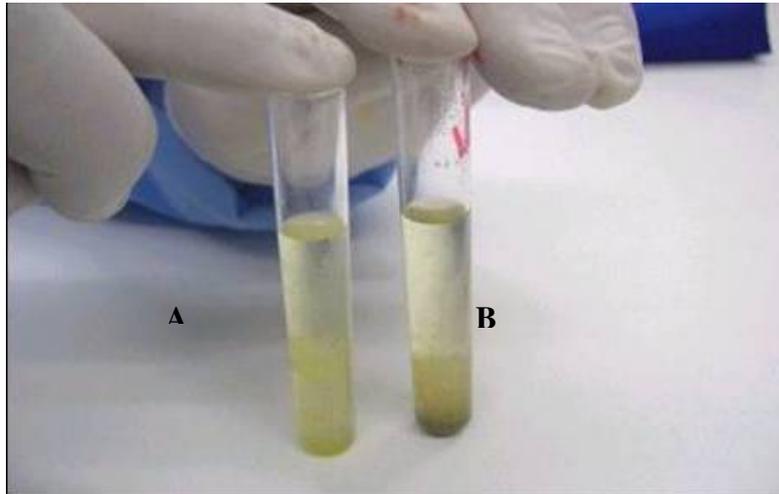
Na figura 22 é mostrada fotografia do material fecal de ratos mantidos previamente com dieta líquida de 5% por 120 horas, preparado em tubo eppendorfs e o espectro correspondente com iluminação por luz UV.



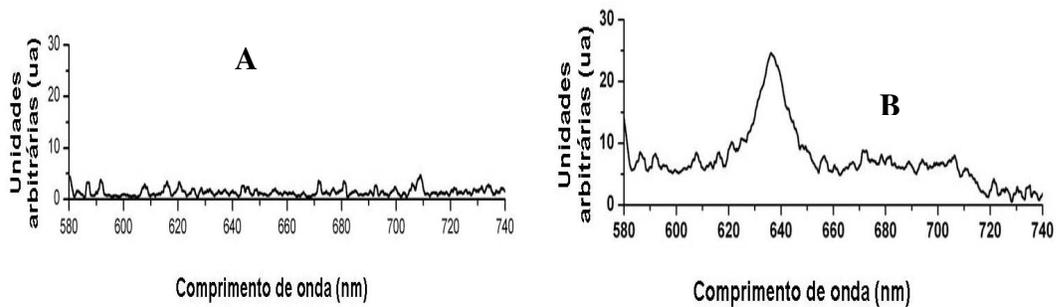
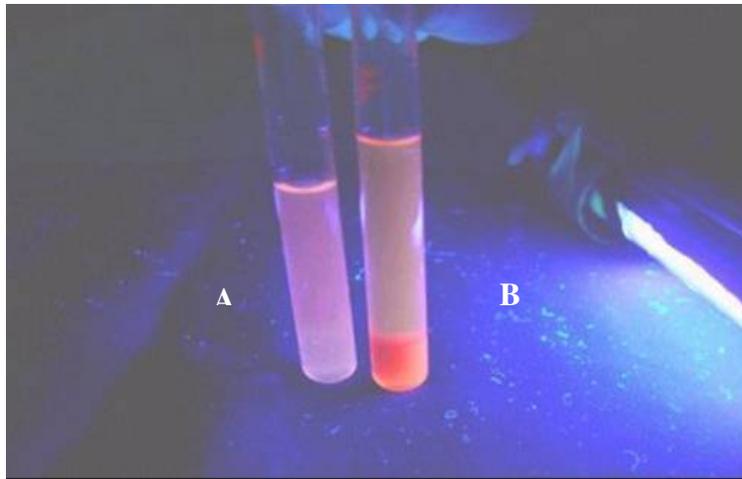
**Figura 22-** Material fecal fluorescente de ratos com dieta de glicose por 120 horas, contidos em “eppendorfs”. Observa-se a presença de fluorescência vermelha, vista sob ação de luz UV. A espectrometria mostra curva com pico de 636 nm.

## 5- Teste de detecção de porfirinas modificado por EALES e cols.

Resultado do Teste de Detecção de Porfirinas, modificado por Eales (Eales *et al*, 1966).(56)



**Figura 23-** Tubo de ensaio (A) com material fecal colhido de animal com dieta normal e (B) animal submetido à dieta de glicose por 120 horas, fotografado com luz branca, preparado segundo a técnica de Eales.



**Figura 24-** Tubos de ensaio com material fecal preparado segundo a técnica modificada por Eales. Em (A) material colhido de animal com dieta normal e em (B), de animal submetido à dieta de glicose por 120 horas, fotografados com UV. Os espectra correspondentes demonstram a ausência de fluorescência em (A) e presença de intensa fluorescência em (B), com pico em torno de 636 nm.

## Experimento 2

As figuras abaixo são representativas da metodologia experimental para a pesquisa de fluorescência em áreas externas dos ratos tratados com dieta de glicose a 5%.



**Figura 25-** Animal submetido à dieta líquida de glicose – 5%, por 120 horas, iluminado com luz branca.

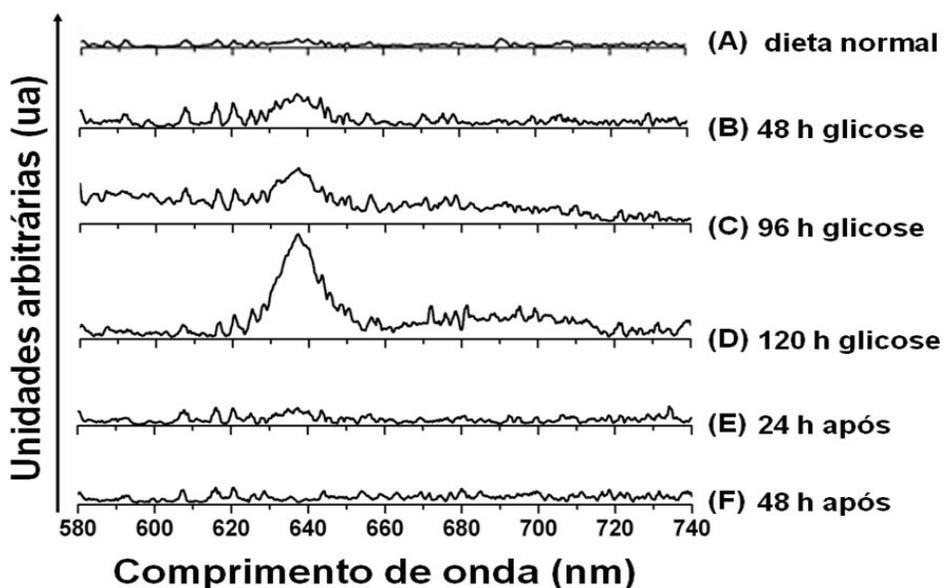


**Figura 26-** Animal da figura 25, fotografado com luz UV, evidenciando a presença de fluorescência vermelha disseminada em várias áreas, como focinho, patas, cauda e bolsa escrotal.

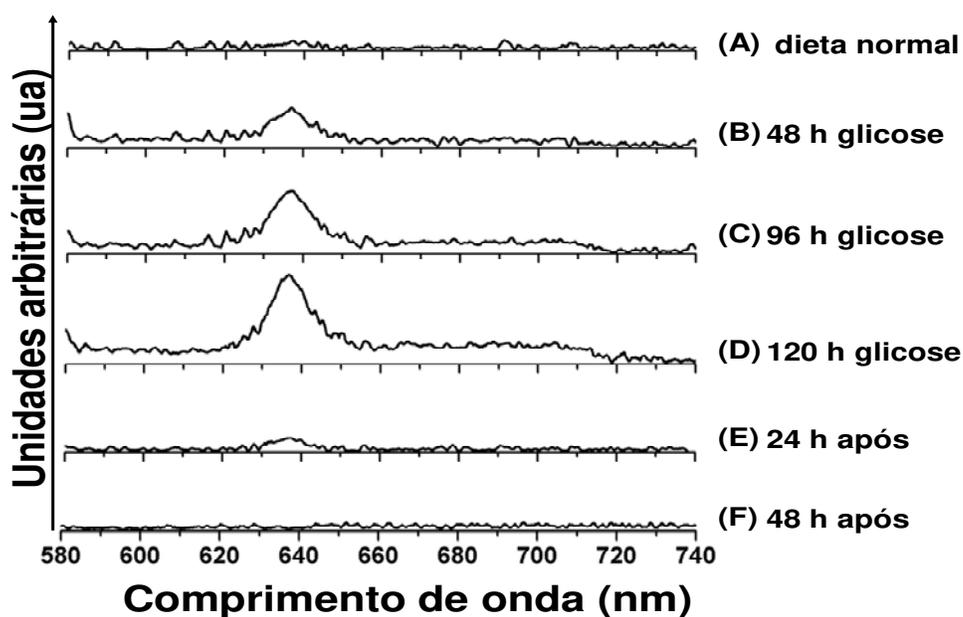
## **1- Avaliação com Lâmpada de Ultra Violeta - (UV) (Áreas Fluorescentes x Espectrometria).**

Os vários espectros obtidos de cada uma das áreas externas estudadas apresentam entre si, grande similaridade. Para a presente apresentação de resultados foram selecionados, portanto, espectros mais significativos de cada situação já que não tínhamos os resultados em forma digital, o que não permitiu o tratamento mais exato.

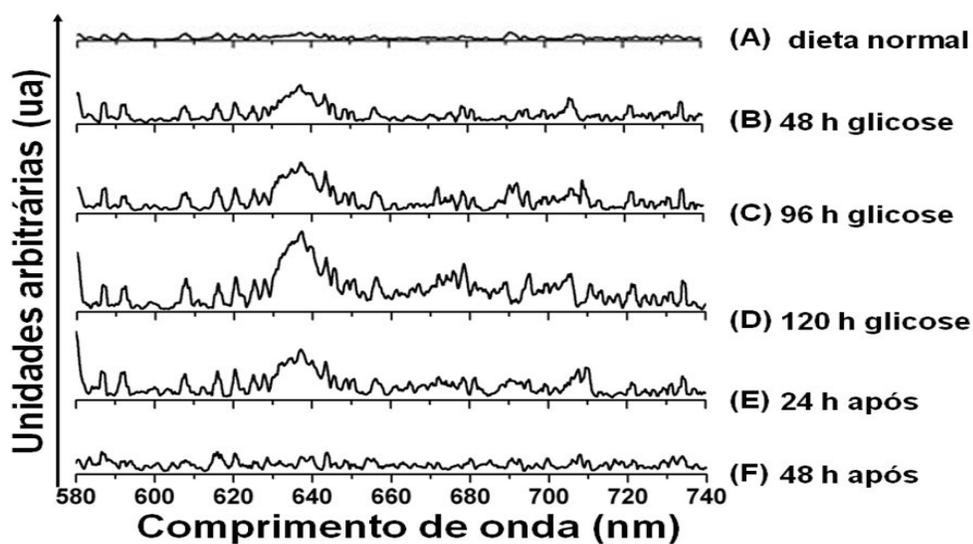
Segue abaixo a sequência de fotos e registros espectrográficos das áreas analisadas de cada animal.



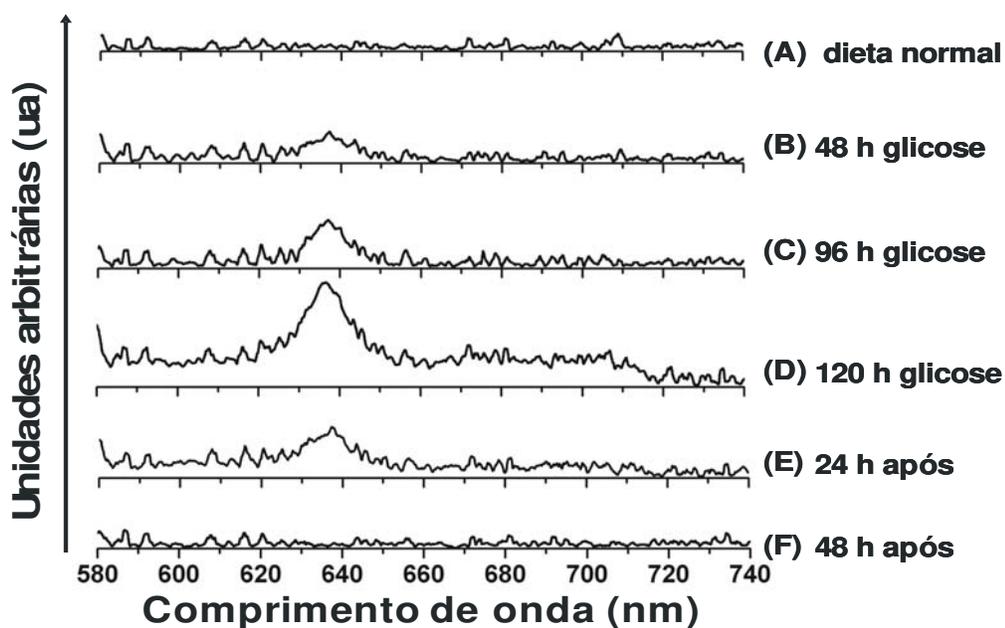
**Figura 27-** Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência nas patas traseiras, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições: (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F), representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal.



**Figura 28-** Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência na cauda, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições: (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F) representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal.



**Figura 29-** Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência no focinho, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F), representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal.



**Figura 30-** Foto de animal iluminado com luz UV, onde se observa a presença de fluorescência na bolsa escrotal, bem como a evolução dos respectivos registros de espectros de fluorescência nas seguintes condições: (A) dieta normal, (B) dieta de glicose a 5% com 48h, (C) dieta glicose 96h, (D) dieta glicose 120h. Em (E) e (F), representam os registros 24h e 48h, após a retomada da dieta normal, respectivamente. Foram feitos 05 registros espectrométricos de cada área por animal.

# DISCUSSÃO



Na fase inicial deste trabalho, em estudo piloto experimental com ratos Wistar, observou-se a presença de fluorescência nativa por excitação UV em regiões externas e internas nos animais submetidos à restrição alimentar sólida (21). Esta observação trouxe indagações e, conseqüentemente, novo direcionamento para um estudo experimental cujos resultados estão apresentados no capítulo correspondente.

O Experimento 01, dedicado a estudo de órgãos internos dos animais, traz como evidência inicial, quando se comparam as figuras 10 e 12 (representativas do grupo tratado com dieta normal de ração e água “*ad libitum*”) e 11 e 13 (representativas do grupo tratado com dieta líquida, glicose 5%), o surgimento de fluorescência vermelha, observada a olho nu, pelo menos em um único ponto em alça intestinal, sugerindo relação com a condição de dieta líquida imposta arbitrariamente.

A sistematização do estudo, mostrado pela sequência de fotos 13, 14, 15 e 16, para animais mantidos sob dieta líquida, glicose 5%, por, respectivamente, 48, 72, 96 e 120 horas antes do sacrifício, evidencia, mesmo a olho nu, que a região que fluoresce no trato gastrintestinal se expande com o aumento do período de dieta líquida. O limite de 120 horas foi imposto por questões de resistência do animal. Isto foi determinante para a definição metodológica do presente trabalho.

Certamente observações a olho nu, como as apresentadas e aqui discutidas, não permitem a identificação do fluoróforo uma vez que o nosso processo de visão não é capaz de separar as componentes espectrais de um sinal luminoso qualquer. Para registrar o espectro que compõe a luz vermelha observada a olho nu, um espectrômetro com resolução da ordem de 2nm foi suficiente para o presente trabalho.

A figura 17 é representativa de vários registros de espectros de fluorescência, das situações mostradas pelas figuras 13 a 16, com tal resolução. A emissão fluorescente assim registrada, abrangendo o vermelho e infravermelho

próximo, com pico bem definido (máximo em 636nm +/- 2nm) e, banda no infravermelho próximo, que se estende de 660 a 720nm, é praticamente idêntica à emissão da Protoporfirina IX (PpIX), cujo espectro de emissão fluorescente é conhecido (46;49;50).

A figura 19 mostra fragmento de alça intestinal, proveniente de animal mantido por 120 horas, até o sacrifício, com dieta de glicose a 5%, fotografado com luz UV, permitindo a exposição do material interno e seu registro espectral como mostrado na figura 20. A substância colhida do trato gastrointestinal, com consistência de muco, foi preparada e analisada conforme descrito em materiais e métodos. Na figura 21, é mostrado o material fecal de ratos com dieta normal preparado em tubo *ependorfs* (diluição em soro fisiológico) e o espectro correspondente com iluminação por luz UV, evidenciando a inexistência de picos ou bandas fluorescentes. Já no material proveniente de ratos, previamente mantidos em dieta líquida com 5% de glicose por 120 horas, figura 22, o espectro registrado confirma a existência de pico em 636 nm. Nestes casos, o espectro se apresenta menos definido, provavelmente pela estrutura dos tubos utilizados que foram de plástico, os quais apresentam absorção do UV relativamente grande.

É sabido que fluorescência endógena, por iluminação UV, ocorre em certos tecidos humanos, animais e de plantas. Isso é descrito na literatura desde 1924 – Policard (32) e outros autores (13; 33; 57; 58; 60 62; 63; 64; 65), entretanto não foram encontrados na literatura referências à indução de fluorescência no trato gastrointestinal em função de imposição de stresse causado por dieta não convencional. Dessa forma, tratando-se de situação que difere da normalidade, a identificação do fluoróforo demanda uma atenção especial.

Como as porfirinas animais são elementos centrais no processo de transporte do oxigênio (31), o seu estudo é bastante completo, existindo para sua identificação um teste, relativamente simples, denominado Teste de Detecção de compostos Porfirínicos, descrito e modificado por Eales et al. (56) como descrito em Materiais e Métodos.

O material preparado pelo Método de Eales, conforme figura 23, mostra que não há precipitado no tubo “A”, isto é, do material obtido de animal mantido em dieta normal, enquanto que, no tubo “B”, que contém material obtido de animal mantido sob regime de dieta líquida, há uma quantidade razoável de precipitado. Como mostrado na figura 24, o precipitado (tubo “B”) fluoresce intensamente sob ação do UV e, ainda, o espectro registrado assemelha-se ao espectro da Protoporfirina IX, como esperado.

### Experimento 02

Em relação aos achados de fluorescência externa nos animais, durante o período de dieta líquida com glicose (figura 26), as maiores evidências concentraram-se nas patas (figura 27), na cauda (figura 28), no focinho (figura 29) e na bolsa escrotal (figura 30). Os locais selecionados para o estudo da fluorescência basearam-se também no fato de que a fluorescência, nestes sítios, poderia ser facilmente registrada pelo equipamento. Nos olhos dos animais também foi observada a presença de fluorescência, entretanto com baixa intensidade.

As sequências de espectros de fluorescência, registrados para quaisquer destas regiões externas, mostrou sempre o mesmo padrão. A intensidade do pico em 636 nm, característico da PpIX, inexistente na condição de dieta normal, é mínima para a situação de 48 horas de dieta líquida com 5% de glicose, aumentando com o acréscimo do período até 120 horas, que foi o período máximo suportado pelo animal. A reintrodução da dieta normal acarretou o desaparecimento gradativo da fluorescência em tais regiões, desaparecendo totalmente em 48 horas (gráficos associados às figuras 26 a 30).

A literatura relata a evidência de uma condição patológica, em que a síntese de porfirina pode estar alterada tanto em seres humanos quanto em alguns animais, denominada Porfiria (16; 17; 18). A Porfiria é uma patologia de origem genética ou adquirida, caracterizada por um aumento na excreção de coproporfirina e uroporfirina, precursores das porfirinas, observados tanto nas

fezes, como na urina, quando em concentrações elevadas no sangue. Essa elevação associa-se a uma diminuição da atividade catalásica do fígado, embora a perturbação metabólica produzida ainda seja pouco conhecida (14; 15). O quadro clínico é representado por graves crises, com a presença de manifestações cutâneas, vermelhidões, aumento à fotossensibilidade por UV e alterações na coloração das excretas, que se apresentam avermelhadas, através do suor, da lágrima, da urina e das fezes (17; 18).

De acordo com Anderson et al. (66), estados de jejum ou mesmo de dieta hipocalórica prolongada pode acarretar o aparecimento de Porfíria. Considerando que ratos têm metabolismo muito acelerado, necessitando de ingestão diária de grande quantidade de ração, a manutenção dos mesmos, com dieta líquida a 5% de glicose, pode ser considerada como indutora de uma situação de Porfíria. Isto, por si só, poderia explicar a presença da fluorescência vermelha observada em áreas externas dos animais do presente trabalho em condição de dieta glicosada.

Por outro lado, roedores como no caso dos ratos Wistar do presente trabalho, possuem uma glândula, denominada de Glândula Harderiana, situada posteriormente ao globo ocular e que apresenta fluorescência intensa atribuída à produção de PpIX ( 4; 26; 57; 58; 59).

Figge e Salomon (61) dissecaram o trato naso-lacrimar de ratos Wistar, expondo a Glândula Harderiana e encontraram uma ligação dessa glândula com o trato naso-lacrimar, onde parte da secreção da glândula passaria para a cavidade nasal e, depois ao tubo digestivo. Esse achado justificaria a presença de substância fluorescente vermelha no trato gastrintestinal e nos resíduos fecais dos animais do presente estudo, conforme evidenciado no Experimento 01.

Observa-se, ainda, pelos resultados do presente trabalho, que o volume do material fluorescente aumenta significativamente ao longo das 120 horas de dieta. A ausência de material fecal sólido, nesta situação, facilitaria a concentração do material fluorescente.

Ainda, como é referido por Harkness e Ridgway (67), Coto-Montes et al.(68), condições de stress, doenças ou carência alimentar causam, em roedores, o aumento na produção de PpIX pela Glândula Harderiana, levando a maior acúmulo desse fluoróforo no trato intestinal, bem como absorção do mesmo pela corrente circulatória com a consequente distribuição sistêmica. Segundo Persengiev et al. (69) e Mason et al. (70), as condições adversas citadas levam a significativas alterações funcionais e metabólicas, onde a glândula Harderiana é particularmente sensível a essas alterações, respondendo com variações nos níveis de secreção de Melatonina e grande aumento na produção de PpIX (4; 68; 70).

A condição de stress, por si só, é capaz de determinar aumento nos níveis de produção de PpIX, decorrente de alterações nos níveis séricos de melatonina circulante, o que corrobora com os resultados encontrados nesse estudo (4; 67; 69; 70).

Os animais deste estudo foram submetidos à dieta restritiva e mantidos no escuro durante um período considerado longo em relação ao seu metabolismo e a resposta a esta situação atípica, foi um aumento na produção de PpIX encontrados em seu trato intestinal. A dieta líquida, uma vez que consegue esvaziar o lúmen intestinal, certamente contribuiu para a detecção da fluorescência e os respectivos espectros da substância vermelha, conforme ilustrado em resultados.

Parte da elevação dos níveis de PpIX detectado no lúmen intestinal foi, certamente, absorvida pelo sistema circulatório e assim, atingindo diferentes áreas do corpo, o que seria capaz de induzir o animal a uma condição de Protoporfiria Eritropoiética (51; 55), o que é evidenciado pela fluorescência vermelha encontrada em áreas externas do corpo do rato.

Os achados experimentais registrados nas figuras 26 a 30 sugerem, portanto, que a dieta líquida glicosada em ratos Wistar, pode induzir a uma condição similar à Porfíria, com característica reversível, quando do retorno dos animais à dieta sólida convencional.

# CONCLUSÃO



Os dois experimentos aqui desenvolvidos mostram, de forma clara, o surgimento de fluorescência vermelha ( $\lambda = 636 \text{ nm}$ ) apenas nos grupos de animais submetidos à dieta líquida.

- Em relação ao tempo e ao aparecimento da fluorescência, foi observado que as áreas investigadas apresentaram um efeito diretamente proporcional entre o tempo de administração da dieta glicosada e a evidência da fluorescência. Quanto maior o tempo de duração da dieta glicosada, mais intenso foi o aparecimento de picos de fluorescência.

- A quantidade de material fluorescente nas alças intestinais aumentou de intensidade em relação ao tempo de duração da dieta, constituindo-se em fator determinante para coleta de material para determinados testes.

- Em relação aos objetivos específicos:

- 1- A espectroscopia de fluorescência realizada nas diversas etapas dos experimentos 01 e 02, evidenciaram, sempre, o registro de espectros compatíveis com a presença de protoporfirina IX, (PpIX), no material e/ou nas áreas fluorescentes dos animais submetidos à dieta de glicose 5%.
- 2- O teste de Eales comprovou a presença de material porfirínico no conteúdo fluorescente das alças intestinais no grupo de estudo do experimento 01. Este resultado, quando comparado com a espectroscopia, ratificou a presença de Protoporfirina IX.
- 3- A documentação fotográfica e, em especial, o registro sequencial dos espectros de emissão no experimento 02 evidenciaram o surgimento e a evolução da fluorescência vermelha nas áreas tegumentares selecionadas (bolsa escrotal, focinho, patas e cauda).

4- O espectro de emissão da PpIX, nas áreas externas estudadas, mostrou nítida intensificação dos picos característicos, em relação ao tempo de dieta líquida de glicose e à quantidade de material porfirínico no lúmen intestinal, conforme evidenciado no experimento 01. Comprovação que condiz perfeitamente com uma situação de porfiria reversível ou transitória, já que os animais retornaram à condição de normalidade com a retomada da dieta habitual.

Os resultados obtidos, bem como os dados encontrados na literatura, incentivam o aprofundamento da presente pesquisa no sentido de se buscar um maior conhecimento sobre os efeitos de dietas restritivas, sobre as possíveis alterações fisiopatológicas impostas ao metabolismo alimentar.

Com base nos resultados deste estudo experimental, concluímos que os grandes aumentos na produção PpIX pela glândula da Harderiana de ratos Wistar, causada pelo stress imposto nas condições do experimento, em associação com uma quantidade relativamente baixa de ferroquelatase encontrada na cadeia de produção do Heme, podem determinar uma situação de Protoporfiria Eritropoiética (PPE) nos animais. Esta foi observada e acompanhada, através do registro da intensidade e posição dos picos de fluorescência vermelha. A detecção de fluorescência pode ser um método confiável para o acompanhamento de concentração de porfirinas em diferentes tecidos, para fim diagnóstico.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- 1- Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27: 36-43.
- 2- Prenna G, Sacchi S. Primi risultati di microspettrofluorometria qualitativa del tessuto elastico e collagene. *Bolletino della Società Medico-Chirurgica di Pavia*. 1964; 3 (6):779 – 90.
- 3- Strum JM, Shear CR. Harderian Glands in mice: Fluorescence, peroxidase activity and fine structure. *Tissue and Cell*. 1982; 14: 135 –148.
- 4- Reis E, Nicola EMD e Nicola JH. In vivo photobleaching detection of endogenous PpIX: Experimental study with rat Harderian Gland. *In: Anais do ASLMS - Laser in Surgery and Medicine*. 2004;16 :4.
- 5- Banga I, Bihari-Varga M. Investigations of free and elastin-bound fluorescent substances present in the atherosclerotic lipid and calcium plaques. *Connective Tissue Research*. 1974; 2: 237 – 41.
- 6- Chance B, Thorell B. Fluorescence measurements of mitochondrial pyridine nucleotide in aerobiosis and anaerobiosis. *Nature*. 1959; 184: 931- 34.
- 7- Movarec J, Hatt PY, Rost FWD. The application of the cytophotometer to study of metabolic transitions of isolated rat heart. *Cardiology*. 1972; 57: 61 – 6.
- 8- Benson R C, Meyer R A, Zaruba, M E and Mckhann G M. Cellular autofluorescence – is it due to Flavins? *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27: 44 - 8.
- 9- Govindjee F, Govindjee R. “The primary events in photosynthesis”. *Sci. Am*. 1974; 82: 231- 8.
- 10- Porra RJ. Recent Progress in Porphyrin and Chlorophyll Biosynthesis. *Photochem and Photobiol*. 1997; 65 (3): 492 – 516.

- 11- Matsumoto H., Kitamura S, Araki T. Autofluorescence in human dentine in relation to age, tooth type and temperature measured by nanosecond time-resolved fluorescence microscopy. Archives of Oral Biology. 1999; 44: 309 – 18.
- 12- Nicola JH, Hernandez JWR, Nicola EMD, Reis ER, Mesquita R. Detection of native fluorescence in the gastrointestinal tract according to different diets: experimental studies in Wistar rats. *In: Anais do WALT – Photomedicine and Laser Surgery.* 2007; 4: 25.
- 13- Colussi VC, Nicola ED, Nicola JH. Fototerapia, Fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. Rev. Ass. Med. Brasil. 1996; 42 (4): 229 – 36.
- 14- Bickers DR, Keogh L, Harber LC, Kappas A. The effect of environmental light exposure on drug induced porphyria in the rat. Photochem Photobiol. 1976; 24 (6): 551- 53.
- 15- Pattak MA, West JD. Porphyrins: office procedures and laboratory tests for diagnosis of porphyrin abnormalities. Acta Derm Venereol /Suppl/ (Stockh), 1982; 100 :91-105.
- 16- Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Di Mascio P. Danos ao DNA Promovidos por Ácido-5-Aminolevulínico: Possível Associação com o Desenvolvimento de Carcinoma Hepatocelular em Portadores de Porfiria Aguda Intermitente. Química Nova. 2002; 25 (4): 594-608.
- 17- Anderson KE. Distúrbios da Nutrição e do Metabolismo – Cap. 141 – Porfirias. Manual Merck, 2007. Disponível em: [www.msd-brazil.com](http://www.msd-brazil.com) Acesso em 15/11/2007.
- 18- Jorge, SG. Porfirias Hepáticas. **HEPCENTRO - 2007.** Disponível em: [www.hepcentro.com.br/porfiria](http://www.hepcentro.com.br/porfiria). Acesso em: 16/12/2007.
- 19- Elder GH. Porphyrin metabolism in porphyria cutanea tarda. Semin Hematol. 1997; 14 (2): 227- 42.

- 20- Elder GH, Sheppard DM, De Salamanca RE, Olmos A. Identificación of two types of porphyria cutanea tarda by measurement of erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase. *Clin Sci.* 1981; 58: 477-84.
- 21- Nicola JH, Hernandez JWR, Nicola EMD, Reis ER, Mesquita R. Follow up of native fluorescence induced by glucose diet in Wistar rats. *In Anais do WALT – Photomedicine and Laser Surgery.* 2007; 4: 25.
- 22- Cheong WF, Welch AJ. A review of the optical properties of tissues. *IEEE J. Quantum Electron.* 1990; 26: 2166-2185.
- 23- König K, Kienle A, Boehncke WH, Kaufmann R, Rück A.; Meier T. et al. Photodynamic tumor therapy and on-line fluorescence spectroscopy after ALA administration using 633nm light as therapeutic and fluorescence excitation radiation. *Optical Engineering.* 1994; 33 (9): 2945 – 52.
- 24- Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*,.2000 ;2 : 89-117.
- 25- Stringer M, Moghissi K. Photodiagnosis and fluorescence imaging in clinical practice. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2004; 1 (1): 09-12.
- 26- Payne AP, MC Gadey J and Johnston HS. “The structure of the Harderian gland of the golden hamster. Harderian gland effects”( Ed. S.M. Weeb; R.A Hoffman; Puig- Domingo & R.J. Reiter) Berlin Springer. 1992; 53 – 67.
- 27- Hendricks SB. How light interacts with living matter. *Sci. Am.* 1968; 219: 174 – 86.
- 28- Patterson MS, Wilson BC. The physics of photodynamics therapy. *Phys Med Biol* 1986; 31(4): 327 – 60.
- 29- Fiorotti R, Nicola JH e Nicola EMD. Native Fluorescence of Oral Cavity Structures: Na Experimental Study in Dogs. *Photomedicine an Laser Surgery.* 2006 ;24 (1): 22-28.

- 30- Dougherty TJ., Kaufman J E, Goldfarb A, Weishaupt K R, Boyle D and Mittleman A. Photoradiation therapy for the tratament of maligmant tumors. *Cancer Res.* 1978; 38: 2628-35.
- 31- Brown SB. An Introdtion to spectroscopy for biochemists. Academic Press London/New York. 1980; 112 (2): Page 387.
- 32- Policard A. “Estudies sur les aspects offerts par des tumour experimentales examinee a la lumiere de woods”. *CR. Soc. Biol.* 1924: , 91: 1421- 23.
- 33- Alfano RR, Yeo, SS. Human Teeth with and whithout dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. *Journal of Dental Research*; 1981:80, 120-122.
- 34- Heyerdahl H, Wang I, Liu DL. Pharmacokinetic studies on 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tumours and normal tissues. *Cancer Lett* 1997; 112: 225–231.
- 35- Hinnen P, De Rooij FWM, Van Velthuysen MLF, Edixhoven A, Van Hillegersberg R, Tilanus HW, et al: Biochemical basis of 5- aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX accumulation: A study in patients with (pre)malignant lesions of the oesophagus. *Br J Câncer.* 1998; 78:679 - 682.
- 36- Reis ER, Nicola EMD e Nicola JH. Harderian Gland of Wistar Revised as a Protoporphyrin IX Producer. *Braz. J. morphol. Sci.* 2005: 22:(1) 43-51.
- 37- Leunig A, Rick K, Stepp H, Gutmann R, Alwin G, Baumgartner R et al. Fluorescence Imagining and Spectroscopy of 5-Aminolevulinic Acid Induced Protoporphyrin IX for Detection of Neoplastic Lesions in the Oral Cavity. *Am J Surg.* 1996 ;172(6):674-7.
- 38- Jori, G. Tumor Photosensitizers: Approaches to Enchange the Selectivity and Efficiency of Photodynamic Therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1996; 36: 87-93.

- 39- Krieg RC, Messmann H, Rauch J, Seeger S, Knuechel R. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem Photobiol.* 2002; 76:518–525.
- 40- Seema Gupta BS, Dwarakanath K, Muralidhar V.J. Cellular uptake, localization and photodynamic effects of hematoporphyrin derivate in human glioma and squamous carcinoma cels lines. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2003; 69:107-120.
- 41- Kriegmair M, Zaak D, Knuechel R, Baumgartner R, Hofstetter A. 5-Aminolevulinic Acid-induced Fluorescence Endoscopy for Detection of Lower Urinary Tract Tumors. *Urol Int.* 1999; 63: 27-31.
- 42- Alfano RR, Kats A. *Photonic Pathology. Fluorescence NAD Raman Espectroscopy for Tissue Diagnosis and Characterization.* New York: 1996, Plenun Press.
- 43- BAUMGARTNER, R. et al.: Inhalation of 5-Aminolevulinic Acid: A new Technique for Fluorescence Detection of Early Stage Lung Cancer. *J Photochem Photobiol B: Biol .* 1997; 36 :169-174.
- 44- Dhingra JK, Perrault DF Jr, McMillan K, Rebeiz EE, Kabani S, Manoharan R, et al. Early Diagnosis of Upper Aerodigestive Tract Cancer by Autofluorescence: *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996; 122 (11): 1181 – 86.
- 45- Buorg-Heckly G, Blais J, Padilla JJ, Bourdon O, Etienne J, Guillemin, F et al. Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of esophagus: tissue characterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy;* 2000 32(10):756-65.
- 46- Dougherty TJ., “Photodynamic therapy: Yearly Review”, *Photochem. Photobiol.* 1993; 58 (6):895- 900.

- 47- Kochevar IE, Lambert C R, Lynch M C and Tedesco A C. Comparison of Photosensitized Plasma Membrane Damage caused by Singlet Oxygen and Free Radicals. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1280: 223-230.
- 48- Na R, Stender IM, Wulf, HC. Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence. *Acta Derm Venereol*; 2001; 81 (4): 246 –9.
- 49- Zeng, H, Lui H, McLean D I, Macaulay C E, Palcic B. Update on Fluorescence Spectroscopy Studies of Diseased Skin. *SPIE*.1996; 2671:196-198.
- 50- Bissonnette R, Zang H, McLean DI , Schreiber WE , Roscoe DL and Lui H. Psoriatic Plaques Exhibit RedAutofluorescence that is Due to Protoprphyrin IX. *The Journal of Investigate Dermatoly*. 1998; 111: 586–591
- 51- Prauchner CA and Emanuelli T. A patogênese das porfirias agudas.*Revista do Hospital Central de Porto Alegre*. 2002; 22(1): 17-25.
- 52- Stedile R. Porfirias e Icterícia. *Bioquímica e Biologia Molecular*. 2004 - Disponível em: [www6.ufrgs.br/bioquimica/](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/). Acesso em: 11/12/2007.
- 53- González FHD, Silva SC. Bioquímica clínica de proteínas e compostos nitrogenados – Bioquímica do grupo heme. In. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2 a. Ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio grande do Sul. 2006; 91-101.
- 54- De Matheis F. Toxicological aspects of liver heme biosynthesis. *Sem Hemat*. 1988; 25: 321-9.
- 55- Piper WN. Role of heme in endocrine fuction. *Sem. Hematol*. 1988; 25: 300-5.
- 56- Eales L, Levey, MJ, Swee, GD. The place of screening tests and quantitative investigation in the diagnosis of the porphyries, with particular reference to variegate and symptomatic porphyria. *South Afr Med J*. 1966; 40 : 63.

- 57- Derrien E, Turchini J. "Sur l'accumulation d'une porphyrine dans la glande de Harder des Rongeurs du genre Mus et sur son mode d'exeretion", C.R. Soc. Biol. Paris. 1924: 91, 637-639.
- 58- Thomas PT. Experimental Imitation of Tumour Conditions. Nature. 1945;156: 738 - 740 .
- 59- Grafflin AL. Histological observations upon the porphyrin excreting Harderian gland of the albino rat. American Journal of Anatomy. 1941;71: 43-64.
- 60- McElroy LW, Salomon K, Figge FHJ, and Cowgill GR. On the Porphyrin Nature of the Fluorescent "Blood Caked" Whiskers of Pantothenic Acid Deficient Rats. Science. 1941; 94, 467.
- 61- Figge FHJ, Atkinson WB. "Relation of water metabolism to porphyrin incrustations in pantothenic acid-deficient rats", Proc. Soc. exp.Biol. N.Y.1941; 48:112-114.
- 62- Rimington C. Compt. Rend. Trav. Lab. Carisberg, Ser. Chim. 1938; 22 :454-64.
- 63- Solomon K J and Figge FHJ. Disturbance in porphyria caused by feeding 3,5 diethoxycarbonyl – 1,4 – dihydro- 2,4,6 – trimethyl-pyridine- 3,5- dicarboxilate: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960;100: 583 – 87.
- 64- Ewing PL, Cornbleet TJ. Investigative Dermatol. 1941; 5 : 127- 33.
- 65- Rimington C. Quantitative determinations of porphobilinogen and porphyrins in urine and feces. Assoc. Clin. Path. Broadsheet . 1963; 36: 238 - 821.
- 66- Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky, HL, Kushner V, Pierach CA, Pimstone N R, et al. Ann Intern Med 2005; 142: 439 - 450. [www.annals.org](http://www.annals.org).
- 67- Harkness JE, Ridgway MD. The red tears: porphyrin and the Norway rat. Lab. Anim Sci. 1980; 30 (5): 841- 4.

68- Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadreja D, et al. Porphyrin enzymes in hamster harderian gland, a model of damage by porphyrins and their precursors. A chronobiological study on the role of sex differences. *Chemico-Biological Interactions*. 2001;134:135–149.

69- Persengiev S, Kanchev L and Vezenkova G. Circadian patterns of melatonin, corticosterone and progesterone in male rats subjected chronic stress: Effect of constant illumination. *Journal of Pineal Research*. 1991;11(2): 57-62.

70- Mason G, Wilson D, Hampton C and Würbel H. Non-invasively Assessing Disturbance and Stress in Laboratory Rats by Scoring Chromodacryorrhoea. *Alternative to Laboratory Animals (ATLA)*. 2004; 32(1): 153-9.

# **ANEXO**





**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **587-1**, sobre as atividades didáticas – Título da Aula "**ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA ENDÓGENA NA VIA DIGESTIVA DE RATOS WISTAR EM FUNÇÃO DA DIETA**" sob a responsabilidade de **Professores Doutores Jorge Humberto Nicola e Ester Maria Danielli Nicola** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05 de Setembro de 2003.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **587-1**, entitled " \_\_\_\_\_ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 5, 2003.

Campinas, 05 de Setembro de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

# APÊNDICE



## APÊNDICE I – PROPRIEDADES DAS PORFIRINAS

### I – ESTRUTURA, BIOSÍNTESE, Absorção e Fluorescência.

As cores dos organismos vivos suscitaram desde sempre, o interesse de várias linhas de pesquisas, dentre elas a da biologia. Dentre as variadas colorações e suas funções, no ateremos àquelas que contribuem à formação das células sangüíneas, a hemoglobina, e seus derivados.

Sabemos que a coloração própria da hemoglobina e da clorofila é atribuível ao núcleo tetrapirrólico que as constitui. Mas, longe de serem exclusivas destes pigmentos, os principais da matéria viva, as porfirinas encontram-se largamente distribuídas pelos reinos animal e vegetal, onde são formadas a partir de substâncias relativamente simples (1).

Os trabalhos fundamentais realizados na primeira metade deste século, por alguns autores (R. Willstätter e H. Fischer, em particular) (2;3), fundamentaram as bases da química orgânica das porfirinas que permitiram, após 1945, o esclarecimento da sua biossíntese (4).

As porfirinas encontram-se na Natureza, sobretudo, na forma combinada; ocorrem em pequenas quantidades sob a forma livre (2).

A ferroprotoporfirina IX constitui o grupo prostético de várias enzimas importantes (catalase, peroxidase e citocromo-B) e das cromoproteínas animais (hemoglobina, mioglobina). A clorocruorina, citocromo-C e a citocromo-oxidase contêm hemes diferentes dos precedentes, nas respectivas estruturas (3).

Os anéis macrocíclicos das clorofilas a e b derivam do mesmo núcleo básico, a porfina, e afiguram ter uma síntese idêntica à das porfirinas animais (1;3).

Assim, o transporte e armazenagem de oxigênio, a fotossíntese, a oxidação intracelular, o transporte de elétrons e outras funções relacionadas, dependem destes pigmentos celulares. Agruparemos neste trabalho os principais dados, conhecidos no momento, sobre a estrutura, biossíntese e mecanismos reguladores das porfirinas, cujas perturbações, genéticas ou adquiridas, se revestem de várias facetas clínicas.

## 1. QUÍMICA DAS PORFIRINAS

Realizados numa época em que não existiam espectrofotômetros nem técnicas cromatográficas, os trabalhos legados por Willstätter e Hans Fischer (2;3) são considerados os pioneiros no estudo e na identificação das porfirinas.

A síntese laboratorial de várias porfirinas existentes na natureza e o conhecimento preciso das respectivas estruturas formaram, com efeito, o suporte das ulteriores contribuições de LEMBERG e LEGGE (5); MAC DONALD e STEDMAN (6); MACDONALD e JACKSON (7); FALK (8); FALK (9); GRANICK e MAUZERALL (10); PHILLIPS (11) e BURNHAM (12), entre outros, que deram à química orgânica das porfirinas a solidez que hoje a caracteriza.

### 1.1- ESTRUTURA

Podemos considerar a porfina como o núcleo-mãe de todas as porfirinas onde estas não são mais que tetrapirróis cíclicos conjugados com metais (12).

Compõem-se de 4 anéis heterocíclicos (A, B, C, D) ligados entre si por grupos de meteno (-CH=), arbitrariamente denominados  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (13).

A disposição alternada das ligações simples e duplas atribui ao todo à estabilidade própria das estruturas de ressonância (FALK, 1964). Apesar desta molécula (com diâmetro aproximado a 8,5 Å e espessura de 4,7 Å) se dispor no mesmo nível, tem a flexibilidade suficiente para que os pirróis, que a compõem, sofram desvios relativos entre si (14; 15).

Na Natureza existem três grandes classes de compostos tetrapirrólicos: hemes, clorofilas e cobalaminas. Os tetrapirróis derivam da porfina através de três possibilidades: substituição de alguns ou de todos os átomos de hidrogênio situados nas posições beta (numerados de 1 a 8) dos anéis pirrólicos, por cadeias laterais de vários tipos; formação de complexos com átomos metálicos diversos, no centro do anel macrocíclico (modificáveis por alteração da valência, pela constituição de compostos e pela combinação com proteínas específicas); substituição das pontes meténicas de carbono (12).

Os porfirinogênios, resultantes desta redução com 6 átomos de H, deixam de apresentar os espectros de absorção próprios das porfirinas, perdem a estrutura plana e tornam-se instáveis ao contacto com o ar ou sob ação de soluções aquosas iodadas (1; 16).

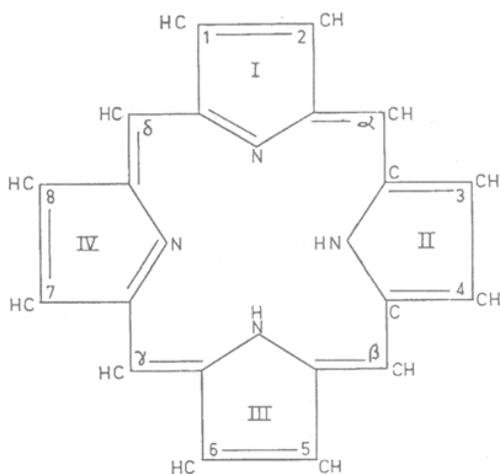


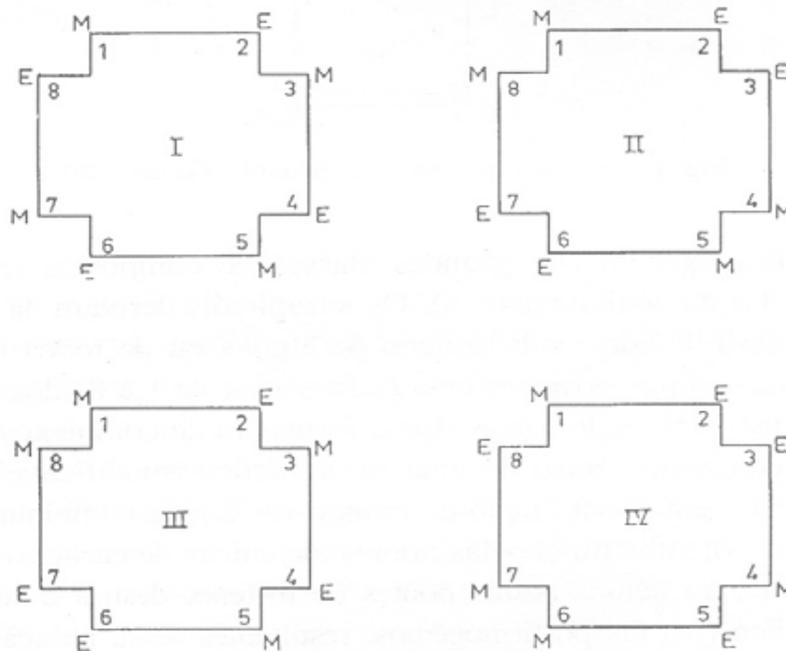
Fig. 1 – Porfina (adaptado de Bénard e Gajdos, 26).

## 1.2- ISOMERIA

A substituição, por grupos carboxílicos, do hidrogênio das posições beta dos tetrapirróis, acompanha-se de efeitos, correlacionados entre si, nas propriedades espectrais, nas de oxiredução dos derivados metálicos e na ionização dos azotos do anel (12).

Fischer (3) apud de RIMINGTON e KENNEDY (13), ao constatar que grupos semelhantes não substituem os átomos de hidrogênio no mesmo pirrol, assentou que, em presença de duas cadeias laterais diferentes, qualquer porfirina possuía 4 isômeros possíveis; sintetizou os 4 isômeros da etiporfirina, a partir da porfina, ao adicionar 4 grupos metil (CH<sub>3</sub>) e 4 etilo (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) às posições beta (Fig. 1.2). Em conseqüência, propôs que todas as porfirinas fossem referidas aquela, na designação do tipo isomérico.

Assim, quer as uroporfirinas (UP) com 4 cadeias laterais acéticas (-CH<sub>2</sub>-COOH) e protônicas (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), quer as coproporfirinas (CP) com 4 funções metil e 4 propiônicas, têm 4 isômeros possíveis (I, II, III, IV), dos quais, apenas os I e III, ocorrem naturalmente (17).



**Fig. 1.2** – Esquema representativo dos 4 isômeros (I, II, III, IV) da etioporfirina (adaptado de Bénard e Gajdos, 26).  
E=etil ( $C_2H_5$ ); M=metil ( $CH_3$ ).

Estas porfirinas tetracarboxílicas chegaram a ser sintetizadas por Fischer e por MacDonald, que também elaboraram no laboratório todos os isômeros da uroporfirina (3; 6). Quando há três grupos substituintes diferentes são possíveis 15 isômeros. A protoporfirina (PP) pertence a esta série, com 4 cadeias laterais metila, 2 vinila ( $-CH=CH_2$ ) e 2 propiônicas. O isômero IX é o único com interesse biológico (1).

Todas as porfirinas e metaloporfirinas de que se conhecem funções biológicas pertencem ao tipo isomérico III, no qual temos representada, a PpIX. As porfirinas do tipo I, não obstante serem isoladas de matérias naturais, não possuem quaisquer atividades fisiológicas (1;17). Ocorrem em excesso em determinadas condições patológicas e formam-se *in vitro*. Não se conhecem, na Natureza, hemes ou complexos metálicos relacionados que sejam provenientes daquela forma isomérica (13).

As porfirinas naturais mais importantes, não complexadas com metais, são a PpIX e os isômeros I e III das uroporfirina (UP) e coproporfirina (CP); há quantidades mínimas no sangue (UP, CP e PP), urina (CP) e fezes (UP, CP e PP), que se elevam em certas situações patológicas (17).

As protoporfirinas (PP) e deuteroporfirinas encontram-se habitualmente nas fezes de carnívoros, sobretudo após a ingestão de sangue ou hemorragias intestinais, devido à ação fermentadora das bactérias intestinais; de igual modo, a filioeritrina surge nas matérias fecais dos herbívoros, após a degradação da clorofila (8).

Os hemes (complexos de ferro e porfirinas) não são detectáveis no estado livre, em tecidos normais. Constituem os grupos prostéticos de muitas hemoproteínas biologicamente ativas (8).

### 1.3- COMBINAÇÃO COM METAIS

As porfirinas tem a propriedade de se combinarem prontamente com metais, formando quelatos ou complexos muito estáveis, as metaloporfirinas (1). É sob esta forma que os pigmentos pirrólicos exercem as suas funções mais importantes nos organismos vivos (11). Praticamente todos os metais têm possibilidade de se combinarem, *in vitro*, com os átomos de azoto centrais das porfirinas. (18; 19).

Alguns complexos metálicos bivalentes, por exemplo, Fe (II), Co (II), Mn (II), ao oxidarem-se em trivalentes, ocasionam a libertação de um excesso de carga positiva prontamente neutralizada por ânions (11). Quando os metais são monovalentes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, L<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>), temos diminuída a estabilidade termodinâmica própria das metaloporfirinas (8); enquanto que um dos cátions fica levemente acima do plano do núcleo, o outro se situa um pouco abaixo (9).

As metaloporfirinas biologicamente importantes utilizam o ferro (hemoproteínas), magnésio (clorofilas) e cobalto (Vit. B12) (12). Encontram-se na Natureza outros complexos de porfirinas e metais, como, de vanádio, cobre, zinco e magnésio (19).

Os complexos de ferro são conhecidos coletivamente, por hemes. A mudança do estado de valência, do ferroso para o férrico e vice-versa, estabelece um sistema de transporte de elétrons que põe em contato as desidrogenases intracelulares com o oxigênio exterior (13).

A coordenação do heme com proteínas, como sucede nas mioglobinas e hemoglobinas, que funcionam depósitos de oxigênio, dispensa esta mudança de valência (13).

O heme parece ser formado, naturalmente, apenas com a Protoporfirina e porfirinas descarboxílicas relacionadas. Apesar disso, obteve-se a união do ferro à coproporfirina, *in vitro*, com ou sem preparações teciduais. Detectam-se complexos de PP e CP com cobre, zinco e magnésio, nos tecidos e excretas (20).

Identificou-se nas penas de certas aves da África Central uma substância de cor vermelha, a turacina, composta por cobre e uroporfirina III (21; 22).

A incorporação de um átomo de metal, no centro do núcleo porfirínico, altera as propriedades de ambos, o que é demonstrável, em particular, no espectro de absorção, fluorescência e solubilidade das porfirinas e respectivos complexos metálicos (19).

#### 1.4- ESPECTRO DE ABSORÇÃO

Sabemos que os pigmentos tetrapirrólicos, em meio neutro, possuem um espectro de 4 bandas na região visível (4500-7000 Å) e um máximo de absorção da ultravioleta (~ 400 Å), a banda de Soret (11).

Podemos caracterizar as porfirinas de acordo com a intensidade relativa das suas 4 principais bandas visíveis, situadas perto de 620, 580, 540 e 500 nm e numeradas, respectivamente, de I a IV; entre a I e II ocorre a Ia, de baixa intensidade, em algumas porfirinas (8; 17).

A intensidade da banda de Soret é cerca de vinte vezes superior à da banda visível mais forte de muitas porfirinas, o que permite a determinação em recipientes de 1 cm de trajeto óptico nas regiões visível e ultravioleta, em concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ , respectivamente (11). É própria dos tetrapirróis conjugados, desaparecendo com a ruptura da conjugação, como nos pigmentos biliares (8).

As porfirinas se caracterizam de acordo com a intensidade relativa das suas 4 bandas visíveis principais; apesar das cadeias laterais ligadas aos pirróis não influenciarem o padrão ou intensidade relativa das bandas, afetam as suas posições e intensidade absoluta, sendo um bom guia de identificação daqueles pigmentos (11). Há 24 combinações possíveis, ainda que sejam observados 4 tipos apenas, na prática; a mais freqüente, conhecida por «etio», caracteriza-se pela diminuição progressiva da intensidade das bandas, desde a I à IV; existe nas porfirinas naturais, proto-, copro-, uro- e deuteroporfirina (DP), entre outras (8).

As metaloporfirinas apresentam 2 máximos de absorção ( $\alpha$  e  $\beta$ ) na região visível do espectro e 1 na banda de Soret ( $\gamma$ ). A intensidade relativa de  $\alpha$  e  $\beta$  depende do metal em causa; o seu padrão assemelha-se ao das porfirinas dissolvidas em meio ácido (1).

O espectro de absorção na região infravermelha conduziu a resultados interessantes sobre a estrutura molecular das porfirinas, em particular na distinção dos isômeros do mesmo tipo (23; 24).

## 1.5 FLUORESCÊNCIA

As soluções de porfirinas e seus sais, quando irradiados com luz ultravioleta ( $\sim 400$  m $\mu$ ), evidenciam lindas fluorescências, vermelha ou alaranjada, detectáveis pelo olho até concentrações de  $10^{-8}$  M e, fotoeletricamente, abaixo de  $10^{-10}$  M (11;12). Esta característica, já assinalada em 1867 por Tudichum, permite a extração, purificação e quantificação das porfirinas existentes nos meios em estudo, quer estejam em solução, sob a forma de cristais, ou absorvidos a colunas de cromatografia ou papel de filtro, ou até no interior das células (17).

Em virtude de a fluorescência poder ser mascarada por alguns solventes orgânicos e vários compostos biológicos, há que se manter as condições de observação quantitativa sob controle (8).

A fluorescência é influenciada pela natureza do metal das metaloporfirinas enquanto que os complexos metálicos de Cd, Pb, Zn, Mg fluorescem quando dissolvidos em alguns solventes, os de Co, Ni, Fe e Cu são desprovidos dessa característica. Explica-se assim que a hemoglobina, a mioglobina e os seus derivados, não possuam a fluorescência que surge logo após a libertação do Fe do grupo prostético (17).

A intensidade da fluorescência para determinadas porfirinas depende de vários fatores: natureza do solvente, temperatura, pH do meio, concentração dos eletrólitos. Todas as porfirinas em solução aquosa apresentam menor intensidade de fluorescência a pH próximo do ponto isoelétrico (11).

A excitação de fluorescência das porfirinas e seus sais correspondem, no respectivo comprimento de onda, à situação das bandas de absorção, nas regiões visível e ultravioleta, dos pigmentos tetrapirrólicos. Enquanto que o anel porfirínico fechado apresenta um espectro de fluorescência de várias bandas, a cadeia aberta fluoresce ou de um modo difuso ou com uma única banda (17).

#### 1.6- BIODÍNTENSE DA PROTOPORFIRINA

A conversão do Coproporfirinogênio III (CPG III) em protoporfirina IX (PpIX) é uma operação complexa que exige a descarboxilação e oxidação dos grupos propiônicos, das posições 2 e 4, em grupos vinílicos, e a remoção de 6 átomos de hidrogênio do protoporfirinogênio (PPG), para a produção de protoporfirina (25; 26).

A formação de PP, a partir do ALA a PBG, em preparações de eritrócitos e hemolisados, requer a presença de mitocôndrias, sem as quais pouca ou nenhuma quantidade se obtém (27; 28). Este fato chamou a atenção para o sistema enzimático, tendo-se confirmado, posteriormente, a sua localização nas mitocôndrias (29; 30).

Não está bem estabelecido, contudo, quantas enzimas são responsáveis pela totalidade desta reação (31), que necessitaria da presença exclusiva de oxigênio como facilitador dos íons hidrogênio, em todos os sistemas em que tem sido estudada, com a exceção dos microbianos, que funcionam em aneroiose (32).

Aparentemente, é responsável uma única enzima pelo mal esclarecido mecanismo da descarboxilação oxidativa dos grupos propiônicos (31), no decorrer da qual podem aparecer um tetrapirrol tricarboxílico intermediário, com 1 grupo vinílico e 3 propiônicos, que cedo evolui para PPG (25).

O catalisador desta reação, a oxidase ou descarboxilase oxidativa do CPG, é uma enzima mitocondrial específica para o CPG III, sem qualquer atividade sobre o tipo I (33). A sua ação é mais elevada nos tecidos que renovam com maior velocidade o heme, tais como o fígado e a medula óssea (19). As dúvidas incidem sobre a oxidação seqüente do PPG em PP.

Esta reação pode ser espontânea, pode ser catalisada pela mesma enzima da descarboxilação oxidativa ou ser mediada por uma segunda enzima. A aceleração daquela conversão em presença de preparados mitocondriais sugere que, na célula, a reação é regulada enzimaticamente (26). As observações realizadas em microrganismos fazem pensar numa ação catalítica do ferro em todo o processo reativo, o que não se confirmou nas plantas (1). Em culturas celulares de *Tetrahymena vorax* demonstrou-se o envolvimento da Co-A nesta reação (34).

### 1.7- FORMAÇÃO DO HEME

É conhecida a incorporação do ferro nas porfirinas, sem que haja qualquer influência enzimática, não obstante a rapidez e as quantidades de quelatos produzidos estarem longe dos valores fisiológicos (20).

Nos sistemas biológicos, o ferro não se une aos porfirinogênios não obstante incorporar-se nas porfirinas parcialmente reduzidas, *in vitro* (35).

A formação do heme, a partir da protoporfirina e do ferro bivalente, é catalisada, *in vivo*, por uma enzima, a sintetase ou quelatase do heme, situada nas mitocôndrias e demonstrada em múltiplos tecidos e organismos (36). O chumbo inibe a sua ação, ao nível dos grupos sulfídricos, o que explica em parte, a acumulação da PP no saturnismo, enquanto a inosina e adenina tem a capacidade de ativá-la. Ficou demonstrada que a ausência de oxigênio favoreceria a sua ação (35). A protoporfirina ligada a uma proteína é incorporada mais rapidamente no heme do que em sua forma livre (37). Por sua vez, a globina ativa a reação (38).

De qualquer modo, desconhece-se se o ferro é inserido num estágio intermediário da reação ou, o que parece mais evidente, no final.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO APÊNDICE**

---

---

## **Bibliografia do Apêndice I:**

- 1- Lascelles J. Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation, W. A. Benjamim, Inc., New York, 1964.
- 2- Willstatter R, Stoll A. - «Investigations on Chlorophyll», Science Press, Lancaster, Ohio, 1928.
- 3- Fischer H, Orth H. - «Die Chemie des Pyrrols», Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.
- 4- Shemin D., Rittenberg J. J. Biol. Chem. 1945; 20: 159: 567.
- 5- Lemberg R, Legge JW. "Haematin Compounds and Bile Pigments"- Interscience, New York, 1949.
- 6- MacDonald SF., Stedman RJ. - J. Am. Chem. Soc., 1953; 75: 3040.
- 7- MacDonald SF, Jackson AH. - Ibid. 1957; 35: 715.
- 8- Falk JE. - In «Comprehensive Biochemistry», vol. IX, M. Florkin e E. H. Stotz (eds.), Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1963, p. 3.
- 9- Falk J.E. - «Porphyrins and Metalloporphyrins», vol. 2, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964.
- 10- Granick S. e Mauzerall D. - In «Metabolic Pathways», D. M. Greenberg (ed.), vol. II, Academic Press, New York, 1961, p. 525.
- 11- Phillips JN. - In «Comprehensive Biochemistry», vol. IX, M. Forkin e E. H. Stotz (eds.), Elsevier Publishing Company, 1963, p. 34.
- 12- Burnham, BF. - «Seminars in Hematology», 1968; 5: 296.
- 13- Rimington C, Kennedy GY. - In «Comparative Biochemistry», M. Florkins e H. S. Mason (ed.), vol. IV, Academic Press, New York, 1962, p. 557.

- 14- Hoard JL, Hamor TA, Caughey WS. J. Amer. Chem. Soc. 1965; 87: 2305.
- 15- Hoard JL, Hamor MJ, Hamor TA., Caughey WS. J. Amer. Chem. Soc. 1965; 87: 2312.
- 16- Rimington C, Mason SP, Kennard O. – Biochemical and fluorescence-microscopy screening tests and quantitative investigations in the diagnosis of the porphyria. Lancet. 1958: 624 – 6.
- 17- Bénard H, Gajdos A, Gajdos-Torok M. - «Porphyries», J. B. Baillièere et Fils (eds.), Paris, 1958.
- 18- Williams RJP. Chem. Rev. 1956; 56: 299.
- 19- Schwartz S, Cardinal R. Fed. Proc. 1965; 24: 485.
- 20- Heikel T, Lockwood WH, Rimington C. - Nature, 1958; 182: 313.
- 21- With TK. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1957; 9: 398.
- 22- Nicholas REH., Rimington C. - Biochem. J. 1951; 48: 306.
- 23- Gray CH, Neuberger A, Sneath PHA. - Biochem. J. 1950; 47: 87.
- 24- Thomas DW, Mastell AE. Arch. Biochem. Biophys. 1958; 76: 286.
- 25- Mauzerall D. - Pediat., 1964; 64: 5.
- 26- Sano S, Granick S. J. Biol. Chem. 1961; 236: 1173.
- 27- Gajdos A.-In «Médecine et Biochemie», Mason et Cie. (ed.), Paris, 1967.
- 28- Granick S, Levere RD. - In «Progress in Hematology», vol. IV, C. V. Moore e E. B. Brown (eds.), Grune e Stratton, New York, 1964, p. 1.
- 29- Granick S, Mauzerall D. - Fed. Proc. 1958; 17: 233.
- 30 - Del C, Batlle AM, Benson A and Rimington C. - Biochem. J. 1965; 97 : 731.

- 31- Ehteshamuddin AFM. - Biochem. J. 1968; 107: 446.
- 32- Sano S. - J. Biol. Chem. 1966; 241: 5276.
- 33- Porra RJ, Falk JE. - Biochem. J. 1964; 90: 69.
- 34- Marsh HW, Evans HJ, Matrone G. - Plant Physiol. 1963; 38: 638.
- 35- Porra RJ, Jones OT G. - Biochem. J. 1963; 87: 181.
- 36- Lockhead AC, Kramer S, Goldberg A. - Brit. J. Haemat., 1963; 9: 39.
- 37- Sugita Y, Yoneyama Y., OYAMA H. J. Biochem. 1962; 51: 450.
- 38- Eriksen L. - In «Porphyrin Biosynthesis and Metabolism», Ciba Foundation, Churchill, London, 1955, p. 185.