Reinaldo Jordão Gusmão

Diagnóstico de neoplasias malígnas através da ação fotodinâmica do derivado de hematoporfirina (HpD): desenvolvimento de modelo experimental local.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas, para obtenção do título de Mestre em Medicina na área de Cirurgia Geral, pelo Médico Reinaldo Jordão Gusmão.
Campinas, 10 de dezembro de 1992.

Profa. Dra. ESTER MARIA D. NICOLA
- Orientadora -

G972d
19034/BC

Campinas, 1992.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Área de Concentração:

CIRURGIA GERAL

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Profa.Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

Orientadora:

Profa. Dra. Ester Maria Danielli Nicola

Agradecimento Especial

Ao Prof.Dr. Jorge Humberto Nicola agradeço a orientação e ensinamentos de conceitos de física, sem os quais não teríamos levado a efeito este trabalho.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, pela orientação de vida, carinho e apoio.

À Lina, por deixar e participar de meus sonhos e caprichos.

Sumário 1
Resumo 2
Abstract 3
1. Introdução 4
1.1 - Considerações Gerais 4
1.2 - Histórico 5
1.3 - Terapia Fotodinâmica Propriamente Dita 10
1.4 - Aspectos Biológicos Relativos ao HpD 12
1.5 - Aspectos Físicos-Químicos do HpD 15
1.5.1 - Absorção Óptica 20
1.6 - Mecanismo de Ação Fotodinâmica do HpD 23
1.7 - Estudos Pré-Clínicos do Uso do HpD 25
1.7.1 - Estudos Toxicológicos 25
1.7.2 - Estudos "In vitro" 27
1.7.3 - Estudos "In vivo" 27
1.8 - Aplicações Clínicas da PDT 28
2. Objetivos 31
3. Material e Método 32
3.1 - Material 32
3.2 - Método 33
4. Resultados 40
5. Discussão 43
6. Conclusões 49
7. Referência Bibliográfica 51
8. Anexos 61

RESUMO

Neste trabalho, apresentamos os resultados experimentais de detecção de tumores malignos através da terapia fotodinâmica - PDT (do inglês Photodynamic therapy) com o uso do derivado de hematoporfirina - HpD (do inglês Hematoporphyrin derivative), ativado por fonte de luz com comprimento de onda em torno de 365nm. Os resultados obtidos comprovam que o fotossensibilizador utilizado apresenta maior retenção nos tecidos malignos em relação ao tecido normal, servindo como delineador (localizador) através de fluorescência avermelhada.

Os estudos foram realizados em modelo experimental, especialmente montado para esse fim, utilizando tumores malignos do tipo sarcomatoso implantados em ratas, lâmpada ultravioleta e HpD preparado em nosso meio. São descritas a montagem e a metodologia empregadas neste modelo, que permitiram o presente estudo e que certamente servirão de embasamento em futuras pesquisas e/ou aplicações clínicas. Foi discutido, também, o modelo fotográfico empregado para efeito de documentação.

A revisão bibliográfica da PDT é apresentada com seus aspectos históricos, físico-químicos, biológicos e aplicações clínicas, chamando a atenção para essa modalidade de diagnóstico e tratamento do câncer, desconhecida em nosso meio.

ABSTRACT

In this study, we present experimental results on the detection of malignant tumors using photodynamic therapy with the use of a hematoporphyrin derivative activated by a light source with a wavelength of approximately 365nm. The results showed that the photosensitizer used presented greater retention on the malignant tissues when compared with normal tissue, serving as a localizer by means of red fluorescence.

An experimental model was created specially for this study utilizing sarcomatose malignant tumors implanted in female rats, an ultraviolet light and the hematoporphyrin derivative prepared in our laboratory. The methodology and the preparation of the model is described, which undoubtedly will serve as a basis for future studies and/or clinical applications. We also discuss the photographic model used for documentation.

The bibliographic revision of photodynamic therapy is presented with historical, physical-chemical and biological aspects as well as clinical applications, paying special attention to the diagnostic and treatment of cancer, which is unknown in our milieu.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

A luz, como vários outros fenômenos físicos, tem sido utilizada em Medicina como agente de diagnóstico em situações particulares. A simples observação de uma coloração amarelada na pele de um paciente, leva o clínico a suspeitar de síndrome ictérica; a translucidez de uma membrana timpânica, ou até mesmo a observação do aspecto geral de um paciente são exemplos de diagnósticos simples, que usam a luz como agente indicador.

Encerrando um grau de complexidade um pouco maior, a chamada "Terapia Fotodinâmica" ou simplesmente PDT é uma técnica que utiliza a luz tanto para diagnóstico como para tratamento especificamente de tumores malignos. A sua história é bem conhecida e o seu uso é relativamente bem difundido em outros países, entretanto, o seu entendimento técnico-científico ainda está em fase inicial.

Basicamente, a PDT como método de tratamento de câncer, utiliza luz de um certo comprimento de onda (cor), que é absorvida seletivamente por um corante previamente depositado e retido nas células malignas. Uma seqüência de mecanismos físicos, químicos e biológicos, desencadeados pela absorção da referida luz, levam à destruição seletiva das células malignas. Como qualquer procedimento terapêutico, a PDT apresenta limitações e vantagens que devem ser analisadas em cada caso particular.

A PDT, como técnica diagnóstica, também utiliza luz como agente de informação sobre a malignidade de tumores, guardadas certas limitações e ressaltadas certas vantagens sobre as demais técnicas. Neste caso, o mesmo corante é depositado nas células; aquelas que forem malignas irão retê-lo por mais tempo, o qual, sob a ação da luz, agora ultravioleta, irá fluorescer, mostrando uma cor vermelha característica da sua presença. Daí podemos concluir que: se somente células malignas retêm o corante, a detecção da fluorescência indicará malignidade!

Sem dúvida, a PDT abre um vasto campo de investigações e qualquer projeto de pesquisa tem que definir, inicialmente, o aspecto de interesse, isto é,

tratamento ou diagnóstico. Apesar da proximidade, estes dois aspectos são completamente distintos.

Conforme destacaremos nos objetivos do presente trabalho, optamos por desenvolver o aspecto da "PDT-diagnóstico". Neste caso, o direcionamento também pode tomar inúmeros caminhos de investigação, levando a indagações e respostas específicas. Por exemplo: aspectos técnicos sobre o acesso aos tumores; questões relativas ao estágio de crescimento do tumor; do tipo de tumor; de sua vascularização e outros.

O assunto proposto e desenvolvido como tema desta dissertação tem um forte cunho interdisciplinar e somente foi concretizado graças ao apoio de infra-estrutura e recursos humanos tanto do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como do Grupo de Desenvolvimento e Aplicação de Laser do Departamento de Física do Estado Sólido e Ciência dos Materiais, do Instituto de Física e, ainda, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia, ambos da Universidade Estadual de Campinas.

No desenvolvimento deste trabalho, apresentamos revisão histórica baseada na bibliografia disponível, que esperamos sirva de orientação para trabalhos futuros nesta linha de pesquisa, além de, é claro, permitir situar a nossa contribuição dentro do panorama geral.

1.2 - Histórico

A utilização de substâncias sensíveis à luz, na terapia de determinadas doenças, é do conhecimento da Medicina através dos séculos.

A **FOTOQUIMIOTERAPIA**, ativação de substância exógena através da luz, era utilizada pelos antigos egípcios há 6000 anos. Em áreas despigmentadas da pele, eram friccionados macerados de plantas como a salsa, que após exposição à luz solar, determinavam queimaduras severas. Tratamentos repetidos nessas áreas faziam a pele retornar à sua coloração natural(1).

Referência ao uso de extratos de plantas e exposição à luz solar no tratamento de vitiligo, se encontra no Arthava Veda, em 1400 a.C., na India, e também citada pelo médico árabe Ibn El-Bitar, em 1250 d.C. (1).

Os estudos de Isaac Newton, em 1671 (1), sobre o efeito da luz no prisma; da descoberta da radiação espectral próximo da banda de luz visível por Willian Herschel no final do século XVIII (1), culminando com a descoberta da radiação ultravioleta por Ritter, em 1801 (1), não suscitaram interesse imediato na Medicina.

Em 1858, Charcot (1), demonstrou que a radiação ultravioleta induzia queimaduras solares na pele normal; Palm, em 1890 (1), foi o primeiro a sugerir a luz no tratamento do raquitismo, levando à descoberta de Steenbock e Daniel, em 1925, da vitamina D e sua ativação na pele (1).

A **FOTOTERAPIA**, onde a luz é usada isoladamente e absorvida por uma substância endógena, tem seu pioneiro em Niels Finsen, 1901 (2), o qual utilizou radiação ultravioleta natural e artificial, com sucesso, no tratamento de *Lupus vulgaris*, nos países da Escandinávia.

Em 1898, Oscar Raab (3), estudando os efeitos tóxicos do corante acridina em paramécias (*Paramecium caudatum*), concluiu que a sensibilização e até a morte desses organismos não dependiam apenas do corante como também da intensidade da luz.

Em 1900, Tappeiner (4), publicou um pequeno artigo sobre a descoberta de Oscar Raab, dizendo das possíveis aplicações clínicas com corantes.

Os primeiros a utilizarem a fototerapia com substâncias químicas injetadas foram Tappeiner e Jesionek, em 1903 (5), no tratamento de uma variedade de doenças da pele, *Ptyriasis versicolor*, *Herpes tonsurans*, *Molluscum contagiosum*, *Psoriasis vulgaris* e carcinoma de célula basal, com o corante eosina e luz branca, introduzindo a expressão "ação fotodinâmica".

Esses achados culminaram em 1907 (6), com a formulação da Teoria de Ação Fotodinâmica, proposta por Tappeiner e Jodlbauer.

O primeiro a usar a hematoporfirina (Hp), em estudos de ação fotodinâmica, foi Hausmann, em 1908 (7), quando observou destruição de paramécias e células vermelhas. Descreveu, também, os sintomas de sensibilização em ratos, quando expostos à luz.

Em 1913, Meyer-Betz (8), após sensibilizar a si próprio com hematoporfirina, registrou os sintomas de sensibilização descritos por Hausmann, os quais se manifestaram por um período de dois meses. Os

sintomas foram: prurido e eritema nas regiões da pele expostas à luz solar, sinais de queimadura e fotofobia.

Em 1924, Policard (9) demonstrou a existência de fluorescência avermelhada em tumores malignos de animais, atribuindo-a ao acúmulo de porfirinas endógenas conseqüente à infecção secundária por bactérias hemolíticas.

Em 1942, Auler e Banzer (10) observaram que a hematoporfirina acumulava-se em tecidos malignos e nódulos linfáticos de cobaia, os quais, quando expostos à luz ultravioleta, apresentavam necroses tumorais e emitiam fluorescência vermelha. A guerra interrompeu os estudos desse grupo, quando seriam iniciadas pesquisas em seres humanos.

Em 1948, Figge e colaboradores (11) confirmaram os trabalhos de Auler e Banzer. Ratos com sarcomas e carcinomas mamários, quando injetados com hematoporfirina, apresentavam fluorescência vermelha em resposta à ativação com luz ultravioleta e notaram, também, o aparecimento de fluorescência em tecidos traumatizados, embrionários e nódulos linfóides de ratos.

Em 1953, Figge e Peck (12) demonstraram que vasos linfáticos, invisíveis a olho nu, fluoresciam após injeção de hematoporfirina em ratos, cachorros e coelhos, mas não em humanos.

Em 1955, Schwartz e colaboradores (13) concluíram que a hematoporfirina, até então usada, era uma mistura de várias porfirinas e que os componentes "impuros" eram melhores nas propriedades de localização (fluorescência) do que a hematoporfirina pura.

Esses trabalhos chamaram a atenção da clínica como método diagnóstico na detecção de tumores malignos e levaram ao refinamento da técnica, principalmente quanto ao uso da hematoporfirina. Até então, grandes quantidades de hematoporfirina eram exigidas, com perigo de fotossensibilização devido ao seu baixo grau de especificidade (14).

Em 1960, Lipson e colaboradores (15) buscaram novas técnicas para a obtenção de compostos, cujos resultados seriam mais confiáveis. Utilizando ácido acético-sulfúrico, com posterior hidrólise, chegaram a um derivado de hematoporfirina (uma porfirina artificial derivada da hemoglobina) cuja

atividade era superior. A aplicação em seres humanos, desse derivado de hematoporfirina, na localização de tumores de brônquios (16), esôfago (17) e colo uterino (18), mostrou uma boa correlação entre as áreas de fluorescência e as respectivas biópsias.

Em 1967, Lipson, Baldes e Gray (19) relataram pela primeira vez o uso do HpD e luz de espectro de 407nm (Anexo I) de comprimento de onda no tratamento de câncer cervical. Com propósitos iniciais de deteção de tumores, Lipson percebeu o potencial de destruição seletiva de tumores com HpD, usando propriedades fotodinâmicas.

Em 1968, Gregorie e colaboradores (20) relataram a aplicação clínica da ativação da fluorescência em tumores com HpD e luz ultravioleta.

Em 1972, Diamond e colaboradores (21) verificaram que a hematoporfirina comercial, ativada por luz branca em culturas de gliomas e tumores de células gliomas transplantadas em ratos, apresentavam morte das células nas culturas e destruição do tumor e pele dos ratos.

Dougherty, em 1973 (22), demonstrou que a fluorescência ativada pela luz de comprimento de onda de 488nm, reduzia a taxa de crescimento de tumores mamários transplantados em ratos, e concluiu que, para um fotossensibilizador ser usado clinicamente, o mesmo deveria ser:

- não tóxico em doses clinicamente úteis;
- seletivamente retido e/ou acumulado em tecidos malignos;
- ativado por luz penetrante com espectro maior que 600nm, e menor que 700nm; e,
- ter relativa eficiência fotoquímica.

O HpD e seu componente ativo purificado, chamado de dihematoporfirina éter (DHE), apresentavam esses critérios melhor que qualquer outro fotossensibilizador até então testado (23).

Em 1975, Dougherty e colaboradores (24) relataram que o HpD injetado e ativado pela luz vermelha (660-700nm) de uma lâmpada de xenônio, poderia causar completa erradicação de tumor mamário transplantado em camundongos, sem dano da pele circundante incluída no campo de luz.

Em 1976, Kelly e Snell (25, 26), à parte a comunicação de Lipson em 1966, foram os primeiros a relatar um caso clínico completo de PDT, no tratamento de câncer de bexiga, usando HpD e luz de mercúrio, através de uma fibra óptica. Foi encontrada destruição das células malignas apenas nas áreas irradiadas (iluminadas) anteriormente.

Inicialmente, o uso do HpD estava restrito a tumores de fácil acesso, basicamente a lesões de pele, onde se usava lâmpada ultravioleta convencional como fonte de luz.

O desenvolvimento de sistemas de distribuição de luz, através do uso de fibra óptica, propiciou a aplicação do HpD, via endoscópica, em tumores profundos, intersticiais e intracavitários (27).

A evolução do LASER ("Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation") a partir da construção do primeiro laser de rubi por Maimann, em 1960, e sua utilização como fonte de luz, foi também fator de desenvolvimento da aplicação do HpD em tumores malignos (27).

Em conseqüência desses fatores, na década de 70, o uso do HpD despertou o interesse de outras áreas do conhecimento, aprofundando as pesquisas no campo experimental da interação da luz, tecidos e fotossensibilizador, possibilitando também a sua aplicação clínica. Esse interesse foi liderado e iniciado pelo grupo de Dougherty (28).

A partir da década de 80, considerável progresso se fêz sentir no emprego da fluorescência do HpD na detecção e localização de tumores do trato respiratório, gastrointestinal, e outros, graças ao desenvolvimento e aplicação dos endoscópios de fibra óptica flexível (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

No Brasil, a primeira referência foi em 1986, quando Abrahão e Goldenberg apresentaram um artigo de revisão sobre o assunto (35).

Zezell, em 1987 e 1991, respectivamente, realizou trabalhos experimentais sobre o estudo das propriedades ópticas do HpD (36) e sobre o processo de monitorização e otimização da terapia fotodinâmica (37).

1.3 - A Terapia Fotodinâmica Propriamente Dita

Nas considerações gerais, explicamos suscintamente o que vem a ser a PDT. No presente tópico, descreveremos o processo descendo a níveis de detalhes compatíveis com a natureza do nosso trabalho.

Temos salientado que a PDT se apresenta como técnica de diagnose ou como processo de tratamento. A única coisa que estes dois aspectos têm em comum é a participação de um mesmo corante, neste caso, um derivado de hematoporfirina, o qual deve ser fixado nas células malignas. No próximo capitulo, falaremos sobre esse processo de fixação com mais detalhes.

A figura 1 ilustra os dois aspectos da PDT. Inicialmente é injetada uma solução de HpD diluída em soro fisiológico 0.9% que, após algumas horas, é retida preferencialmente nos tecidos malignos.

Se iluminarmos o tecido com luz ultravioleta adequada, ocorrerá uma fluorescência vermelha com comprimento de onda da ordem de 620nm. Essa detecção poderá ser feita a olho nu, através de registro fotográfico ou por sistemas eletrônicos de detecção com o uso de fotocélulas.

Qualquer que seja o método, se o resultado for positivo quanto à fluorescência, também será positiva a malignidade. A fundamentação física sobre a fluorescência bem como seu mecanismo de ação propriamente dito estão descritos em capítulo específico, de forma simplificada, tanto quanto a terminologia da Física permite.

Embora a "PDT-tratamento" não seja objeto de nosso estudo seu mecanismo também esta ilustrado na mesma figura. Neste caso, uma radiação visível proveniente de um laser ou lâmpada com sistemas de filtros é dirigida ao tumor (agora a radiação ultravioleta do caso anterior não participa). Os fótons dessa luz são absorvidos pelo HpD que transfere energia ao oxigênio da célula. Este oxigênio passa a ser quimicamente ativo e reage destruindo a célula hospedeira do HpD.

Pelo exposto, é fácil ver que a "PDT-diagnóstico" é um método poderoso, rápido e eficiente para o diagnóstico de malignidade, restando apenas estudar casos particulares em busca de padronizações úteis ao dia-a-dia do uso clínico.

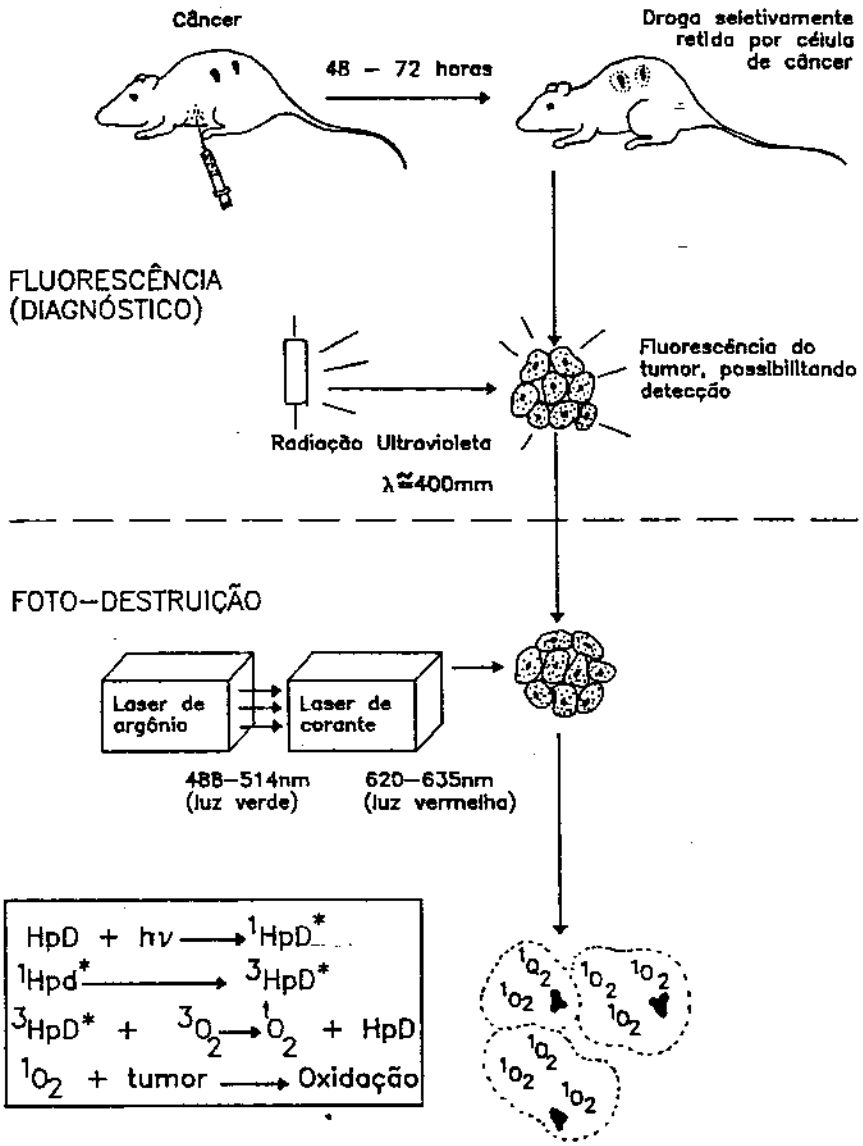


Figura 1. Sumário da Terapia Fotodinâmica do câncer.
^{1}HpD* = Derivado de Hematoporfirina no estado singlete
^{3}HpD* = Derivado de Hematoporfirina no estado triplete
$^3O_2$ = Oxigênio molecular no estado triplete
$^1O_2$ = Oxigênio molecular no estado excitado singlete

1.4 - Aspectos Biológicos do HpD

A razão da alta seletividade do HpD para com as células neoplásicas ainda não está esclarecida, bem como, não se conhece o local exato dessa interação hematoporfirina-luz, a qual resulta no processo de fluorescência e/ou destruição.

O mecanismo de citotoxicidade através da formação de oxigênio singlete é aceito por todos. Em 1976, Weishaupt e colaboradores (38) identificaram a produção de oxigênio singlete intracelular como provável agente citotóxico em células neoplásicas, quando da ativação da hematoporfirina com luz vermelha. Essa observação é corroborada por outros autores (39, 40, 41, 42, 43, 44).

Kessel, em 1977 (39) e Kessel e Khon, em 1979 (40), em estudos experimentais, demonstraram alterações ao nível da membrana celular por radicais superóxidos liberados. Em seu primeiro trabalho, Kessel concluiu que a ligação das porfirinas à superfície celular (células L1210) era maior quanto mais hidrófoba fosse a hematoporfirina; e era pré-requisito na fotoinativação das células. Demonstrou também a inibição do transporte de aminoácidos e nucleosídeos, e alteração da permeabilidade da actino-miosina D, através da membrana plasmática.

Bellnier e Dougherty, em 1982 (45), demonstraram a correlação entre morte celular e lise da membrana celular em culturas de células CHO (Chinese Hamster Ovary) quando expostas ao HpD e à luz vermelha.

O papel central da membrana celular como sítio da interação porfirina-luz, foi descrito por outros pesquisadores. Girotti, em 1976 (46), e Dubblemann e colaboradores, em 1980 (47), concluíram que a destruição na membrana plasmática resultava de alterações do "crosslinking" da membrana protéica.

Berns e colaboradores, em 1982 (48), trabalhando com células epiteliais de canguru (PTK 2) e HpD, relataram a presença de fluorescência na mitocôndria localizada próxima da membrana celular.

Os estudos da interação do HpD e luz e sua relação com danos nas mitocôndrias já tinham sido relatados por Coppola e colaboradores, em 1980 (41), em células de linfoma, tratadas "in vitro", com HpD e luz.

Moan e colaboradores, em 1982 (49), observaram as mesmas alterações em mitocôndrias de células NHIK 3025, relatando que a fluorescência do HpD era detectável na membrana celular e nas mitocôndrias; com alterações vesiculares na membrana celular, aumento da permeabilidade e redução do número e tamanho das microvilosidades.

Outros autores encontraram inibição da respiração celular, pela alteração de atividade do citocromo-e oxidase mitocondrial, quando da exposição ao HpD e luz (50, 51).

Eversen e Moan, em 1982 (52), demonstraram uma variedade de aberrações cromossômicas que ocorriam em células "in vitro" com exposição ao HpD e doses de luz subletal.

Gommer, em 1980 (53), encontrou alterações do DNA-nuclear quando da iluminação de células fibroblásticas de ovário de Hamster chinês (CHO) na presença de HpD. A esse estudo, seguiram-se outros mais específicos, que demonstraram as alterações fotodinâmicas no DNA-nuclear (54, 55, 56, 57, 58).

Trabalhos de Zhou, em 1989 (37) e Brault, em 1990 (37), demonstraram a importância do transporte das porfirinas pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL); dos receptores LDL na membrana celular e da sua difusão passiva através desta. Brault concluiu ainda a importância da hidrofobicidade, sugerida por Kessel em 1985 (59), e a diferença de pH entre o meio intra e extracelular.

A figura 2 mostra a difusão da hematoporfirina segundo o modelo do mosaico fluido, proposto por Brault (apud37).

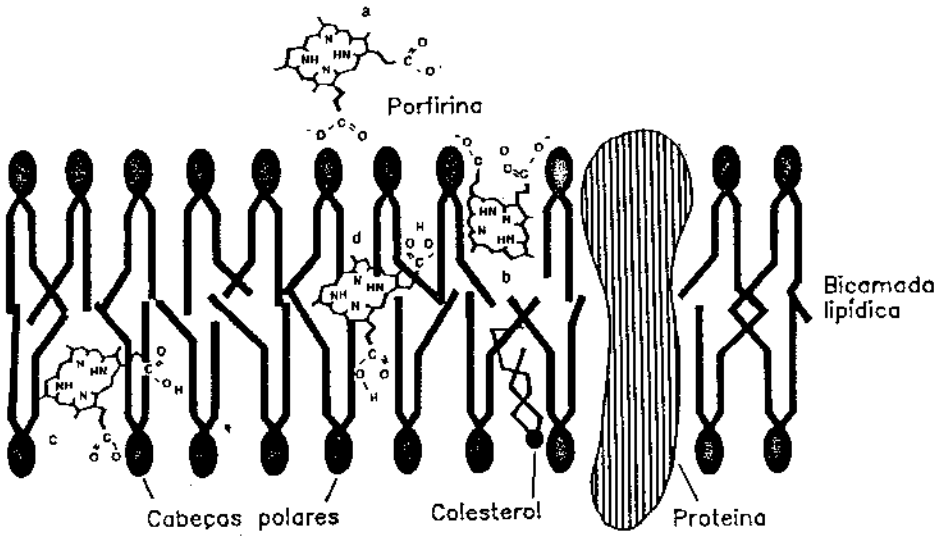


Figura 2 - Difusão da hematoporfirina segundo Brault (apud 37).

A figura 3 mostra as possíveis localizações do HpD nas células, segundo Eversen e Moan (52).

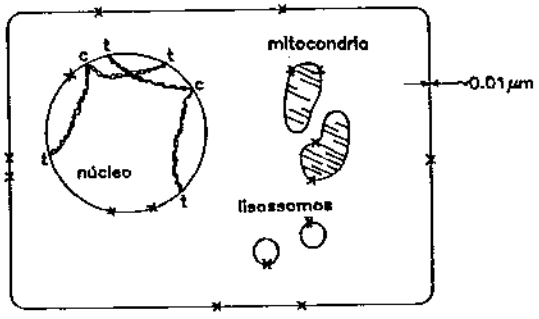


Figura 3 - Esquema demonstrativo dos possíveis sítios (x) de interação do HpD na célula (52).

1.5 - Aspectos Físicos Químicos do HpD

A hematoporfirina é uma porfirina. As porfirinas são compostos químicos orgânicos encontrados nos animais e plantas, sendo de grande importância nas transformações químicas vitais. As porfirinas são compostos cíclicos formados pela ligação de quatro anéis do pirrol, por pontes metilênicas. Quando dois átomos de hidrogênio estão ligados ao centro, chamamos de porfirina de base livre (60) (Fig. 4).

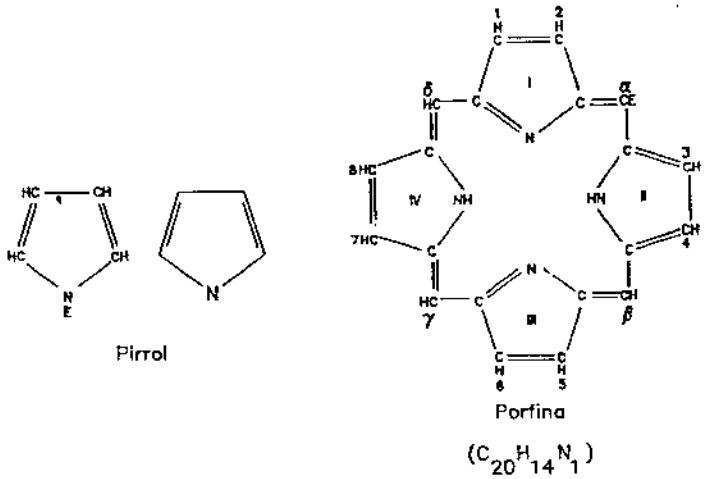


Figura 4 - Estrutura química da porfirina.

Uma propriedade característica das porfirinas é a formação de complexos com íons metálicos, que ficam ligados ao nitrogênio dos anéis pirrólicos. São as chamadas METALOPORFIRINAS, que são encontradas na natureza, conjugadas às proteínas, formando vários compostos de importância nos processos biofísicos e bioquímicos. São exemplos: a hemoglobina, a clorofila, as mioglobinas, citocromos, as catalases etc. A figura 5 mostra a estrutura da hemoglobina, uma metaloporfirina, cujo íon metálico é o ferro, por isso, é chamada de porfirina heme. É composta de quatro cadeias protéicas (α_1, α_2, β_1, β_2), ligadas cada qual a uma metaloporfirina. As moléculas de oxigênio ligam-se aos núcleos metálicos destas.

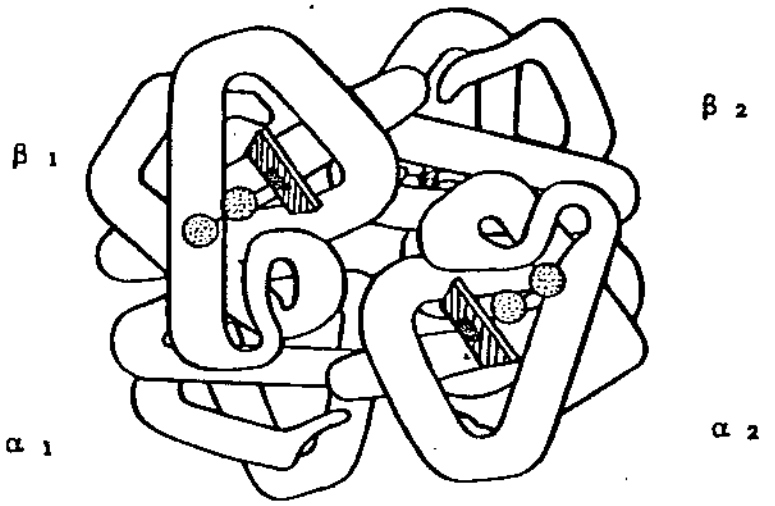


Figura 5 - Estrutura esquemática da hemoglobina, consistindo de quatro cadeias de proteínas (α_1, α_2, β_1, β_2) e quatro estruturas planas heme, onde o oxigênio se liga (apud 36).

As porfirinas são compostos que se comportam como bases fracas, devido à presença de nitrogênio terciário em dois anéis pirrólicos. Algumas porfirinas possuem um grupo carboxila em uma ou mais cadeias laterais e funcionam também como ácidos. Como resultado, tais compostos são francamente anfóteros, com seus pontos isoelétricos variando de pH 3,0 a 4,5 e, dentro dessa faixa de pH, podem ser facilmente precipitados em solução aquosa.

Há um grupo de porfirinas que são incolores, enquanto diversas outras são coloridas. No estudo das porfirinas ou de seus derivados, é de grande importância o espectro de absorção característico de cada uma, tanto na faixa do visível quanto na faixa do ultravioleta.

O espectro de absorção da hematoporfirina, em solução de ácido clorídrico a 5%, mostra uma grande absorção em 400nm, conhecida como banda de Soret, e duas faixas mais fracas na região de 550 e 592nm (Fig. 6). Quando dissolvida em ácidos minerais fortes, ou em solventes orgânicos, e iluminada com luz ultravioleta, emite uma fluorescência vermelha intensa.

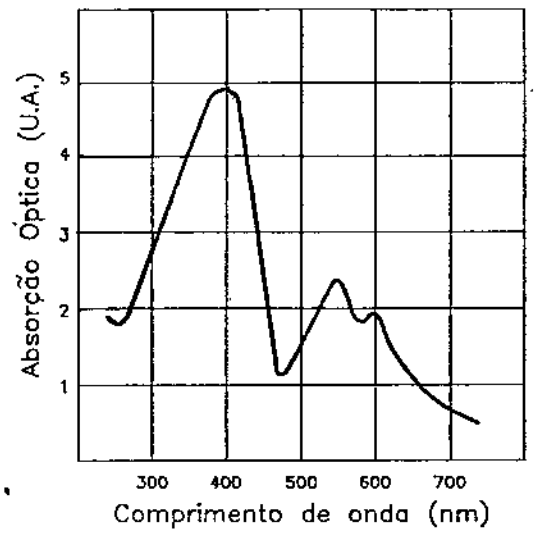


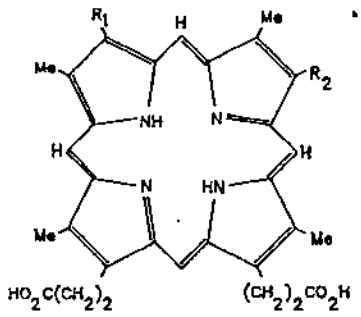
Figura 6 - Espectro de absorção da hematoporfirina em solução 0,01% em HCl a 5%.

O estudo das propriedades físicas e químicas da hematoporfirina deu-se a partir de 1960, por Lipson (14, 15, 16, 17, 18, 19), que estabeleceu técnicas para obtenção desses compostos. Em 1973, Dougherty (28) sistematizou e descreveu vagamente a obtenção desses preparados.

Com o auxílio da cromatografia de camada delgada (ou cromatografia de placas - TCC) foi possível identificar os três principais componentes da hematoporfirina: hematoporfirina pura, monoacetato de hematoporfirina e o diacetato de hematoporfirina, registrando-se também a presença de impurezas de estruturas desconhecidas (59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67).

Com a utilização da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), uma técnica mais sofisticada que a anterior, diversos grupos de trabalho identificaram algumas porfirinas conhecidas como componentes do HpD, e observaram a presença de uma porfirina de estrutura ate então desconhecida, responsável pela atividade fotossensibilizadora da mistura do HpD "in vitro" e "in vivo" (61, 62, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73). (Tabela 1 e Fig. 7).

Em 1984, Dougherty e colaboradores (74) isolaram essa porfirina (o número 14 da tabela 1) com uso de uma coluna de filtração em gel e de HPLC e identificaram, através de técnicas com isótopos e espectrometria de massa por bombardeamento de átomos rápidos, como sendo a dihematoporfirina éter (DHE) (Fig. 8).



No.	COMPONENTES	R1	R2	ISÔMEROS?
01	hematoporfirina	CHOHMe	CHOHMe	
02	protoporfirina	CH=CH$_2$	CH=CH$_2$	
03	monoacetato Hp	CHOHMe	CHOAcMe	sim
04	diacetato Hp	CHOAcMe	CHOAcMe	
05	HVD	CHOHM	CH-CH$_2$	sim
06		CHOHMe	CHOEtMe	sim
07		CHOAcMe	CH-CH$_2$	sim
08		CHOEtMe	CHOAcMe	sim
09		CHOHMe	Ac	sim
10		CHOAcMe	Ac	sim
11		CHOEtMe	CH-CH$_2$	sim
12		CHOEtMe	CHOEtMe	sim
13		Ac	Ac	
14	do HpA e do HpD	?	?	

Tabela 1 - Componentes do HpD identificados por HPLC.
Ac = CH3COO-, Me = CH3-, Et = CH3CH2,
HVD = hidroxietilvinildeuteroporfirina (apud 36).

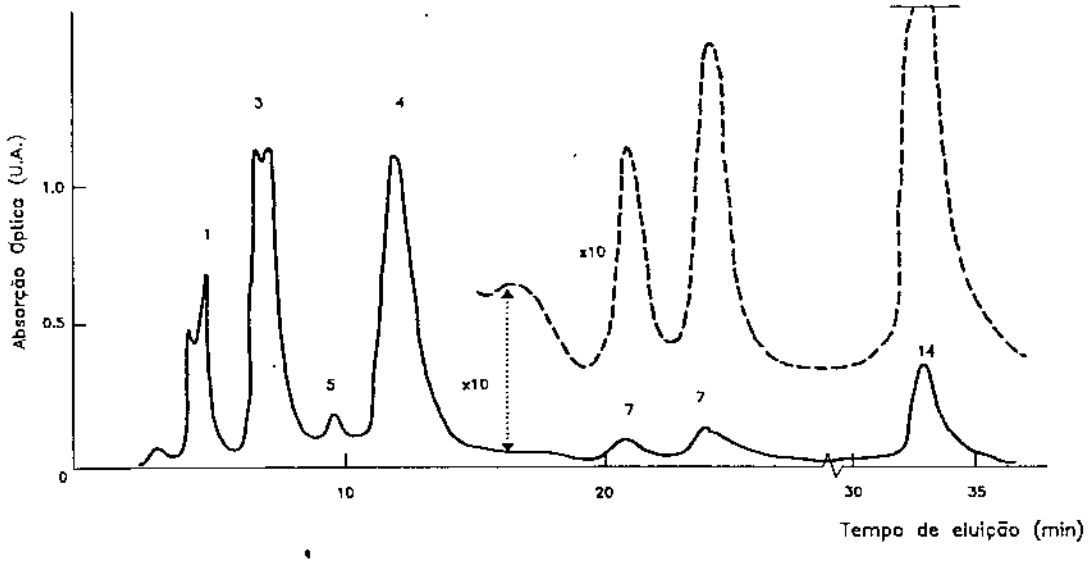


Figura 7 - Cromatograma do ácido de hematoporfirina (apud 36).

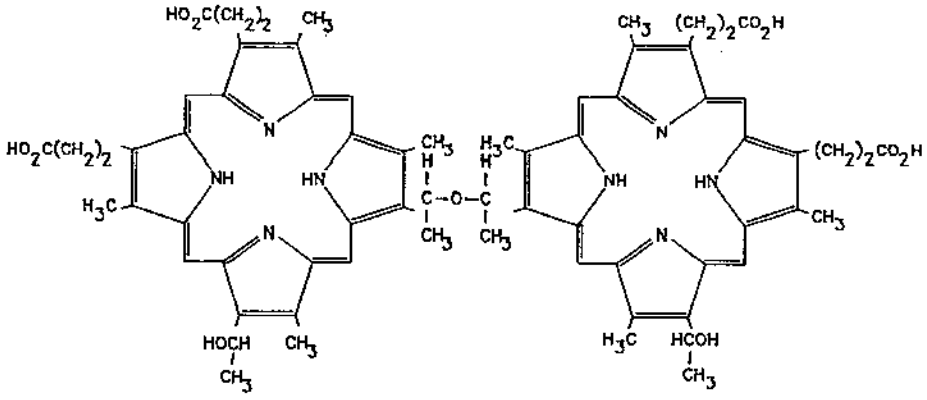


Figura 8 - Estrutura química do componente fotoativo do derivado de hematoporfirina, o DHE.

Verificaram, também, que a fração 14 não era pura, aparecendo com cerca de 10 a 20% de impurezas, sendo seu principal contaminante o hidroxietilvinildeuteroporfirina (HVD).

Como o dihematoporfirina éter (DHE) não existe na sua forma pura, e não havia identificação de todos os componentes do HpD, a Food and Drug Administration (F.D.A.), que inicialmente havia permitido a utilização desses compostos para centros de pesquisas, vetou em 1986 o uso clínico e sua comercialização até que se completasse a identificação química e posterior teste biológico de cada um dos componentes separadamente, permanecendo seu uso restrito a centros de pesquisa clínica. Entretanto, na Europa, vários países utilizam o HpD na rotina de seus procedimentos diagnósticos e terapêuticos (75, 76).

1.5.1 - Absorção Óptica

Em espectroscopia óptica entendemos que variações de densidades nos estados quânticos (ou níveis de energia) podem ser detectados quando uma molécula absorve energia de um fóton incidente, passando para um estado de maior energia. Durante o decaimento desses níveis, para níveis de energia inferiores da molécula, ocorrem emissões que, dependendo do seu comprimento de onda, podem ser visíveis ou não (Fig. 9).

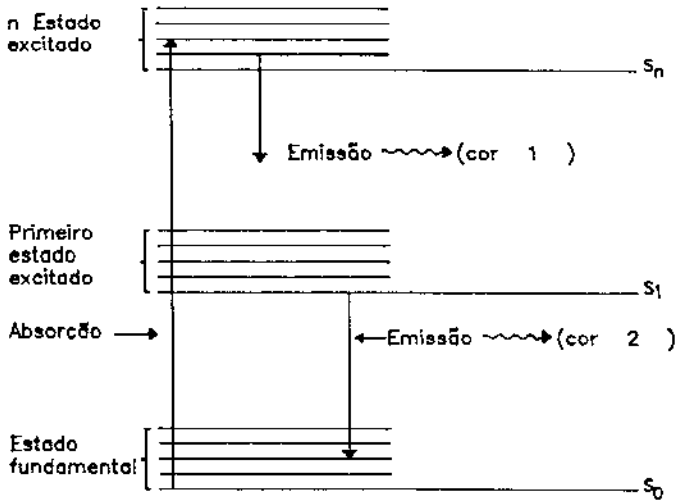


Figura 9 - Esquema gráfico de absorção e emissão de energia de uma molécula.

A figura 10 (26) mostra os espectros da absorção óptica característicos da maior parte das metaloporfirinas e porfirinas de base livre.

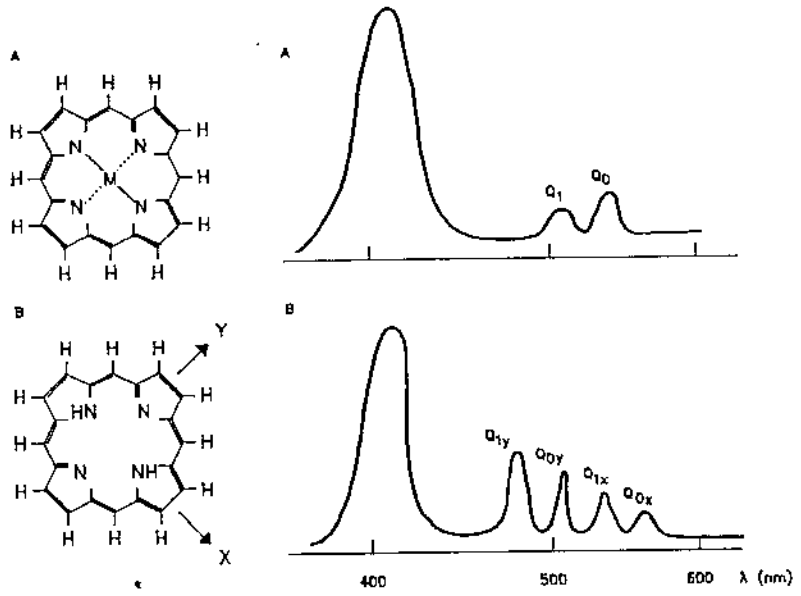


Figura 10 - Espectros de absorção típicos para: (A) metaloporfirinas e (B) porfirinas de base livre, em solução aquosa.

A figura 11 (26) exibe o espectro de absorção registrado pela hematoporfirina em solução aquosa 1,25µg/ml, tendo o perfil esperado das porfirinas e exibindo o pico máximo de absorção em 394nm de comprimento de onda.

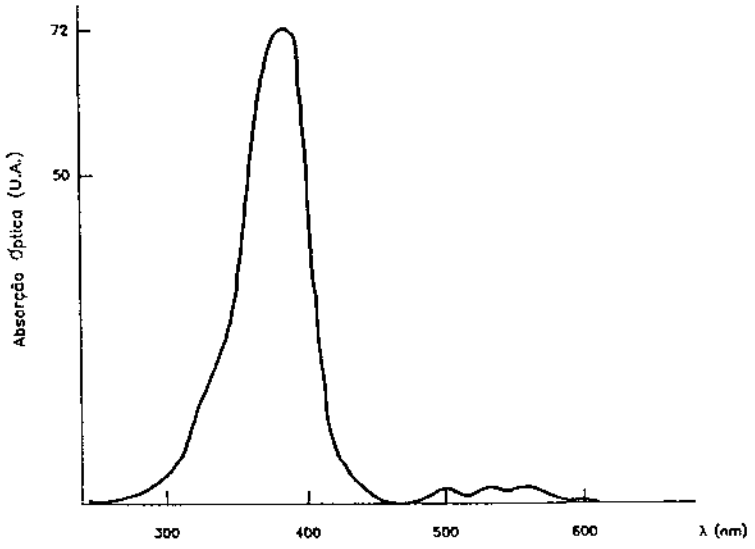


Figura 11 - Espectro de absorção da hematoporfirina em solução aquosa 1,25 µg/ml.

A figura 12 (77) fornece uma comparação entre os espectros de absorção da hematoporfirina, HpD e o dihematoporfirina éter em solução aquosa. As variações de intensidade e pequenos deslocamentos caracterizam as diferentes espécies moleculares encontradas em solução. Enquanto a hematoporfirina tem sua absorção máxima em 395nm, o HpD e o dihematoporfirina éter apresentam um deslocamento próximo de 365nm, indicando a presença de agregados moleculares.

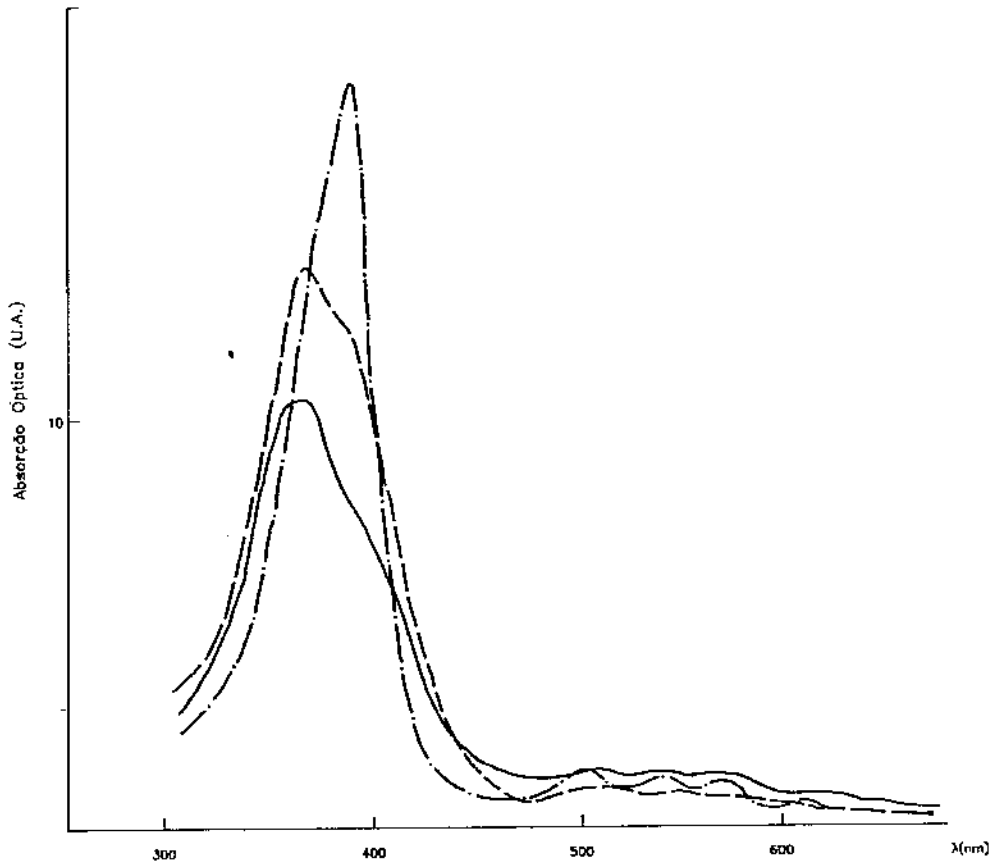


Figura 12 - Espectros de solução aquosa 1,25 μg/ml de:
(–·–·–·) Hp , (------) HpD e (————) DHE (77).

A figura 13 (77) mostra os espectros de emissão fluorescente de solução aquosa de hematoporfirina, HpD e dihematoporfirina éter sob excitação de luz ultravioleta com comprimento de onda de 405nm. Uma diferença marcante das intensidades de fluorescência entre a hematoporforina e o dihematoporfirina éter (quatro vezes menor), deve-se ao fato de que este tem uma certa quantidade de agregados compostos não fluorescentes.

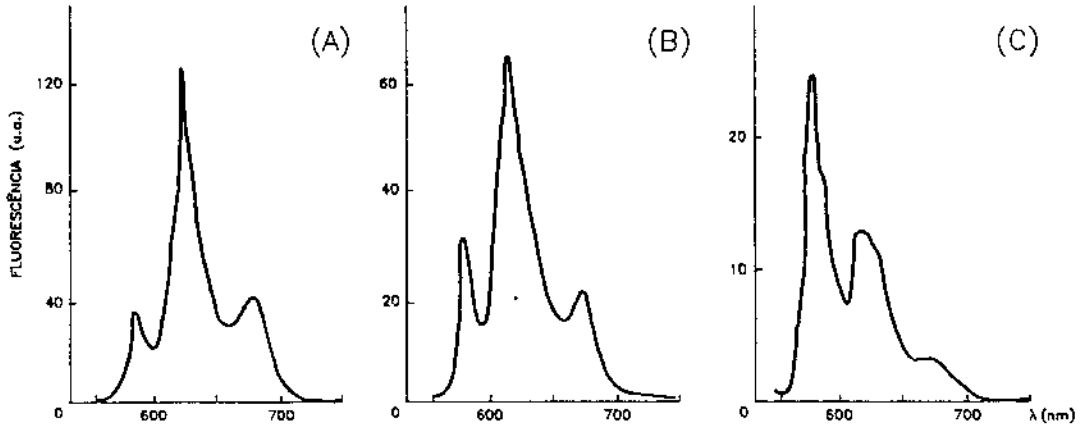


Figura 13 - Espectros de emissão fluorescente de solução aquosa do Hp (A), HpD (B) e DHE (C), 1,25μg/ml.

Trabalhos realizados por Riccheli e Moan, sobre os espectros do HpD mostraram resultados semelhantes aos encontrados em outros estudos (78, 79).

1.6 - Mecanismo de Ação Fotodinâmica do HpD

Muitas substâncias podem agir como fotossensibilizadores na ação fotodinâmica. A hematoporfirina, e em particular seus derivados, estão entre os fotossensibilizadores que mais têm sido utilizados pela sua eficiência e resultados positivos. A figura 14 apresenta a estrutura química desses fotossensibilizadores utilizados (37).

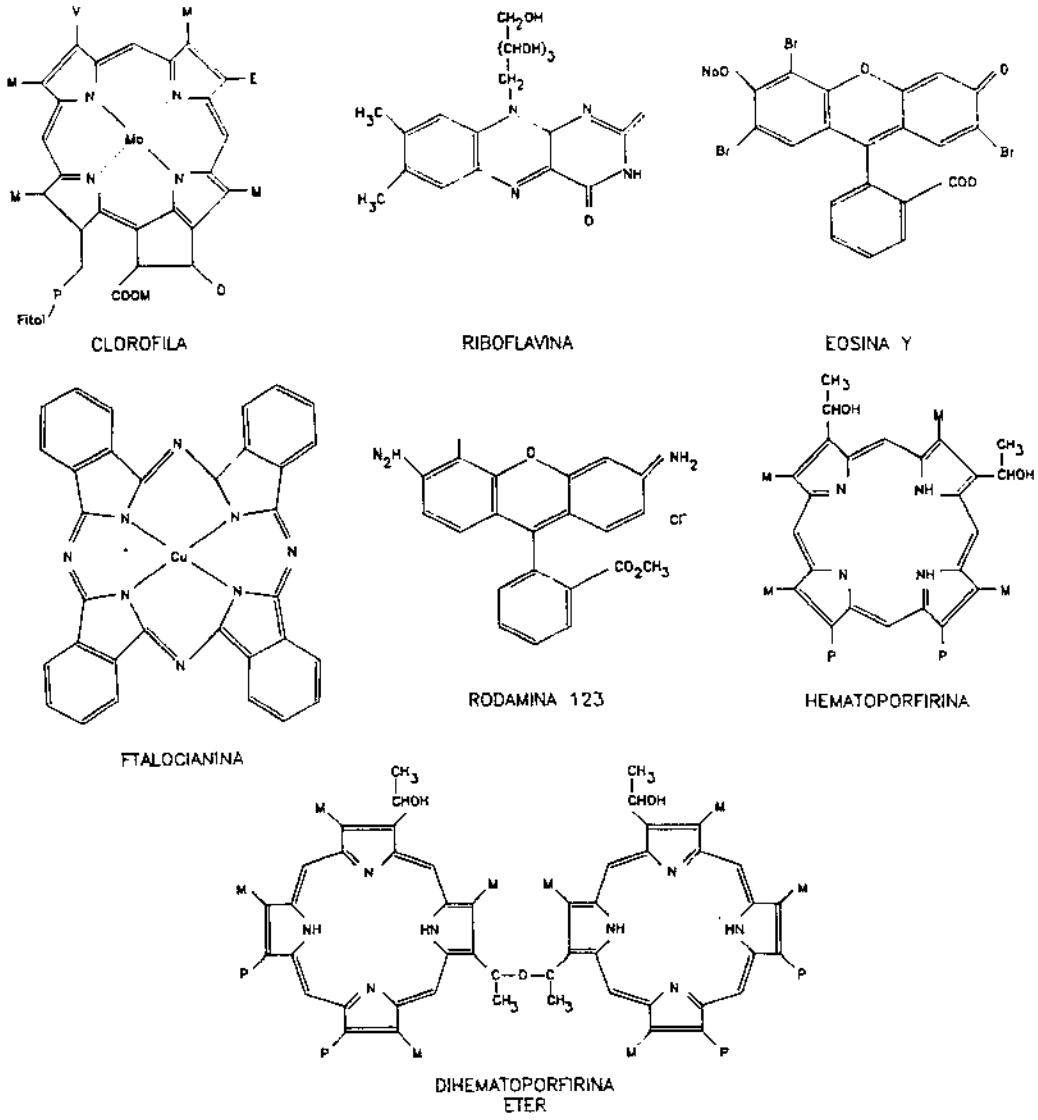


Figura 14 - Estrutura química dos fotossensibilizadores

A ação fotodinâmica do HpD, na intimidade da célula, mostra duas situações distintas e independentes uma da outra. A primeira situação, que é objeto de nosso trabalho, refere-se à fluorescência; neste caso, a absorção de um fóton de luz com comprimento de onda na região ultravioleta excita a molécula do HpD de um estado fundamental (S_o) para um certo estado excitado (S_n), de maior energia. Muitos são os caminhos de retorno ao estado fundamental, e dentre esses, a molécula do HpD decai a um nível de energia intermediário (S_2) em direção ao estado fundamental, emitindo parte da energia absorvida sob forma de luz fluorescente avermelhada, de comprimento

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

de onda próximo ao 620nm. Esse efeito que ocorre pela interação da luz ultravioleta com o HpD, na célula neoplásica, não acarreta alterações biológicas, mas permite através da observação da fluorescência vermelha, a detecção e delineação do tecido neoplásico.

A segunda situação ocorre quando a excitação de um fóton de luz de comprimento de onda próximo ao 620nm (por coincidência semelhante ao da situação anterior) eleva a molécula de HpD do seu estado fundamental (S_0) a um estado de maior energia (S_1), transferindo, posteriormente, essa energia ao oxigênio molecular originalmente triplete ($^3O_2$), transformando-o em oxigênio singlete ($^1O_2$) que é altamente tóxico para a célula. Esse processo, reconhecido pela maioria dos autores, leva a uma série de alterações fotobiológicas que culminam com a destruição das células tumorais nas quais a hematoporfirina estava retida.

A figura 15 ilustra o esquema gráfico da PDT que ocorre a nível celular.

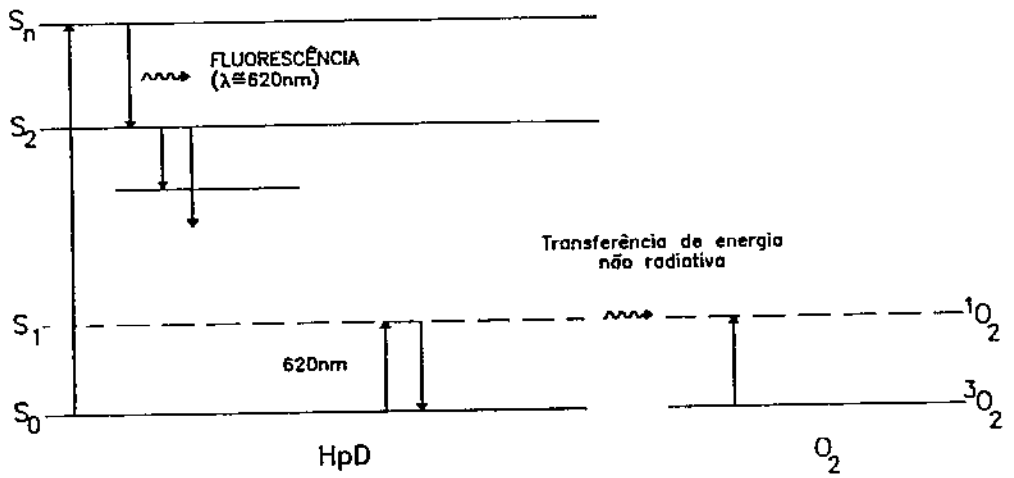


Fig. 15 - Esquema gráfico da PDT

1.7 - Estudos Pré-Clínicos do Uso do HpD

1.7.1 - Estudos Toxicológicos

Os primeiros estudos biológicos de toxicidade da hematoporfirina e do HpD foram realizados por Lipson e colaboradores (15), em cobaias, e observaram que doses maiores de 15mg/kg intraperitonial, em um período de até 48 horas de exposição à luz branca, determinavam eritema auricular,

edema facial e queimaduras da pele. Quando o HpD era injetado intravenosamente, os efeitos na pele eram observados mais rapidamente. Esses efeitos não se alteravam com a administração de epinefrina, antihistamínicos, corticóides e outras drogas. Concluíram, também, que entre os efeitos da hematoporfirina e do HpD, este último duas vezes mais potente como fotossensibilizador, também apresentava efeito tóxico duas vezes maior.

Dougherty (23) foi quem determinou diretamente a toxicidade da droga, em camundongos albino suíço (Ha/ICR) mantidos no escuro. Concluiu que a LD 50, após 24 horas da injeção intraperitonial do HpD, tanto em macho como em fêmeas, era de 275mg/kg. Múltiplas doses de 50mg/kg/dia, durante cinco dias, ou 25mg/kg/dia por dez dias, não produziam morte. O dihematoporfirina éter era (aproximadamente duas vezes) tão toxico quanto o HpD quando os valores eram próximos de 130mg/kg (dose total). A morte dos animais foi atribuída à necrose do fígado e rim, sendo, também, observada necrose do baço e timo. A medula óssea não foi afetada.

Em outro experimento com a utilização de ratos, Dougherty (23) observou que ambas porfirinas (HpD e dihematoporfirina éter) eram mais tóxicas quando os animais eram expostos à luz. Em exposição por cinco horas contínuas, com luz emitida por lâmpada de xenônio e diferentes doses sistêmicas do HpD e dihematoporfirina éter, observou que a LD 50 para o HpD era 7,5mg/kg por 24 horas, e a toxicidade por 14 dias. O valor para o dihematoporfirina éter era aproximadamente 4mg/kg. As mortes nesse grupo foram atribuídas à síndrome do choque e não à falência de algum órgão específico.

Estudos similares em ratos que receberam 20mg/kg do HpD, onde nenhuma morte ocorreu, ao contrário do que ocorreu em camundongos, indicam a relação entre tamanho do animal e superfície de exposição.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade do HpD e da luz, foram realizados estudos em coelhos (23) implantados com tumor de Brown Pearce (carcinoma) nos órgãos intra-abdominais. Esses animais receberam 5mg/kg do HpD 48 e 72 horas antes da cirurgia e exposição de luz, com comprimento de onda de 630 ± 5nm. Foram observados raros efeitos no estômago, intestino delgado, fígado, pâncreas, rim e bexiga, efeitos estes que diminuíam a partir de 72 horas.

1.7.2 - Estudos "in vitro"

Os estudos "in vitro" foram importantes pelas informações que forneceram sobre os danos do tratamento fotodinâmico na membrana celular, conforme descrevemos no capítulo anterior.

Chang e Dougherty, em 1976 (80), demonstraram que não havia diferença de absorção do HpD entre células normais (CHO, L929) e células com características malignas (HeLa, PC 1). Moan e colaboradores (81) e Hendersen (82) encontraram resultados semelhantes.

Christensen e colaboradores (83), por outro lado, demonstraram em células malignas uma absorção entre 25 a 50% do HpD maior que em células normais; inativação de 85% das células e uma taxa de crescimento menor do que as células sobreviventes.

Andreoni e colaboradores (84) evidenciaram destruição de células epiteliais transformadas de tireóide de ratos em cultura, comparada com células normais quando expostas ao HpD e luz.

Eversen e colaboradores (67), em estudos da absorção e eficiência da fotossensibilização em células NHIK 3025 "in vitro", verificaram maior eficiência do dihematoporfirina éter em relação à hematoporfirina e HVD.

1.7.3 - Estudos "in vivo"

Os estudos "in vivo" realizados em animais permitiram conhecimentos mais próximos dos processos envolvidos na PDT. Tipos e tamanhos de tumores, dosagem do fotossensibilizador, comprimento de onda e potência mais adequada, também puderam ser avaliados nestes estudos.

Quando o HpD é estimulado por luz de comprimento de onda próximo a 405nm, ele emite uma fluorescência vermelha com picos característicos de 630 e 690nm. Essa fluorescência permite a delineação e localização de tecidos malignos (28, 62).

Os trabalhos de Hendersen (63) e Dougherty (22) mostraram que a ação da luz com comprimento de onda de 488nm reduzia a taxa de crescimento de

carcinoma de células escamosas e de células de tumor mamário transplantado em ratas. Observaram também o aparecimento de um vermelho intenso no centro do tumor.

Dougherty e colaboradores, em 1981 (85), estudando cães e gatos com vários tipos de tumor, observaram que massas tumorais com diâmetro de até 8-10cm podiam responder à PDT. Nos casos em que o tumor era superficial, observava-se fluorescência moderada a intensa, quando da iluminação com lâmpada ultravioleta.

Bulgelski, Porter e Dougherty, em 1981 (86), demonstraram autoradiograficamente que 3H-HpD estavam fortemente associados ao estroma vascular em tumores tipo sarcomas e carcinomas dos camundongos.

Utilizando broncoscópio flexível, Hayata e colaboradores (33), estudaram carcinomas de células escamosas intrabronquiais induzidos em cães e observaram que a fluorescência dos tumores tratados com HpD (2,5-3,0mg/kg) era induzida pela luz ultravioleta de um laser de Krypton (comprimento de onda entre 406,7 a 422,6nm). Profio e colaboradores, em 1979 (87, 88), utilizaram um broncoscópio flexível para a localização de tumor oculto de pulmão, em humanos. Através do canal de biópsia, utilizaram uma luz vermelha com o sistema de laser de argônio - laser de corante de comprimento de onda de 630nm. Os pacientes portadores desses tumores haviam recebido 48 horas antes, a dose de 2,5-3,0mg/kg de HpD, e de acordo com os autores houve erradicação completa dos tumores, confirmada por documentação histológica.

O desenvolvimento tecnológico dos sistemas de fibra óptica permitiu, posteriormente, a detecção e delineação de tumores ocultos (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

1.8 - Aplicação Clínica da Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica tem se mostrado efetiva no diagnóstico e tratamento de uma infinidade de tumores malignos da pele, das vias aéreas respiratórias altas e baixas, do trato gastrointestinal, ginecológicos, urológicos, e outros, nos estágios iniciais, e permitindo, nos estágios mais avançados, uma alternativa a mais, entre as modalidades terapêuticas oncológicas, na sobrevida dos pacientes.

Em todos os trabalhos citados abaixo, anterior à fase do tratamento é descrita a primeira fase do processo de ação fotodinâmica, que tem importância relevante na determinação dos diagnósticos, que é a fluorescência.

Lipson, na década de 60 (14, 15, 16, 17, 18, 19), e mais tarde Gregorie, em 68 (20), descreveram a fluorescência em vários tipos de tumores em pacientes tratados com HpD.

Dougherty e colaboradores, em 1978 (28), apresentaram os resultados de 25 pacientes com neoplasias de diferentes linhagens celular, submetidos a doses intravenosa de HpD, entre 2,5 a 3,0mg/kg do peso corporal e irradiados nos 2°, 3°, 4° e 5° dias com luz de comprimento de onda entre 600 a 700nm;os resultados obtidos foram altamente favoráveis à PDT.

Em 1979, Dougherty e colaboradores (62), obtiveram bons resultados em tumores primários e metastáticos de câncer de pele, e concluíram que o tratamento fracionado apresentava vantagens para os tecidos normais, quando grandes áreas deviam ser irradiadas. Já o tratamento repetido nessas áreas, duas ou três semanas após a primeira injeção, resultavam respostas rápidas do tumor (necrose em menos de uma semana), porém, apresentavam severas complicações na pele normal. A dose de HpD era de 2,5mg/kg do peso corporal, com luz entre 620 a 640nm, durante 20 minutos. Para tumores como melanoma maligno, sarcoma de Kaposi e câncer metastático de mama, respostas completas de tumores superficiais eram obtidas com baixas dosagens. Tumores com profundidade a partir de 1,5cm necessitavam de complementação terapêutica fotodinâmica.

Em 1982, Wile e colaboradores (89), utilizaram a PDT em 50 pacientes com diferentes tumores em 267 locais. Com dose do HpD variando entre 2 a 5mg/kg de peso corporal e um sistema laser que emitia comprimento de onda próximo de 630nm (Argônio-corante ou vapor de ouro), obtiveram resultados favoráveis de 81% de respostas positivas, após 30 dias.

Hayata e colaboradores, em 1982 (90), utilizaram a PDT em 13 pacientes com câncer de pulmão e um caso de metaplasia epidermóide, com resultados alentadores. O tratamento do câncer de pulmão e traquéia também foi objeto de trabalho de Balchum, em 1984 (91), de Hayata e colaboradores, em 1984 (92) e de Vincent, em 1982 (93), e demonstrou boa eficiência nos estados iniciais e promissor quando dos estágios avançados. Resultados

semelhantes foram referidos no diagnóstico e tratamento de câncer de esôfago (23, 94).

A utilização da PDT, em câncer gástrico, embora com resultados promissores na destruição tumoral, revelou dificuldades técnicas em alcançar todas as áreas com a luz devido as dobras gástricas, ângulo das fibras usadas e peristaltismo, como observou Aida (23).

Em neoplasias da bexiga, do tipo carcinoma "in situ" de células transicionais, câncer multicêntrico e displasia do epitélio, Benson e colaboradores, em 1983 (43), demonstraram maior grau de seletividade e resistência à PDT com HpD.

No tratamento de câncer ginecológico, a aplicação da PDT não tem sido extensiva, mas importante pelos excelentes resultados obtidos, com respostas parciais ou completas na regressão dos tumores (95, 96, 97).

A aplicação da PDT em câncer da cabeça e pescoço, nos tumores de laringe, base da língua, palato, assoalho da boca, foram objeto de estudos de Wile (89), Kinsey (98), Keller (99) e Gluckman (100). Esses autores observaram que a maioria dos casos apresentavam redução da massa tumoral, porém, biópsias posteriores eram positivas nas porções mais profundas, abaixo da mucosa.

Outros tipos de tumores ainda apresentam resultados preliminares que necessitam de investigações mais aprofundadas, como é o caso de tumores cerebrais, tumores intraoculares como o melanoma maligno da coróide e retinoblastoma (23).

Embora a meta da PDT seja a destruição dos tumores, tem-se que salientar a importância da fase de fluorescência tanto na evidência das células malignas como no mapeamento da área a ser fotodestruída posteriormente.

2. OBJETIVOS

Como vimos, a PDT utiliza luz que ativa um fotossensibilizador seletivamente "depositado" em tecidos malignos. Decorrentes desta interação, surgem dois aspectos dos quais podemos nos beneficiar na prática, ou seja, o aspecto utilizado para o diagnóstico quando observamos fluorescência avermelhada nos tecidos malignos e o aspecto utilizado no processo terapêutico, quando fenômenos fotobiológicos são responsáveis pela destruição celular.

O desconhecimento e a ausência quase total de pesquisa sobre este tema, chamou nossa atenção e nos levou a pensar sobre a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o assunto, visando a introdução dessas modalidades de diagnóstico e, posteriormente, tratamento em nosso meio.

Propusemo-nos, então, a investigar a PDT apenas quanto ao seu aspecto diagnóstico, partindo primeiro da criação de um modelo experimental que nos oferecesse subsídios de estudos para investigar a interação entre uma fonte de luz ultravioleta com um fotossensibilizador, o qual seria preparado em nossos laboratórios e aplicado em tumores malignos.

A grande variedade de tumores malignos existentes também foi objeto de preocupação inicial e, portanto, direcionamos nossos objetivos ao estudo da fluorescência em tumores malignos do tipo sarcoma, para relacionar os resultados encontrados com as características específicas desse tipo de tumor.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 - Material

3.1.1 - **Fonte de Luz**: luz ultravioleta de 20W, 110V, comprimento 60cm; comprimento de onda de maior eficiência em torno de 365nm; modelo BLB, firma Sankyo Denki, Japão; montada em estativa (Anexo II)

3.1.2 - **Animal Experimental**: fêmeas de ratos isogênicos da linhagem WAB NOT (Wistar Albino Booths/Nottingham) de criação SPF (Specific Pathogen Free - Livres de Patógenos Específicos), obtidas no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, originárias de matrizes recebidas em 1981 da Universidade de Nottingham, Grã-Bretanha, trazidas pelo Prof. Fauzi Dawood, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia/UNICAMP.

3.1.3 - **Substância Fotossensibilizadora**: derivado da hematoporfirina (HpD) preparado segundo Zezell (36); frascos tubinetes aluminizados; recipiente de isopor para conservação em freezer a -20 °C.

3.1.4 - **Tumor**: neoplasia maligna de origem mesenquimal (sarcoma) compatível com fibrohistiocitoma maligno, cedido pelo Prof. Fauzi Dawood, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia/UNICAMP.

3.1.5 - **Equipamento anestésico**: cuba cilíndrica de vidro transparente com tampa de vedação e esponja umedecida com o agente anestésico; frascos do agente anestésico éter etílico (éter anestésico Rhodia).

3.1.6 - **Equipamento Cirúrgico**: cabo de bisturi para lâmina no. 11 e lâmina no. 23; tesoura curva de Metzbauer de 15cm; tesoura reta fina de 15cm;pinça anatômica denteada simples de 12cm; pinça anatômica dente de rato de 12cm; pinças Kelly simples e curvas de 12cm; seringas para

insulina de 1ml; agulhas descartáveis no. 10x5; gaze cirúrgica; papel alumínio; frascos coletores tipo cápsula, para os procedimentos histopatológicos; placas de Petri.

3.1.7 - **Equipamento Fotográfico**: máquina fotográfica ASAHI PENTAX ME; lente fotográfica 1:1.7 de 50mm; filme Fujicolor Super HG, 1600 ASA; tripé de apoio para máquina fotográfica (Viola, mod.321); lente close-up n.o 3, 49mm (Focal, Japão); filtro de banda passante centrada no comprimento de onda próximo a 620nm. (Anexo III).

3.1.8 - **Equipamento Geral**: papel preto fosco; foco de luz com lâmpada de 40W; mesa cirúrgica experimental; luvas; campos cirúrgicos azul escuro; papel absorvente; formol 10%; decadry n.o 1; livro para registro diário de dados.

3.2 - Método

O método de trabalho constituiu-se de duas etapas; a primeira, na qual nos preocupamos com a montagem do modelo experimental; e uma segunda etapa, na qual realizamos o experimento propriamente dito.

1.a Etapa:Foram escolhidas ratas da linhagem WAB NOT pela sua isogenicidade, uniformidade de peso (190 a 210g), atividade, trofismo e docilidade.

Os primeiros animais já se encontravam com o tumor implantado, dependendo de nós sua manutenção e vitalidade, o que foi obtido através de repiques (transplantes) que seguiram uma rotina ao longo de um período entre abril de 1990 a outubro de 1991. Essa rotina consistia em:

a) as ratas com tumoração na região dorsal eram anestesiadas,por via inalatória, no interior de uma cuba de vidro fechada, contendo esponja embebida em éter anestésico. Era feita então a retirada total do tumor do animal;

b) esse tumor era lavado em soro fisiológico a 0.9% estéril,e a seguir seccionado em fatias de ± 0,5cm de espessura, ao longo do seu eixo maior, com bisturi de lâmina n.o 23. Os fragmentos eram submetidos a uma

seqüência de três lavagens consecutivas, com duração de 5 minutos cada, sempre em solução fisiológica estéril a 0.9%.

c) conforme o tumor era seccionado, observava-se uma parte periférica homogênea e uma parte central de aspecto gelatinoso; tomava-se então o cuidado de retirar pequenos cubos de mais ou menos 0,5cm cúbicos dessa parte homogênea, que eram deixados em solução.

Após essa rotina, passava-se então ao transplante de parte do tumor: imobilizava-se o animal receptor em decúbito ventral, em prancheta apropriada, com tricotomia lombar, mantendo-se a anestesia com cone aluminizado. Realizava-se incisão de pele (de 1cm mais ou menos) na região lombar direita, com tesoura de ponta fina. Com a tesoura de Metzbauer era aberto um túnel subcutâneo contralateral, pelo qual era introduzido, com pinça anatômica denteada, fragmento do tumor. O fechamento dessa incisão era feito por pressão com pinça Kelly.

Após recuperação anestésica, os animais eram deixados em gaiolas apropriadas, em número máximo de nove animais por gaiola, em condições ambientais convencionais, recebendo água e ração apropriadas (Labina, Purina), *ad libitum*.

Observava-se a evolução do crescimento dos tumores, macroscopicamente, com transplantes em novos grupos a cada três meses em média. Nessa oportunidade escolhia-se, aleatoriamente, um animal, no qual injetava-se, via retroorbitária, o HpD na concentração de 7,5mg/kg de peso. Após 48 horas procedia-se à iluminação do tumor com luz ultravioleta e observava-se a fluorescência emitida, o que significava a boa atividade do HpD injetado. Para cada tumor foi realizado controle anátomo-patológico no intuito de observar eventuais alterações no padrão histológico do tumor.

A opção pela via de administração retroorbitária , decorreu depois de termos testado outras vias como, jugular, artéria abdominal e peritoneal, e ter sido a retroorbitária a que melhor se adaptou ao nosso trabalho. Em relação à concentração do HpD, foram testadas dosagens que variaram de 5 a 20mg/kg, sendo a mais conveniente e dentro do nosso propósito, a de 7,5mg/kg.

Ainda na etapa preparatória do experimento, foram realizados, no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP), testes imunohistoquímicos para melhor caracterização do tumor. Além destes testes com a Queratina (negativo) e a Vimentina (positivo difuso), os achados histológicos apresentavam células de núcleos ovais e fusiformes, com citoplasma eosinófilo, as quais estavam dispostas em várias direções; apresentavam de moderado a intenso grau de pleomorfismo e hipercromatismo nuclear com figuras de mitoses atípicas. Observavam-se em meio ao tumor, frequentes células atípicas multinucleadas e pequena quantidade de vasos sanguíneos (Fig. 16). Exames complementares das peças tumorais realizados por microscopia eletrônica, revelaram a presença de fibras colágenas no citoplasma das células (Fig. 17). Esses dados caracterizaram, de forma definitiva, o tumor como uma neoplasia maligna de origem mesenquimal (sarcoma) do tipo fibrohistiocitoma. Esses estudos sobre caracterização do tumor se fizeram necessários dado ao seu comportamento atípico durante os experimentos, e pela ausência de maiores informações histológicas sobre o mesmo.

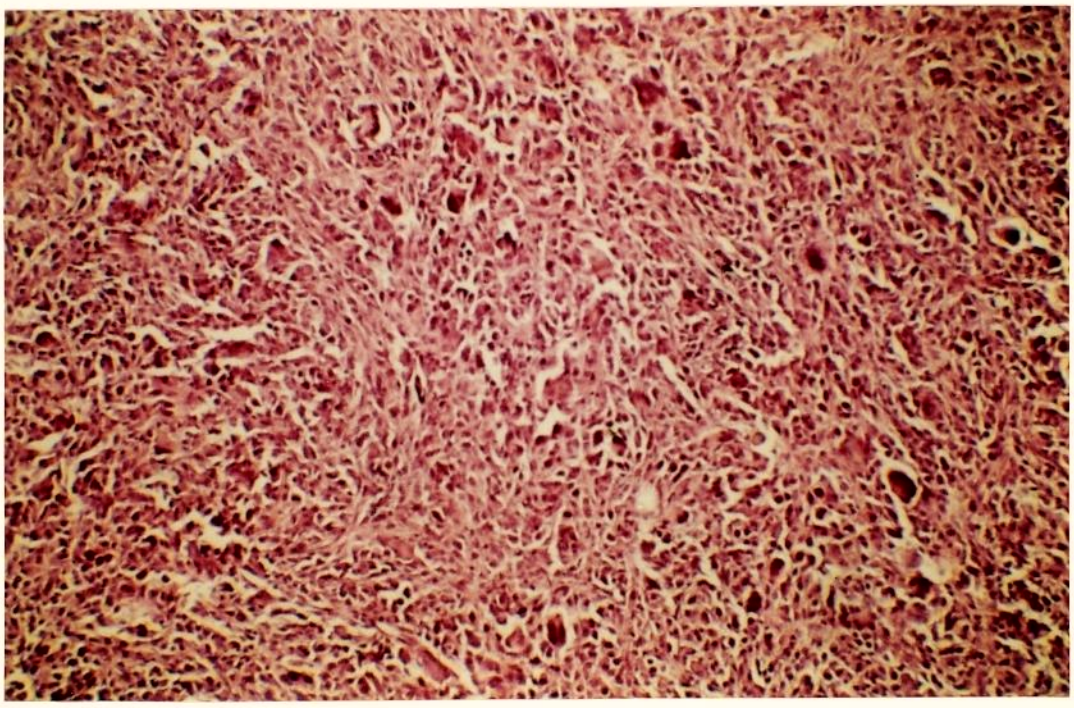


Fig. 16 - Fotomicrografia do tecido maligno-fibrohistiocitoma. HE 400x.

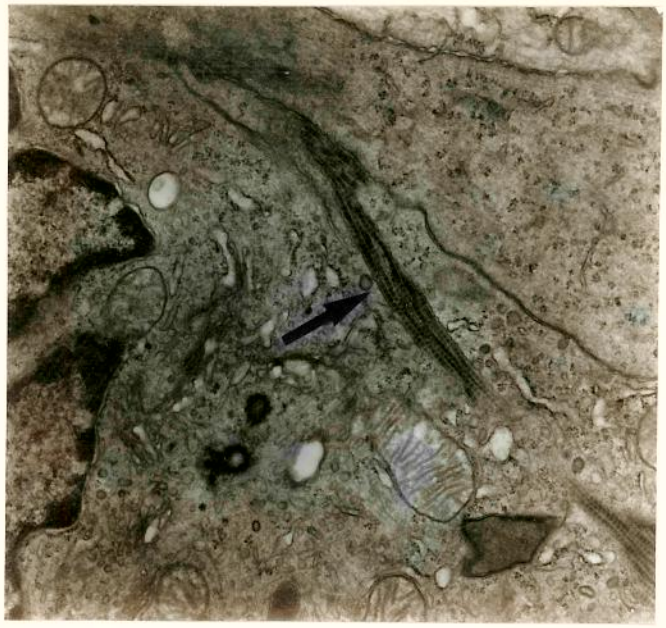


Fig. 17 - Eletromicrografia do tecido maligno-fibrohistiocitoma. A seta indica fibras colágenas intracelulares (I6000 x).

A preparação da substância fotossensibilizadora consistiu na dissolução de 1g de Hp.2HCl (Dihidroclorido de Hematoporfirina) em uma mistura de 19ml de ácido acético glacial e 1ml de ácido sulfúrico concentrado suprapur, durante aproximadamente 20 minutos. Essa solução permanecia em repouso por 24 horas, no escuro, e à temperatura de 20 °C; era filtrada, a seguir, em papel de filtro Whatmann n.o 1, por cerca de 30 minutos. Com a adição de cerca de 15 litros de solução aquosa 3-5% de acetato de sódio, à solução inicialmente filtrada,estabelecia-se o pH 6.0 para que houvesse precipitação máxima de sólido. O material precipitado era recolhido mediante filtração por gravidade (aproximadamente 48 horas), em papel de filtro Whatmann n.o 1 e lavado com água bidestilada. Os papéis de filtro com o sólido eram colocados em um dissecador com sílica gel, em vácuo (1.10^{-2} torr) por cerca de uma hora. O sólido recolhido pela raspagem dos papéis de filtro é o ácido de hematoporfirina (0,45g.)e deve ser guardado em frasco escuro à temperatura de -20 °C, até que se queira preparar a solução injetável chamada de HpD.

A solução injetável é obtida dissolvendo-se a proporção de 1g de HpA para 50ml de solução de hidróxido de sódio p.a. (NaOH Merck) 0,1N. A solução deve ser agitada por cerca de uma hora à temperatura de 20 °C e neutralizada a pH 7,1 com a adição de ácido clorídrico 0,1n e ajustada a um volume total de 200ml com solução de cloreto de sódio 0.9%. O cloreto de sódio é

adicionado para tornar a solução isotônica. Esta solução final é esterilizada por filtração em membrana Millipore de 20μm. Esses procedimentos foram descritos por Dougherty e modificados por Zezell (36).

Terminado o preparo da solução do HpD (concentração de 5mg/ml), a mesma era armazenada em tubinetes aluminizados, para evitar qualquer contato com luz natural e conservados em caixas de isopor em freezer, à temperatura de -20 °C. Antes do seu uso, esses tubinetes eram retirados do freezer e deixados à temperatura ambiente por 30 minutos; em seguida eram diluídos com soro fisiológico 0.9%, tendo-se sempre o cuidado em não expor a solução à luz.

Para a montagem da fonte de luz, utilizou-se lâmpada ultravioleta (comprimento de onda 365nm) que foi fixada em estativa com braço articulado. Tomou-se cuidado de revestir as extremidades da lâmpada com papel preto e fosco para evitar que emissões anômalas pudessem interferir no experimento. Na utilização dessa fonte, aguardava-se um tempo mínimo de dez minutos para aquecimento da lâmpada.

A exposição à luz nunca era inferior a cinco minutos e era feita em mesa cirúrgica experimental, com leve inclinação, totalmente coberta com campo cirúrgico azul-escuro úmido, distante 20cm da fonte de luz (Fig. 18).

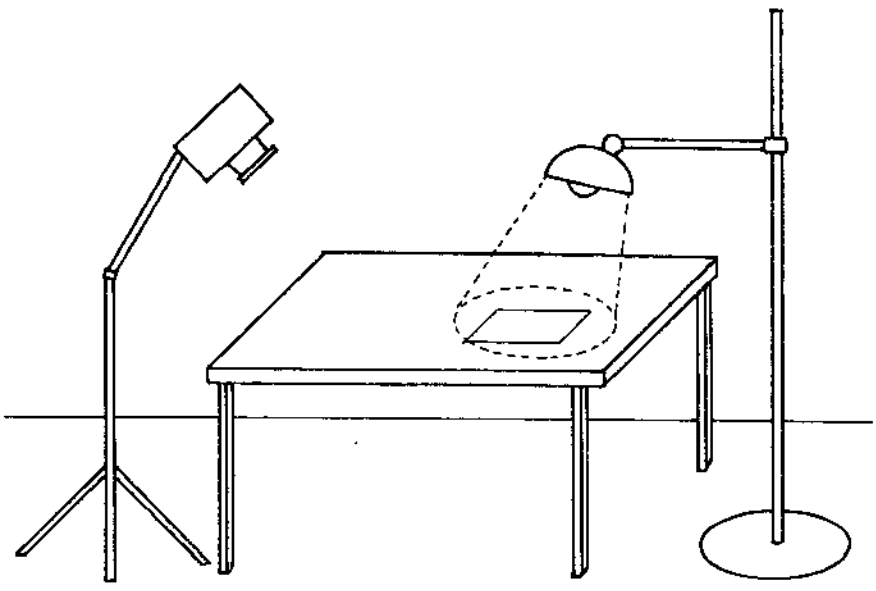


Figura 18 - Desenho esquemático da sala experimental.

2.a Etapa: Foram selecionados para o experimento 27 animais, distribuídos em três grupos (A, B, C) de nove animais cada.

O grupo A era composto por animais com tumor previamente implantado na região lombar e receberam HpD na dose de 7,5mg/kg, via retroorbitária no olho direito com volume médio de 1,2ml, dependendo da variação do seu peso. Após esse procedimento, separavam-se os animais em três grupos de três, que eram colocados em gaiolas totalmente escuras para posterior exposição à luz ultravioleta de 24, 48 e 72 horas. Decorridos esses prazos, cada grupo era sacrificado, com exérese de todo o tumor e retirada dos órgãos (rim, baço, fígado e músculo lombar), que eram seccionados e colocados sempre segundo uma determinada disposição, em campo cirúrgico úmido azul-escuro, para exposição à luz ultravioleta e registro fotográfico (Fig. 19).

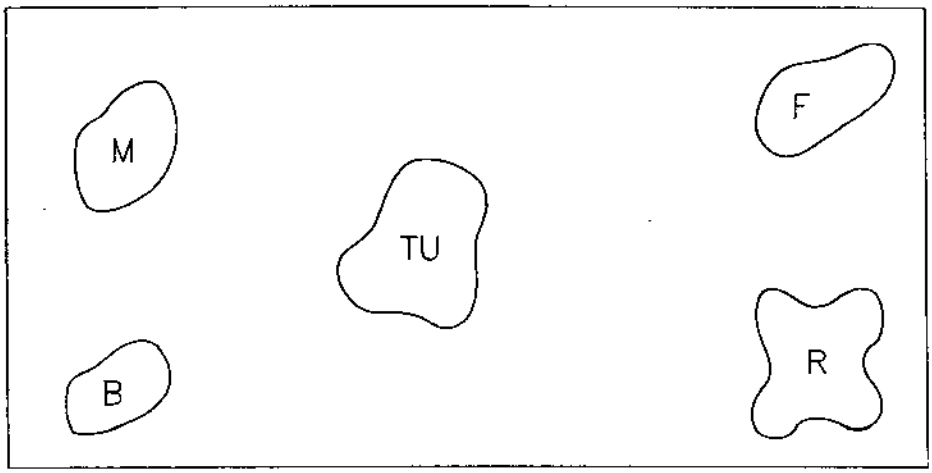


Figura 19 - Disposição dos órgãos e peça tumoral. Tu = tumor; M = músculo; B = baço; F = fígado; R = rim.

No grupo B foram realizados os mesmos procedimentos do grupo A, com a diferença de que neste grupo os animais não haviam sido submetidos ao implante de tumor.

Já no grupo C, os animais apresentavam o tumor mas não receberam o HpD, tendo os demais procedimentos seguido rotina igual à dos grupos A e B.

Os resultados obtidos eram computados em tabela e tidos como positivos quando aparecia, a olho nu, uma luz vermelha alaranjada fluorescente nos tumores e órgãos (rim, baço, fígado, músculo lombar). A negatividade era representada pelo não aparecimento dessa luz fluorescente.

Deve-se ressaltar que durante os procedimentos dessa segunda etapa do experimento, a sala do laboratório encontrava-se com total ausência de luz natural, o que foi conseguido pela colocação de papel preto e fosco nas janelas. Nas exéreses do tumor e nas retiradas dos órgãos dos animais, foi utilizado foco de luz indireta com lâmpada de 40W do tipo convencional.

4. RESULTADOS

Quando do aparecimento de fluorescência avermelhada, a olho nu, os resultados foram expressos pelo sinal (+). Essa fluorescência não se apresentava de maneira uniforme, mas sim de forma irregular e setorizada, principalmente nas regiões centrais do tumor. O não aparecimento da fluorescência foi expresso pelo sinal (-) e significava que não havia um único ponto ou região onde ela aparecia (Fig. 20).

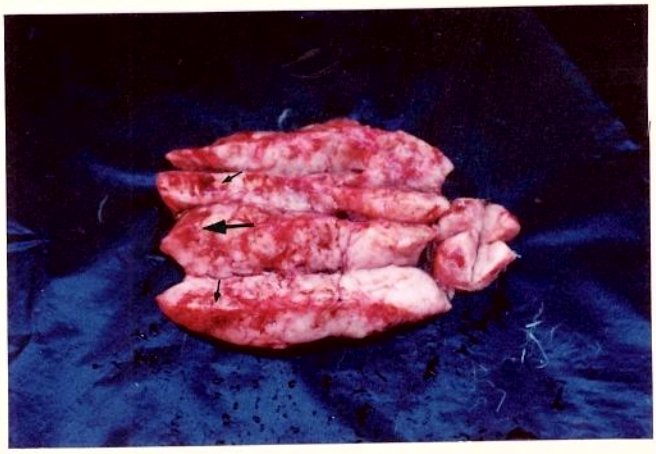


Figura 20 - Foto da emissão fluorescente do HpD nos tumores. As setas indicam os pontos de fluorescência.

Nos três grupos de estudo (A, B, C) foram obtidos os seguintes resultados:

No grupo A, foi observada a fluorescência nas nove peças tumorais retiradas dos animais. A positividade (+) nos órgãos rim, fígado, baço e músculo só esteve presente na leitura de 24 horas. Nas leituras de 48 e 72 horas desse mesmo grupo, não foi observada qualquer fluorescência.

No grupo B, à semelhança do que ocorreu no grupo A, a fluorescência apareceu também apenas na leitura de 24 horas dos órgãos retirados dos animais, sendo negativa a sua presença nas leituras de 48 e 72 horas. Nesse grupo, não havia peças tumorais.

No grupo C, os resultados mostraram a ausência de fluorescência em todas as peças tumorais e órgãos: fígado, rim, baço e músculo, retirados dos animais.

As fotos realizadas durante as leituras (24, 48 e 72 horas) dos grupos A e B não traduzem fielmente a realidade dos resultados em relação à fluorescência, pois, a olho nu, esta se apresentava avermelhada e nas fotos apareciam manchas escuras nos locais onde havia fluorescência (Fig. 21).

Abaixo é apresentado, para melhor visualização, esquema resumindo as experiências e seus resultados.

	24 horas			48 horas			72 horas		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GRUPO A	M+ F+ T+ B+ R+	M+ F+ T+ B+ R+	M+ F+ T+ B+ R+	M- F- T+ B- R-	M- F- T+ B- R-	M- F- T+ B- R-	M- F- T+ B- R-	M- F- T+ B- R-	M- F- T+ B- R-
GRUPO B	M+ F+ 0 B+ R+	M+ F+ 0 B+ R+	M+ F+ 0 B+ R+	M- F- 0 B- R-	M- F- 0 B- R-	M- F- 0 B- R-	M- F- 0 B- R-	M- F- 0 B- R-	M- F- 0 B- R-
GRUPO C	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-	M- F- T- B- R-

Legenda:

M = músculo
F = fígado
T = tumor
B = baço
R = rim

(+) = positivo
(-) = negativo
0 = ausente

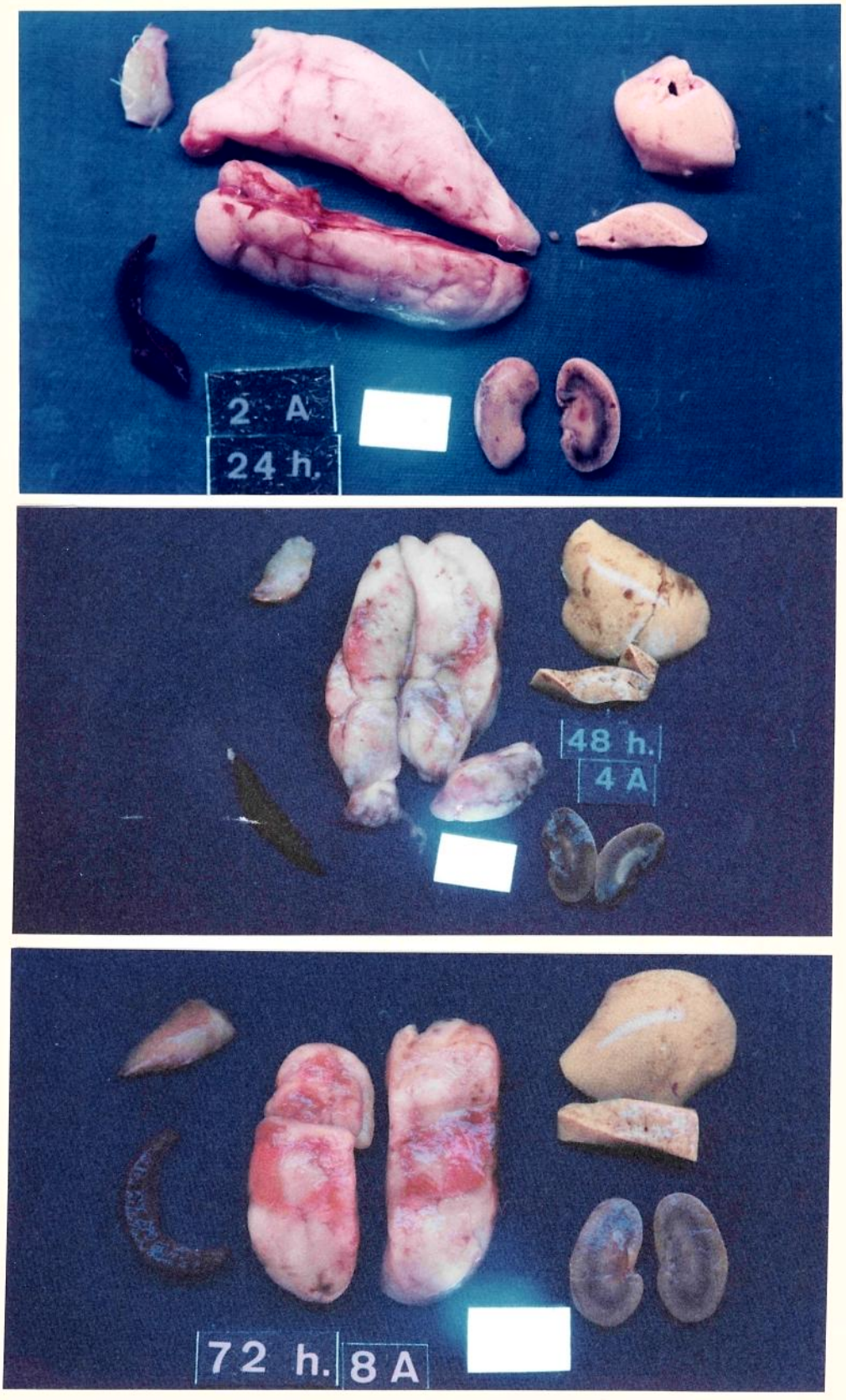


Figura 21 - Fotografia das leituras de 24, 48 e 72 horas.

5. DISCUSSÃO

No tecido maligno, quando "sensibilizado" por compostos da hematoporfirina e exposto à luz ultravioleta, torna-se visível uma fluorescência avermelhada (10, 11, 14, 23, 27, 28). Este é um fundamento da PDT na detecção de tumores malignos.

Sabe-se que em tecido neoplásico, a retenção do HpD é maior do que em tecido normal (10, 23, 31, 63, 87, 88, 101, 102).

Ao realizar nosso estudo, a preocupação de criarmos três grupos foi no sentido de constatar a fluorescência em tecido maligno; excluir o fenômeno da fluorescência por excesso de fotossensibilizador circulante e evitar que a fluorescência endógena das peças tumorais e órgãos retirados dos animais induzisse a erro de interpretação.

O aparecimento da fluorescência nas peças tumorais do grupo A, de certo modo, era esperado como resultado, não contrariando nossas expectativas, bem como as da literatura. A positividade da fluorescência nas leituras de 24, 48 e 72 horas,e sua manutenção nesses períodos, estão consoantes com os estudos de interação do HpD, luz ultravioleta e tumores malignos.

Ao observar a fluorescência nos órgãos retirados dos animais do grupo A, vimos que a positividade estava presente apenas nas leituras de 24 horas. Com isso constatamos que a retenção do HpD em tecido tumoral foi maior que em tecidos normais.

A hipótese de superdosagem do HpD, que eventualmente poderia alterar os resultados do nosso estudo, foi motivo de realização do experimento com o grupo B. Neste grupo não foi implantado tumor, onde o HpD poderia interagir. A dose injetada do fotossensibilizador, de 7,5mg/kg, a mesma do grupo A, encontrava-se dentro da faixa de 2 a 10mg/kg que encontramos na literatura em estudos de detecção e delineamento e, até mesmo, na fotodestruição de tumores (15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 30, 31, 32, 33, 63, 85, 86, 87, 88, 90).

Descartada a possibilidade de retenção seletiva do HpD no tecido neoplásico, já que no grupo B não havia tumor, imaginávamos que o "excesso" do fotossensibilizador em circulação teria um tempo maior de

acumulação em tecidos normais do animal, e que nessa interação com os tecidos, em presença de luz ultravioleta, teríamos o fenômeno da fluorescência não só na leitura de 24 horas, como também nas leituras de 48 e 72 horas.

Os resultados mostraram que o efeito de fluorescência só apareceu nos órgãos retirados, na leitura de 24 horas, estando negativa nas leituras de 48 e 72 horas.

Quando comparamos esses resultados com os do grupo A, notamos que a fluorescência nos órgãos retirados se mantinha na mesma intensidade, não havendo, portanto, superdosagem do HpD.

Uma consideração a mais no processo de fotodetecção de tumores é que intensidades baixas de fluorescência podem ocorrer devido ao fenômeno de fluorescência endógena dos tecidos, em presença de luz ultravioleta, possivelmente pela presença de porfirinas endógenas circulantes.

Esse fenômeno existe, ainda que em baixa intensidade (23). Aizawa *apud* Dougherty (23), utilizando um analisador espectral, demonstrou que a fluorescência do HpD apresentava emissões entre 600 a 690nm, enquanto a fluorescência endógena se mostrava abaixo de 600nm.

Ainda que de fraca intensidade, as emissões pela fluorescência endógena encontram-se dentro da capacidade perceptiva do olho humano. Ao estudar o grupo C, observamos que em todas as peças tumorais e órgãos retirados dos animais, as leituras não tiveram a positividade da fluorescência.

Esses resultados vêm confirmar nossas expectativas de que a fluorescência presente nos grupos A e B era decorrente da interação da luz ultravioleta com o fotossensibilizador retido nas células do tumor (leituras de 48 e 72 horas), ou ainda, circulante, nos casos de leituras mais precoces (24 horas).

A fluorescência da hematoporfirina é um fenômeno visível e mensurável.

A emissão de luz fluorescente de cor avermelhada do HpD, mostrou que seu comprimento de onda está entre 600-700nm (23, 28, 102, 103), medida esta realizada através de aparelho de espectrofotometria. O olho humano tem capacidade à percepção de estímulos luminosos dentro do espectro da luz que vai da faixa do violeta (± 360nm) ao vermelho (± 720nm) (104).

Num estudo experimental e de objetivos qualitativos quanto a

positividade da fluorescência, a percepção do olho preencheu plenamente nossos requisitos. A presença das emissões com comprimento de onda em torno de 620nm se mostrava dentro da faixa de sensibilidade do olho, não dependendo de fatores subjetivos quanto a positividade ou não da fluorescência.

São indispensáveis na PDT, para detecção de tumores: fonte de luz com comprimento de onda em torno de 400nm; fotossensibilizador e tecido neoplásico (10, 23, 29, 103, 105).

Inúmeras são as fontes de luz que podem ser utilizadas. Os aparelhos de laser, como por exemplo de Krypton e Argônio (27, 87, 88, 102), apresentam as vantagens de oferecer luz pura monocromática, com baixo poder de dispersão na superfície do tecido alvo. Adaptados às fibras ópticas flexíveis, possibilitam seu uso em regiões cavitárias e de difícil acesso. Entretanto, o custo desses aparelhos, muitas vezes, torna um experimento inviável.

As lâmpadas de luz ultravioleta são de fácil manuseio e de custo mais acessível. Apresentam as desvantagens de oferecer luz com variados comprimentos de onda, grande área de dispersão na superfície dos tecidos e uso restrito a áreas de fácil acesso (27).

Em nosso ensaio, visando a fluorescência do HpD, utilizamos uma lâmpada ultravioleta que apresentava emissões, em sua maioria, próximo a faixa de 365nm.

Os resultados de positividade do HpD, anteriores e durante os nossos experimentos, mostraram que a lâmpada de luz ultravioleta escolhida supria plenamente as necessidades de nosso trabalho, apresentando baixo custo e podendo ser facilmente encontrada no mercado local.

Os tecidos apresentam diferentes absorções de comprimento de onda de luz. A radiação em torno de 400nm, muito importante na ativação do HpD, não tem nenhum efeito quando o fotossensibilizador se encontra em camadas profundas dos tecidos, devido à absorção destes comprimentos de onda pelas camadas mais superficiais (Fig. 22).

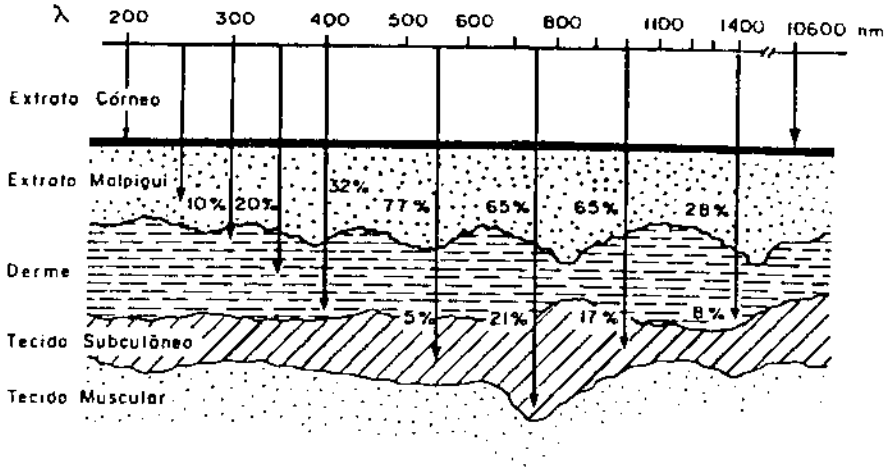


Figura 22 - Desenho esquemático da absorção de diferentes comprimentos de onda pelos tecidos

Estudos demonstraram que a ação fotodinâmica do HpD se prestava muito bem a tumores superficiais e que os resultados eram satisfatórios quando eles se encontravam em profundidades de até 2,3mm da pele (27, 28, 101).

A implantação de um tumor de origem mesenquimal, nas camadas profundas da derme do animal e ativação do HpD com luz ultravioleta através da pele, poderia nos induzir a interpretações de falso negativo pelo não aparecimento de fluorescência avermelhada.

A metodologia adotada de retirar cirurgicamente as peças tumorais e os órgãos dos animais, esteve fundamentada nesses conhecimentos de absorção da luz pelos tecidos, de tal forma que a ativação do fotossensibilizador não apresentasse fatores que interferissem entre a fonte e o tumor.

O fotossensibilizador utilizado foi o HpD preparado e adaptado para estudos do ponto de vista das propriedades ópticas (36). Este mostrou-se adequado para os nossos estudos experimentais em animais.

A alta seletividade por tecidos malignos e o sítio exato de interação do HpD na intimidade celular ainda não foram totalmente esclarecidos; sabe-se que eles existem e que, em estudos para diagnósticos desses tecidos,a interação é traduzida por uma luz brilhante avermelhada. Essa fluorescência apresenta características de intensidade e uniformidade relacionadas ao tipo

histológico e tamanho do tumor (11, 14, 15, 16, 20). Estudos em carcinomas e adenocarcinomas demonstraram forte fluorescência, localizada e uniforme, enquanto que em sarcomas essas características não eram tão definidas, do que discorda Dougherty (23) que afirma não haver relação entre tipo e tamanho de tumor, tendo encontrado intensa fluorescência em tecido sarcomatoso em seus estudos.

O tipo de tumor por nós utilizado, após testes imunohistoquímicos, foi caracterizado como do tipo sarcoma, e em nosso experimento apresentou fluorescência desigual em toda a sua extensão, sendo observadas áreas róseas e áreas de forte intensidade avermelhada. Exames histológicos dessas duas áreas apresentavam as mesmas características de tecido sarcomatoso, exceto que nas áreas fortemente fluorescentes foram encontrados pontos de necrose e trombose vascular, indicando que nestas o HpD deve ter circulado de maneira mais intensa. Quando transplantadas em animais, essas duas áreas apresentaram capacidade de crescimento semelhante, o que reflete igual viabilidade celular.

O tumor sem o HpD, em presença de luz ultravioleta, experimento do grupo C, apresentava em toda a sua extensão aspecto uniforme branco nacarado.

Métodos simples e acurados para detectar e documentar a fluorescência de tumores são descritos com o uso de máquinas fotográficas e filmes comerciais (31,63, 103).

A imagem fotográfica é o resultado de luz simultaneamente refletida e emitida pelo objeto de estudo que "sensibiliza" a película, através de uma série de reações fotoquímicas. Essa película apresenta diferentes sensibilidades e métodos de processamento. O uso de filtro entre o objeto e a película fotográfica é um artifício usado quando se quer realçar e/ou selecionar uma determinada característica de cor do objeto.

Na tentativa de documentar os resultados do nosso experimento, encontramos dificuldades operacionais que estavam fora da nossa área de conhecimento. A lâmpada ultravioleta utilizada como fonte de excitação do HpD não era monocromática, apresentando diferentes comprimentos de onda, capazes de sensibilizar nossa película fotográfica de alta sensibilidade (ASA 1600). O filtro de banda passante em torno de 620nm utilizado, também

deixava passar luz ultravioleta (± 380nm), o que acarretava subexposição dos pontos de fluorescência e super exposição de todo o conjunto. Esse efeito teria sido minimizado com o uso de um filtro para luz ultravioleta e um tempo maior de exposição, o que prejudicaria a nitidez do conjunto, mas caracterizaria melhor as regiões de fluorescência.

No processo de revelação, encomendado a laboratório especializado, com orientação de realce para os tons de vermelho, os resultados mostraram que áreas de fluorescência visível a olho nu, das peças tumorais e órgãos retirados dos animais, foram retratadas, muitas vezes como imagem escura, não tendo, portanto, neste caso, valor como prova dos resultados.

6. CONCLUSÕES

Ao realizar a presente monografia tínhamos consciência das dificuldades que iríamos enfrentar ao abordar um assunto tão amplo, sério e tão pouco difundido em nosso meio. Seu caráter interdisciplinar, nos obrigou buscar uma linguagem comum entre as áreas do conhecimento e a montar um modelo experimental que pudesse reproduzir e introduzir a PDT como tema de pesquisa e possíveis aplicações clínicas no futuro.

Os resultados mostraram que o modelo experimental proposto, embora com algumas imperfeições, é adequado e suficiente para estudos da PDT no seu aspecto diagnóstico, permitindo-nos evidenciar que:

1. O derivado de hematoporfirina, por nós estudado e preparado, permitiu não só estudos de suas propriedades ópticas no âmbito da Física, como também estudos biológicos, podendo ser ativado, a nível de tecido maligno, por uma lâmpada ultravioleta de comprimento de onda em torno de 365nm, evidenciando uma fluorescência avermelhada.

2. O derivado de hematoporfirina permaneceu por mais tempo no tecido maligno do que no tecido normal, favorecendo nossos estudos de detecção para diagnóstico de tumores.

3. O tipo histológico, fibrohistiocitoma maligno, por nós implantado nos animais, apresentou peculiaridades de detecção com o aparecimento de uma fluorescência não uniforme, evidente em regiões profundas e pouco observada em regiões mais superficiais do tumor, o que pode induzir a diagnóstico de falso negativo de malignidade pela dificuldade de observá-la em toda a extensão do tumor.

4. A controvérsia quanto às características da fluorescência que aparecem em tecido sarcomatoso, exige mais estudos a fim de melhor caracterização da mesma.

5. O método fotográfico empregado para registro do efeito de fluorescência em nosso estudo da PDT, apesar de simples,exige aperfeiçoamento para melhor documentação.

Na extensa revisão bibliográfica realizada, com enfoques multidisciplinar sobre a PDT, pudemos constatar que essa nova modalidade de diagnóstico e tratamento do câncer, já utilizada em alguns países, está fundamentada em conceitos e princípios puramente científicos e não por um modismo sensacionalista, o que nos incentiva a continuar nesta linha de pesquisa, adequando cada vez mais o uso da PDT, de forma a introduzí-la como método de diagnóstico e, posteriormente, de tratamento em nosso meio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASTRO, D.J.; SAXTON, R.E.; FETTERMAN, H.R. et al. New concepts in photodynamic therapy with laser. In: FEE ,W.E. Jr.; GOEPFERT, H.; JOHN, M.E. et al. (eds). **Head and Neck Cancer**. Toronto, Decker, 1990. v.2. p.400-1.

2. FINSEN, N.R. **apud** WERTTHER. Ueber die Lichtbehandlung der Lupus mit der Finsen-Reynschen Lampe und die verwandten physikalishen Methoden. **Muench Med. Wochsch, 47**: 2044-6, 1903.

3. RAAB, O. Ueber die Wirkung fluoreszirenden Stoffe auf Infusorien . **Z. Biol., 39**: 524-46, 1900.

4. TAPPEINER, H. von. Ueber die Wirkung fluoreszirenden Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. **Muench Med. Wochsch., 47**: 1-5, 1900.

5. TAPPEINER, H. von & JESIONEK, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. **Muench Med. Wochsch., 1**: 2042-4, 1903

6. TAPPEINER, H. von & JODLBAUER, A. **Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen**. Leipzig. Vogel, 1907. 210 p.

7. HAUSMANN, W. Die sensibilisierende Wirkung tierischer Farbstoff und ihre physicologische Bedentung. **Wien. Klin. Wochsch., 21**: 1527-9, 1908.

8. MEYER-BETZ, F. Untersuchungen ueber die biologische (photodynamische) Wirkung des Haematoporphyrins und andere derivate des Blut-und-Gallenfarbstoffs. **Dtsch. Arch. Klin. Med., 112**: 476-503, 1913.

9. POLICARD, A. Etudes sur les aspectos offerts par des tumeur experimetales examinee a lumiere de woods. **Apud** DOUGHERTY (23).

10. AULER, H.& BANZER, G. Untersuchungen ueber die rolle der porphine bei geschwulstkranken meschen und tieren. **Z. Krebsforsch, 53**: 65-8, 1943.

11. FIGGE, F.H.J.; WEILAND, G.S.; MANGANIELLO, L.O.J. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. **Proc. Soc. exp. Biol. Med., 68**: 640-1. 1948.

12. FIGGE, F.H.J. & PECK, G.C. Cancer detection and therapy affnity of lymphatic tissue for hematoporphyrin. **Anat. Rec., 115**: 306-9, I953.

13. SCHWARTZ, S.K.; ABSOLON, H.; VERMUD, H. Some relationships of porphyrins, X-ray and tumors. **Bull. Minnesota Univ. Scholl Med., 27**: 7-23, 1955 **apud** 15.

14. LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **J. Nat. Cancer Inst.,26(1)**: 1-8, 1961

15. LIPSON, R.L. & BALDES, E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **Arch. Derm., 82**: 508-I6, 1960.

16. LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. Hematoporphyrin derivative: A new aid of endoscopic detection of malignant disease. **J. Thor. Card. Surg., 42**: 623-9, 1961.

17. LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. **Dis. Chest., 46**: 676-9, 1964.

18. LIPSON, R.L.; PRATT, J.H.; BALDES, E.J. Hematoporphyrin derivative for detection of cervical cancer. **Obstet. Gynec., 24:** 78-84, 1964.

19. LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; GRAY, M.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Cancer, 20(12)**: 2255-7, 1967.

20. GREGORIE, H.B. Jr.; HORGER, E.O.; WARD, J.L. et al. Hematoporphyrin derivative fluorescence in malignant neoplasms. **Ann. Surg., 167**: 820-8, 1968.

21. DIAMOND, I.; GRANELLI, S.G.; McDONAGH, A.F. et al. Photodynamic therapy on malignant tumors. **Lancet, 2**: 1175-7, 1972.

22. DOUGHERTY, T.J. Activated dyes as anti-tumor agents. **J. Natl. Cancer Inst., 51**: 1333-6, 1973.

23. DOUGHERTY, T.J.; WEISHAUPT, R.K.; BOYLE, D.G. Photodynamic therapy and cancer. In: DeVITA, V.T.; HELMAN, S.; ROSEMBERG, S.A. (eds). **Principles and practice of oncology**. Philadelphia. Lippincott, 1985.

24. DOUGHERTY, T.J.; GRINDEY, G.B.; FIEL, R. et al. Photoradiation therapy. II. Cure of cervical twins with hematoporhyrin and light. **J. Natl. Cancer Inst., 55** : 115-21, 1975

25. KELLY, J.F.; SNELL, M.E.; BERENBAUM, M. Photodynamic destruction of human bladder carcinomas. **Brit. J. Cancer , 31**: 237-44, 1975.

26. KELLY, J.F. & SNELL, M.E. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. **J. Urol., 155:** 150-1, 1976.

27. WILSON, B.C. & PATTERSON, M.S. The physic of photodynamic therapy. **Physics Med. Biol., 31**: 327-60, 1986.

28. DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res., 38**: 2628-35, 1978.

29. KINSEY, J.H.; CORTESE, D.A.; SANDERSON, D.R. Detection of hematoporphyrin fluorescence during fiber-optic bronchogenic carcinoma. **Mayo Clin Proc, 53**:594-600, 1978.

30. BALCHUM, O.J.; DORION, D.R.; PROFIO, A.E. et al. Fluorescence bronchoscopy for localizing early bronchial cancer and carcinoma **in situ. Rec. Cancer Res. 82**: 97-120, 1982.

31. BENSON, Jr.,R.C.; FARROW, G.M.; LINSEY, S.H. et al. Detection and localization on **in situ** carcinoma of the the bladder with hematoporphyrin derivative. **Mayo Clin. Proc., 57**: 548-50, 1982.

32. CORTESE, D.A. & KINSEY, J.H. Endoscopic management of lung cancer with hematoporphyrin derivative phototerapy. **Mayo Clin. Proc., 57**: 543-7, 1982.

33. HAYATA, Y.; KATO, H.; KONAKA, C. et al. Fiberoptic bronchoscopic photoradiation in experimentally induced canine lung cancer. **Cancer, 51:** 50-6, 1983.

34. TSUCHIYA, A.; OBARA, N.; MIWA, M. et al. Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the diagnosis and treatment of bladder cancer. **J. Urol., 130**: 79-82, 1983.

35. ABRAHÃO, M. & GOLDENBERG, S. Fotoradiação por laser e hematoporfirina no tratamento de tumores malignos. **Acta Cir. Bras., 1(3)**: 35-50, 1986.

36. ZEZELL, D.M. Hematoporfirina e derivados: propriedades ópticas e terapia fotodinâmica do câncer. Campinas, 1987. 91p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas.

37. ZEZELL, D.M. Processos de monitorização e otimização da terapia fotodinâmica de tumores. Campinas, 1991. 137p. Tese Doutorado - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas.

38. WEISHAUPT, K.R.; GOMER, C.J.; DOUGHERTY, T.J. et al. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. **Cancer Res., 36**: 2326-9, 1976.

39. KESSEL, D. Effects of photoactivated porphyrin at the cell surface of leukemis L1210 cells. **Biochemistry, 16**: 3443-7, 1977.

40. KOHN, K. & KESSEL, D. On the mode of cytotoxic action of photoactivated porphyrins. **Biochem. Pharmacol., 28**: 2465-70, 1979.

41. COPPOLA, A.; VIGGIANI, E.; SALZARULO, L. et al. Ultrastructural changes in lymphoma cells treated with hematoporphyrin and light. **Amer. J. Pathol., 99(1)**: 175-92, 1980.

42. FIEL, R.J.; GUPTA, N.D.; MARK, E.H. et al. Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. **Cancer Res., 41**: 3543-5, 1981.

43. BENSON, Jr., R.C.; KINSEY, J.H.; CORTESE, D.A. et al. Treatment of transitional cell carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative phototherapy. **J. Urol., 130**: 1090-4, 1983.

44. BERNS, M.W.; WILSON, M.; RENTZEPIS, P. et al. Cell biology of hematoporphyrin derivative (HpD). **Lasers Surg. Med., 2**: 261-6, 1983.

45. BELLNIER, D.A. & DOUGHERTY, T.J. Membrane lysis in Chinese hamster ovary cells treated with hematoporphyrin derivative plus light. **Photochem. Photobiol., 36**: 43-7, 1982.

46. GIROTTI, A.W. Photodynamic action of protoporphyrin IX on human erythrocytes: Cross-linking of membrane proteins. **Biochem. Biophys. Res. Com., 72**: 1367-74, 1976.

47. DUBBELMAN, T.M.A.R.; De GOEIJ, A.F.P.MM.; VAN STEVENINCK,J. Protoporphyrin-induced photodynamic effects on transport processes across the membrane of human erythrocytes. **Biochem. Biophys. Acta, 595**: 133-9, 1980.

48. BERNS, M.W.; DAHLMAN, A.; JOHNSON, F.M. et al. **In vitro** cellular effects of hematoporphyrin derivative. **Cancer Res., 42**: 2325-9, 1982.

49. MOAN, J.; JOHANNESSEN, J.V.; CHRISTENSEN, T. et al. Porphyrin sensitized photoinactivation of human cells **in vitro. Amer. J. Pathol., 109**: 184-92, 1982.

50. GIBSON, S.L. & HILF, R. Photosensitization of mitochondrial cytochrome C oxidase by hematoporphyrin derivative and related porphyrins **in vitro** and **in vivo**. **Cancer Res., 43**:4191-7, I983.

51. DAS, M.; DIXIT, R.; MUKHTAR, H. et al. Role of active oxygen species in the photodestruction of microsomal cytochrome p-450 and associated monooxigenases by hematoporphyrin derivative in rats. **Cancer Res., 45:** 608-15, 1985.

52. EVENSEN, J.F. & MOAN, J. Photodynamic action and chromosomal damage: a comparison of haematoporphyrin derivative (HpD)and light with X-irradiation. **Brit. J. Cancer, 45**: 456-65, 1982.

53. GOMER, C.J. DNA damage and repair in CHO cells following hematoporphyrin photoradiation. **Cancer Letters, 11**: 161-7, 1980.

54. MOAN, J.; WAKSVIK, H.; CHRISTENSEN, T. DNA single-strand breaks and sister chromatid exchanges induced by treatment with hematoporphyrin and light or by X-rays in human NHIK 3025 cells. **Cancer Res., 40**: 2915-8, 1980.

55. DUBBELMAN, T.M.A.R.; VAN STEVENINCK, A.L.; VAN STEVENINCK, J. Hematoporphyrin-induced photooxidation and photodynamic cross-linking of nucleic acids and their constituents. **Biochem. Biophys., Acta, 719**: 47-52, 1982.

56. BLAZEK, E.R.; HARIHARAN, P.V. Alkaline elution studies of hematoporphyrin photosensitized DNA damage and repair Chinese hamster ovary cells. **Photochem. Photobiol., 40**: 5-14, 1984.

57. BELLNIER, D.A. & DOUGHERTY, T.J. Haematoporphyrin derivative photosensitization and gama-radiation damage interaction in Chinese hamster ovary fibroblasts. **Int. Radiat. Biol., 50(4)**: 659-64, 1986.

58. LIN, G.S.; AL-DAKAN, A.A.; GIBSON, D.P. Inhibition of DNA and protein synthesis and cell division by photoactivated haematoporphyrin derivative in hamster ovary cells. **Brit. J. Cancer, 53**: 265-9, 1986.

59. KESSEL, D. & CHENG, M.L. Biological and biophysical properties of the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative. **Cancer Res., 45:** 3053-7, 1985.

60. HARPER, H.A. **Manual de química fisiológica**. México, Manual 1969. Cap. 6, p.69-80: Porfirinas e pigmentos biliares.

61. CLEZY, P.S.; HAI, T.T.; HENDERSON, R.W. et al. The chemistry of pyrrolic compounds XLV. Hematoporphyrin derivative: Hp diacetate as the main product of the reaction of Hp with a mixture of acetic and sulfuric acids. **Aust. J. Chem., 33**: 585-97, 1980.

62. DOUGHERTY, T.J.; LAWRENCE, G.; KAUFMAN, J.H. et al. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst., 62**: 231-7, 1979.

63. HENDERSON, R.W.; CHRISTIE, G.S.; CLEZY, P.S. et al. Hematoporphyrin diacetate: a probe to distinguish malignant from normal tissue by selective fluorescence. **Brit. J. exp. Path., 61**: 345-50, 1980.

64. MOMENTEAU, M.; ROPAS, C.; ROUGEE, M. Purification par chromatographic d'une hematoporphyrine commerciale. **J. Chem. Phys., 65**: 1637-9, 1968,

65. KESSEL, D. & CHOU, T.H. Tumor-localizing components of the porphyrin preparation hematoporphyrin derivative. **Cancer Res., 43**: 1994-99, 1983.

66. KESSEL, D. Determinants of hematoporphyrin-catalyzed photosensitization. **Photochem. Photobiol., 36**: 99-101, 1982.

67. EVENSEN, J.F.; SOMMER, S.; MOAN, J. et al. Tumor-localizing and photosensitizing properties of the main components of hematoporphyrin derivative. **Cancer Res., 44**: 482-6, 1984.

68. BERENBAUM, M.C.; BONNETT, R.; SCOURIDES, P.A. **In vivo** biological activity of the components of Haematoporphyrin derivative. **Brit. J. Cancer, 45**: 571-81, 1982.

69. BONNETT, R.; LAMBERT, C.; LAND, E.J. et al. The triplet and radical species of hematoporphyrin and some of its derivatives. **Photochem. Photobiol., 38**: 1-8, 1983.

70. COWLED, P.A.; FORBES, I.J.; SWINCER, A.G. et al. Separation and phototoxity **in vitro** of some of the component of hematoporphyrin derivative. **Photochem. Photobiol., 41**: 445-51, 1985.

71. MOAN, J. & SOMMER, S. Fluorescence and absorption properties of the components of the hematoporphyrin derivatives. **Photochem. Photobiophys., 3**: 93-103, 1981.

72. MOAN, J.; SANDERBERG, S.; CHRISTENSEN, T. et al. Hematoporphyrin derivative: chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. In: KESSEL, D. and DOUGHERTY, T.J. **Porphyrin properties**. New York, Plenum . 1983. p. 165-79.

73. KESSEL, D. **In vivo** fluorescence of tumors after treatment with derivatives of hematoporphyrin. **Photochem. Photobiol., 44(1)**: 107-8, 1986.

74. DOUGHERTY, T.J.; POTTER, W.R.; WEISHAUPT, K.R. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. In: DOIRON, D.R. (ed). **Porphyrin localization and treatment of tumors.** Alan . 1984, **apud** 36.

75. DOUGHERTY, T.J. Variability in Hematoporphyrin derivative preparations. **Cancer Res., 42**: 1188, 1982.

76. BERNS, M.W. Preface: Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy. **Lasers Surg. Med., 4:** 1-4, 1984.

77. ANDREONI, A. & CUBEDDU, R. Properties of the blue-shiftes emission of Hp and related derivatives in aqueous solution. **Chem. Phys. Lett., 100**: 503-7, 1983.

78. RICCHELI, F. & GROSSWEINER, L.I. Properties of a new state of hematoporphyrin in dilute aqueous solution. **Photochem Photobiol., 40:** 599-606, 1984.

79. MOAN, J, Porphyrin sensitized photodynamic inactivation of cells: a review. **Laser Med. Scien., 1**: 11, 1986.

80. CHANG, C.T. & DOUGHERTY, T.J. Photoradiation therapy: kinetics of thermodynamics of porphyrin uptake and loss in normal and malignant cells in culture. **Radiat. Res., 74**: 498-9, 1978.

81. MOAN, J.; STEEN, H.B.; FEREN, K. et al. Uptake of hematoporphyrin derivative and sensitized photoinactivation of C3H cells with different oncogenic potential. **Cancer Letters, 14**: 291-6, 1981.

82. HENDERSON, B.W.; BELLNIER, D.A.; ZIRING, B. et al. Aspects of the cellular uptake and retention of hematoporphyrin derivative and their correlation with the biological response to PRT **in vitro**. In: KESSEL, D.; DOUGHERTY, T.J. (eds). **Porphyrin photosensitization.** New York, Plenum, 1983. p.129.

83. CHRISTENSEN, T.; SANDQUIST, T.; FEREN, K. et al. Retention and photodynamic effects of hematoporphyrin derivative in cells after prolonged cultivation in the presence of porphyrin. **Brit. J. Cancer, 48:** 35-43, 1983.

84. ANDREONI, A.; CUBEDDU, R.; De SILVESTRI, S. et al. Effects of laser irradiation on hematoporphyrin-treated normal and transformed thyroid cells in culture. **Cancer Res., 43:** 2076-80, 1983.

85. DOUGHERTY, T.J.; THOMA, R.E.; BOYLE, D.G. et al. Interstitial photoradiation therapy for primary solid tumors in pet, cats and dogs. **Cancer Res., 41**: 401-4, 1981.

86. BUGELSKI, P.J.; PORTER, C.W.; DOUGHERTY, T.J. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. **Cancer Res., 41**: 4606-12, 1981.

87. PROFIO, A.E.; DOIRON. D.R.; KING, E.G. Laser fluorescence bronchoscopy for localization of occult lung tumors. **Med. Phys., 6:** 523-5, 1979.

88. DOIRON, D.R.; PROFIO, E.; VINCENT, R.G. et al. Fluorescence bronchoscopy for detection of lung cancer. **Chest, 76**: 27-31, 1979.

89. WILE, A.G.; DAHLMAN, A.; BURNS, R.G. et al. Laser photoradiation therapy of cancer following hematoporphyrin sensitization. **Lasers Surg. Med., 2**: 163-8, 1982.

90. HAYATA, Y.; KATO, H.; KONAKA, C. et al. Hematoporphyrin derivate an laser photoradiation in the treatment of lung cancer. **Chest, 81**: 269-77, 1982,

91. BALCHUM. O.J.; DOIRON, D.R.; HUTH, G.C. Photoradiation therapy of endobronchial lung cancers employing the photodynamic action of hematoporphyrin derivative. **Lasers Surg. Med., 4**: 13-30, 1984.

92. HAYATA, Y.; KATO, H.; KONAKA, C. et al. Photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative in early and stage I lung cancer. **Chest, 86**: 169-77, 1984.

93. VINCENT, R.G.; DOUGHERTY, T.J.; RAO, U. et al. Photoradiation therapy in advanced carcinoma of the trachea and bronchus. **Chest., 85**: 29-33, 1984.

94. McCAUGHAN, Jr., S. Process in photoradiation treatment of cancer following administration of HpD. **Laser Focus**, 44-56, 1983.

95. FORBES, I.J.; COWLED, P.A.; LEONG, A.S. et al. Phototherapy of human tumours using haematoporphyrin derivative. **Med. J. Aust., 2:** 489-91, 1980.

96. WARD, B.G.; FORBES, I.J.; COWLED, P.A. et al. The treatment of vaginal recurrences of gynecologic malignancy with phototherapy following hematoporphyrin derivative pretreatment. **Amer. J. Obstet. Gynecol., 142(3)**: 356-7, 1982.

97. SOMA, H.; AKIYA, K.; NUTAHARA, S. et al. Treatment of vaginal carcinoma with laser photoirradiation following administration of haematoporphyrin derivative. Report a case. **Ann. Chir. Gyn., 71**: 133-4, 1982.

98. KINSEY, J.H.; CORTESE, D.A.; NEEL, H.B. Thermal considerations in murine tumor killing using hematoporphyrin derivative phototherapy. **Cancer Res., 43**: 1562-7, 1983.

99. KELLER, G.S.; DOIRON, D.R.; FISHER, G.U. Photodynamic therapy in otolaryngology-head and neck surgery. **Arch. Otolaryngol., 111**: 758-61, 1985.

100. GLUCKMAN, J.L. & WEISLER, M.C. Role of photodynamic therapy in the management of early cancers of the upper aerodigestive tract. **Laser Med. Scien., 1:** 217-9, 1986.

101. PUTTEN, W.J.M. van der & GEMERT, M.J.C. van. A modelling approach to the detection of subcutaneous tumours by haematoporphyrin-derivative fluorescence. **Phys. Med. Biol., 28(6)**: 639-45, 1983.

102. PUTTEN, W.J.M. van der & GEMERT, M.J.C. van. Haematoporphyrin-derivative **in vitro** and in an animal tumour. **Phys. Med. Biol., 28(6):** 633-8, 1983.

103. LANZAFAME, R.J.; BLACKMAN, J.R.; ROGERS, D.W. et al. Hematoporphyrin derivative fluorescence: photographic techniques for the localization of malignant tissue. **Lasers Surg. Med., 6:** 328-35, 1986.

104. HOUSSAY, B.A.; BARCIA, R.C.; COVIAN, M.R. et al. **Fisiologia Humana**. 4 ed. Buenos Aires, "El Ateneo", 1973. Cap. 93, p. 1202-51: La vision.

105. GOMER, C.J.; FERRARIO, A.; HAYASHI, N. et al. Molecular, cellular, and tissue responses following photodynamic therapy. **Lasers Surg. Med., 8**: 450-63, 1988.

8. ANEXOS

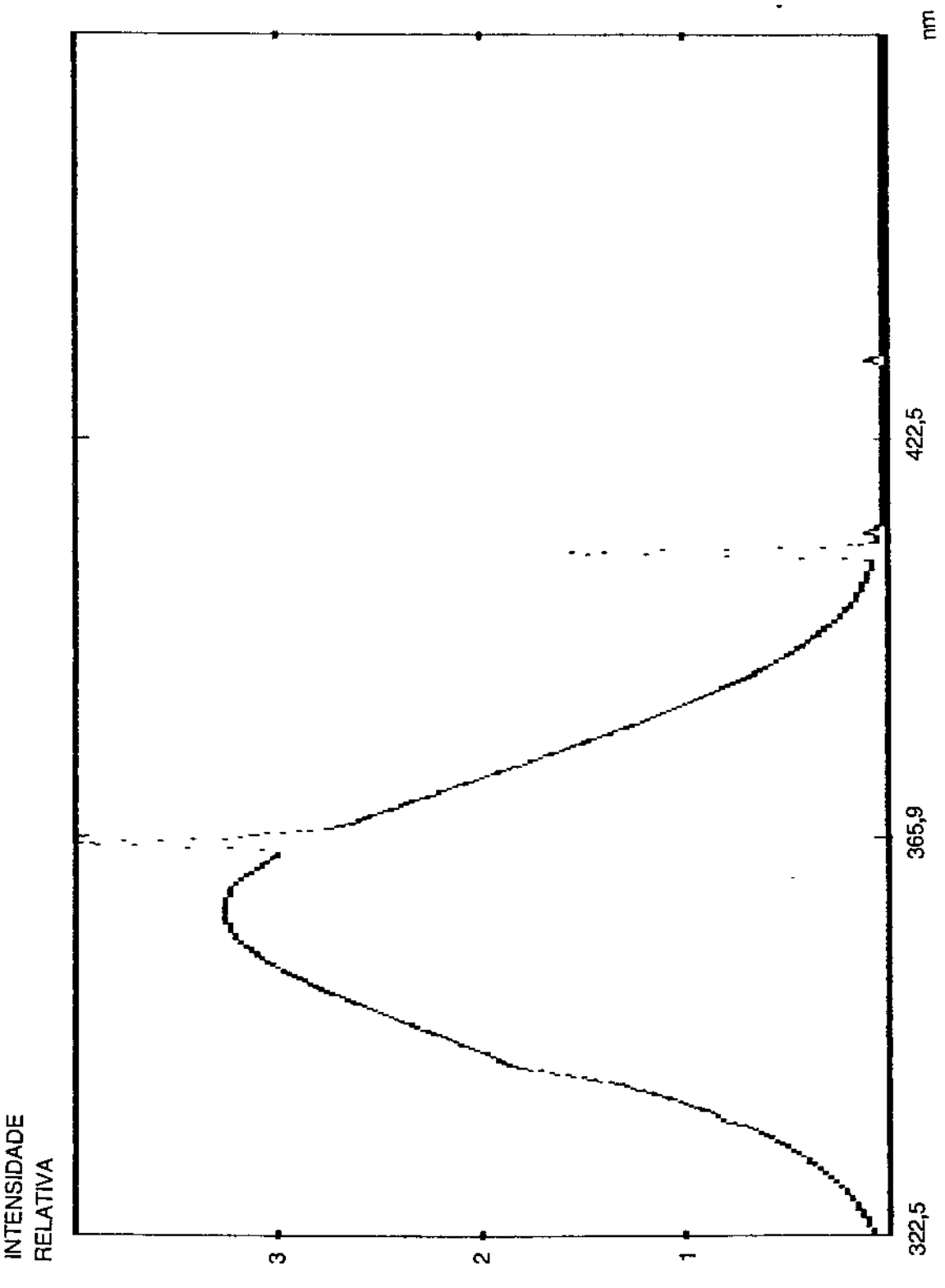
Anexo I

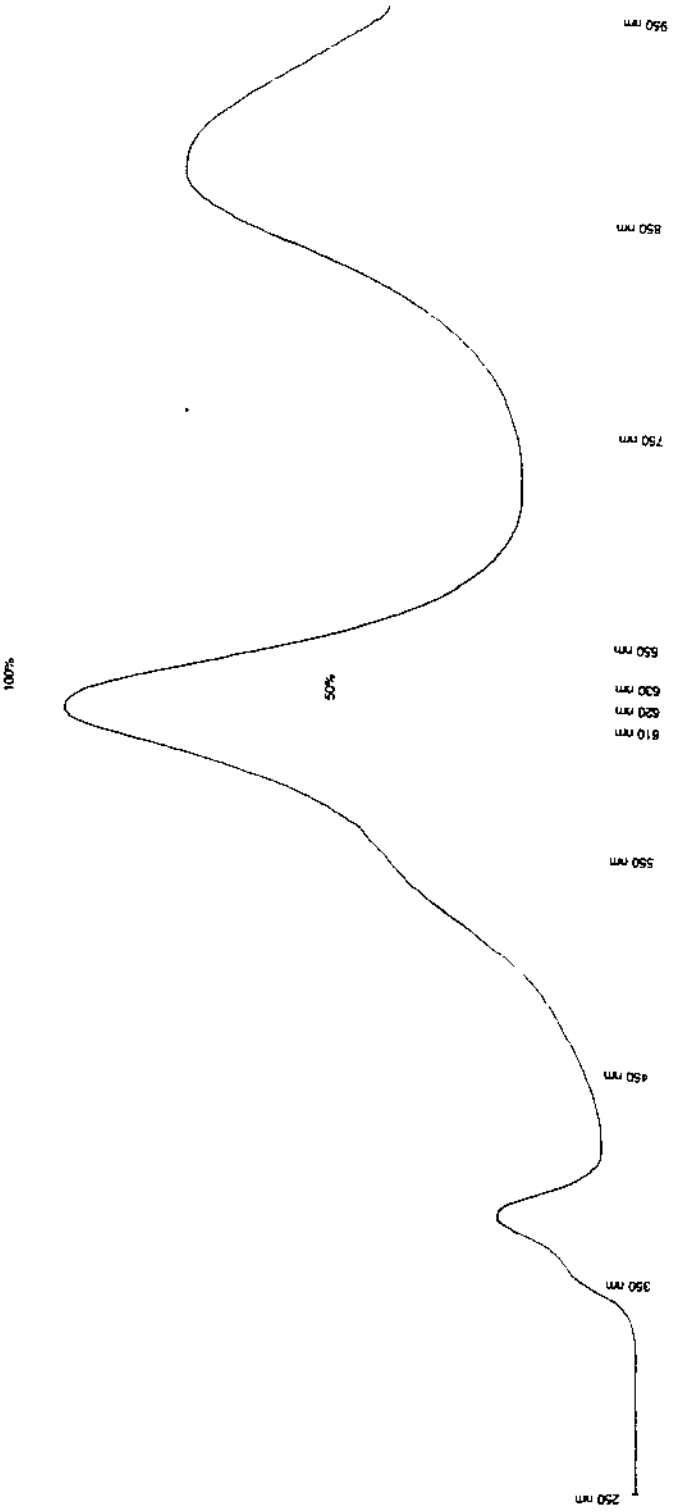
UNIDADES DE COMPRIMENTOS DE ONDA

UNIDADE	Equivalente em Centímetros
Å = Ângstron	10^{-8}
nm = nanômetro	10^{-7}
µm = micrômetro	10^{-4}
mm = milímetro	10^{-1}

Anexo II

Espectro de emissão da lâmpada de luz ultravioleta



ANEXO III

Espectro de transmissão do filtro de banda passante centrada em 620nm