

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Raquel Ferreira Rego**

*Estudo comparativo de precursores da Protoporfirina IX  
(ALA e MAL) utilizados topicamente em Terapia  
Fotodinâmica*

**São Carlos - SP**

**2008**

**Raquel Ferreira Rego**

***Estudo comparativo de precursores da Protoporfirina IX  
(ALA e MAL) utilizados topicamente em Terapia  
Fotodinâmica***

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

**Orientadores:** Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira  
Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

**São Carlos - SP**

**2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R343ec

Rego, Raquel Ferreira.

Estudo comparativo de precursores da *PpIX* (ALA e MAL) utilizados topicamente em terapia fotodinâmica / Raquel Ferreira Rego. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
89 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Protoporfirina. 3. Ácido aminolevulínico. 4. Metil aminolevulinato. 5. Necrose. 6. Tecido hepático. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

## **Dedicatória**

À minha mãe Lucinda Leite Ferreira por abdicar dos seus sonhos em prol dos meus.

À minha avó, que infelizmente não pode acompanhar o desfecho desse trabalho, mas que sempre me deu força e ensinou-me a ter paciência pra nunca desistir.

E ao meu namorado Fernando Antonio de Faria pela compreensão, apoio e incentivo e por estar sempre ao meu lado torcendo pelo meu sucesso.

Amo muito vocês!!!

“A grandeza não consiste em receber  
honras, mas em merecê-las.”  
(Aristóteles)

## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo-Moreira, por estar sempre presente me ajudando a superar todas as dificuldades e por ser um grande amigo, e Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, por me amparar naquele momento crucial e dar-me uma oportunidade tão valiosa de poder fazer parte do seu grupo.

À Dra. Juliana Ferreira pela verdadeira ajuda, paciência e dedicação, que foram fundamentais para realização deste trabalho, por todos os ensinamentos que me passou.

À Dra. Natalia M. Inada pela contribuição preciosa na análise mitocondrial, na realização dos experimentos e na finalização do trabalho.

À Dra. Cristina Kurachi pela enorme colaboração enquanto a Juliana esteve ausente.

Aos amigos Clóvis e José Dirceu pela prestatividade em me auxiliar nas dificuldades.

À Maristella pela amizade e por dedicar parte do seu precioso tempo às minhas lâminas.

À Priscila pela colaboração na preparação do ALA.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zuccolotto pela colaboração no preparo das lâminas e na análise histológica.

A todos os amigos do laboratório que me acolheram com carinho.

Aos colegas do PPGBiotech pela companhia agradável neste período.

Ao Mauro, secretário do PPGBiotech por todos os serviços prestados com grande eficiência.

Aos meus irmãos Renata, Rochelle e Bill pela compreensão e paciência diante dos meus momentos de estresse.

Aos meus avós Antônio Ferreira Neto, Antônio do Rego e Gracia Bucheme do Rego pelo exemplo de determinação e de vida.

As meninas que moraram comigo, Valéria Ghislotti Yared e Natália Cerântola por terem sido sempre grandes amigas.

E, principalmente, a Deus por todas as oportunidades que me proporcionou e por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas no meu caminho.

Valeu Deus!!!

## Resumo

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica para tratamento de tumores que provoca a destruição do tecido alvo através da combinação de uma droga (fotossensibilizador) e uma fonte de luz na presença de oxigênio molecular. Na ausência de algum desses componentes, o efeito citotóxico não é observado. Desde 1990, têm-se estudado a aplicação tópica de substâncias precursoras da protoporfirina IX (PpIX) associada à TFD, como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e o metil aminolevulinato (MAL). O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo *in vivo* entre duas substâncias precursoras da PpIX, o ALA (ácido 5-aminolevulínico - ALA) da Rússia e o Metvix (metil aminolevulinato - MAL) do Reino Unido. Foram realizados experimentos em animais para analisar o desempenho fotodinâmico ALA e pelo MAL em fígado de ratos. Os espectros de fluorescência do fígado foram coletados em tempos pré-determinados. O tempo de acúmulo da PpIX observado foi de 2 horas e 45 minutos para o ALA e 4 horas para o MAL após a aplicação da droga no fígado. A formação, acúmulo e a profundidade de penetração da PpIX no tecido hepático foram determinados através da espectroscopia de fluorescência. Utilizando um total de 21 animais foi realizada a irradiação do fígado fotossensibilizado com ALA ou com MAL isoladamente com diferentes doses de luz (20, 50, 100 e 200J/cm<sup>2</sup>) ou na forma combinada MAL + ALA a 8%, 16 e 32% com dose de 100J/cm<sup>2</sup>. Trinta horas após a iluminação, os animais foram mortos e os fígados removidos. A área necrosada do fígado foi avaliada macroscopicamente e as amostras foram preparadas para o estudo histológico, considerando, principalmente, os aspectos e a profundidade da necrose. Na análise histológica realizada foram observados vários aspectos da necrose e da região normal do fígado. As profundidades de necrose foram medidas e a dose limiar obtida utilizando-se um modelo matemático proposto na literatura. Além disso, foi realizado o monitoramento do consumo de O<sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas de fígados de ratos, após administração tópica dos medicamentos precursores da PpIX (ALA e MAL) afim de verificar a influência dessas substâncias na bioenergética mitocondrial. Os resultados obtidos mostraram uma maior penetrabilidade do MAL no tecido, bem como uma maior profundidade de necrose quando comparado ao ALA. Esses resultados sugerem que o MAL possui uma tendência a melhor resposta fotodinâmica que o ALA para os critérios estudados.

**Palavras-Chave:** TFD, ALA, MAL, aplicação tópica, necrose, fígado.

## Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a modality for treatment of tumors, and uses a combination of a drug (photosensitizer) and light in the presence of the molecular oxygen to selectively damage target tissue. In the absence of one of these components, the cytotoxic effect is not observed. Since 1990, many works in the literature study the topical application of precursors of protoporphyrin IX (PpIX) in PDT, such as 5-aminolevulinic acid (ALA) and methyl aminolevulinate (MAL). The purpose of this work was to realize a comparative study *in vivo* between two commercial and available drug precursors of PpIX, the ALAsense (5-aminolevulinic acid - ALA) from Russia and Metvix (methyl aminolevulinate - MAL) from the United Kingdom. Experiments were carried out in animals to analyze the performance and the ALA photodynamic MAL in the liver of rats. The fluorescence spectra of the liver were collected at pre-determined times. The time of accumulation of PpIX was observed by 2 hours and 45 minutes for the ALA and MAL for 4 hours after application of drugs in the liver. The formation, accumulation and depth of penetration of PpIX in liver tissue were determined by fluorescence spectroscopy. Using a total of 21 animals, the irradiation of the liver was sensitized with ALA or MAL alone with different doses of light (20, 50, 100 and 200 J/cm<sup>2</sup>) or in a combination MAL + ALA to 8%, 16% and 32% dose of 100 J/cm<sup>2</sup>. Thirty hours after the lighting, the animals were killed and livers removed. The area of necrosis of the liver was assessed macroscopically and the samples were prepared for histological study, considering especially the aspects and depth of necrosis. In histological analysis, many aspects of necrosis and the normal liver were carried out. The depths of necrosis were measured and the threshold dose obtained using a mathematical model proposed in the literature. Moreover, the monitoring was carried out of O<sub>2</sub> consumption of mitochondria isolated from livers of rats, after topical administration of drug precursors of PpIX (ALA and MAL) in order to check the influence of these substances in mitochondrial bioenergetics. The results showed a higher penetration of MAL in the tissue, as well as greater depth of necrosis when compared to the ALA. These results suggest that MAL has a tendency to a better photodynamic response than ALA to the criteria studied.

**Key-Words:** PDT, ALA, MAL, Topical Application, necrosis, liver.

## Lista de Figuras

Figura 1: Efeito da Irradiação da luz no FS dentro das células. ....	19
Figura 2: Esquema representando a ativação do agente fotossensibilizador pela luz. ....	20
Figura 3: Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração da luz de diferentes comprimentos de onda. ....	26
Figura 4: Estrutura química da PpIX. ....	27
Figura 5: Espectro de absorção ótica dos HpD. ....	27
Figura 6: Estruturas Químicas do ALA (A) e do MAL (B). ....	29
Figura 7: Esquema da via de Biossíntese do Heme Celular. ....	30
Figura 8: Alojamento dos animais montado no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica no IFSC – USP/São Carlos. ....	37
Figura 9: Foto do Sistema de Diagnóstico (A) e desenho esquemático das partes constituintes (B). ....	38
Figura 10: Fonte de luz utilizada para a TFD. Laser de Diodo em 630 nm utilizado para excitação das porfirinas e derivados de hematoporfirinas. ....	39
Figura 11: Microscópio (com os micrômanipuladores acoplados) utilizado na pesquisa. ....	39
Figura 12: Imagem das drogas precursoras da PpIX utilizadas. ALA (A) e MAL - Metvix <sup>®</sup> (B). ....	40
Figura 13: Esquema representando a coleta da fluorescência do fígado na superfície (A) e em cada fatia cortada transversalmente nas profundidades 1, 2 e 3 (B). ....	42
Figura 14: Iluminação do fígado de um animal fotossensibilizado mostrando a delimitação da área iluminada com uma máscara de papel laminado envolto por gaze com um orifício de 1.0 x 1.0 cm. ....	44
Figura 15: Analogia com uma lâmina histológica, explicando a maneira na qual foram obtidas as medidas da profundidade de necrose do fígado. ....	45
Figura 16: Espectro de autofluorescência do fígado. Em 1 observa-se um pico referente a reflexão da luz no fígado e em 2 a emissão da autofluorescência na região do vermelho. ....	51
Figura 17: Espectros típicos de fluorescência coletados após a aplicação tópica da droga precursora da PpIX no fígado. Observa-se uma curva característica da emissão de fluorescência pela substância fotossensibilizadora, sendo que há uma variação da intensidade emitida com o tempo. ....	52
Figura 18: Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX para o ALA. ....	53
Figura 19: Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX para o MAL. ....	54
Figura 20: Espectros de Fluorescência emitidos pela PpIX quando concentrações crescentes do ALA foram incorporadas ao MAL. ....	56
Figura 21: Intensidade de fluorescência média obtida antes da irradiação do fígado com o laser. ....	57
Figura 22: Picos máximos dos espectros de fluorescência coletados na superfície do tecido hepático após 4 horas da aplicação do MAL e das drogas combinadas. ....	58
Figura 23: Espectros de Fluorescência coletados após 2 horas e 45 minutos da aplicação do ALA o fígado. Houve maior formação de PpIX na superfície e decaiu com a penetração no tecido. ....	58
Figura 24: Gráfico da Amplitude de fluorescência versus profundidade do fígado para o ALA. ....	60
Figura 25: Espectros de Fluorescência coletados após 4 horas da aplicação do MAL no fígado. A formação de PpIX foi maior na superfície e decaiu com o aumento da profundidade. ....	60

Figura 26: Gráfico da Amplitude de fluorescência <i>versus</i> profundidade do fígado para o MAL .....	61
Figura 27: Gráfico da profundidade de necrose <i>versus</i> Fluência para o ALA .....	62
Figura 28: Gráfico da profundidade de necrose <i>versus</i> Fluência para o MAL.....	63
Figura 29: Gráfico da profundidade de necrose <i>versus</i> Concentração do ALA incorporado ao MAL submetidos à TFD com dose de luz de 100J/cm <sup>2</sup> .....	64
Figura 30: Esquema de iluminação no fígado: (A) representa a luz incidindo perpendicularmente no fígado; (B) representa o espalhamento da luz no tecido; e (C) a necrose no tecido hepático.....	64
Figura 31: A dose limiar encontrada para o MAL foi inferior a obtida para o ALA, ou seja, o MAL necessita de uma dose de luz menor para provocar necrose hepática .....	68
Figura 32 A e B: Fotomicrografias de fígado de rato, w-cortes transversais corados com HE, aumentados em 100x (A) e (B) . Necrose do tecido hepático com regiões de tecido normal ao redor do espaço porta .....	70
Figura 33: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Transição do tecido hepático normal e necrosado, presença de áreas preservadas na periferia dos espaços portais na região necrosada e células saculiformes no tecido normal.....	71
Figura 34: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Presença de hemácias indicando congestão e pontos hemorrágicos .....	72
Figura 35: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico .....	72
Figura 36: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Necrose da veia centrolobular .....	73
Figura 37: Esquema representando os “estados respiratórios” 3 e 4 e a determinação do controle respiratório mitocondrial (C.R.). .....	75
Figura 38: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca <sup>2+</sup> e EROs na membrana mitocondrial interna. ....	77
Figura 39: Redução no controle respiratório provocada pelo ALA e MAL aplicados topicamente em fígados de ratos .....	79
Figura 40: Razão ADP/O não foi alterada pela aplicação tópica do ALA e do MAL no fígado.....	79
Figura 41: Velocidade (V3) não foi significativamente modificada pela presença da PpIX no fígado. ....	80
Figura 42: Velocidade de repouso (V4) aumentou significativamente em relação ao grupo controle na presença presença da PpIX no tecido hepático, .....	81

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Parâmetros de Irradiação.....	43
-----------------------------------------	----

## Lista de Símbolos e Abreviações

ADP	Adenosina Difosfato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ANT	Translocador de Nucleotídeos de Adenina
ATP	Adenosina Trifosfato
CBC	Carcinoma Basocelular
CyD	Ciclofilina D
C.R.	Controle Respiratório
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DLI	Drug Light Interval
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
FSs	Fotossensibilizadores
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Redutase (estado oxidado)
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
HpD	Derivados de Hematoporfirina
ISC	Cruzamento Intersistema
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LDL	Proteína de Baixa Densidade
LED	Light Emitting Diode
MAL	Metil aminolevulinato
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
MnSOD	Mn-superóxido dismutase
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
Pi	Fosfato Inorgânico
PpIX	Protoporfirina IX
RCR	Respiratory Control Ratio
PTPM	Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial
SH	grupos Tiólicos
TFD	Terapia Fotodinâmica
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
TPx	Tioredoxina Peroxidase
TH	Transhidrogenase
TSH	Tioredoxina (estado reduzido)
TSST	Transhidrogenase (estado oxidado)
TR	Tioredoxina Redutase
V3	Velocidade de Respiração do Estado 3

V4	Velocidade de Respiração do Estado 4
VDAC	Canal Iônico Voltagem-Dependente
$\lambda$	Comprimento de onda
nm	nanômetros

# Sumário

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Lista de Símbolos e Abreviações**

**Sumário**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Histórico .....	16
1.2 Mecanismos de Ação.....	18
1.3 Mitocôndrias.....	21
1.4 Morte Celular.....	22
1.5 Substâncias Fotossensibilizadoras .....	24
1.5.1 Derivados de Hematoporfirina .....	26
1.5.2 ALA e MAL .....	28
1.6 Farmacocinética.....	32
1.7 Dosimetria .....	33
1.8 Fonte de Luz .....	34
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Animais.....	37
3.2 Sistema de detecção óptica por Espectroscopia de Fluorescência .....	38
3.3 Fonte de Luz .....	38
3.4 Análise histológica .....	39
3.5 Fotossensibilizadores.....	40
3.6 Preparação dos Animais .....	41
3.7 Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX .....	41
3.8 Avaliação Indireta da penetração do medicamento no fígado.....	42
3.9 Terapia Fotodinâmica .....	43
3.10 Preparo do Material para análise histológica.....	44
3.11 Estudo da Necrose .....	45
3.11.1 Morfometria do tecido hepático .....	45
3.11.2 Processamento dos dados da Necrose .....	45
3.11.3 Cálculo da Dose Limiar para profundidade de necrose.....	45
3.12 Análise Mitocondrial .....	47
3.12.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	48
3.12.2 Dosagem de proteína .....	48
3.12.3 Condições experimentais.....	48
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1 Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX .....	50
4.2 Combinação MAL+ALA.....	55
4.3 Avaliação Indireta da Penetração do Medicamento no Fígado .....	59
4.4 Estudo da Necrose .....	62
4.4.1 Microscopia da Necrose .....	69
4.5 Análise Mitocondrial .....	73
4.5.1 Controle Respiratório Mitocondrial .....	74

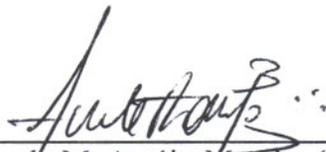
4.5.2 Velocidade de Consumo de O <sub>2</sub> (V3 e V4) .....	76
4.5.3 O Fenômeno de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) .....	69
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>

**RAQUEL FERREIRA REGO**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

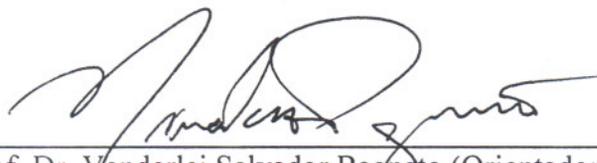
**Aprovado em: 08/08/2008**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira (Orientador)  
Universidade Federal de São Carlos - DF/UFSCar



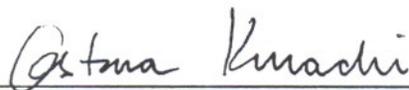
---

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (Orientador)  
Instituto de Física – USP – São Carlos



---

Prof. Dr. Iouri Borissevitch  
Departamento de Física – USP – Ribeirão Preto



---

Prof. Dra. Cristina Kurachi  
Instituto de Física – USP – São Carlos

---

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto  
Univ. Federal de São Carlos – Departamento de Fisioterapia

## 1. INTRODUÇÃO

Embora conhecido haja muitos séculos, somente nas últimas décadas o câncer vem ganhando uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Esta doença atinge cerca de dez milhões de indivíduos em todo o mundo. O relatório mundial de câncer, de três de abril de 2003, da Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) alerta que a incidência dessa doença pode aumentar em 50%, resultando em aproximadamente 15 milhões de casos em 2020 [1].

No Brasil, a partir dos anos 60, o câncer passou a ser a terceira maior causa de mortes por doença, representando 11,84% do total dos óbitos registrados no país. Estimativas para o ano de 2006 indicavam que o principal tipo a acometer a população brasileira seria o câncer não melanóico de pele, seguido pelo carcinoma da mama feminina, pulmão, estômago e colo do útero [2].

Atualmente, os recursos mais utilizados para o tratamento oncológico são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser usados de forma isolada ou combinada. Embora essas terapias tenham mostrado eficiência, principalmente quando a doença é detectada nos seus estágios iniciais, apresentam muitos efeitos colaterais, como alopecia (queda de cabelo), alterações gastrointestinais (vômito, diarreia, náuseas), adinamia (prostração física) e imunodepressão [1]. Além disso, muitos casos têm como única opção a cirurgia radical, comprometendo a função e a anatomia do órgão ou região residual [3]. Devido, tanto à gravidade dos efeitos colaterais, quanto às limitações dessas terapias convencionais, alternativas estão sendo estudadas para o tratamento do câncer [4]. Uma nova técnica que vem crescendo vertiginosamente nos últimos anos é a Terapia Fotodinâmica (TFD).

Essa técnica apresenta várias vantagens sobre os métodos tradicionais de tratamento de neoplasias. Dentre elas podem-se citar: dano seletivo às células tumorais, ausência de intervenções cirúrgicas, possibilidade de repetição do procedimento quantas vezes forem necessárias, efeitos colaterais mais controlados e menos adversos. Outra vantagem é que, uma vez sensibilizado, o paciente pode ser submetido ao diagnóstico por fluorescência

para detecção tumoral. Além disso, o procedimento em geral é ambulatorial, não requerendo internação do paciente e em muitos casos pode ser realizada sem medicação anestésica [3].

Devido a todos esses fatores entre outros, hoje, praticamente não há nenhum centro de tratamento oncológico nos países desenvolvidos que não disponha de uma infraestrutura para a TFD. Inúmeros resultados apresentados em todo mundo, comprovam de forma irrefutável a eficácia desta terapia [3].

A TFD é uma técnica utilizada para tratamento oncológico e outras condições clínicas, baseada na aplicação de um fotossensibilizador (FS) que se acumula nas células neoplásicas e quando iluminado por uma fonte de luz de comprimento de onda específico provoca uma reação química com o oxigênio molecular gerando espécies reativas do oxigênio que são altamente tóxicas para os constituintes celulares e, portanto, responsáveis pela destruição tecidual [5].

O tratamento com TFD pode ser útil em qualquer patologia que envolva tecidos de crescimento rápido, como é o caso das doenças cardiovasculares (tratamento de arteriosclerose), em doenças de pele (psoríase, queratose solar), no campo da oftalmologia (degeneração macular relacionada à idade), artrite reumatóide sistêmica, restenoses, micoses fúngicas, infecções bacterianas, verrugas e AIDS [4, 6, 7].

## 1.1 Histórico

Há mais de 4.000 anos atrás, países como a Índia, China e Egito utilizavam-se do princípio da TFD, através da ingestão de plantas (contendo psoralenos, furo [3,2-g]-coumarina ou ácido 6-hidróxi-5-benzofurano-acrílico  $\delta$ -lactona) associada à exposição à radiação solar, para o tratamento de patologias, como o vitiligo [8, 9].

No início do século XX, Oscar Raab [10], um estudante de medicina alemão, observou que o corante acridina laranja na presença de luz solar era letal para o *Paramécio caudatum*. Em 1900, Heron Herman Von Tappeiner[11], diretor do Instituto de Farmacologia da Universidade de Munique, publicou um artigo sobre a descoberta de Raab relatando que o consumo de certos materiais fluorescentes poderia ter aplicações clínicas, predizendo assim, aplicações fotoquimioterapêuticas de sensibilizadores fotodinâmicos.

Em 1901, Finsen ganhou o prêmio Nobel pelo seu feito de tratar lupus vulgaris com o auxílio de uma lâmpada de arco-carbono (constituída de dois eletrodos de carbono conectados a um terminal de corrente elétrica e separados por poucos milímetros) e um filtro para radiação infravermelha [12].

Porém, foram Von Tappeiner & Jesionek [13] que realizaram as primeiras experiências visando aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de tumores cutâneos, condilomas planos e lúpus vulgaris, empregando eosina como fotossensibilizador e, a partir daí, introduziram o termo “reação fotodinâmica” para descrever reações tissulares dependentes de oxigênio, secundárias a fotossensibilização e a irradiação com luz.

Hausman [14] foi o primeiro a usar hematoporfirina em estudos de ação fotodinâmicas nos quais reportou a destruição de paramécios e células vermelhas do sangue, descrevendo os sintomas de sensibilidade em ratos quando expostos a luz.

Mais tarde, Policard [15] relatou a existência de uma fluorescência avermelhada em certos tumores malignos de animais, atribuindo-a ao acúmulo de porfirinas endógenas em tais tumores, devido a uma infecção secundária por bactérias hemolíticas. As porfirinas são atóxicas, mas na presença de luz visível e oxigênio apresentam-se altamente tóxicas ao tecido celular.

Na década de 50, Schwartz mostrou que, nos experimentos realizados por Meyer-Betz para identificar substâncias fototóxicas bioendogênicas, o princípio ativo não estava relacionado ao estado monomérico da hematoporfirina (pois esse composto é facilmente eliminado pelo organismo), mas, na realidade, tratava-se de uma mistura de diversas substâncias oligoméricas provenientes do método original de síntese e isolamento a partir do sangue [16]. Schwartz enriqueceu a mistura e a denominou de derivados de hematoporfirina (HpD).

No final dos anos 60, Lipson [17] relatou que o uso desses HpD com irradiação seletiva do tumor com luz visível foi eficaz no tratamento de câncer de mama e metástase na região torácica.

Em meados da década de 70, Weishaupt *et al.* [18] reportaram que o agente citotóxico responsável pela morte de células tumorais era o oxigênio singlete, gerado por sensibilização a partir da transferência de energia do agente fototerapêutico no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular no estado fundamental. A partir desses achados, foi

proposto que o tratamento fotodinâmico deveria ser sumarizado em duas etapas. Na primeira, o tecido maligno é iluminado com laser em comprimento de onda específico, excitando as moléculas do derivado de hematoporfirina, presentes no tecido, que passam do estado fundamental para um determinado estado excitado singleto e com o decaimento é observada a fluorescência do tecido na região do vermelho ( $\lambda = 600$  nm), possibilitando a detecção e delineamento do neoplasma. Na segunda etapa, o tecido é iluminado com um laser emitindo radiação vermelha ( $\lambda = 620$  nm), que excita as moléculas do derivado de hematoporfirina. Estas, por sua vez, são levadas mediante cruzamento intersistemas ao estado excitado tripleto. Uma vez no estado tripleto, essas moléculas poderão transferir a energia de excitação às de oxigênio, levando a formação do oxigênio singleto, que será um dos responsáveis pela destruição tecidual [19].

O uso clínico da TFD foi feito pela primeira vez por Dougherty *et al.*[20], em 1978, com relato de sucesso no tratamento de câncer cutâneo e outras malignidades.

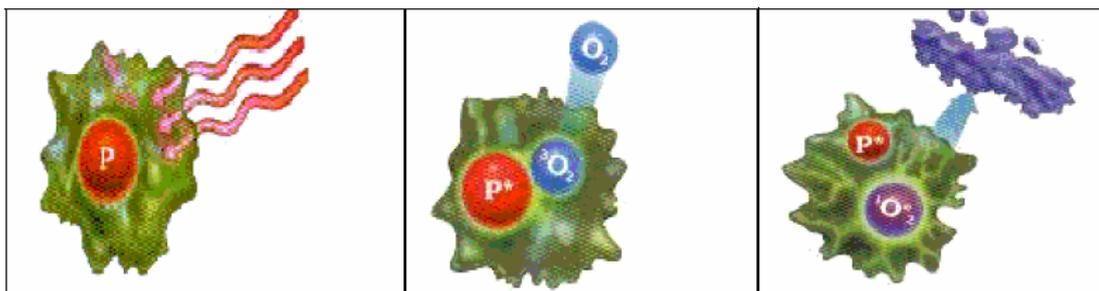
Desde então, a terapia fotodinâmica tem sido amplamente estudada como uma modalidade de tratamento não-cirúrgico de grande aceitação para vários tipos de tumores e outras condições clínicas.

Na década passada, Kennedy *et al.*[21], deram novo impulso a TFD com a introdução do ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seus ésteres, substâncias precursoras da protoporfirina IX, que é uma porfirina endógena.

## 1.2 Mecanismos de Ação

Na TFD o FS é administrado ao paciente, sendo aguardado o tempo para atingir seletivamente o tecido alvo com máximo acúmulo [22]. Posteriormente, o tecido é irradiado por luz de comprimento de onda específico [23].

Essa interação da luz em comprimento de onda específico, ativa o fotossensibilizador presente nos tecidos, transferindo energia para o oxigênio molecular resultando em espécies reativas do oxigênio, entre elas o oxigênio singleto, que induzem a morte das células [24] (Figura 1).

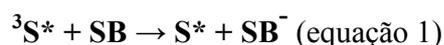


**Figura 1: Efeito da Irradiação da luz no FS dentro das células [25].**

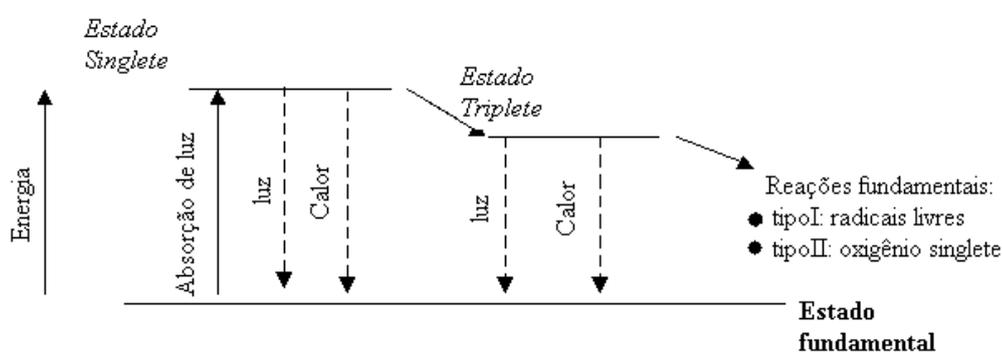
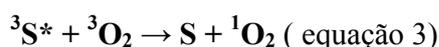
Quando estas moléculas são irradiadas com luz visível, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singleto (elétrons de spins emparelhados). Este elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou passar para o estado tripleto (spins paralelos), de menor energia, através de cruzamento intersistema (ISC), processo não permitido de acordo com as regras espectroscópicas, que requer uma inversão de spins. No entanto, a probabilidade que este processo ocorra é menor do que a dos processos permitidos. Assim, uma das propriedades desejáveis para um bom fotossensibilizador é uma alta eficiência para sofrer cruzamento intersistema. Como o tempo de vida do estado tripleto é relativamente longo ( $10^{-3}$  a 10 segundos), o fotossensibilizador excitado pode interagir com moléculas vizinhas. Esta interação pode ocorrer através de dois principais mecanismos [6]:

**Mecanismo tipo I ou via formação de radical:** O fotossensibilizador no estado excitado pode agir abstraindo um átomo de hidrogênio (reação 1) de uma molécula do substrato biológico (fosfolipídios, colesterol, proteínas entre outros) [26] ou transferindo elétrons (reação 2), gerando íons radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental resultando em produtos oxidados responsáveis pela cadeia de radicais livres gerados ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  ou  $\cdot OH$ ) que provocam lesões celulares e a subsequente morte da célula.

As reações 1 e 2 representam o FS no estado tripleto como  $^3S^*$ , o substrato biológico como SB [6]:



**Mecanismo tipo II ou via formação de oxigênio singleto:** O fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto) produzindo oxigênio singleto, retornando o FS ao estado 1. A reação 3 [6] abaixo representa o FS no estado tripleto como  $^3S^*$ , o oxigênio molecular como  $^3O_2$ , o FS no estado fundamental como S e o oxigênio singleto como  $^1O_2$ :



**Figura 2:** Esquema representando a ativação do agente fotossensibilizador pela luz.

As espécies reativas geradas a partir da interação entre o estado excitado do fotossensibilizador e o oxigênio (oxigênio singleto e ânion radical superóxido), entre o estado excitado do fotossensibilizador e sítios dos substratos que estão sendo atacados, e as resultantes dos processos secundários (radicais livres e outras espécies carregadas), tendem a se difundir nas vizinhanças do tecido afetado, iniciando uma cadeia de reações bioquímicas, resultando em danos de diferentes proporções à célula tumoral, podendo levá-la a morte. O oxigênio singleto tende a reagir com sítios ativos presentes nas células-alvo, como, por exemplo, a guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídeos insaturados. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, sendo alvos subcelulares destruídos pela TFD. Portanto essas reações resultam em alterações da permeabilidade celular, provocando efeitos celulares como edemas, levando a morte das células [27, 28].

### 1.3 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas presentes em todas as células eucariontes e as responsáveis pelo fornecimento e controle da energia vital para a vida celular.

É impossível especificar quem descobriu primeiramente as mitocôndrias como organelas citoplasmáticas distintas, porém, Kölliker merece menção particular, pois se encontra entre os primeiros que descreveram a existência de grânulos organizados no sarcoplasma de músculo esquelético e os estudou por vários anos, a partir de 1850. Esses grânulos, que por volta de 1890, foram chamados por Retzius de “sarcossomos” eram na verdade, as mitocôndrias de tecido muscular [29].

Em organismos aeróbicos, o metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos converge em uma etapa final que envolve a doação dos elétrons removidos desses nutrientes para o oxigênio. Esse processo ocorre na cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória) mitocondrial, que promove a redução contínua do oxigênio para gerar o potencial eletroquímico de  $H^+$  necessário para a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Uma das conseqüências deste processo é a constante geração de espécies reativas de oxigênio (entre elas o oxigênio singleto), que são altamente deletérias aos componentes celulares, portanto, podem levar à morte celular, que é o principal objetivo a ser alcançado com a TFD.

A energia liberada é conservada primeiramente na forma de um gradiente transmembrana de prótons e, posteriormente, na forma de ATP, sintetizado via fosforilação oxidativa [30], a principal fonte de compostos fosfatados ricos em energia dos organismos aeróbicos. O ATP formado pela fosforilação oxidativa é essencial para a manutenção de atividades celulares dependentes de energia, como a contração muscular, formação de impulsos nervosos, transporte iônico e síntese de macromoléculas. Deste modo, falhas do metabolismo energético mitocondrial estão associadas à morte celular por causas diversas incluindo infarto cardíaco, acidente vascular cerebral, Alzheimer ou por efeitos de compostos tóxicos para as células, como ocorre na terapia fotodinâmica.

Entretanto, nas células normais, as defesas antioxidantes mitocondriais têm que ser efetivas para a detoxificação desses produtos oxidativos; caso contrário, danos importantes podem ocorrer nas mitocôndrias e fora delas.

Uma maneira de se determinar a integridade da membrana mitocondrial interna é calculando o valor do controle respiratório (C.R.). A respiração mitocondrial inicia-se quando substratos reduzidos doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. Neste processo, o  $O_2$  é o aceptor final sendo reduzido à  $H_2O$ . A formação de um potencial eletroquímico de  $H^+$  mais negativo internamente, permite a síntese de ATP pela  $F_0F_1$ -ATPase, na presença de ADP (adenosina difosfato) e  $P_i$  (fosfato inorgânico).

Durante o processo de fosforilação, a velocidade de respiração é alta (estado respiratório 3 ou respiração de fosforilação) e diminui após fosforilação de todo ADP presente (estado respiratório 4 ou respiração de repouso). A razão entre as velocidades desses dois estados fornece o valor do controle respiratório. A eficiência da fosforilação oxidativa pode ser avaliada através da razão ADP/O (nº de ADP fosforilado por átomo de  $O_2$  consumido).

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o  $O_2$  à  $H_2O$ . Esta energia é utilizada pela ATP sintetase para fosforilar o ADP à ATP. Assim, a cadeia respiratória converte a energia redox gerada pelo catabolismo em potencial de membrana mitocondrial, que é a força motriz para a fosforilação oxidativa [30].

#### **1.4 Morte Celular**

A TFD pode ocasionar a morte celular por necrose ou apoptose, ou então, uma combinação desses, dependendo da concentração das substâncias fotossensibilizadoras utilizadas e das condições do tratamento [31, 32]. Essa morte celular/necrose tecidual é o resultado que se quer atingir, e este pode ser empregado para avaliar o sucesso ou não da terapia [3].

A apoptose é um processo pelo qual uma única célula é levada a morte com ausência de resposta inflamatória. Células apoptóticas apresentam núcleo pequeno e fragmentado, e corpos de cromatina condensados; como resultado final há fragmentação do DNA nuclear [33].

O tecido tumoral pode ser eliminado pela TFD através da reativação desse mecanismo de morte celular programada, a apoptose. Isso ocorre porque os

fotossensibilizadores localizados em organelas subcelulares, como as mitocôndrias, provocam a liberação de enzimas envolvidas na apoptose [32, 34, 35].

Necrose é uma forma patológica de morte celular, caracterizada por células edemaciadas, floculação de cromatina, perda rápida da integralidade da membrana e rápida lise da célula [36].

Sugere-se que a regressão do tumor de pele ocasionada pela TFD possa ocorrer pela necrose maciça do tumor após 72 horas da exposição à luz, seguida da formação da ferida sobre a área depois de 3 a 4 dias da fototerapia, com posterior desaparecimento da ferida e regressão tumoral, e por fim, cura da pele e crescimento dos pelos, sem formação de cicatrizes ou perda de tecido irradiado [37, 38].

A morte das células neoplásicas provocada pela TFD pode ser resultante de diversos mecanismos importantes, sendo a formação do oxigênio singlete, citotóxico às células, a principal delas. O fármaco por si só, é um agente reativo dentro da célula, destruindo vários substratos celulares importantes. A reação fotodinâmica também ocasiona dano vascular ao tumor. A medicação ainda presente nos vasos sanguíneos pode ser excitada promovendo a destruição de pequenos vasos e conseqüentemente à estase sanguínea local [39]. A perturbação no suprimento sanguíneo ao tumor, devido à destruição do endotélio dos vasos, pode levar a uma isquemia e hipóxia celular. O efeito hipertérmico, condicionado pela absorção ativa da luz pelas células tumorais, também, pode causar dano celular. Reações citotóxicas, condicionadas pelo estímulo da produção do fator de necrose tumoral, produzem um infiltrado inflamatório com a migração de macrófagos, leucócitos e linfócitos [5].

Para atingir os efeitos desejados na TFD, ou seja, a morte celular, há quatro pontos importantes a serem considerados: os fotossensibilizadores, que devem apresentar propriedades adequadas; a fonte de luz, que deve estar centrada em uma das bandas de absorção do FS utilizado; as condições clínicas do paciente, tais como as patologias associadas e o histórico que possam interferir no tratamento; e a lesão, que é um dos pontos mais importantes. Nesta última, devem ser considerados geometria, localização e tipo celular, além de características como a cor, vascularização, invasividade ou crescimento exofítico, que determinarão as propriedades ópticas do tecido alvo, e, conseqüentemente as interações luz/tecido biológico (reflexão, espalhamento, absorção e transmissão). A lesão deve ser iluminada uniformemente e globalmente, assim como a margem de segurança adotada. Esses

conhecimentos dos detalhes da lesão serão relevantes para a determinação da dose de luz adequada para otimização do tratamento [3].

### **1.5 Substâncias Fotossensibilizadoras**

Fotossensibilizadores são compostos que absorvem a energia luminosa em um comprimento de onda específico e tornam-se excitados, provocando uma reação química com o oxigênio molecular [40].

Substâncias fotossensibilizadoras são administradas ao paciente por uma rota específica (tópica, oral ou intravenosa). Uma vez introduzida endovenosamente no organismo essa droga percorre todo o corpo, sendo absorvida por todas as células. As células sadias eliminam essa droga em um período de tempo que varia entre 24 a 36 horas, para FSs de primeira geração, enquanto as células tumorais retêm essa droga por mais tempo. Assim, aguardando o tempo ótimo para que a concentração desse fotossensibilizador atinja o seu máximo no tecido neoplásico, procede-se à exposição do tumor à radiação visível de comprimento de onda adequado para a excitação do agente fototerapêutico. Este, quando excitado, reage com o oxigênio molecular provocando necrose do tecido [5].

O mecanismo pelo qual as células tumorais retêm o agente fotossensível por um tempo mais prolongado do que as células normais, ainda não está bem esclarecido. No entanto, sabe-se que ocorre uma associação do FS (derivados porfirínicos) a lipoproteínas do plasma, que assim o transporta preferencialmente para as células anormais. Isso ocorre porque as células tumorais possuem um número exageradamente alto de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), resultado de sua elevada demanda por colesterol [41-43]. Dessa maneira, tem sido aceito que a seletividade tumoral aumenta com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizador [4, 28, 34].

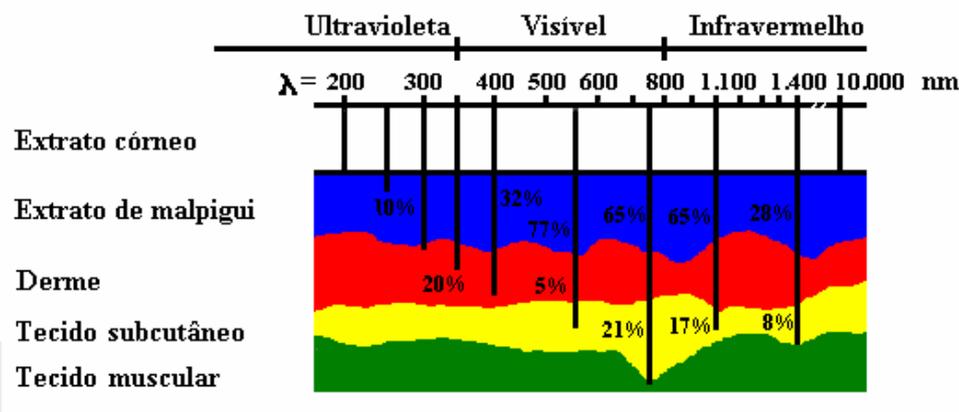
Segundo Sternberg, *et. al.* [16], um agente fotossensibilizador adequado deve possuir algumas propriedades:

1. Baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade);
2. Fotossensibilidade não prolongada;

3. Simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado (tempo mínimo de dois anos) que, geralmente, é mantido seco, bastando ao médico adicionar água ou soro fisiológico e agitar;
4. Farmacocinética favorável (rápido acúmulo no tecido alvo e rápida eliminação do organismo);
5. Facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis;
6. Facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade;
7. Facilidade de análise total dos componentes da fórmula, inclusive com fornecimento de roteiros de validação
8. Alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade).

Além disso, é importante que o fotossensibilizador apresente características fotofísicas favoráveis, como o comprimento de onda da luz necessária à foto-excitação da substância. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior a penetração no tecido. Tecidos normais contêm muitas substâncias que absorvem ou refletem radiação eletromagnética como as proteínas e o DNA que absorvem na faixa do ultravioleta (200-350 nm), a melanina (absorve em comprimentos de onda menores), a hemoglobina, que absorve na região do verde-amarelo do espectro visível e a água na região do infravermelho. Radiação de comprimento de onda menor sofre maior espalhamento e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos, que absorvem em comprimentos de onda menores faz com que a penetração de luz seja menor. Na região entre 600 e 700 nm não há competição dos cromóforos endógenos, e a profundidade de penetração no tecido é de 1 a 5 cm [6].

A Figura 3 representa o decréscimo na intensidade da luz (fluência) do tecido exposto a um feixe de luz plano de diferentes comprimentos de onda em função da penetração.



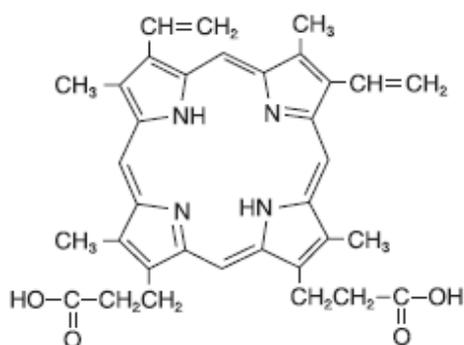
**Figura 3:** Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração da luz de diferentes comprimentos de onda [6, 7].

Quanto maior a penetração de luz, maior a eficiência da destruição volumétrica do tecido canceroso, possibilitando, também, o tratamento de tumores maiores. Portanto, as drogas desenvolvidas para uso em TFD devem ser corantes (cromóforos) e/ou fotossensibilizadores, que absorvam na região próxima ao infravermelho [41, 44, 45].

Muitos tipos de moléculas podem agir como fotossensibilizadores, incluindo as de ocorrência natural (entre elas as porfirinas), as sintéticas derivadas de compostos orgânicos e algumas substâncias inorgânicas [19].

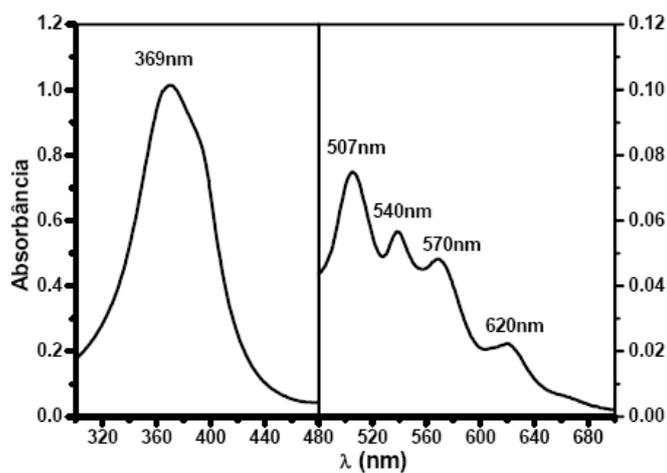
### 1.5.1 Derivados de Hematoporfirina

Os fotossensibilizadores mais utilizados em estudos clínicos em TFD têm sido os derivados de hematoporfirina (do inglês, *hematoporphyrin derivative*, ou HpD). Tais FSs consistem em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirina unidas por ligações éter ou éster [6, 46]. Os HpD são produzidos de acordo com a tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e de humanos, a partir de protoporfirina IX (PpIX) existente na circulação sanguínea [47, 48].



**Figura 4: Estrutura química da PpIX.**

Estes FSs apresentam espectro de absorção eletrônica contendo cinco bandas de absorção, sendo uma banda intensa na região de 369 nm, conhecida como banda de Soret e quatro de menor intensidade em comprimentos de onda maiores, conhecidas como bandas-Q [6] (Figura 5).



**Figura 5: Espectro de absorção ótica dos HpD [49].**

Apesar de eficientes em quase todos os tipos de tumores, os HpD não são considerados ideais, uma vez que apresentam elevada retenção dérmica e ocular, causando um

efeito colateral indesejável que consiste na fotossensibilização cutânea do paciente. Portanto, o indivíduo fotossensibilizado deve se proteger da exposição à luz solar ou luz brilhante por um período de 4 a 8 semanas, tempo necessário para eliminação do fármaco pelo organismo. Outro fato importante é que a última banda de absorção destes FSs encontra-se na faixa de 620-630 nm com baixo coeficiente de extinção molar. Deve-se salientar que neste comprimento de onda a penetração de luz nos tecidos não é ideal [6].

Os HpDs apresentam-se como uma mistura complexa de vários constituintes que formam agregados em diferentes extensões e diferentes ambientes, o que provoca alterações na eficácia terapêutica da droga [6].

Além disso, esses FSs podem formar complexos com íons metálicos por coordenação através dos quatro átomos de nitrogênio pirrólicos, no entanto, muitas porfirinas existem naturalmente sob a forma desmetilada. Estes compostos possuem uma alta hidrofobicidade, sobretudo na forma desmetilada, aspecto interessante a TFD, pois a menor compatibilidade com a água implica, em geral, em maior afinidade por tecidos celulares. Por outro lado, essa propriedade faz com que haja grande tendência a esses compostos se auto-agregarem em solução aquosa [23].

O efeito da agregação sobre as propriedades fotofísicas de um fármaco, particularmente a fluorescência, a energia dos estados excitados gerados, a capacidade de transferência de energia e elétrons, é de fundamental importância na avaliação do potencial fotodinâmico destes compostos nas reações foto-oxidativas [22].

A auto-agregação de porfirinas gera espécies pequenas (dímeros e trímeros) e agregados grandes (poliméricos). Este estado afeta fortemente suas propriedades espectrais e energéticas, reduzindo o tempo de vida dos estados excitados, conseqüentemente o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto e, portanto, comprometendo a eficácia em TFD [50]. Ao mesmo tempo, a agregação pode levar a precipitação do fármaco com perdas de materiais, ou mesmo obstrução de artérias no corpo humano [51].

### **1.5.2 ALA e MAL**

Uma nova classe de derivados porfirínicos tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Desde 1990, uma técnica simples e eficaz baseada na aplicação tópica de

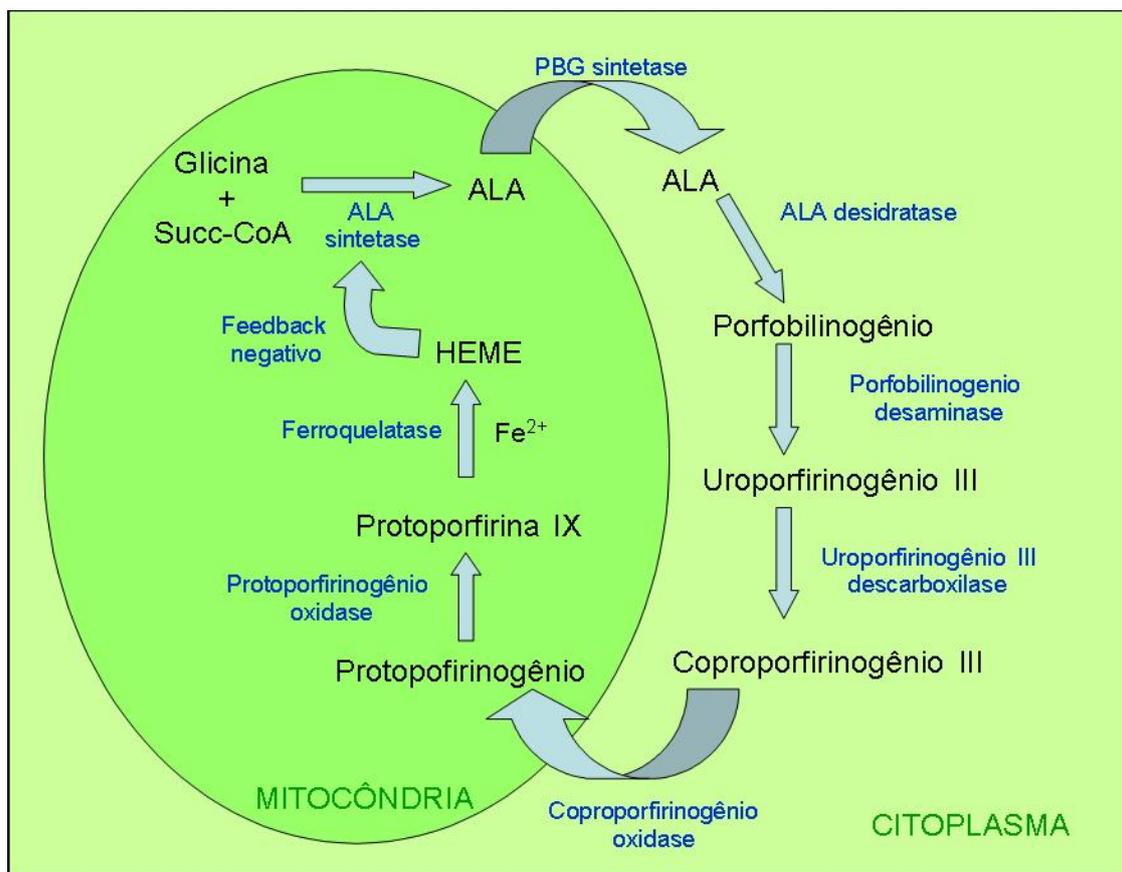
substâncias precursoras da hematóporfirina endógena, o ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Figura 6A) e seus derivados, como o metil aminolevulinato (MAL) (Metvix® - Galderma, França) (Figura 6B), têm sido empregada em TFD [52].



**Figura 6: Estruturas Químicas do ALA (A) e do MAL (B).**

O ácido 5-aminolevulínico pode ser aplicado sistemicamente ou de forma tópica na pele ou em outros tumores, como carcinoma basocelular (CBC) de pele e adenocarcinoma gastrointestinal [21, 53-55]. Além disso, esta droga pode ser utilizada para diagnóstico de tumores de pele, pulmão, bexiga e do trato gastrointestinal [55, 56].

O ALA não é um fotossensibilizador propriamente dito, mas sim um precursor metabólico da Protoporfirina IX (PpIX) na via intrínseca de biossíntese do heme celular (Figura 7) [57].



**Figura 7: Esquema da via de Biossíntese do Heme Celular.**

A enzima ALA sintetase é capaz de formar uma molécula do ácido 5-aminolevulínico a partir de uma glicina e uma succinil coenzima A. A atividade dessa enzima é, normalmente, regulada por um mecanismo de feedback negativo, no qual compostos heme livres vão inibir a síntese do ALA [58]. Entretanto, a adição de ALA exógeno leva a formação da PpIX com velocidade mais rápida do que a da enzima ferroquelatase em convertê-la em heme, resultando em acúmulo de PpIX intracelular. Outra enzima que participa dessa via é a porfobilinogênio desaminase, responsável pela catálise da formação do porfirinogênio a partir do porfobilinogênio. Sua atividade é mais intensa em alguns tumores [59, 60], enquanto que a ferroquelatase é menos ativa nessas condições [61, 62]. Desse modo, a PpIX acumula-se com certa seletividade em determinados tumores [57].

O ALA é um composto hidrofílico em pH fisiológico, por isso possui uma capacidade limitada de atravessar barreiras biológicas da pele, como membranas celulares e extrato córneo. Essa penetração é uma condição fundamental para conversão do ALA em

PpIX [63]. Em células de mamíferos, o ALA é carreado, principalmente por mecanismos de transporte ativo, que requerem energia. Esses sistemas são lentos, mas encontram-se levemente acelerados em células tumorais [64-66]. Quando o ALA é aplicado topicamente em tumores cutâneos ocorre um aumento na permeabilidade da pele cancerosa. Por isso, a frequência de indução da síntese e acúmulo de PpIX pelo ALA é muito maior em células malignas e pré-malignas, se comparado a condições normais [67].

A formação da PpIX apresenta uma considerável heterogeneidade quando o ALA é aplicado topicamente. Há uma distribuição não homogênea e limitada da PpIX no tecido, resultando em um tratamento ineficiente e com pouca penetração para lesões nodulares. A fim de assegurar níveis de PpIX clinicamente relevantes, é necessário administrar doses razoavelmente altas do ALA por longos períodos de tempo [68].

Na tentativa de minimizar muitos dos problemas encontrados na aplicação tópica do ALA, foram desenvolvidas drogas mais lipofílicas derivadas do ALA, os chamados ésteres do ALA (metil, etil e propil) [68-70].

O metil aminolevulinato (MAL) é um éster derivado do ALA. Este éster possui caráter lipofílico e é transportado por aminoácidos apolares através da difusão passiva, mecanismo este que não necessita de energia [70]. Esse sistema de transporte é bastante eficiente em células normais, e apresenta-se potencializado em células neoplásicas. Devido a esse mecanismo, o MAL possui melhor capacidade de penetração em comparação com o ALA, e a diferença é ainda mais evidente quando se trata de células tumorais, já que é capaz de atravessar mais facilmente a camada queratinizada e atingir maior profundidade [52, 69, 71]. Devido a essa maior afinidade pelas células neoplásicas, o MAL provoca menos alterações decorrentes da fotossensibilização nos tecidos normais que o ALA [65, 71, 72].

Logo após sua penetração na célula, o MAL é rapidamente demetilado transformando-se em ALA e, a partir daí, ambos seguem a mesma via metabólica, ou seja, a via de biossíntese do heme celular [66].

Uma das vantagens do uso tanto do ALA quanto do MAL é que são rapidamente degradados pelo organismo, eliminando em poucas horas possíveis riscos da fotossensibilização do tecido [73]. Além disso, são quimicamente puros, absorvem luz próximo ou acima de 650 nm e, em função das baixas doses administradas, os efeitos colaterais tendem a ser pouco ou nada pronunciado [52, 57, 74].

Há vários estudos reportados na literatura sobre o uso tópico do ALA associado à TFD. Sziemies *et al.* [75] observou que após 3 meses do tratamento do ALA tópico associado a TFD, 71% da queratose actínica presente na cabeça regrediram completamente.

No tratamento de CBC, a TFD tópica com ALA mostrou uma freqüência de regressão de 79 a 100% para lesões superficiais e de 10 a 75% para CBC nodular [76-78].

O ALA tópico associado à TFD apresentou resultados positivos no tratamento da doença de Bowen com freqüência de regressão de 90 a 100% e uma recorrência muito baixa de 0 a 10% [21, 78, 79].

A TFD tópica com o ALA também foi explorada em várias condições não-oncológicas. Há evidências de que doenças inflamatórias como psoríase [80, 81], sarcoidose [82], escleroderma localizado [83], acne vulgaris [84], dermatose de papiloma vírus humano [85], tiveram resposta animadoras no tratamento com ALA tópico associado à TFD.

O MAL foi testado em vários ensaios clínicos controlados, nos quais foi observado um acúmulo mais seletivo da PpIX em queratose actínica e CBC [66, 86], especialmente quando aplicado topicamente [72, 87-89].

Wiegell & Wulf [89] realizaram um estudo comparativo entre o ALA e o MAL associados à TFD no tratamento de acne vulgaris e mostraram que ambas as substâncias foram igualmente efetivas no tratamento, promovendo uma redução média de 59% na acne inflamatória na região facial após doze semanas da aplicação.

Apesar do ALA e do MAL serem duas drogas bastante estudadas e utilizadas em várias condições clínicas na TFD, faz-se necessário estabelecer dosimetria adequada para utilização tópica dessas substâncias, pois, se o tecido não for irradiado com uma dose mínima de luz, denominada *threshold dose*, a necrose não ocorrerá [3].

## 1.6 Farmacocinética

A farmacocinética é o estudo da velocidade com que os fármacos atingem o sítio de ação e são eliminados do organismo, bem como dos diferentes fatores que influenciam na quantidade de fármaco a atingir o seu sítio. Basicamente, estuda os processos metabólicos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos fármacos [90].

Uma das técnicas utilizadas para o estudo da farmacocinética é a espectroscopia de fluorescência. Ela é muito empregada como método indireto para detecção, quantificação e localização da posição das espécies emissoras (como a PpIX). Alguns fluorímetros foram desenvolvidos para registrar espectros de fluorescência de tecidos vivos sensibilizados. Contudo, deve-se registrar inicialmente, a fluorescência natural dos tecidos vivos em estudo [90].

A farmacocinética é muito importante para o estudo da dosimetria em TFD, através da determinação do DLI (*Drug Light Interval*), ou seja, do intervalo entre a administração do FS e a iluminação do tumor, já que a quantidade de fármaco na neoplasia terá grande influência na resposta final induzida. Cada substância fotossensibilizadora apresenta uma farmacocinética, bem como um DLI ótimo, variando para cada tipo de órgão (localização anatômica), assim como a identificação individual, dadas as variações interpacientes [3].

### 1.7 Dosimetria

Como mencionado anteriormente, há uma dose mínima de luz que deve ser aplicada no tecido para que ocorra a necrose (*threshold dose*) [3]. Portanto, determinar a dosimetria a ser utilizada em TFD é um fator extremamente importante.

Os estudos de dosimetria mais relevantes são os que levam em consideração:

1. Distribuição da luz utilizada para excitar a molécula de FS no tecido (as variadas estruturas e composições teciduais alteram a forma como a luz se propaga, modificando o perfil inicialmente previsto para a iluminação, de forma que a quantidade de luz necessária pode não ser atingida em determinados pontos);
2. A oxigenação do tecido a ser tratado e o consumo do oxigênio (a quantidade de oxigênio presente no tecido determinará a eficiência com que o oxigênio singlete será produzido e, portanto, a intensidade do dano celular),
3. A variação da concentração do FS no tecido fotossensibilizado (a concentração de FS determina a intensidade de luz que deve chegar a uma determinada região do tecido para que ocorra reação fotodinâmica no tecido suficiente para promover a destruição do tecido tumoral) [91].

Entretanto, a dosimetria tradicional para TFD tem sido desenvolvida apenas para casos de injeção sistêmica do fotossensibilizador, o qual se distribui uniformemente na superfície do tecido alvo [92, 93], situação que não se aplica a fotossensibilizadores tópicos, que não apresentam distribuição homogênea no tecido [94].

Por isso, a não uniformização da distribuição da droga é um critério relevante quando se trata de dosimetria em TFD para fotossensibilizadores de aplicação tópica.

### 1.8 Fonte de Luz

A penetração efetiva da luz nos tecidos tumorais depende da absorção ótica dos cromóforos bioendogênicos e do espalhamento da luz pelo tecido, por isso, as fontes de luz utilizadas em TFD devem emitir radiação na faixa de comprimento de onda denominada de “janela terapêutica”, a qual permite que a fotoxidação dos tecidos tumorais não seja apenas superficial [95, 96].

Qualquer fonte de luz que possua características espectrais apropriadas pode ser utilizada em TFD, tais como lâmpadas de tungstênio ou halogênio, laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e LED (*Light Emitting Diode*). As lâmpadas raramente são empregadas, pois requerem condições específicas, como o emprego de filtros adequados para a seleção do comprimento de onda de irradiação, um sistema óptico bastante eficiente a fim de dirigir a radiação ao local de irradiação com um mínimo de perdas, e uma determinada potência que forneça radiação com a fluência adequada no comprimento de onda requerido [97].

Por outro lado, os avanços na tecnologia laser têm contribuído muito para o desenvolvimento da terapia fotodinâmica. Sendo uma fonte de luz monocromática e de alta intensidade, a luz laser permite estimular de modo eficiente os níveis de energia das moléculas do fotossensibilizador. Devido à monocromaticidade da luz laser, é possível selecionar a cor ideal, de tal forma que a luz só interaja com uma molécula específica dentro de um universo de várias moléculas: a isto chamamos seletividade [5].

Lasers no estado sólido, como o Nd:YAG, têm sido empregados mais recentemente. O problema nesse caso refere-se ao seu elevado custo. No entanto, a vantagem dessa fonte de luz é a possibilidade de se empregar os harmônicos do laser Nd:YAG e alguns

dispositivos ópticos para obtenção de feixes de laser numa faixa muito ampla do espectro, entre 200 e 2000 nm. Uma alternativa de custo intermediário são os lasers de diodo. Existem atualmente lasers de diodo cobrindo praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo, podendo assim atender boa parte dos agentes fototerapêuticos já existentes no mercado. Tais lasers são capazes de fornecer luz pulsada e contínua de considerável potência, com precisão sobre o tecido a ser irradiado, graças a sistemas de distribuição baseados em feixes de fibras ópticas [97], o que torna possível irradiar tumores internos localizados em cavidades [98], que são regiões de difícil acesso.

## 2. OBJETIVOS

- Observar os tempos de produção de PpIX para os ALA e MAL, assim como a sua influência na TFD
- Analisar a profundidade de necrose induzida pelo ALA, MAL e ALA+MAL em TFD variando os parâmetros de iluminação;
- Determinar e comparar o *threshold dose* (dose limiar) para o ALA e MAL, aplicados topicamente em fígados de ratos normais;
- Comparar o ALA e o MAL com relação aos efeitos no desempenho fotodinâmico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

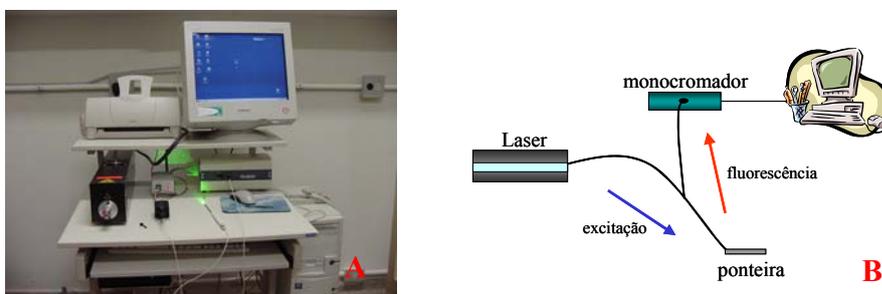
Foram utilizados 47 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, pesando, aproximadamente, 350g cada, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP). Os animais foram mantidos durante todo experimento em um alojamento para animais, com quatro filtros para entrada de ar, um exaustor para as saídas de ar e controle da iluminação com ciclos de doze horas de claro e doze horas de escuro, montado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – USP, no laboratório de Biofotônica. Ficaram alojados em gaiolas contendo cinco animais cada. Receberam água filtrada e ração comercial específica para roedores (Primor). A temperatura foi mantida entre 23 e 25°C.



**Figura 8:** Alojamento dos animais montado no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica no IFSC – USP/São Carlos.

### 3.2 Sistema de detecção óptica por Espectroscopia de Fluorescência

O aparato experimental utilizado para leitura da espectroscopia de fluorescência é composto por um laser de excitação no comprimento de 442 nm ou 532 nm, espectrômetro, computador (Cluster – Rússia) com um programa de aquisição (*LightView – Med<sup>®</sup> - Lightview.Exe*) e uma sonda de investigação do tipo Y (Figura 9). Através do laser de excitação acoplado à fibra óptica, a luz é entregue à superfície do tecido a ser analisado. A sonda é mantida em leve contato com o tecido e o mais perpendicularmente possível à superfície deste. A outra extremidade da sonda é conectada ao espectrômetro levando a luz coletada ao tecido. A sonda Y é composta por uma fibra central, que conduz a luz de excitação ao tecido, e seis fibras ao redor que coletam a luz emitida do tecido alvo. O espectrômetro está conectado ao computador e o programa *LightView<sup>®</sup>* mostra o resultado em forma gráfica com intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Neste trabalho, o laser de excitação utilizado foi o de comprimento de onda de 532 nm, na região do verde do espectro eletromagnético, uma vez que a protoporfirina IX formada possui uma de suas bandas de absorção próxima a esse comprimento de onda.



**Figura 9: Foto do Sistema de Diagnóstico (A) e desenho esquemático das partes constituintes (B)**

### 3.3 Fonte de Luz

Para aplicação da TFD foi utilizado um laser de Diodo Ceralas 630 (Ceramoptec<sup>®</sup>, Alemanha), que produz até 2 W de potência óptica no comprimento de onda de 630 nm, adequado para excitação das porfirinas e dos seus derivados, que foi acoplado a uma fibra óptica para iluminação frontal.



**Figura 10: Fonte de luz utilizada para a TFD. Laser de Diodo em 630 nm utilizado para excitação das porfirinas e derivados de hematoporfirinas.**

### **3.4 Análise histológica**

O sistema para análise microscópica utilizado foi um microscópio (aumento 40x) acoplado a dois micromanipuladores, um que realiza medidas no sentido da abscissa e outro que realiza medidas nas ordenadas. A iluminação é realizada através de um LED colocado no interior do microscópio de modo que ilumine a amostra de baixo para cima (Figura 11).



**Figura 11: Microscópio (com os micromanipuladores acoplados) utilizado na pesquisa.**

### 3.5 Fotossensibilizadores

Foram utilizados precursores da PpIX para fotossensibilizar o tecido: ALA, MAL (Figura 12 A e B) ou uma associação de ambos (ALA + MAL) em diferentes concentrações.

Para preparação do ALA, 16% do ácido 5-aminolevulínico em pó (ALAsens – Rússia) foi incorporado a uma pomada creme com a seguinte composição: Cera polawax<sup>®</sup> (alcoois graxos + álcool etoxilado); Crodalan LA<sup>®</sup> (álcool de lanolina acetilada), Miristato de isopropila, BHT (butil hidroxitolueno), uniphen<sup>®</sup> (fenoxietanol + parahidroxibenzoatos de metila, etila, butila e propila), Propilenoglicol, EDTA, água destilada. Em seguida, foi devidamente armazenado em embalagem própria e mantido em refrigerador.

O MAL utilizado foi o *Metvix*<sup>®</sup> creme comercial (cloridrato de aminolevulinato de metila 16%) do Reino Unido, adquirido de Galderma Brasil Ltda.

A associação dos dois precursores da PpIX (MAL + ALA) foi realizada através da incorporação de concentrações de 8, 16 ou 32% do ácido 5-aminolevulínico em pó no *Metvix*<sup>®</sup> creme comercial, com concentração constante de 16%.

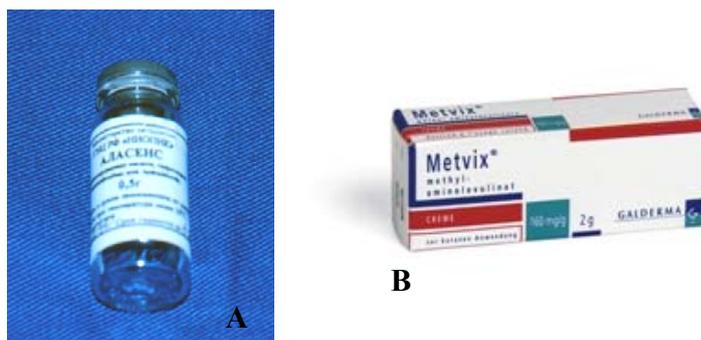


Figura 12: Imagem das drogas precursoras da PpIX utilizadas. ALA (A) e MAL - *Metvix*<sup>®</sup> (B).

### 3.6 Preparação dos Animais

Os animais foram submetidos a um período de jejum de doze horas, tendo acesso livre à água. Posteriormente, foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução estéril de cloridrato de *ketamina* a 5% (*Vetanarcol*<sup>®</sup> - *Konig*), na dose de 0,08 ml/100g de massa corporal, associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *xilasina* a 2% (*Coopazine*<sup>®</sup> - *Coopers*) na dose de 0,04 ml/100g. Foi realizada a tricotomia na região abdominal dos animais. Através de uma incisão mediana, o lobo direito do fígado do animal foi exposto e isolado em uma gaze embebida em soro fisiológico. Em seguida, foi aplicado topicamente 0,08ml do ALA, MAL ou MAL + ALA (8,16 ou 32%) no lobo direito do fígado dos animais.

### 3.7 Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX

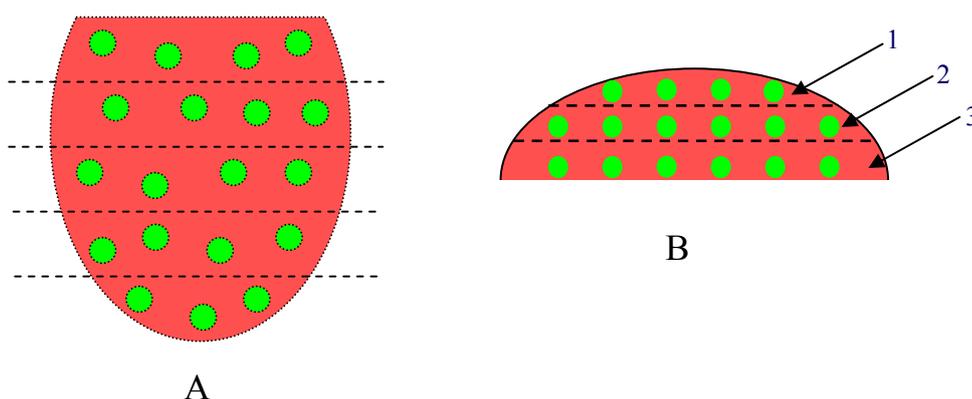
Para determinação do tempo ótimo de formação da PpIX pelo ALA e pelo MAL, quatro animais foram utilizados, sendo dois para cada droga. Os animais foram preparados de acordo com o item 3.6. Antes da aplicação do medicamento foi coletada a autofluorescência do tecido hepático. Posteriormente, as drogas foram administradas topicamente no fígado, o excesso foi removido com gaze embebido em soro fisiológico e iniciou-se a coleta da fluorescência no intervalo de tempo de 0 a 360 minutos (a cada 10 minutos nas primeiras 4 horas e a cada 15 minutos nas últimas 2 horas). Utilizou-se o segundo harmônico do laser Nd:YAG (532 nm) para excitação do tecido alvo. Em cada tempo de investigação, foram realizadas cinco leituras para cada animal. A extremidade da leitura da sonda protegida com filme de PVC foi posicionada em contato, e o mais perpendicularmente possível à superfície do tecido. Através da análise dos espectros de fluorescência foi determinado o tempo ótimo entre a aplicação de cada FS e o intervalo de iluminação do tecido hepático.

A presença da PpIX no tecido hepático pode ser evidenciada por uma banda de emissão ao redor de 635nm. A intensidade de emissão pode ser empregada como uma medida quantitativa relativa, ou seja, de maneira comparativa em vários tempos investigados, quanto maior a intensidade de emissão, maior a quantidade relativa de PpIX no tecido. O

monitoramento da intensidade em 635nm em função do tempo, possibilita estabelecer o tempo de formação da PpIX e, conseqüentemente, o intervalo entre a aplicação da droga e a iluminação mais adequado para cada medicação e tecido. Foram considerados os valores médios obtidos em cada tempo de coleta para cada um dos grupos.

### 3.8 Avaliação Indireta da penetração do medicamento no fígado

Através da espectroscopia de fluorescência foi determinado a presença de PpIX na superfície e em três níveis de profundidade do fígado. Para isso, quatro animais foram utilizados, sendo que dois receberam aplicação tópica do ALA e os outros dois do MAL. Após 2 horas e 45 minutos da aplicação do ALA e 4 horas da aplicação do MAL, tempos previamente determinados através da análise superficial, no lobo direito do fígado dos animais, o órgão hepático foi removido e cortado em fatias de aproximadamente 3 mm de espessura. Em cada fatia foi coletada a fluorescência em vários pontos da superfície (sup) e em três níveis de profundidade (1, 2 e 3), com distâncias de aproximadamente 1,5mm (figura 13). A extremidade da leitura da sonda protegida com filme de PVC foi posicionada em contato e o mais perpendicularmente possível à superfície do tecido.



**Figura 13:** Esquema representando a coleta da fluorescência do fígado na superfície (A) e em cada fatia cortada transversalmente nas profundidades 1, 2 e 3 (B).

Os valores obtidos foram processados no *Software Origin*<sup>®</sup> e gerados gráficos de intensidade de fluorescência *versus* profundidade de penetração da PpIX.

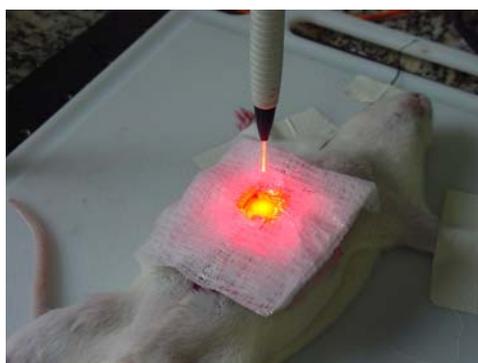
### 3.9 Terapia Fotodinâmica

Foram utilizados 33 animais, divididos em três grupos, sendo dois grupos com doze animais cada e um com nove. Os grupos com doze animais foram subdivididos em quatro subgrupos com três animais para cada dose de luz. O outro grupo foi subdividido em três subgrupos de três animais, sendo um para cada concentração de ALA que foi incorporado ao MAL (8, 16 e 32%). Os animais foram previamente preparados e fotossensibilizados. Após 2 horas e 45 minutos da aplicação do ALA, 4 horas da aplicação do MAL e do MAL + ALA, foi realizada a coleta do espectro de fluorescência do local para detectar a presença de PpIX, e a posterior irradiação do fígado com laser de diodo no comprimento de onda em 630 nm (região do vermelho). Os animais que receberam a aplicação tópica do ALA ou do MAL isoladamente, foram irradiados com doses de 20, 50, 100 e 200 J/cm<sup>2</sup> e intensidade de 250 mW/cm<sup>2</sup>, durante 80, 200, 400 e 800 s, respectivamente. O grupo fotossensibilizado com MAL + ALA em diferentes concentrações, foi iluminado somente com dose de luz de 100 J/cm<sup>2</sup>.

**Tabela 1: Parâmetros de Irradiação**

<b>Dose (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Intensidade (mW/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Tempo (s)</b>
20	250	80
50	250	200
100	250	400
200	250	800

Uma máscara de papel laminado envolto por gaze com um orifício de 1cm x 1cm foi utilizada para delimitar a área a ser irradiada e proteger o restante do tecido, evitando a iluminação de áreas indesejadas (Figura 14).



**Figura 14: Iluminação do fígado de um animal fotossensibilizado mostrando a delimitação da área iluminada com uma máscara de papel laminado envolto por gaze com um orifício de 1.0 x 1.0 cm.**

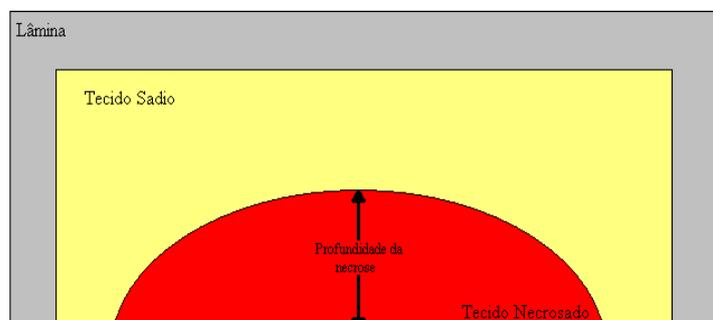
### **3.10 Preparo do Material para análise histológica.**

Após a irradiação, os animais foram suturados, colocados nas respectivas gaiolas e levados ao alojamento. Após 30 horas, os animais foram mortos por *overdose* de anestésico. O lobo direito do fígado dos animais foi removido e área necrosada foi cortada com o auxílio de um bisturi, em fatias de aproximadamente 1 mm, no sentido antero-posterior, para permitir análise da profundidade. As fatias do tecido foram colocadas em frascos plásticos contendo solução de formaldeído 40% (*Formol – Merck*<sup>®</sup>), misturado a uma solução de monofosfato de sódio hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  - *Merck*<sup>®</sup>) e difosfato de sódio hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{2H}_2\text{O}$  - *Merck*<sup>®</sup>) diluídos em água destilada, durante 24 horas para fixação do material, a fim de se iniciar o processo de preparo das lâminas histológicas. Os fragmentos foram então, incluídos em parafina e cortados com o microtomo em espessura de 4  $\mu\text{m}$ . O processo de coloração foi realizado pela metodologia padrão com hematoxilina-eosina (HE).

### 3.11 Estudo da Necrose

#### 3.11.1 Morfometria do tecido hepático

As lâminas do tecido hepático foram analisadas para determinação da profundidade de necrose, ou seja, a distância entre a superfície necrosada e o tecido normal adjacente (Figura 15). Para cada animal foram obtidos quatro a seis cortes da região aparentemente necrosada e, em cada corte, foram realizadas quatro medidas de profundidade de necrose.



**Figura 15: Analogia com uma lâmina histológica, explicando a maneira na qual foram obtidas as medidas da profundidade de necrose do fígado.**

#### 3.11.2 Processamento dos dados da Necrose

Os valores de profundidade de necrose médios foram analisados para cada grupo experimental (fluência e droga) e geraram-se gráficos de Profundidade de necrose *versus* Fluência.

#### 3.11.3 Cálculo da Dose Limiar para profundidade de necrose

Há uma dose mínima de luz que deve ser aplicada no tecido para que ocorra a necrose, ou seja, a dose limiar. Quanto maior essa dose, maior a quantidade de luz necessária para que o FS seja excitado e reaja com o oxigênio molecular levando a morte tecidual, portanto sua eficiência fotodinâmica pode ser reduzida. Com base nesse conhecimento foi

realizado o cálculo da dose limiar com o intuito de comparar as doses limiares para as substâncias estudadas.

A intensidade de luz decresce exponencialmente conforme penetra no tecido, estando de acordo com a Lei de *Lambert-Beer*, que pode ser descrita como:

$$I = I_0 e^{-\alpha d} \quad (1)$$

onde  $\alpha$  é o coeficiente de atenuação efetivo,  $I_0$  é a intensidade entregue na superfície do tecido e  $I$  é a intensidade local a uma certa profundidade  $d$ . Deste modo pode-se dizer que a dose de luz na superfície é dada pela equação:

$$D_0 = I_0 t \quad (2)$$

onde  $t$  é o tempo de irradiação no tecido. Assim a dose local a uma profundidade  $d$  no tecido corresponde a  $D = It = I_0 t e^{-\alpha d}$  ou  $D = D_0 e^{-\alpha d}$ . A profundidade de penetração e a dose de luz local podem ser descritas pela expressão:

$$d = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{D_0}{D} \quad (3)$$

Se chamarmos de  $D_{th}$ , a dose limiar, a profundidade  $d_{nec}$  corresponderá à posição onde  $D = D_{th}$ . Logo a profundidade de necrose em primeira aproximação pode ser descrita como:

$$d_{nec} = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{D_0}{D_{th}} \quad (4)$$

Então,  $\frac{1}{\alpha} = \delta$  corresponde ao efeito de absorção e assim possui dependência com a concentração do fotossensibilizador [99]. O valor de  $\delta$  foi utilizado como um parâmetro para descrever a equação 4 quando  $d_{nec}$  é medido em função de  $D_0$ .

De acordo com análise das equações demonstradas, é possível determinar, através de um modelo matemático, a dose limiar para cada tipo de FS partindo dos resultados experimentais da profundidade de necrose em função da dose de luz efetiva.

Através dos resultados obtidos de profundidade de necrose para os FS em função da dose determinou-se o coeficiente de atenuação e a dose limiar a partir da equação (4), já descrita anteriormente, que pode ser escrita desta maneira:

$$dnec = \frac{1}{\alpha} \ln Do - \frac{1}{\alpha} \ln Dth \quad (5)$$

Deste modo, a equação (5) pode ser relacionada como uma equação linear do tipo:

$$Y = A + Bx \quad (6)$$

e através de um ajuste linear da equação (5) obtêm-se os valores de **A** e **B**, onde a incógnita **B** corresponde ao  $\alpha^{-1}$ , ou seja:

$$\left\{ \begin{array}{l} B = 1/\alpha ; \quad 1/\alpha = \delta \quad (7) \\ A = \frac{1}{\alpha} \ln D_{th} \quad (8) \end{array} \right.$$

Relacionando esses resultados, obtêm-se a dose limiar (Dth) através da seguinte equação:

$$Dth = e^{A/B} \quad (9)$$

### 3.12 Análise Mitocondrial

Essa etapa do estudo foi realizada no Laboratório de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP) com o intuito de avaliar os efeitos no escuro das drogas precursoras da PpIX em mitocôndria hepática de ratos, ou seja, se mesmo antes da irradiação com a luz estaria ocorrendo alguma alteração significativa na bioenergética mitocondrial que poderia levar a morte tecidual.

### **3.12.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato**

Para análise mitocondrial, foi realizado o isolamento das mitocôndrias dos fígados dos ratos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial descrita por Schneider e Hogeboom [100]. Seis animais previamente preparados foram divididos em três grupos com dois animais cada: Grupo I - aplicação tópica do ALA, Grupo II - aplicação tópica do MAL e Grupo III - controle. Após a morte dos animais, seguindo os tempos ótimos de formação da PpIX pré-determinados de 2 horas e 45 minutos e 4 horas, respectivamente para o ALA e para o MAL, os fígados foram retirados individualmente, lavados em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES pH 7,2 e 0,5 mM de EGTA, picados com tesouras e homogeneizados em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 8000 x g sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O novo sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em 250 mM de sacarose, 5 mM de HEPES pH 7,2 e 0,3 mM de EGTA, e novamente centrifugado como a condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 80 mg de proteína por mililitro de suspensão mitocondrial.

### **3.12.2 Dosagem de proteína**

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto [101], modificado pela adição de colato 1% [102]. O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

### **3.12.3 Condições experimentais**

Os experimentos com mitocôndrias isoladas foram realizados a 28 °C em meio de reação padrão contendo 150 mM de sacarose, 65 mM KCl, 10 mM de HEPES pH 7,2, 2

mM de fosfato de potássio e 1 mM de cloreto de magnésio. Como substrato respiratório foi utilizado 5 mM de succinato de potássio.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi demonstrar as diferenças entre o MAL e o ALA com relação aos efeitos no desempenho fotodinâmico. Os vários aspectos necessários para o entendimento destas diferenças foram analisados para tornar possível estabelecer uma visão clara a nível microscópico das observações realizadas.

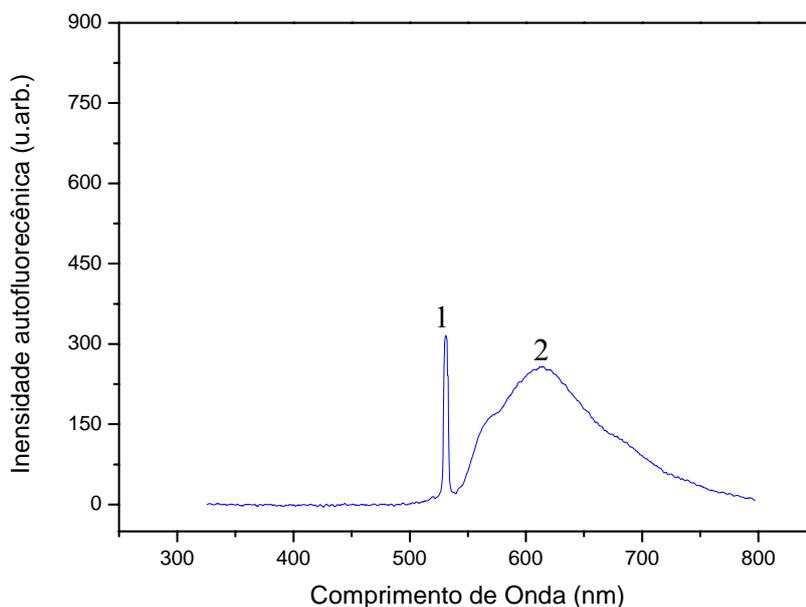
O primeiro aspecto importante observado e discutido correspondeu ao tempo de formação da porfirina para cada uma das substâncias. Para que a comparação pudesse ser feita dentro dos critérios mínimos, foi necessário avaliar os efeitos das drogas no ponto de máxima formação da porfirina. Trabalhando neste ponto ótimo, foram eliminados efeitos estritamente relacionados com a farmacocinética, atribuindo as observações ao rendimento intrínseco de cada substância. Portanto, a discussão iniciar-se-á com a determinação do tempo ótimo de formação da PpIX.

### 4.1 Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX

A determinação do tempo ótimo de formação da PpIX foi realizada através da espectroscopia de fluorescência, levando-se em consideração que a quantidade de luz emitida pela fluorescência é relativamente proporcional à quantidade de emissores no tecido [3].

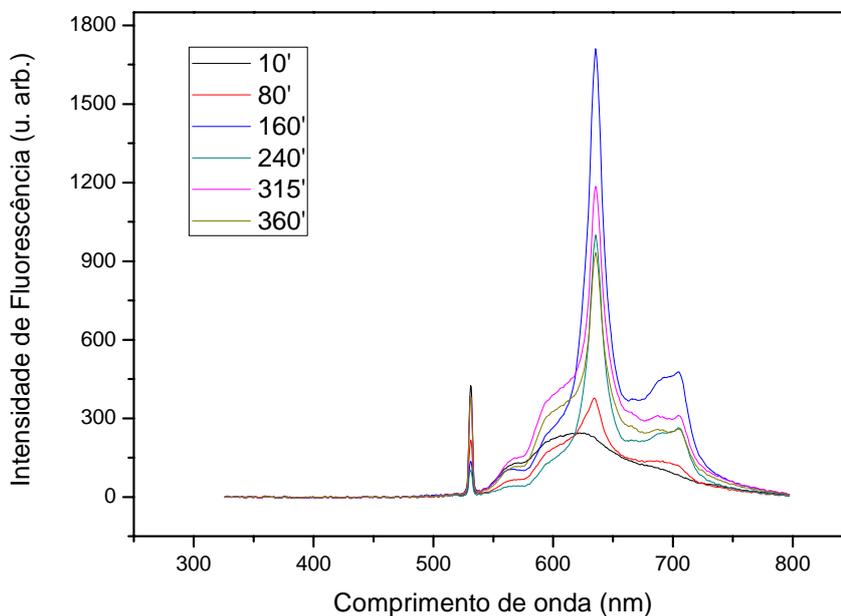
A aquisição dos dados de fluorescência foi feita através do programa *LightView*<sup>®</sup>, que forneceu os dados da relação da intensidade de emissão em função do comprimento de onda.

A figura 16 mostra o espectro de autofluorescência do fígado, ou seja, a fluorescência natural emitida pelo do fígado normal.



**Figura 16: Espectro de autofluorescência do fígado. Em 1 observa-se um pico referente a reflexão da luz no fígado e em 2 a emissão da autofluorescência na região do vermelho.**

A formação do FS no fígado provoca uma alteração nesse espectro. As porfirinas em geral (como é o caso da PpIX) possuem uma banda de emissão na região do vermelho no comprimento de onda ao redor de 630nm. Portanto há um aumento da intensidade de fluorescência nessa região do espectro, configurando um espectro característico, no qual é possível visualizar a variação da intensidade de fluorescência emitida pela PpIX em função do tempo. Após a administração da droga no tecido a substância fotossensibilizadora começa a ser formada atingindo o pico máximo em um determinado tempo, que varia de acordo com a droga, formulação, o local e forma de aplicação. Logo após ocorre uma redução da emissão da fluorescência no tecido pela degradação da PpIX (Figura 17).



**Figura 17: Espectros típicos de fluorescência coletados após a aplicação tópica da droga precursora da PpIX no fígado. Observa-se uma curva característica da emissão de fluorescência pela substância fotossensibilizadora, sendo que há uma variação da intensidade emitida com o tempo.**

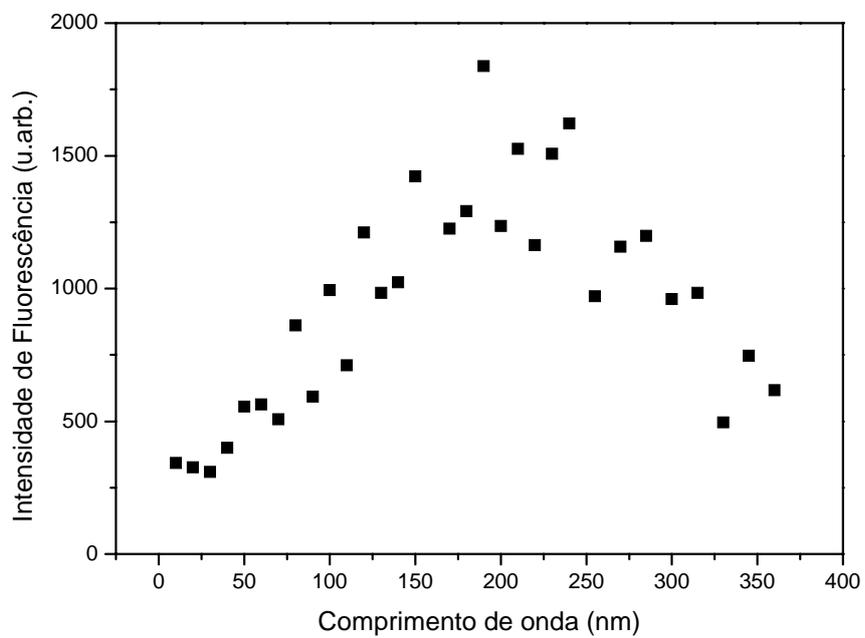
A análise espectral *versus* o tempo de espera foi realizada no pico de maior amplitude para cada FS.

Analisando os dados obtidos de Intensidade da Fluorescência *versus* Tempo, observou-se o período de formação e o decaimento da concentração da PpIX no tecido sadio.

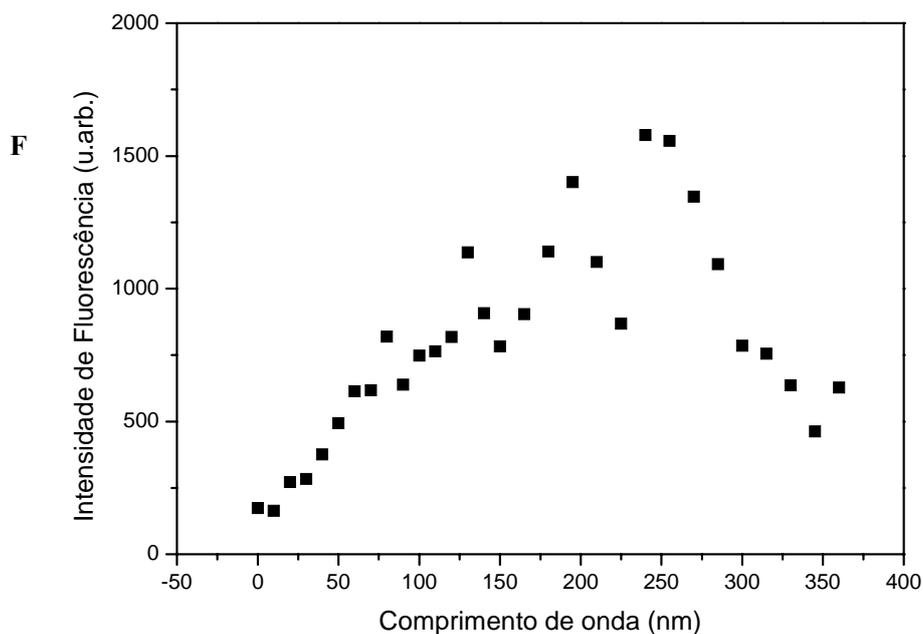
Devido ao procedimento utilizado para as medidas de fluorescência, é importante ressaltar que a análise foi realizada na camada superficial do tecido, atingindo uma profundidade de aproximadamente 0,5 mm.

O DLI, já definido anteriormente como o tempo ótimo entre a aplicação do FS e a iluminação, foi determinado através da coleta periódica das fluorescências emitidas pela PpIX no fígado, posterior a aplicação do ALA e do MAL. O maior acúmulo de PpIX foi observado no tempo entre 150 e 200 minutos para o ALA e entre 230 a 260 minutos para o MAL. Após esse período, houve uma redução na concentração da PpIX, para ambas as drogas

utilizadas. As figuras 18 e 19 apresentam o aumento e a diminuição da PpIX no fígado ao longo do tempo para o ALA e MAL, respectivamente.



**Figura 18: Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX para o ALA.**



**Figura 19: Determinação do tempo ótimo de formação da PpIX para o MAL.**

É interessante ressaltar nesses gráficos que o tempo para produzir a porfirina é estritamente dependente da droga administrada. Esse resultado mostra que as variações entre os processos de formação da PpIX podem estar relacionados com diferenças na formulação entre o ALA e o MAL.

Correlacionando com outros estudos, os valores de DLI para o MAL tópico obtidos neste trabalho condizem com o que está descrito na literatura para a máxima concentração da Protoporfirina IX no tecido. Segundo a literatura, a aplicação tópica do MAL, tanto em tecidos normais quanto em patológicos, provoca um aumento da fluorescência em função do tempo, atingindo um platô em torno de 3 a 8 horas [94, 103].

Já para o ALA, o pico de emissão de fluorescência pela Protoporfirina IX no fígado ocorreu por volta de 2 horas e 45 minutos. Esse valor está abaixo do esperado, já que outros estudos mostram uma DLI entre 4 e 14 horas [52]. No entanto, esse tempo pode variar com a formulação da droga, o tempo de aplicação e o tipo de tecido fotossensibilizado.

Observando a figura 1, nota que o pico da intensidade de fluorescência emitida pelo ALA apresentou-se maior que o MAL, o que significa que a concentração de PpIX no fígado atingiu um nível maior para o ALA que para o MAL.

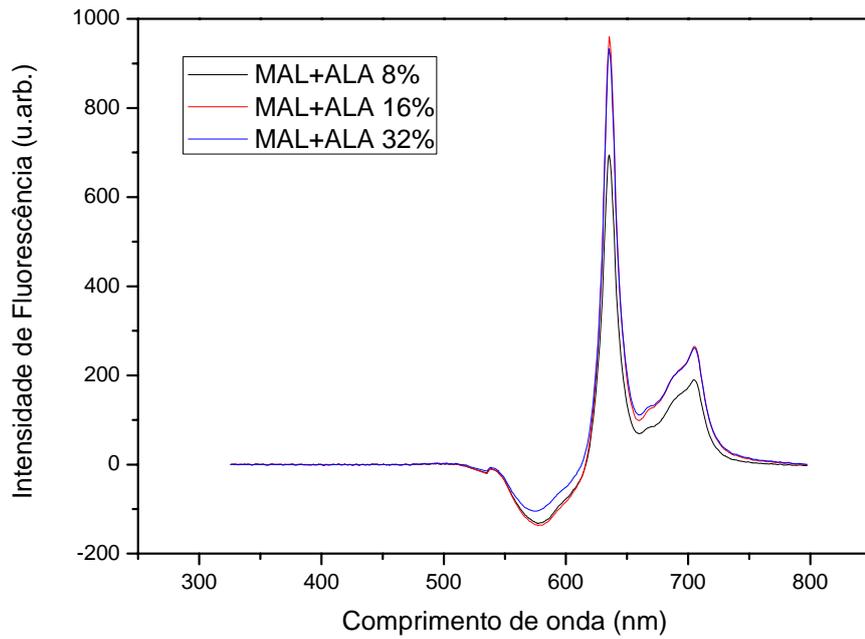
De acordo com Lopez *et al.*[104], substâncias derivadas do ALA formam menos PpIX que o próprio ALA. Essa diferença entre as duas substâncias pode ser decorrente do caráter lipofílico dos ésteres do ALA. Essa característica dota o MAL de uma maior afinidade a membrana celular, fazendo com que parte dessa droga fique retida no local e seja impossibilitada de converter-se em PpIX.

Wiegell & Wulf [89] encontraram resultados similares em relação à concentração de PpIX na pele, quando compararam a fluorescência emitida após aplicação tópica do ALA e do MAL em acne vulgaris. Esses autores verificaram que o a primeira droga formou mais PpIX que o MAL, ou seja, a emissão de fluorescência nesse caso foi mais intensa.

#### **4.2 Combinação MAL+ALA**

A coleta da fluorescência também foi realizada no tempo ótimo de formação da PpIX, antes da irradiação do tecido hepático fotossensibilizado pela aplicação tópica do ALA, MAL ou MAL + ALA 8, 16 e 32%.

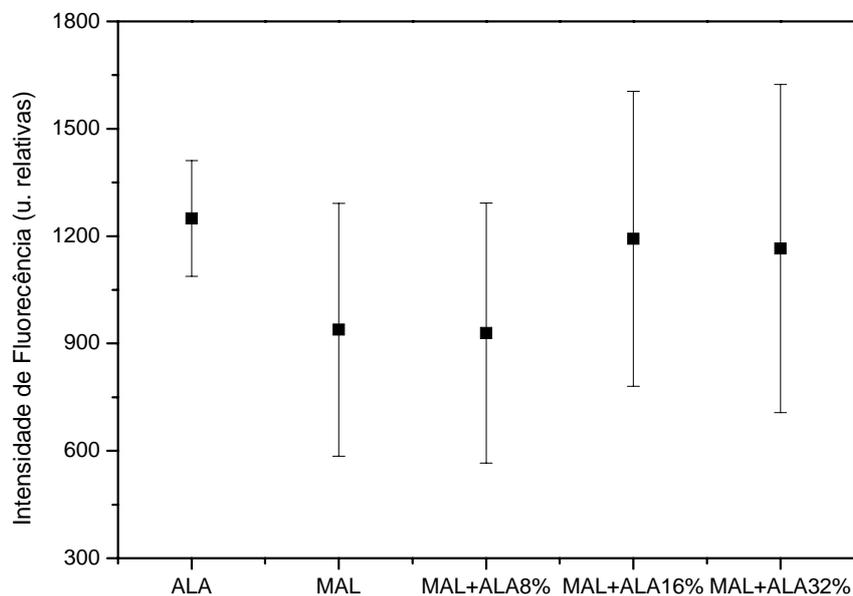
Espectros típicos médios da fluorescência emitida pela PpIX formada no tecido hepático após 4 horas da aplicação tópica da associação do MAL com diferentes concentrações de ALA, podem ser observados na figura 20.



**Figura 20: Espectros de Fluorescência emitidos pela PpIX quando concentrações crescentes do ALA foram incorporadas ao MAL.**

Como procedimento padrão, o espectro de auto-fluorescência é removido do espectro coletado, e a amplitude do pico principal da PpIX localizado ao redor de 635nm é tomado como amplitude de fluorescência

Os dados da figura 21 representam um procedimento no qual foram calculadas as médias dos pontos coletados em toda a superfície do tecido exposto à droga.



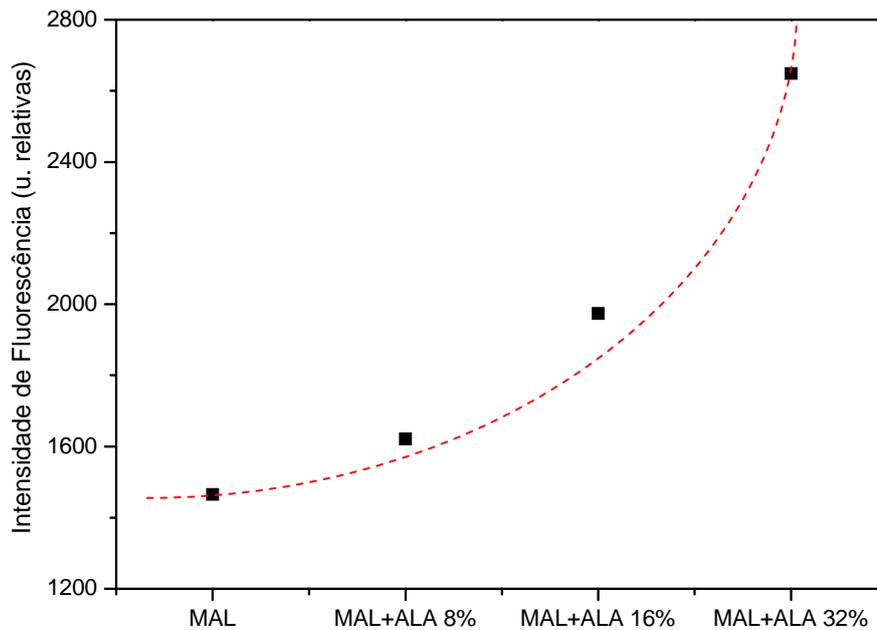
**Figura 21: Intensidade de fluorescência média obtida antes da irradiação do fígado com o laser.**

A média dos espectros de fluorescência obtidos antes da iluminação do tecido fotossensibilizado com ALA associado ao MAL mostraram que o ALA atingiu um pico de fluorescência relativamente mais intenso que o MAL, e houve uma tendência ao crescimento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de ALA que foi incorporada ao MAL. Esses resultados sugerem que a maior formação de PpIX no fígado está relacionada ao aumento da concentração de ALA adicionada ao MAL. Isso pode ser um indício de que o ALA é capaz de produzir mais PpIX no fígado que o MAL.

Além disso, acredita-se que a combinação do ALA no mesmo veículo utilizado pelo MAL tenha aumentando a capacidade de penetração dessa substância no tecido, e conseqüentemente a produção do fotossensibilizador endógeno, já que houve um aumento progressivo da formação de PpIX com a elevação da concentração de ALA adicionada ao MAL.

Considerando a heterogeneidade do tecido, a intensidade de fluorescência registrada foi apenas relativa. Assim, a combinação das drogas pode ter tido uma melhora significativamente maior do que a apresentada nessas condições.

De fato, quando foram considerados os picos máximos dos espectros de fluorescência coletados na superfície do tecido, houve um incremento da intensidade de fluorescência com a adição de ALA ao MAL, que pode ser visto na figura 22.



**Figura 22: Picos máximos dos espectros de fluorescência coletados na superfície do tecido hepático após 4 horas da aplicação do MAL e das drogas combinadas.**

Nesse caso, nota-se que a incorporação de 32% de ALA no MAL quase dobrou a emissão relativa de fluorescência, reforçando a idéia de que a associação das substâncias seja mais eficiente nesse aspecto.

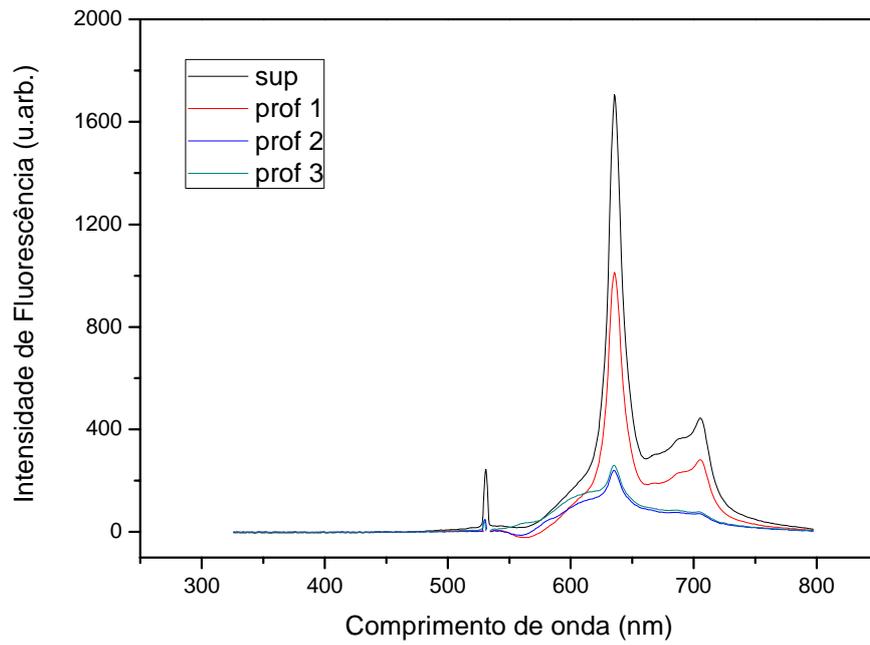
### **4.3 Avaliação Indireta da Penetração do Medicamento no Fígado**

Além da produção superficial, a profundidade de penetração da droga e a quantidade PpIX formada nas camadas mais profundas do tecido são essenciais para o resultado final da PDT.

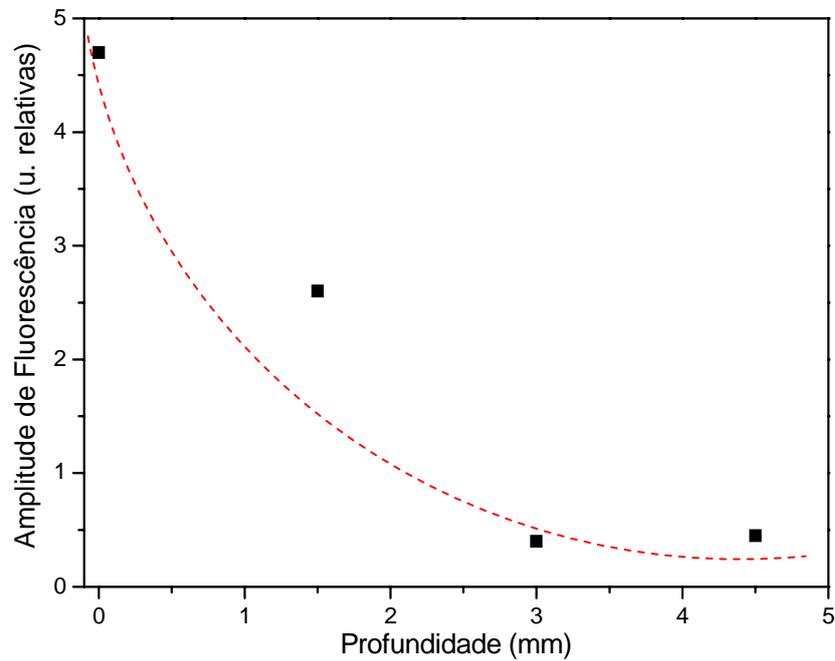
A coleta dos espectros de fluorescência emitidos pela PpIX foi realizada na superfície e em três profundidades do fígado após o tempo ótimo de formação da substância fotossensibilizadora. De acordo com os resultados obtidos, constatou-se a formação de PpIX em todos os níveis de penetração para as duas drogas testadas.

No caso do ALA, a formação de PpIX foi maior na superfície e decaiu com o aumento da profundidade (Figura 23).

A figura 24 a mostra o perfil obtido em termos de amplitude de fluorescência *versus* profundidade de penetração da PpIX.



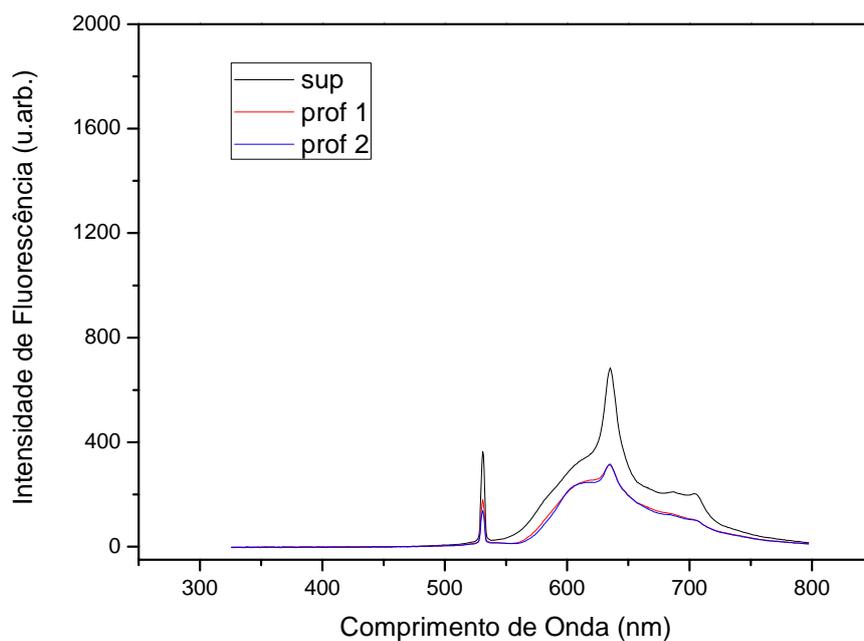
**Figura 23:** Espectros de Fluorescência coletados após 2 horas e 45 minutos da aplicação do ALA o fígado. Houve maior formação de PpIX na superfície e decaiu com a penetração no tecido.



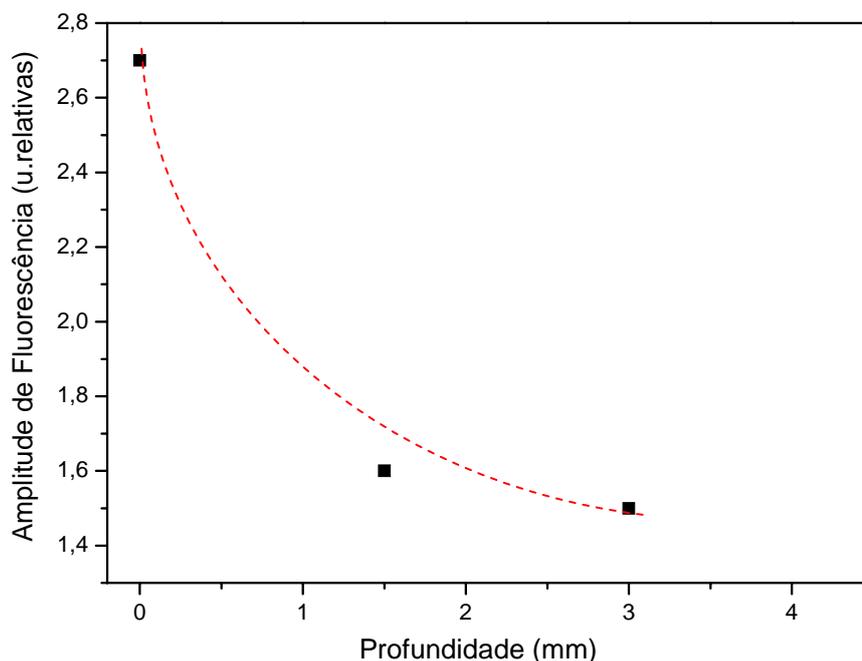
**Figura 24:** Gráfico da Amplitude de fluorescência versus profundidade do fígado para o ALA.

Em relação à penetrabilidade, observa-se um valor do tipo  $(1/e)$  de  $\delta \sim 2,2\text{mm}$  para o ALA, embora não deva ser um exponencial puro.

A figura 25 mostra o resultado dos espectros em algumas profundidades para o MAL. O perfil de profundidade observado na figura 26 é de  $\delta (1/e) \sim 2,0 \text{ mm}$ .



**Figura 25: Espectros de Fluorescência coletados após 4 horas da aplicação do MAL no fígado. A formação de PpIX foi maior na superfície e decaiu com o aumento da profundidade.**



**Figura 26: Gráfico da Amplitude de fluorescência versus profundidade do fígado para o MAL.**

No entanto, a penetrabilidade do MAL parece ser superior ao ALA, já que as maiores profundidades apresentaram uma amplitude de fluorescência relativamente maior para seu derivado que para o próprio ALA. Assim, pode-se afirmar que o MAL forma mais PpIX nas camadas mais profundas do tecido que o ALA.

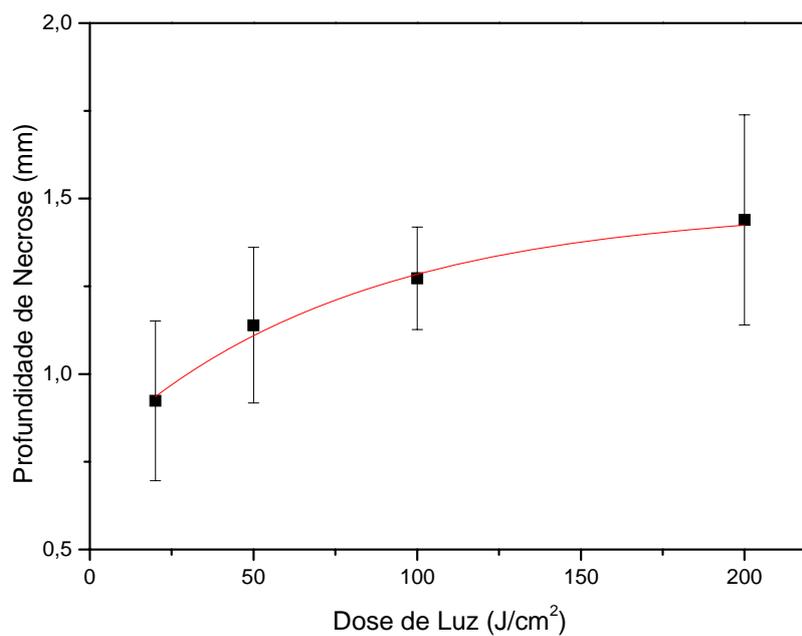
Além disso, a intensidade de emissão de fluorescência na superfície e com aproximadamente 1,5mm de profundidade foi maior para o ALA. Esse dado reforça mais uma vez a maior eficiência do ALA na produção de PpIX nas camadas mais superficiais do tecido.

#### 4.4 Estudo da Necrose

A morte celular/necrose tecidual é o principal objetivo da TFD, e um meio de se avaliar a eficácia dessa terapia [105].

Neste estudo, a medida da profundidade de necrose do tecido hepático foi utilizada para avaliar a ação fotodinâmica do ALA e do MAL submetidos à TFD.

As medidas da profundidade de necrose obtidas mostraram que os valores encontrados para o MAL foram superiores aos do ALA em todas as doses de luz utilizadas, e na associação das drogas houve um aumento da profundidade de necrose com o incremento na porcentagem de ALA incorporado quando o tecido foi irradiado com fluência de 100 J/cm<sup>2</sup> (Figuras 27, 28 e 29).



**Figura 27:** Gráfico da profundidade de necrose *versus* Fluência para o ALA.

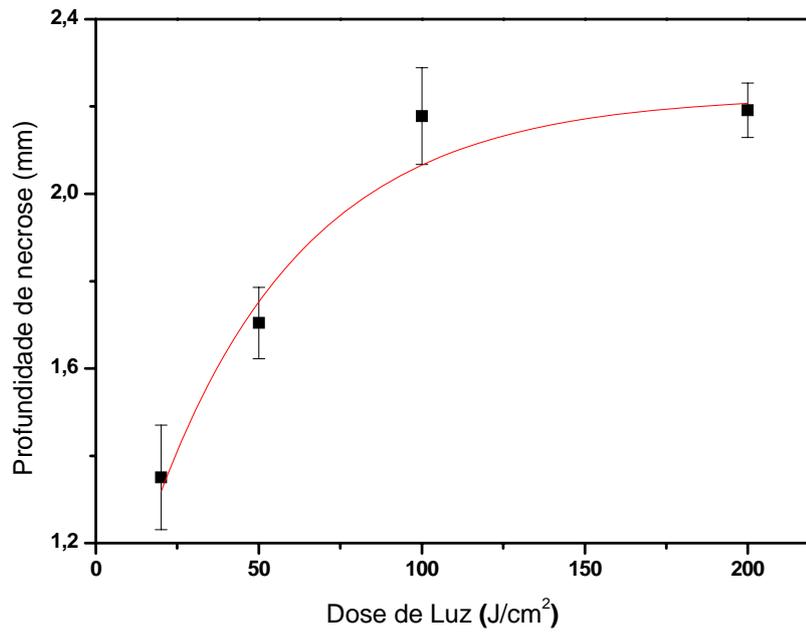


Figura 28: Gráfico da profundidade de necrose *versus* Fluência para o MAL.

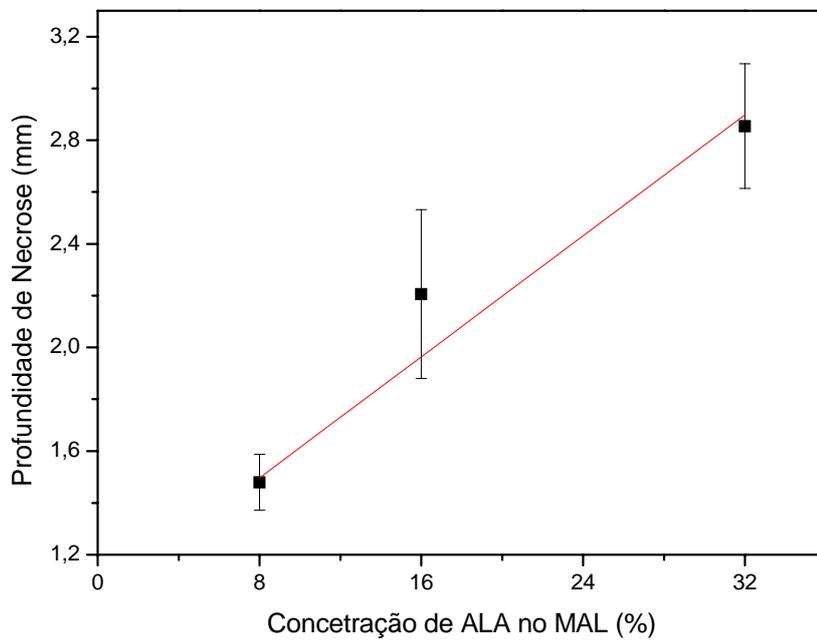


Figura 29: Gráfico da profundidade de necrose *versus* concentração do ALA incorporado ao MAL submetidos à TFD com dose de luz de 100J/cm².

De acordo com as medidas realizadas em tecido hepático de ratos normais, a profundidade máxima de necrose atingida foi de, aproximadamente, 1,5 mm para ALA e de 2,2 mm para o MAL, ou seja, a necrose ocorreu superficialmente.

Os resultados encontrados condizem com os relatados na literatura, que apontam para a dificuldade do ALA em atravessar barreiras biológicas, enquanto que seus derivados têm maior capacidade de penetrar nos tecidos e atingir níveis mais profundos [52, 63, 69, 71].

Além disso, fotossensibilizadores sistêmicos distribuem-se por toda a área da lesão, enquanto que os tópicos não possuem uma distribuição homogênea e são capazes de penetrar somente poucos milímetros [52, 106].

Morton *et al.* [107], em seu trabalho com Carcinomas Basocelulares (CBC) Superficiais, mostrou haver uma relação inversa entre a espessura tumoral e sua resposta à TFD.

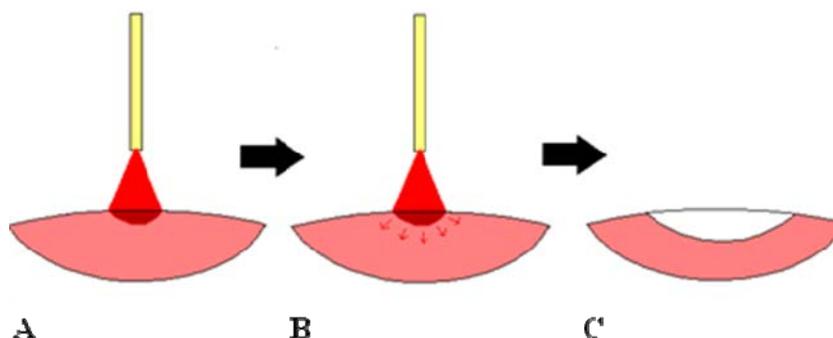
A eficácia da TFD em lesões nodulares e nodulares ulcerativas é drasticamente reduzida quando estas possuem mais de 2 ou 3 mm [52, 53, 77, 108, 109].

Para que haja uma melhor penetrabilidade da luz no tecido, é necessário que a luz incida em um comprimento de onda adequado. Como as porfirinas possuem uma de suas bandas de absorção no comprimento de onda de 630 e 650nm, região do vermelho [52], o comprimento de onda utilizado neste estudo foi de 630 nm. Entretanto, nessa porção do espectro, a máxima profundidade de necrose atingida nos tecidos é inferior a 5 mm [110].

Segundo Ferreira [3, 105], existe uma diferença de profundidade na penetração da luz no tecido hepático, em relação a outros tecidos, uma vez que a penetrabilidade da luz no fígado fotossensibilizado é menor devido à absorção da luz incidente.

Dessa forma, alguns fatores devem ser considerados quando se trata de penetração da luz no tecido são: absorção ótica dos cromóforos bioendogênicos e o espalhamento da luz pelo tecido. O FS presente no fígado absorve uma grande quantidade de luz, diminuindo a profundidade de penetração luminosa no tecido. Grande parte dessa energia absorvida é dissipada na forma de calor [105], mostrando que o tecido hepático normal, na presença do FS, tem suas características ópticas alteradas, o que se reflete na profundidade de necrose.

Por isso, a forma de iluminação do tecido deve objetivar a minimização de efeitos adversos indesejáveis. A incidência perpendicular da luz no lobo do fígado foi adotada pra evitar algumas variações que levariam a mudança nas quantidades refletidas, absorvidas e transmitidas, que dependem do ângulo [105].



**Figura 30: Esquema de iluminação no fígado: (A) representa a luz incidindo perpendicularmente no fígado; (B) representa o espalhamento da luz no tecido; e (C) a necrose no tecido hepático [3].**

Observando-se a figura 30, é possível notar que a iluminação é realizada em uma área pré-estabelecida. Porém, a luz, em uma dose adequada, ao penetrar no tecido sofre espalhamento, fazendo com que uma região muito maior seja atingida, portanto, o dano tecidual poderá ocorrer em uma extensão maior que a área delimitada [3].

Oseroff [111] em seu estudo com ALA tópico associado à TFD para tratamento de CBC enfatizou a importância da dose de luz. Os resultados por ele obtidos mostraram que a frequência de resposta clínica foi de 95% para dose de  $200 \text{ J/cm}^2$  (com intensidade de  $150 \text{ mW/cm}^2$ ) e menos de 70% para dose de  $150 \text{ J/cm}^2$ .

No presente estudo, tanto o ALA quanto o MAL e a combinação de ambos associados à TFD provocaram necrose hepática a partir da dose de  $20 \text{ J/cm}^2$ . Groenlund-Pakkanen *et al.* [112], em seu trabalho com aplicação endovenosa de ALA associado à TFD com dose de  $20 \text{ J/cm}^2$ , encontraram um resultado similar, com necrose superficial e irregular da mucosa.

Como pode ser observado nos gráficos de profundidade de necrose *versus* Fluência para o ALA (Figura 27) houve uma tendência a aumento da profundidade de necrose

com a elevação da dose de luz. No caso do MAL (Figura 28), a profundidade de necrose aumentou com o aumento da dose de luz, sendo que a dose de  $200 \text{ J/cm}^2$  causou uma necrose mais profunda que doses inferiores, porém, muito semelhante aos valores obtidos para dose de  $100 \text{ J/cm}^2$ . Este achado para o MAL foi similar ao encontrado por Ferreira [3] para o Photogem, um FS derivado da hematoporfirina de uso endovenoso.

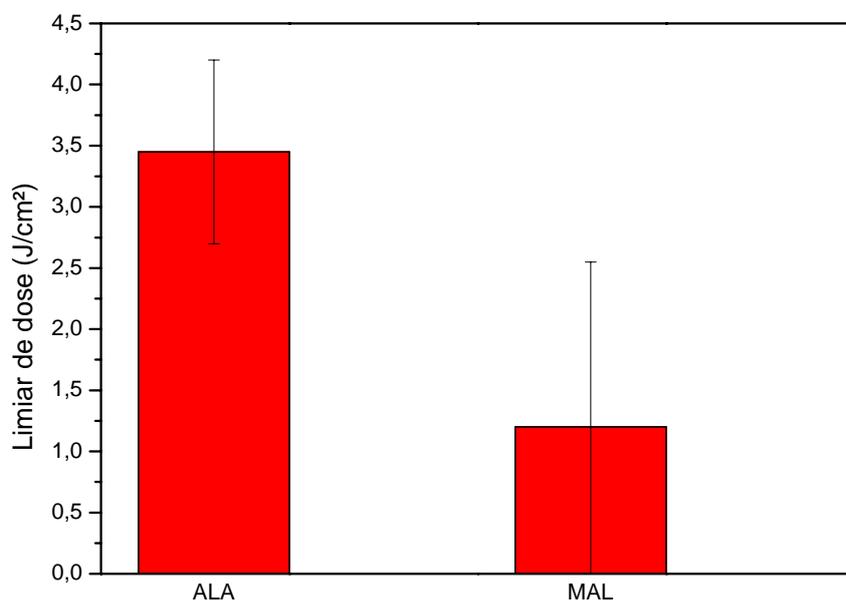
Na figura 28 pode-se observar a ocorrência de saturação na dose de  $100 \text{ J/cm}^2$  para o MAL. O mesmo não ocorreu com o ALA, para o qual a profundidade de necrose continuou tendendo ao aumento com o incremento da dose de luz. De acordo com estudos reportados na literatura, o transporte do ALA através da membrana é mais lento e saturável, pois ocorre por transporte ativo, o qual requer energia e depende de diversos fatores, como pH, temperatura, concentração  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , entre outros [64-66, 86]. No caso do MAL, esse transporte é passivo por difusão através da membrana, portanto não requer energia e é insaturável [70]. Essa diferença do mecanismo de transporte sugere que MAL tem capacidade de penetrar mais rapidamente na célula que o ALA, e por isso sua saturação ocorre primeiro.

Além disso, para que a fotoxidação ocorra de forma suficiente para promover necrose tecidual é necessária uma quantidade mínima de excitação, denominada dose limiar ou *threshold dose*. Doses de luz abaixo do limiar, não induzem a morte celular e o tecido deve se recuperar após aplicação da TFD; doses de luz acima do limiar induzem a morte celular (necrose) [3].

Um estudo recente utilizou os valores de dose limiar a fim de se comparar a eficiência fotodinâmica de diferentes fotossensibilizadores [113].

O modelo utilizado para o estudo da profundidade de necrose, bem como para determinar a dose limiar, baseou-se nos experimentos de Ferreira [3, 105].

A dose limiar obtida a partir do cálculo matemático mostrou um valor de  $3,45 \pm 0,75 \text{ J/cm}^2$  para o ALA e de  $1,20 \pm 1,35 \text{ J/cm}^2$  para o MAL. Isso significa que a dose mínima necessária para que o MAL tópico associado à TFD provoque necrose no fígado é inferior à dose mínima para que o ALA em iguais condições, atinja o mesmo objetivo, sugerindo que o MAL apresenta um melhor desempenho fotodinâmico que o ALA (Figura 31).



**Figura 31: A dose limiar encontrada para o MAL foi inferior a obtida para o ALA, ou seja, o MAL necessita de uma dose de luz menor para provocar necrose hepática.**

Embora as duas substâncias utilizadas topicamente sigam a mesma via metabólica após sua penetração no tecido [66], o MAL possui caráter mais lipofílico, portanto, melhor penetrabilidade e capacidade de atingir níveis mais profundos do tecido quando comparado ao ALA [52, 69, 70].

Um ponto importante a ser discutido em relação à profundidade de necrose mostrada na figura 29 é que o efeito combinado do MAL + ALA pode gerar um grande efeito compensatório, pois, dobrando-se a quantidade de 8% para 16% de ALA incorporado ao MAL, observou-se uma elevação de 60% na profundidade de necrose e esta aumentou praticamente 100% quando essa concentração passou de 8% para 32%.

A figura 29 indica que a profundidade de necrose continua aumentando com porcentagem de ALA adicionado ao MAL, mostrando que o ponto ótimo ainda pode estar adiante em termos de concentração de ALA. Com 32% de ALA, a profundidade de necrose já supera em muito aquilo observado como saturação para o MAL na forma isolada, que atinge um máximo aproximado de 2,2mm.

Estes dados indicam um considerável comprometimento entre a dinâmica de formação da PpIX e a profundidade de necrose que passa a ser atingida. Adicionando uma droga que é mais eficiente na produção de porfirina no mesmo creme de outra que possui maior capacidade de penetração, pode-se alcançar um melhor efeito conjunto. Tal fato é comprovado pela figura 29 .

Os mecanismos envolvidos neste processo podem ser secundários a formulação da droga, sugerindo que a diferença na penetração no tecido entre o ALA e o MAL pode ser influenciada pelo veículo utilizado na composição da droga.

Além disso, é importante lembrar que a profundidade de necrose não é apenas consequência do perfil da droga no tecido. A distribuição da luz, que por sua vez está associada à quantidade de droga, e a fotodegradação do fotossensibilizador durante a iluminação são alguns dos aspectos intrinsecamente relacionados à profundidade final de necrose atingida. Estas conjunturas foram devidamente discutidas recentemente por Vollet-Filho [91].

Portanto, o principal a salientar é que a combinação de vários fatores corrobora para se alcançar maior profundidade de necrose.

Considerando os achados no presente estudo em relação a profundidade de necrose obtida e os dados reportados na literatura, pode-se dizer que o uso individual das drogas deve ser restrito a tratamento de tumores superficiais, locais e não-invasivos.

#### **4.4.1 Microscopia da Necrose**

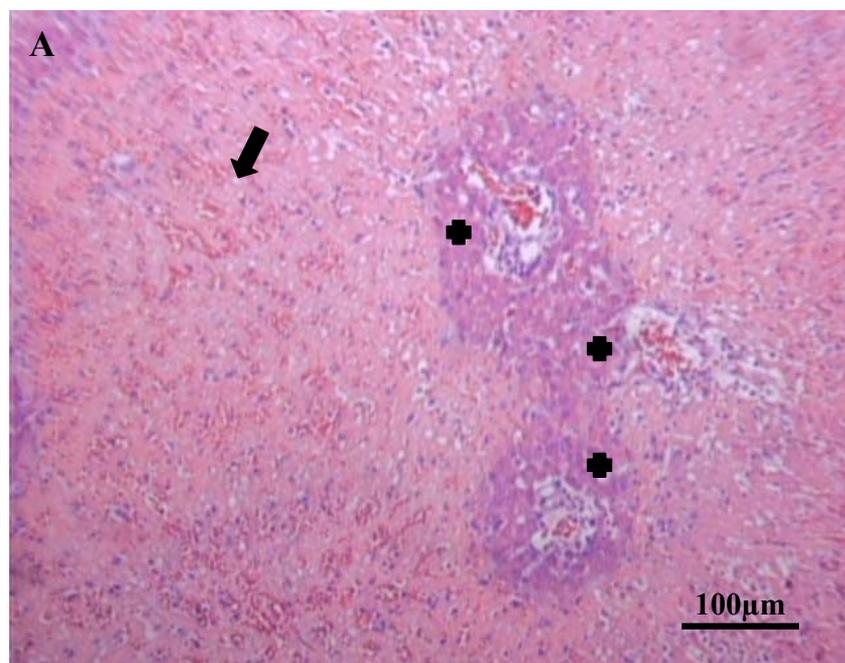
O estudo microscópico da necrose foi realizado através da observação das lâminas histológicas em microscópio óptico. Foram captadas algumas imagens com os aspectos gerais da necrose.

A análise microscópica da necrose induzida pela TFD mostrou presença de necrose coagulativa, infiltrado inflamatório linfocitário discreto e a nítida separação entre os parênquimas necrosado e normal. Observou-se áreas preservadas na periferia dos espaços portais, localizados na região necrosada e necrose da veia centrolobular, bem como grande

quantidade de neutrófilos e áreas congestionadas com presença de hemácias. para os medicamentos aplicados topicamente em fígado normais de ratos.

A TFD com o ALA, MAL ou MAL +ALA em todas as concentrações para as doses de luz utilizadas provocou necrose na superfície do tecido hepático iluminado.

Algumas das principais alterações microscópicas hepáticas, acima referidas, podem ser visualizadas nos quadros de fotomicrografias (32 - 36).



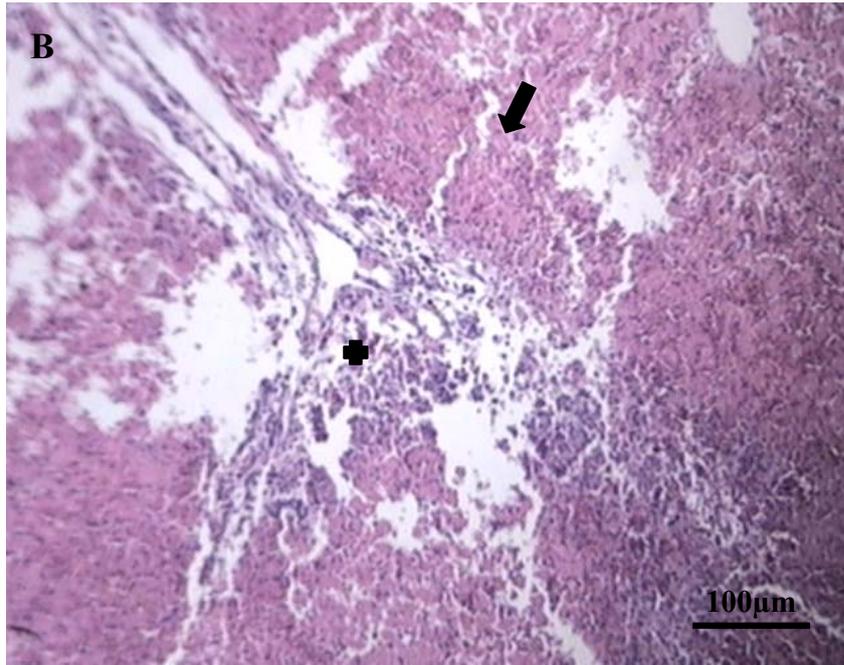


Figura 32 A e B: Fotomicrografias de fígado de rato, w-cortes transversais corados com HE, aumentados em 100x (A) e (B). Necrose do tecido hepático (↑) com regiões de tecido normal ao redor do espaço porta(■).

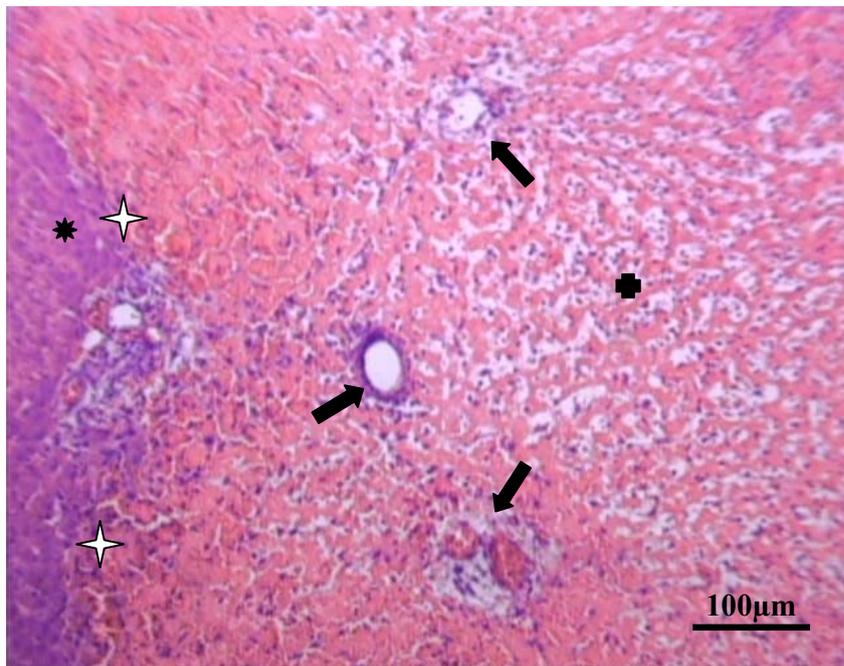


Figura 33: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Transição do tecido hepático normal e necrosado (☆), presença de áreas preservadas na periferia dos espaços portais (↑) na região necrosada (■) e células saculiformes no tecido normal (\*).

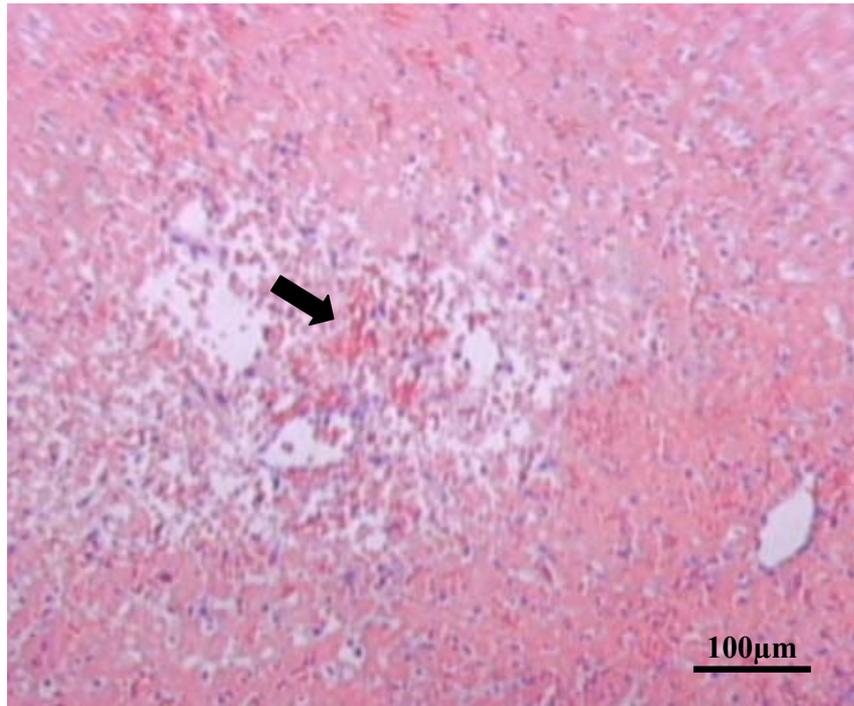


Figura 34: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Presença de hemácias (↑) indicando congestão e pontos hemorrágicos.

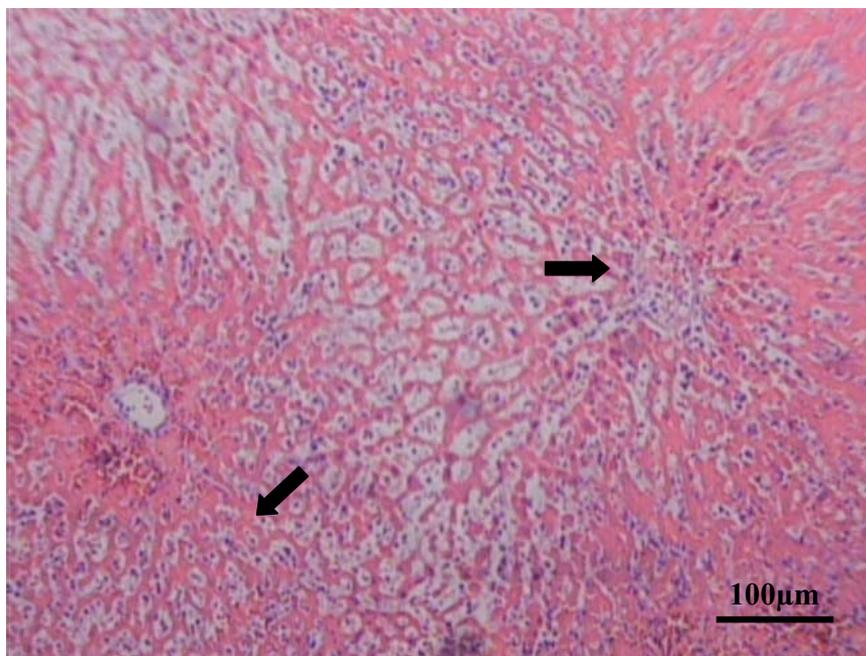
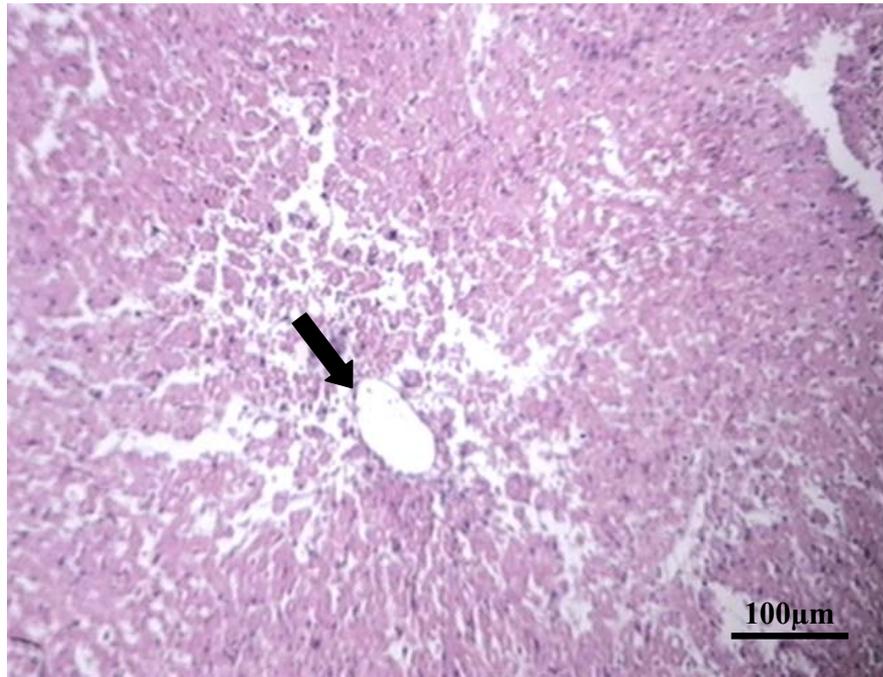


Figura 35: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico (↑).



**Figura 36: Fotomicrografia de fígado de rato, w-corte transversal corado com HE, aumentado em 100x. Necrose da veia centrolobular (↑).**

A análise microscópica das lâminas mostrou que houve necrose para ambas as substâncias aplicadas topicamente em fígados normais de ratos, tanto individualmente quanto na forma associada, para todas as doses de luz utilizadas. No entanto, houve diferença entre o ALA e o MAL em relação à profundidade de necrose. Por isso, sugere-se que o MAL possua uma leve tendência a melhor resposta fotodinâmica que o ALA nas condições experimentais estudadas.

#### **4.5 Análise Mitocondrial**

As mitocôndrias são organelas presentes em todas as células eucariontes e as responsáveis pelo fornecimento e controle da energia vital para a vida celular [114]. Pesquisas sobre disfunções mitocondriais relacionam essas organelas como umas das responsáveis por processos de morte celular tanto por necrose, como por apoptose [115]. Com base nessa e em outras informações, as mitocôndrias são apontadas como alvos importantes para a indução da morte de células tumorais pelo processo de Terapia Fotodinâmica (TFD).

Com o intuito de analisarmos se os precursores da PpIX (ALA e MAL) influenciaram na bioenergética mitocondrial, monitorou-se o consumo de  $O_2$  de mitocôndrias isoladas de fígados de ratos, após administração tópica dos medicamentos nos fígados dos animais.

A demonstração de que a respiração promove uma diferença na concentração de prótons (gradiente protônico) entre o interior da mitocôndria e o espaço que separa suas membranas interna e externa – gerando um potencial elétrico-químico que a célula usa como fonte de energia para fosforilar a adenosina difosfato (ADP), sintetizando ATP – revela a importância da impermeabilidade da membrana interna.

Mesmo prótons só atravessam essa membrana se transportados por moléculas específicas, e essa característica é essencial para a integridade da síntese de ATP e também para a viabilidade da célula.

Além disso, as próprias reações de óxi-redução (reações redox) envolvidas no transporte de elétrons durante a respiração celular geram, como subproduto, espécies reativas de oxigênio, tóxicas a praticamente todos os componentes das células, em especial às próprias mitocôndrias, quando a capacidade antioxidante da célula é deficiente. Tais espécies (radical ânion superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio) parecem contribuir para o declínio na capacidade de produção de energia das mitocôndrias durante o processo de morte celular.

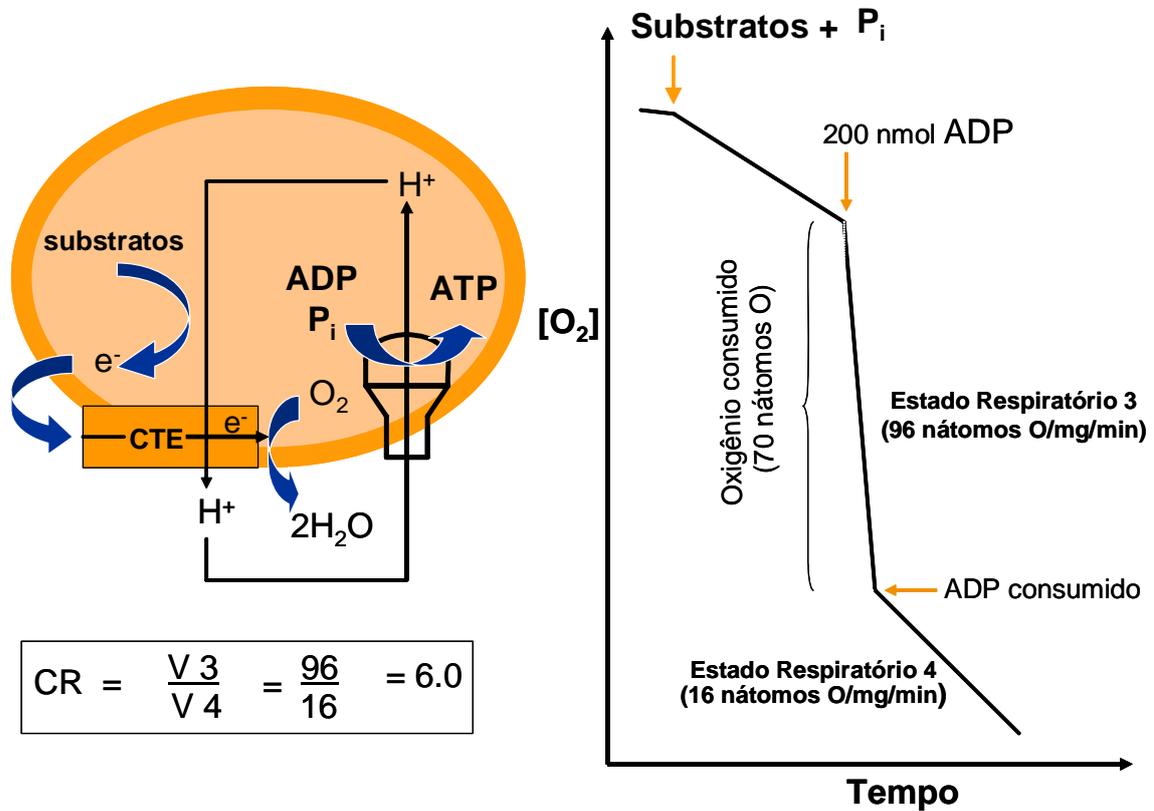
A partir das mitocôndrias isoladas foi realizada a análise mitocondrial em três situações: 1) após 4 horas da aplicação do MAL, 2) após 2 horas e 45 minutos da aplicação do ALA e 3) sem nenhuma medicação.

Os dados obtidos foram processados em oxígrafo acoplado em eletrodo do tipo Clark, onde os seguintes parâmetros foram analisados: controle respiratório, razão ADP/O e velocidades de respiração dos estados 3 e 4 (V3 e V4).

#### **4.5.1 Controle Respiratório Mitocondrial**

Essa medida (figura 37 – esquema controle respiratório [115]) é uma representação da integridade da membrana mitocondrial interna e é representada pela razão das velocidades de consumo de  $O_2$  mitocondrial nos estados de fosforilação oxidativa, ou seja, no momento em que a enzima ATPsintetase está fosforilando o ADP à ATP, na presença de

fosfato inorgânico (Pi), velocidade esta dita como V3, e a velocidade de “repouso” (V4), quando todo ADP do meio de reação foi convertido à ATP.



**Figura 37:** Esquema representando os “estados respiratórios” 3 e 4 e a determinação do controle respiratório mitocondrial (C.R.) [115]. Na cor alaranjada está representada uma mitocôndria com a cadeia de transporte de elétrons (CTE) e a ATP sintetase, fosforilando o ADP a ATP. O gráfico representa um traçado de consumo de oxigênio pela suspensão mitocondrial na presença de substratos respiratórios, fosfato inorgânico (Pi) e ADP (eixo y), em função do tempo (eixo x).

Observou-se que tanto o MAL após 4 horas de exposição no órgão, como o ALA, após 2 horas e 45 minutos (determinado anteriormente como tempo ótimo de produção de PpIX) diminuíram de maneira semelhante e significativamente o controle respiratório mitocondrial (RCR: *respiratory control ratio*, figura 39).

Nos experimentos onde se constatou diminuição do controle respiratório mitocondrial, pode-se deduzir que ocorreu uma perda da capacidade de permeabilidade seletiva da membrana mitocondrial interna, evento que constitui, em muitas condições patológicas, um processo-chave no processo de morte celular programada ou acidental – o que

faz da mitocôndria um centro de atenções em estudos de fisiopatologia e um alvo importante para a indução de morte celular por ação direta ou indireta de drogas e/ou de espécies reativas de oxigênio geradas no processo fotodinâmico.

#### **4.5.2 Velocidade de Consumo de O<sub>2</sub> (V3 e V4)**

Analisando os efeitos destes compostos nas velocidades de consumo de O<sub>2</sub> (V3 e V4) citados anteriormente, notou-se que nenhum dos dois compostos alterou a velocidade do estado 3 (Figura 41), indicando que o alvo de ação provavelmente é a enzima responsável pela fosforilação oxidativa (ATPsintetase). Para confirmar essa hipótese foi quantificada a razão ADP/O, que é a razão entre número de nanomoles de ADP fosforilado por átomos de oxigênio consumidos. Se esse valor fosse menor que a ADP/O das mitocôndrias controle (aquelas isoladas do fígado de ratos que não foram fotossensibilizados), significaria que foi preciso mais O<sub>2</sub> para a ATPsintetase fosforilar a mesma quantidade de ADP presente no meio.

Como não foi observado nenhuma diferença na velocidade de consumo de O<sub>2</sub> no estado 3, bem como na razão ADP/O (Figura 40), foi analisado o consumo de O<sub>2</sub> no estado de repouso (V4) (Figura 42) ou estado não-fosforilante. Nesse caso, observou-se que tanto o ALA quanto o MAL aumentaram significativamente a V4, indicando que ambos compostos atuaram aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial interna (MMI) [116].

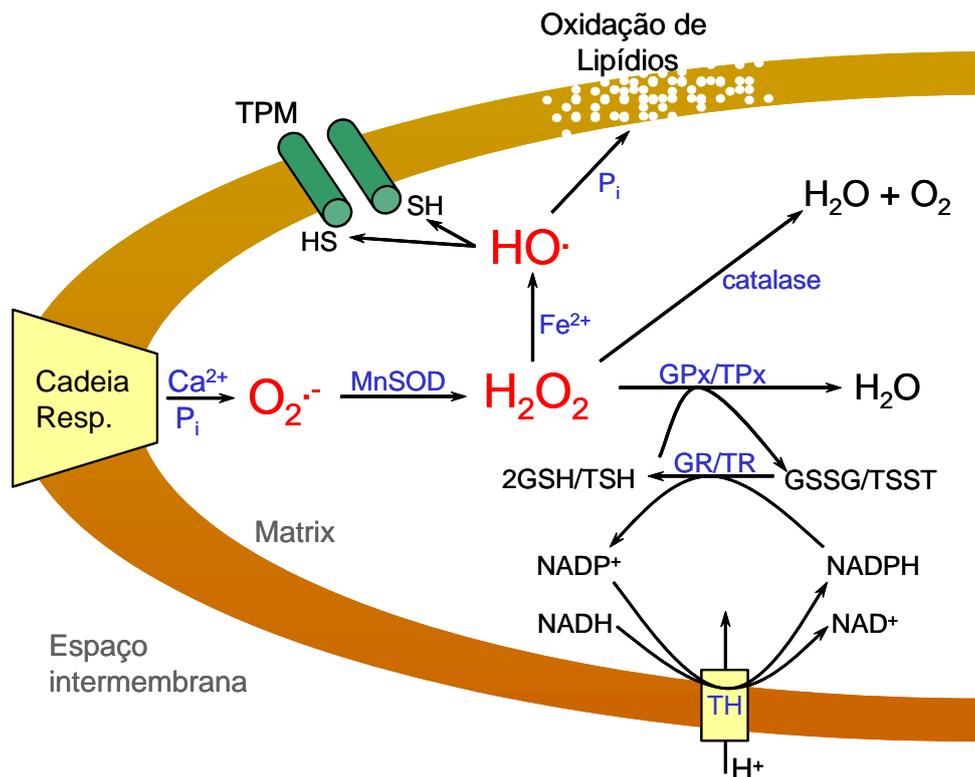
#### **4.5.3 O Fenômeno de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)**

Frente a situações de estresse oxidativo como a exposição de mitocôndrias à agentes oxidantes e altas concentrações de Ca<sup>2+</sup>, poderá ocorrer a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), caracterizada por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente se torna permeável a prótons, íons, suporte osmótico e até mesmo pequenas proteínas. O Ca<sup>2+</sup> parece ser o principal agente estimulador da geração mitocondrial de EROs [117] (figura 38). O aumento da velocidade de consumo de O<sub>2</sub> no estado de repouso (V4, figura 42) pode estar associado à abertura do PTPM, por ser descrito haver um desarranjo das proteínas da cadeia respiratória [118], como o

translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), o canal iônico voltagem-dependente (VDAC) e a ciclofilina D (CyD), recrutado a partir da matriz mitocondrial (para revisão ver [119-123]).

Se a MMI, que possui uma permeabilidade seletiva for alvo de injúria (por exemplo: oxidação de proteínas e lipídeos da bicamada), pode ocorrer o extravazamento de prótons ( $H^+$ ), por “buracos” ou poros inespecíficos da membrana, devido à ocorrência de um fenômeno denominado “transição de permeabilidade mitocondrial”, que somente poderia ser comprovado se os experimentos fossem repetidos na presença de inibidores desse “poro de transição de permeabilidade mitocondrial” [117].

Este fenômeno é claramente explicado por aumento da velocidade de consumo de  $O_2$  no estado de “repouso” (V4) e pela diminuição progressiva do potencial de membrana mitocondrial, ambas situações indicam o extravazamento de prótons devido aumento da permeabilidade da MMI.

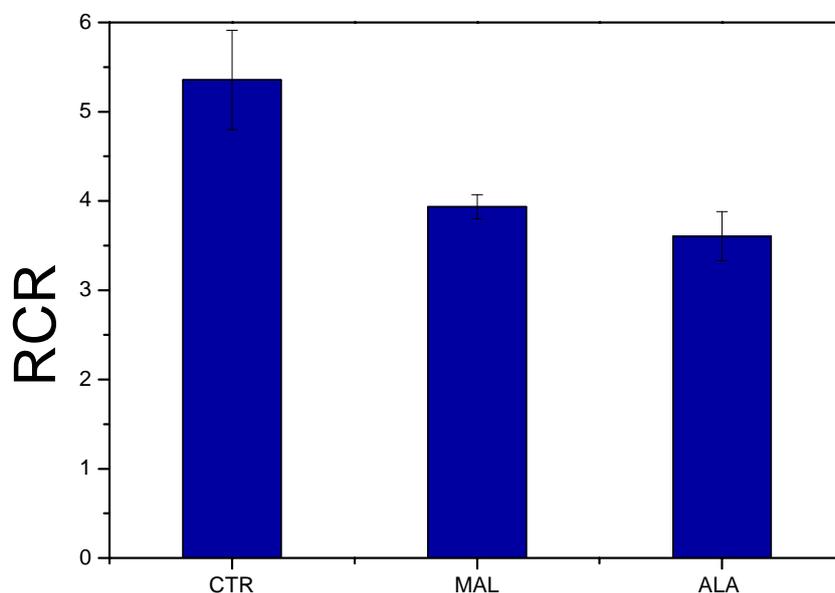


**Figura 38: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por  $Ca^{2+}$  e EROs na membrana mitocondrial interna [117].** O acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais  $O_2^{\bullet-}$ . Quando a geração de  $O_2^{\bullet-}$  aumenta na presença de  $Ca^{2+}$  e  $P_i$ , e/ou os mecanismos de remoção de  $H_2O_2$  estão inativados,  $H_2O_2$  acumula-se e na presença de  $Fe^{2+}$ , gera o radical  $OH^{\bullet}$  altamente reativo.  $OH^{\bullet}$  oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente,  $OH^{\bullet}$  pode promover

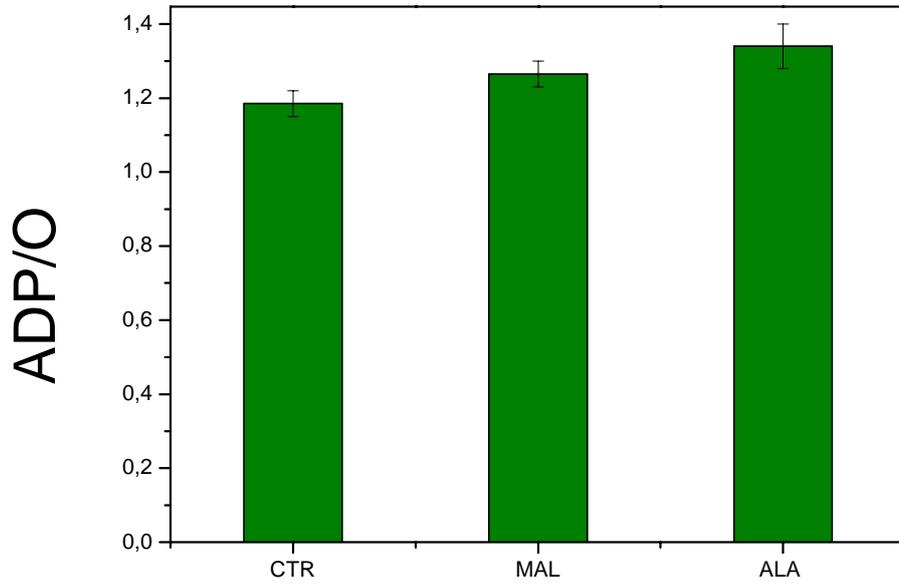
permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por  $P_i$ .

Concluindo, os resultados demonstraram um importante efeito dos dois compostos precursores de PpIX (MAL e ALA) sobre a cadeia de transporte de elétrons, induzindo transição de permeabilidade mitocondrial na presença de  $Ca^{2+}$ . Esses efeitos foram provavelmente devido à maior associação da porfirina com as membranas mitocondriais, seja devido à lipofilicidade dos compostos e/ou pela estrutura do composto *per si*, que estaria favorecendo esta maior associação. Essas e outras alterações podem levar à morte de células tumorais tanto por necrose como por apoptose.

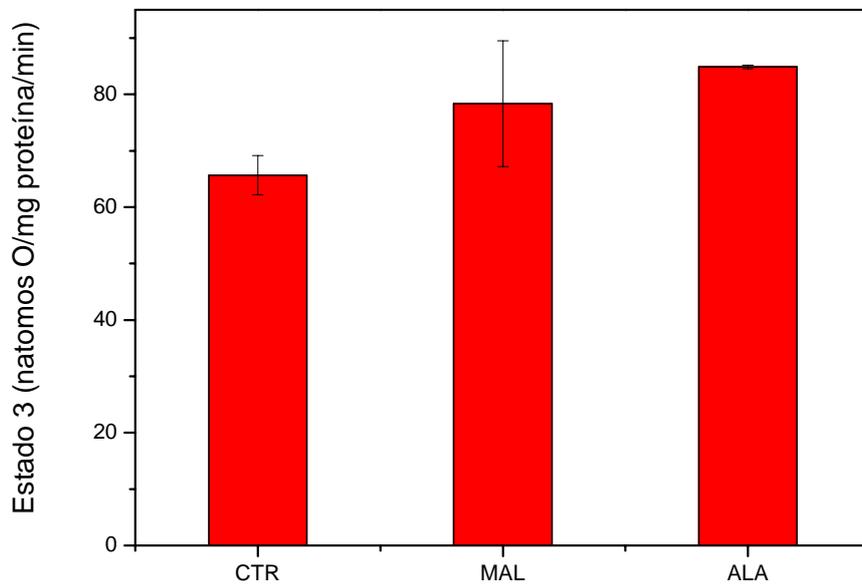
Outros experimentos (como inchamento e potencial de membrana mitocondrial, peroxidação lipídica e protéica, produção de espécies reativas de  $O_2$  e morte celular) realizados paralelamente com os resultados apresentados e discutidos acima, podem indicar mais claramente a ação do ALA e do MAL sobre as mitocôndrias isoladas ou *in situ*, tanto no escuro, como após o processo fotodinâmico. Estes estudos complementares já estão em planejamento para a continuidade dessa pesquisa.



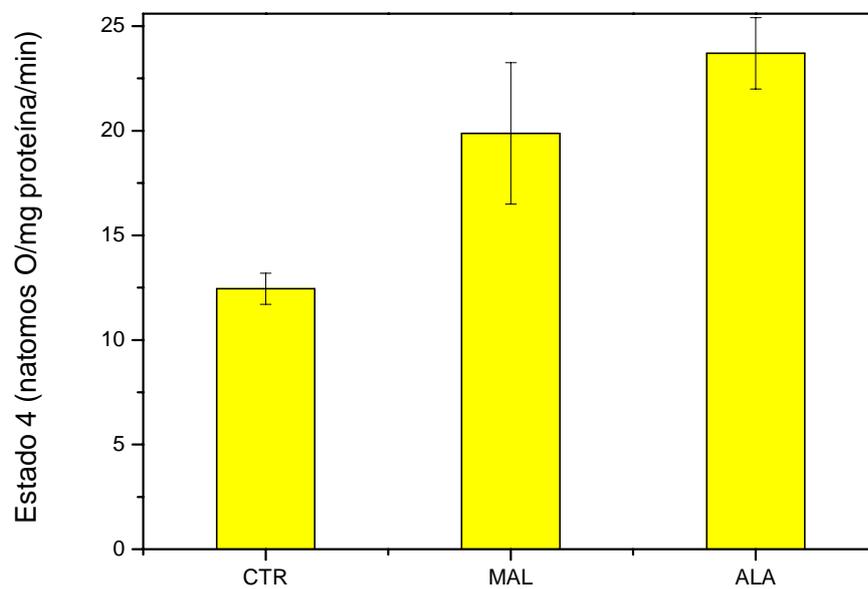
**Figura 39:** Redução do controle respiratório provocada pelo ALA e MAL aplicados topicamente em fígados de ratos.



**Figura 40: Razão ADP/O não foi alterada pela aplicação tópica do ALA e do MAL no fígado.**



**Figura 41: Velocidade (V3) não foi significativamente modificada pela presença da PpIX no fígado.**



**Figura 42: Velocidade de repouso (V4) aumentou significativamente em relação ao grupo controle na presença de PpIX no tecido hepático.**

## 5. CONCLUSÃO

A determinação do tempo ótimo de formação da PpIX para o ALA e para o MAL, aplicados topicamente em fígado sadio de ratos, mostrou que ambos apresentam um padrão semelhante de produção, acúmulo e eliminação da PpIX neste tecido. Entretanto, o tempo de ocorrência desses eventos apresentou-se diferentes, já que DLI foi menor para a primeira substância.

Em determinadas condições, a fluorescência do tecido hepático com ALA revelou um nível de emissão intrínseco, superior ao do MAL, sugerindo uma maior eficiência na produção da PpIX quando comparado ao seu derivado.

Em relação à análise mitocondrial realizada, a PpIX formada por ambas as substâncias, MAL e ALA, induziram a transição de permeabilidade mitocondrial na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , provavelmente devido à maior associação da porfirina com as membranas mitocondriais. Essas e outras alterações mitocondriais podem levar à morte de células tumorais antes mesmo que seja realizada a TFD.

As drogas comparadas neste estudo apresentaram necrose utilizando-se a dose de luz de  $20 \text{ J/cm}^2$ . Os valores da profundidade de necrose aumentaram com o incremento da doses de luz utilizada, ou seja, quanto maior a dose de luz maior a profundidade de necrose.

Através da análise da profundidade de necrose provocada pelo ALA e pelo seu derivado, o MAL, pode-se dizer que o MAL é capaz de induzir uma necrose mais profunda para uma mesma dose de luz.

Na associação das drogas houve um aumento da profundidade de necrose com o incremento na porcentagem de ALA incorporado quando o tecido foi irradiado com fluência de  $100 \text{ J/cm}^2$ , sugerindo que a combinação de uma droga com maior capacidade de penetração no mesmo veículo de outra mais eficiente na produção a porfirina, pode-se alcançar um melhor efeito conjunto.

Entretanto, a necrose provocada pelas substâncias precursoras da PpIX analisadas individualmente, ocorreu apenas em nível superficial, chegando a atingir uma profundidade máxima próxima de 2,2 mm. Portanto, associando os resultados do presente

estudo com fígados de ratos com o que está reportado na literatura, o uso tópico do ALA e do MAL deve ser restrito a tratamento de tumores superficiais, locais e não invasivos.

Baseado nos resultados obtidos foi possível determinar o *threshold dose* e estabelecer uma dosimetria adequada para o uso tópico do ALA e do MAL associados à TFD em fígados normais de ratos.

Observou-se que o valor desse limiar de dose para o ALA foi maior que o valor encontrado para o MAL, ou seja, o ALA necessita de uma dose mínima de luz relativamente maior que o limiar de dose do MAL para provocar necrose tecidual.

Esses achados sugerem que o MAL possui uma tendência a apresentar melhor resposta fotodinâmica que o ALA devido, principalmente, às diferenças entre as formulações dos medicamentos.

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer/INCA. *Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, Ministério da Saúde*. 2003.
2. Kligerman, J., *Revista Brasileira de Cancerologia* 2000. **46** (1).
3. Ferreira, J., *Estudo da Correlação de Diferentes Derivados de Hematoporfirina e Clorinas no Processo de Terapia Fotodinâmica*, in *Doutorado em Ciências Médicas*. 2007, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto.
4. Simplicio, F.; Maionchi, F.; Hioka, N. , *Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos*. . Química Nova, 2002. **25**(5): p. 801-807.
5. Kurachi, C., et al., *Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Um breve Histórico e Resultados Alcançados*. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002. **5**(20): p. 33-41.
6. Carvalho, V.C.M., *Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer*. , in *Instituto de Química de São Carlos*. 2001, Universidade de São Paulo: São Carlos.
7. Colussi, V.C., Nicola, E.M, Nicola, J.H. *Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers*. *Rev. Assoc. Med. Bras*, 1996. **42**(4): p. 229-236.
8. Parrish, J.A., *The scope of photomedicine*, in REGAN, J.D.; PARRISH, J.A. *The science of photomedicine*. , P. Press, Editor. 1982: N.Y.
9. Morison, W.L., *Phototerapy and Photochemoterapy od skin diseases*. Plaeeger Publishers, 1983.
10. Raab, O., *Ueber die Wirkung fluoreezierenden Stoffe auf Infusorien*. *Z.Biol*, 1900: p. 524-526.
11. von Tappeiner, H.H., *Ueber die Wirkung fluorescieren der Stoffo auf infusorien nach Versuchen von O. Raab*. *Munch. Med. Wochenschr*, 1900. **47**(5).
12. Bonnet, R., et al., *Photobleaching of 5, 10, 15, 20 – tetrakis (m- hydroxyphenyl) porphyrin (m- THPP) and the corresponding chlorine (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology*, 1999. **53**: p. 136-143.
13. von Tappeiner, H.H. and Jesionek, A. *Therapeutische Versuche mit Fluorescierenden Stoffen*. *Munch Med Wochenschr*, 1903. **47**: p. 2042-2044.
14. Hausman, W., *Dicsensibilisierender Wirkung Tierisher Farbstoffe und ihre phyiologische Hedeutung*, in *The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate*, R.L.B. LIPSON, E.J., Editor. 1960: Arch. Derm. p. 508-516.
15. Policard, A., *A study on the available aspects of experimental tumours examined by Wood's light*. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, 1924. **91**: p. 1423-1424.
16. Sternberg, E.D., Dolphin, D. and Bruckner, C. *Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy*. *Tetrahedron*, 1998. **54**(17): p. 4151-4202.
17. Lipson, R.L.; Gray, M.J.; BaldoS, E.J *Hematoporphyrin derivate for detection and management of cancer*. in *Proceedings of the 9th International Cancer Congress*. 1966. Tokio, Japan.

18. Weishaupt, K.R., C.J. Gomer, and T.J. Dougherty, *Identification of Singlet Oxygen as Cytotoxic Agent in Photo-Inactivation of a Murine Tumor*. Cancer Research, 1976. **36**(7): p. 2326-2329.
19. Zezzel, D.M., *Hematoporfirina e derivados: propriedades ópticas e terapia fotodinâmica do câncer.*, in Instituto de Física "Gleb Wataghin". 1987, Universidade Estadual de Campinas: Campinas. p. 97.
20. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors*. Cancer Research, 1978. **38**(8): p. 2628-2635.
21. Kennedy, J.C., R.H. Pottier, and D.C. Pross, *Photodynamic Therapy with Endogenous Protoporphyrin .9. Basic Principles and Present Clinical-Experience*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1990. **6**(1-2): p. 143-148.
22. Gomes, C.N.L., *Estudos sinérgicos de novos derivados de ftalocianina de zinco contendo grupamentos quelantes para íons cálcio aplicados na Terapia Fotodinâmica: Avaliação fotofísica e fotobiológica.* , in Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. 2004, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p. 154.
23. Sternberg, E. and Dolphin, D. *Pyrrolic photosensitizers*. Current Medicinal Chemistry, 1996. **3**(4): p. 239-272.
24. Henderson, B.W. and Dougherty, T.J. *How Does Photodynamic Therapy Work*. Photochemistry and Photobiology, 1992. **55**(1): p. 145-157.
25. *Photodynamic Therapy. Mechanism of Action*. Division of Thoracic Surgery at Brigham and Women's Hospital, [cited 29 outubro 2007].
26. Strauss, W.S.L., et al., *Selective examination of plasma membrane-associated photosensitizers using total internal reflection fluorescence spectroscopy: Correlation between photobleaching and photodynamic efficacy of protoporphyrin IX*. Photochemistry and Photobiology, 1998. **67**(3): p. 363-369.
27. Bonnett, R., *Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy*. Chemical Society Reviews, 1995. **24**(1): p. 19-33.
28. Via, L.D. and S.M. Magno, *Photochemotherapy in the treatment of cancer*. Current Medicinal Chemistry, 2001. **8**(12): p. 1405-1418.
29. Lehninger, A.L., *The mitochondrion: molecular basis of structure and function.*, W.A. Benjamin, Editor. 1964, Inc. New York, USA.
30. Mitchell, P., *Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism*. Nature, 1961. **191**(478): p. 144-&.
31. Oleinick, N.L., Morris, R.L. and Belichenko, T. *The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2002. **1**(1): p. 1-21.
32. Dougherty, T.J., *An update on photodynamic therapy applications*. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 2002. **20**(1): p. 3-7.
33. Martines, N.S., *Avaliação do Processo de Morte Celular após Terapia Fotodinâmica*. 2003, Faculdade de Educação da Universidade do Vale do Paraíba: São José dos Campos, SP.
34. Ochsner, M., *Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1997. **39**(1): p. 1-18.
35. MacDonald, I.J. and Dougherty, T.J. *Basic principles of photodynamic therapy*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2001. **5**(2): p. 105-129.

36. Martinkovics, A.T., *Ação de Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal no Processo de Morte Celular após Terapia Fotodinâmica*. 2002, Faculdade de Educação da Universidade do Vale do Paraíba: São José dos Campos, SP. p. 40.
37. Vanleengoed, H.L.L.M., et al., *In-Vivo Fluorescence and Photodynamic Activity of Zinc Phthalocyanine Administered in Liposomes*. *British Journal of Cancer*, 1994. **69**(5): p. 840-845.
38. Bagnato, V.S., et al., *Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o tratamento de tumores*, ed. 1. 2002, São Carlos, SP: Instituto de Física de São Carlos. 1-91.
39. Wieman, T.J., et al., *Effect of Photodynamic Therapy on Blood-Flow in Normal and Tumor Vessels*. *Surgery*, 1988. **104**(3): p. 512-517.
40. Sibata, C.H., et al., *Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000. **33**(8): p. 869-880.
41. Levy, J.G., *Photodynamic Therapy*. *Trends in Biotechnology*, 1995. **13**(1): p. 14-18.
42. Reddi, E., *Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1997. **37**(3): p. 189-195.
43. Jori, G., et al., *Evidence for a Major Role of Plasma-Lipoproteins as Hematoporphyrin Carriers In vivo*. *Cancer Letters*, 1984. **24**(3): p. 291-297.
44. Boyle, R.W. and D. Dolphin, *Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers*. *Photochemistry and Photobiology*, 1996. **64**(3): p. 469-485.
45. Bonnett, R. and Martinez, G. *Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy*. *Tetrahedron*, 2001. **57**(47): p. 9513-9547.
46. Ivanov, A.V., Reshetnickov, A.V. and Ponomarev, G.V. *One more PDT application of Chlorin*. *SPIE*, 2000. **3909**(6): p. 131-137.
47. Dougherty, T.J., *Studies on the Structure of Porphyrins Contained in Photofrin-Ii*. *Photochemistry and Photobiology*, 1987. **46**(5): p. 569-573.
48. Mironov, A.F., Nizhnik, A.N. and Nockel, A.Y. *Hematoporphyrin Derivatives - an Oligomeric Composition Study*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1990. **4**(3): p. 297-306.
49. Menezes, P.F.C., *Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com Laser*. , in *Instituto de Química de São Carlos*. 2001, Universidade de São Paulo: São Carlos.
50. Borissevitch, I.E., Tominaga, T.T. and Schmitt, C.C. *Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics*. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 1998. **114**(3): p. 201-207.
51. Aveline, B.M., Hasan, T. and Redmond, R.W. *The Effects of Aggregation, Protein-Binding and Cellular Incorporation on the Photophysical Properties of Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring-a (Bpdma)*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1995. **30**(2-3): p. 161-169.
52. Peng, Q., et al., *5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy - Clinical research and future challenges*. *Cancer*, 1997. **79**(12): p. 2282-2308.
53. Wolf, P., Rieger, E. and Kerl, H. *Topical Photodynamic Therapy with Endogenous Porphyrins after Application of 5-Aminolevulinic Acid - an Alternative Treatment Modality for Solar Keratoses, Superficial Squamous-Cell Carcinomas, and Basal-Cell Carcinomas*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1993. **28**(1): p. 17-21.

54. Calzavara-Pinton, P.G., *Repetitive photodynamic therapy with topical  $\delta$ -aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1995. **29**(1): p. 53-57.
55. Regula, J., et al., *Photosensitization and Photodynamic Therapy of Esophageal, Duodenal, and Colorectal Tumors Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin-Ix - a Pilot-Study*. Gut, 1995. **36**(1): p. 67-75.
56. Fromm, D., Kessel, D. and Webber, J. *Feasibility of photodynamic therapy using endogenous photosensitization for colon cancer*. Archives of Surgery, 1996. **131**(6): p. 667-669.
57. Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M. and Sala, R. *Photodynamic therapy: update 2006 - Part 1: Photochemistry and photobiology*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2007. **21**(3): p. 293-302.
58. Rossi, E., et al., *Inhibition of Human Lymphocyte Ferrochelatase Activity by Hemin*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1990. **1038**(3): p. 375-381.
59. Leibovici, L., et al., *Activity of Porphobilinogen Deaminase in Peripheral-Blood Mononuclear-Cells of Patients with Metastatic Cancer*. Cancer, 1988. **62**(11): p. 2297-2300.
60. Navone, N.M., et al., *Heme-Biosynthesis in Human Breast-Cancer Mimetic In Vitro Studies and Some Heme Enzymatic-Activity Levels*. International Journal of Biochemistry, 1990. **22**(12): p. 1407-1411.
61. Elsharabasy, M.M.H., et al., *Porphyrin Metabolism in Some Malignant Diseases*. British Journal of Cancer, 1992. **65**(3): p. 409-412.
62. Dailey, H.A. and Smith, A. *Differential Interaction of Porphyrins Used in Photoradiation Therapy with Ferrochelatase*. Biochemical Journal, 1984. **223**(2): p. 441-445.
63. Kloek, J., Akkermans, W. and van Henegouwen, G.M.J.B. *Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: Enzymatic conversion into protoporphyrin*. Photochemistry and Photobiology, 1998. **67**(1): p. 150-154.
64. Rud, E., et al., *5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters*. Photochemistry and Photobiology, 2000. **71**(5): p. 640-647.
65. Kloek, J. and van Henegouwen, G.M.J.B. *Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy*. Photochemistry and Photobiology, 1996. **64**(6): p. 994-1000.
66. Gaullier, J.M., et al., *Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture*. Cancer Research, 1997. **57**(8): p. 1481-1486.
67. Datta, S.N., et al., *Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolaevulinic acid induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma*. British Journal of Cancer, 1998. **78**(8): p. 1113-1118.
68. Radakovic-Fijan, S., et al., *Topical aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy as a treatment option for psoriasis? Results of a randomized, observer-blinded study*. British Journal of Dermatology, 2005. **152**(2): p. 279-283.
69. Peng, Q., et al., *ALA derivative-induced protoporphyrin IX build-up and distribution in human nodular basal cell carcinoma*. Photochem Photobiol, 1995. **61**: p. 82.
70. Gederaas, O.A., et al., *5-aminolaevulinic acid methyl ester transport on amino acid carriers in a human colon adenocarcinoma cell line*. Photochemistry and Photobiology, 2001. **73**(2): p. 164-169.

71. Peng, Q., et al., *Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1996. **34**(1): p. 95-96.
72. Fritsch, C., Goerz, G. and Ruzicka, T. *Photodynamic therapy in dermatology*. Archives of Dermatology, 1998. **134**(2): p. 207-214.
73. Webber, J., Kessel, D. and Fromm, D. *Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1997. **37**(1-2): p. 151-153.
74. Fotinos, N., et al., *5-Aminolevulinic Acid Derivatives in Photomedicine: Characteristics, Application and Perspectives*. Photochemistry and Photobiology, 2006. **82**: p. 994-1015.
75. Szeimies, R.M., Sassy, T. and Landthaler, M. *Penetration Potency of Topical Applied Delta-Aminolevulinic-Acid for Photodynamic Therapy of Basal-Cell Carcinoma*. Photochemistry and Photobiology, 1994. **59**(1): p. 73-76.
76. Dijkstra, A.T., et al., *Photodynamic therapy with violet light and topical 6-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2001. **15**(6): p. 550-4.
77. Kalka, K., Merk, H. and Mukhtar, H. *Photodynamic therapy in dermatology*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2000. **42**(3): p. 389-413.
78. Stockfleth, E. and Sterry, W. *New treatment modalities for basal cell carcinoma*. Recent Results Cancer Res, 2002. **160**: p. 259-68.
79. Cairnduff, F., et al., *Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer*. Br J Cancer, 1994. **69**(3): p. 605-8.
80. Bissonnette, R., et al., *Systemic photodynamic therapy with aminolevulinic acid induces apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques*. Journal of Investigative Dermatology, 2002. **119**(1): p. 77-83.
81. Boehncke, W.H., Elshorst-Schmidt, T. and Kaufmann, R. *Photodynamic therapy is a safe and effective treatment for psoriasis*. Arch Dermatol, 2000. **136**: p. 271-272.
82. Karrer, S., et al., *Successful treatment of cutaneous sarcoidosis using topical photodynamic therapy*. Archives of Dermatology, 2002. **138**(5): p. 581-584.
83. Karrer, S., et al., *Topical photodynamic therapy for localized scleroderma*. Acta Dermato-Venereologica, 2000. **80**(1): p. 26-27.
84. Hongcharu, W., et al., *Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris*. Journal of Investigative Dermatology, 2000. **115**(2): p. 183-192.
85. Frank, R.G.J., et al., *Photodynamic therapy for condylomata acuminata with local application of 5-aminolevulinic acid*. Genitourinary Medicine, 1996. **72**(1): p. 70-71.
86. Uehlinger, P., et al., *5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2000. **54**(1): p. 72-80.
87. Lubritz, R.R., Stephen, A.S. and Smolewski, P.A.C. *Cryosurgery cure rate of actinic keratosis*. J Am Acad Dermatol, 1982. **7**: p. 631-632.
88. Pariser, D.M., et al., *Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2003. **48**(2): p. 227-232.

89. Wiegell, S.R. and H.C. Wulf, *Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2006. **54**(4): p. 647-651.
90. Melo, C.A.S., *Desenvolvimento dos conceitos básico para dosimetria e aplicação em Terapia Fotodinâmica*, in Instituto de Física de São Carlos. 2003, Universidade de São Paulo: São Carlos.
91. Vollet-Filho, J.D., *Identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância em Terapia Fotodinâmica*, in Instituto de Física de São Carlos. 2007, Universidade de São Paulo: São Carlos.
92. Grossweiner, L.I., *Light Dosimetry Model for Photodynamic Therapy Treatment Planning*. Lasers in Surgery and Medicine, 1991. **11**(2): p. 165-173.
93. Svassand, L.O. and Potter, W. *The Implications of Photobleaching for Photodynamic Therapy*, in *Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Aspects*, B.D. Henderson, T.J., Editor. 1992, Marcel Dekker: New York. p. 369-384.
94. Svaasand, L.O., et al., *Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administered photosensitizers*. Lasers Surg Med, 1996. **18**(2): p. 139-49.
95. Grieve, M.B., et al., *An Investigation of the Optical-Properties of Tetrphenylporphyrin Derivatives in Langmuir and Langmuir-Blodgett-Films*. Thin Solid Films, 1994. **243**(1-2): p. 581-586.
96. Ostler, R.B., et al., *The effect of pH on the photophysics and photochemistry of disulphonated aluminum phthalocyanine*. Photochem Photobiol, 2000. **71**(4): p. 397-404.
97. Machado, A.E.H., *Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas*. Química Nova, 2000. **23**(2): p. 237-243.
98. Profio, A.E. and Doiron, D.R. *Transport of light in tissue in photodynamic therapy*. Photochem Photobiol, 1987. **46**(5): p. 591-9.
99. Melo, C.A., et al., *Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats*. J Photochem Photobiol B, 2004. **73**(3): p. 183-8.
100. Schneider, W.C. and Hogeboom, G.H. *Cytochemical Studies of Mammalian Tissues - the Isolation of Cell Components by Differential Centrifugation - a Review*. Cancer Research, 1951. **11**(1): p. 1-22.
101. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. *Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction*. Journal of Biological Chemistry, 1949. **177**(2): p. 751-766.
102. Kaplan, R.S. and P.L. Pedersen, *Characterization of Phosphate Efflux Pathways in Rat-Liver Mitochondria*. Biochemical Journal, 1983. **212**(2): p. 279-288.
103. Morton, C.A., et al., *Development of an alternative light source to lasers for photodynamic therapy. 3. Clinical evaluation in the treatment of pre-malignant non-melanoma skin cancer*. Lasers in Medical Science, 1995. **10**(3): p. 165-171.
104. Lopez, R.F., et al., *Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(1): p. 77-94.
105. Ferreira, J., *Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós-terapia fotodinâmica – estudo in vivo*, in Departamento de Patologia. 2003, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto.
106. Hopper, C., *Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer*. Lancet Oncol, 2000. **1**: p. 212-9.

107. Morton, C.A., et al., *Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: Effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response*. Archives of Dermatology, 1998. **134**(2): p. 248-249.
108. Calzavara-Pinton, P.G., *Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolevulinic acid as an appropriate approach to the route treatment of superficial non-melanoma acid: a promising concept for the treatment of cutaneous skin tumors*. J Photochem Photobiol B., 1995. **29**: p. 53-57.
109. Fijan, S., Honigsmann, H. and Ortel, B. *Photodynamic Therapy of Epithelial Skin Tumors Using Delta-Aminolevulinic-Acid and Desferrioxamine*. British Journal of Dermatology, 1995. **133**(2): p. 282-288.
110. Pope, A.J. and Bown, S.G. *Photodynamic therapy*. Br J Urol, 1991. **68**(1): p. 1-9.
111. Oseroff, A.R., *PDT for cutaneous malignancies: clinical applications and basic mechanisms*. Photochem Photobiol, 1998. **67** p. 17-18.
112. Gronlund-Pakkanen, S., et al., *The morphological changes in rat bladder after photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX*. BJU Int, 2000. **86**(1): p. 126-32.
113. Ferreira, J., et al., *Necrosis characteristics of photodynamics therapy in normal rat liver*. Laser Physics, 2004. **14**(2): p. 209-212.
114. Nicholls, D.G. and Ferguson, S.J. *Proton Current and Respiratory Control*, in *Bioenergetics 3*. 2002, Academic Press Inc: London. p. 69-75.
115. Inada, N.M., *Ação fotodinâmica de meso-porfirinas sobre função mitocondrial e viabilidade de células LNCaP*, in *Faculdade de Ciências Médicas*. 2006, Universidade Estadual de Campinas: Campinas, SP.
116. Inada, N.M., et al., *Irradiated cationic mesoporphyrin rat liver mitochondria induces larger damage to isolated than the anionic form*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **457**(2): p. 217-224.
117. Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. and Vercesi, A.E. *Mitochondrial permeability transition and oxidative stress*. Febs Letters, 2001. **495** (1-2): p. 12-15.
118. Ricchelli, F., et al., *Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(2): p. 306-19.
119. Zoratti, M. and Szabo, I. *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 139-76.
120. Crompton, M., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 11-21.
121. Crompton, M., et al., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death*. Biochimie, 2002. **84**(2-3): p. 143-52.
122. Radi, R., et al., *Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(11): p. 1451-64.
123. Crompton, M., *On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis*. Curr Med Chem, 2003. **10**(16): p. 1473-84.