

AVALIAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DAS FTALOCIANINAS CLOROALUMÍNIO E ZINCO EM ARTÉRIA ILÍACA DE COELHOS

Elaine Ap. Corbani, Janaína Duarte, Kátia Calligaris Rodrigues, Raduan Hage, Renato Amaro Zângaro

Laboratório Espectroscopia de Fluorescência de Tecidos Biológicos – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP
zangaro@univap.br

Resumo - Algumas técnicas de diagnóstico vêm sendo utilizadas na identificação de ateromas tais como, arterioscopia utilizando Raios-X, ultrassom, ressonância magnética e, mais recentemente, o Diagnóstico Fotodinâmico (DFD) que associado à Terapia Fotodinâmica (TFD) permite a identificação e tratamento do ateroma. Neste trabalho foram realizados estudos comparativos, utilizando Cloroalúminio ftalocianina (AlPc) e Zinco ftalocianina (ZnPc) como marcadores para avaliar a absorção dos mesmos pelas paredes da artéria ilíaca de oito coelhos machos da raça Norfolk, através da espectroscopia de fluorescência. Durante a absorção da droga pela parede da artéria foi analisada a intensidade dos picos de fluorescência de 675 nm para AlPc e ZnPc. Esse trabalho é uma etapa precedente para o diagnóstico *in vivo* de placas ateromatosas, provocando a aterosclerose, doença que acomete um grande número de pessoas e, pode levar a graves problemas cardíacos e coronários.

Palavras-chave: espectroscopia de fluorescência, parede arterial, diagnóstico, ftalocianinas

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

Uma das técnicas que vem ganhando força na análise de diferentes tipos de tecido é a espectroscopia de fluorescência induzida por Laser, pois apresenta-se bastante promissora na diferenciação entre tecidos normais e patológicos [1, 2, 3, 4].

A técnica de espectroscopia de fluorescência baseia-se na excitação da amostra por radiação em comprimentos de onda curtos (ultra violeta e visível) e a observação da resposta luminescente da amostra em comprimentos de onda longos (visível). A identificação dos tecidos baseia-se na determinação das diferenças espectrais entre fluoróforos presentes nos tecidos normais e displásicos. Essa técnica vem sendo usada como método de diagnóstico de aterosclerose [3], displasias de cólon [1, 5, 6], no câncer de esôfago [7, 8, 9] e alguns tipos de câncer do pulmão e bexiga [9].

Os fotossensibilizantes estão disponíveis numa forma relativamente pura e são bem apropriados para estudos que buscam avaliar como a hidrofobicidade de um corante influencia sua absorção celular; sua retenção, e a eficiência de sua fotossensibilização. Agregação em células é outro fator passível de estudo com tal série de corantes [10].

Estudos recentes trazem análises quantitativas da localização de fotossensibilizantes [11 e 12]. Como a maioria dos agentes fotossensibilizantes apresenta emissão de fluorescência, pode-se

determinar a localização da droga no tecido através de microscopia de fluorescência [11].

O objetivo deste trabalho foi determinar a fluorescência da AlPc e ZnPc, quando absorvida pela parede da artéria ilíaca de coelhos como etapa precedente para o diagnóstico *in vivo* de placas ateromatosas, provocando a aterosclerose, doença que acomete um grande número de pessoas e, pode levar a graves problemas cardíacos e coronários.

Materiais e Métodos

A técnica transadivertência utilizada neste experimento baseia-se na administração intra-arterial local de uma determinada droga que, ao ser excitada por uma radiação na região do ultravioleta, emite fluorescência, sendo esta radiação coletada através da parede da artéria sem invasão. Neste caso, buscou-se verificar entre as drogas AlPc e ZnPc, qual das duas apresentaria maior absorção pela parede da artéria ilíaca, visando futura aplicação da terapia fotodinâmica. A determinação da absorção destas drogas pela parede arterial ilíaca foi realizada através da medida da intensidade de fluorescência emitida pela droga. Neste caso, a região contendo a droga foi irradiada com um laser emitindo radiação em 382 nm, sendo em seguida sua fluorescência coletada. A excitação da região e a coleta da fluorescência foi realizada através da utilização de um cateter de fibras ópticas na configuração “6 em torno 1” [13].

Foram utilizados 8 coelhos machos da raça Norfolk pesando entre 3,0 e 3,5 Kg cada. A artéria ilíaca foi dissecada e isolada, sendo clampeada em dois pontos, Figura 1, utilizando fio de sutura *catgut* 3.0 (Johnson & Johnson) com um nó simples e distância de 1,5 cm entre eles.

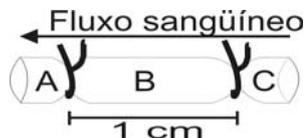


Figura 1 – Esquema de *clampeamento* da artéria.

A excitação da droga foi realizada utilizando um laser de corante (Exalite 384) bombeado por um laser de nitrogênio emitindo radiação em 382 nm. Este sistema, cujo esquema é apresentado na Figura 2, está integrado a um espectrofluorímetro descrito por Zângaro et al. [14]. Após a coleta da fluorescência, o cateter conduz esta até um espectrógrafo (Chromex Imaging Spectrograph Model 2500) que a dispersa em frequências. Após a dispersão da luz, a detecção é realizada com o auxílio de um CCD (1024x256 pixels).

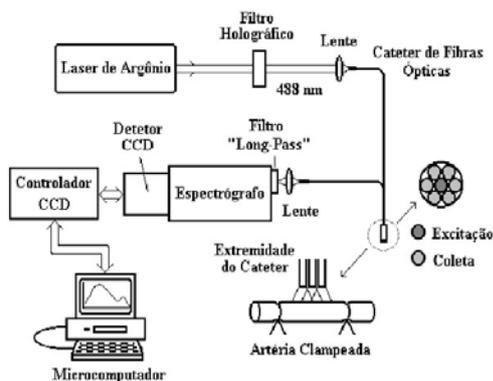


Figura 2 – Sistema de coleta de fluorescência

Resultados

O espectro de fluorescência da artéria ilíaca clampeada, sem a presença das drogas fluorescentes, é apresentada na Figura 3.

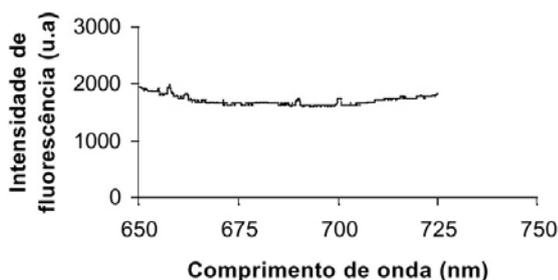


Figura 3 – Espectro de Fluorescência da artéria ilíaca de coelho.

As Figuras 4 e 5 apresentam os picos de fluorescência da AIPc e ZnPc, respectivamente, obtidos antes das drogas serem injetadas nas artérias. Essas medidas fornecem a intensidade de fluorescência das ftalocianinas.

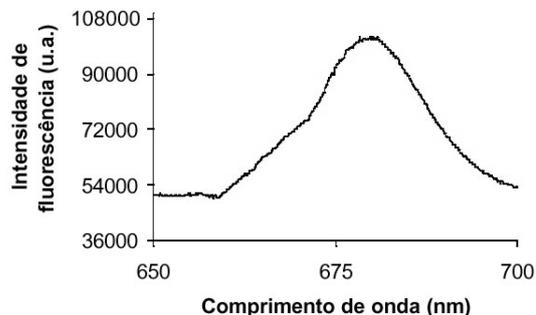


Figura 4 – Espectro de Fluorescência da AIPc com concentração de 5 mM.

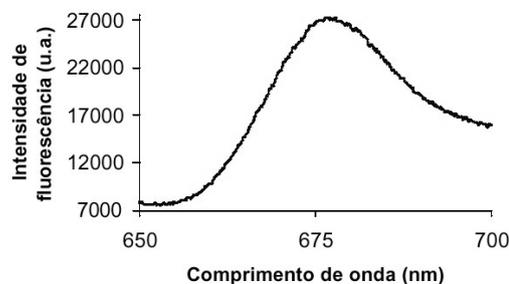


Figura 5 - Espectro de Fluorescência da ZnPc com concentração de 5 mM.

As Figuras de 6 a 11 apresentam, o sinal de fluorescência para a AIPc e ZnPc nas regiões A, B e C da artéria (conforme apresentado na Figura 1), para os tempos $t=0$ e $t=10$ minutos com fluxo sanguíneo interrompido e $t=0$ e $t=10$ minutos após a liberação do fluxo sanguíneo

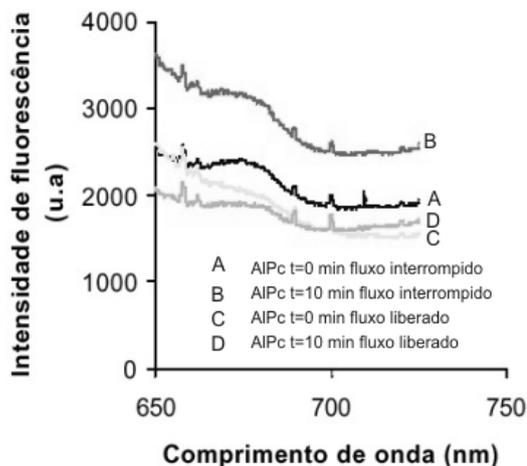


Figura 6 – Espectro da artéria na região A, após aplicação de AIPc.

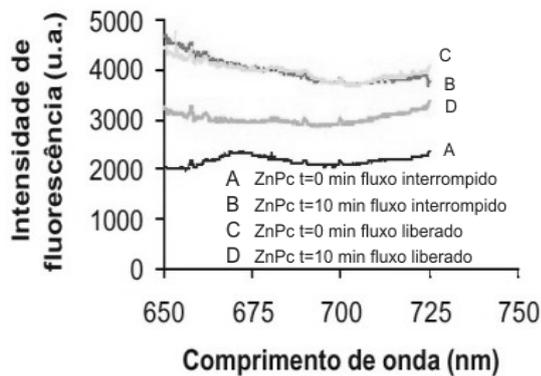


Figura 7 - Espectro da artéria na região A, após aplicação de ZnPc.

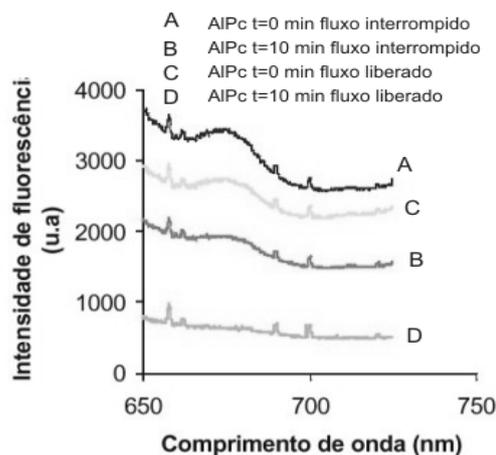


Figura 10 – Espectro da artéria na região C, após aplicação de AIPc.

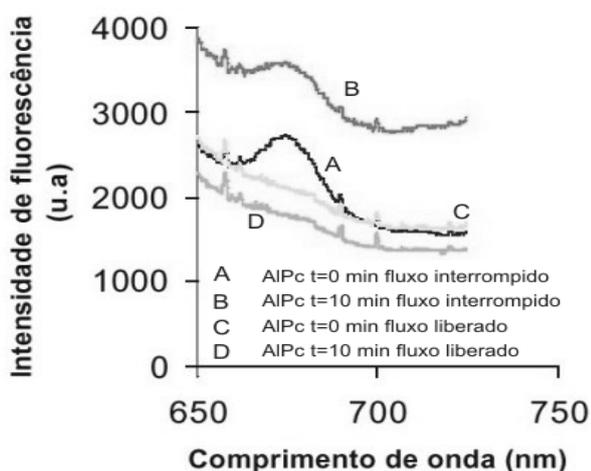


Figura 8 – Espectro da artéria na região B, após aplicação de AIPc.

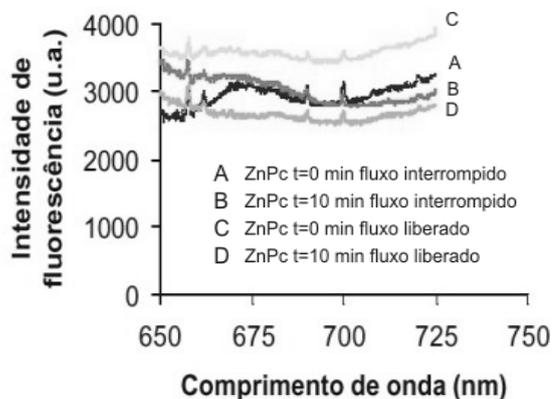


Figura 11 – Espectro da artéria na região C, após aplicação de ZnPc.

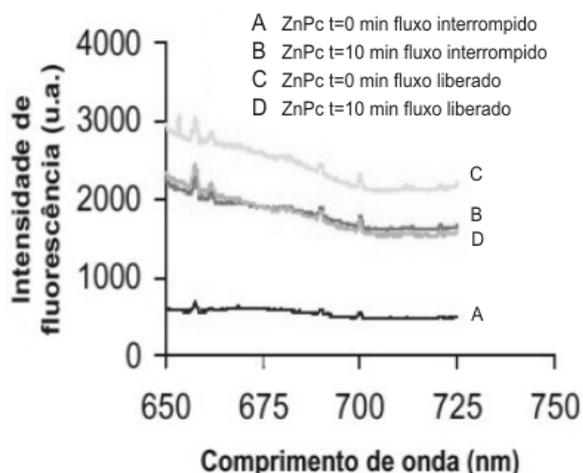


Figura 9 – Espectro da artéria na região B, após aplicação de ZnPc.

Discussão

O espectro apresentado na Figura 3 permite verificar que a artéria ilíaca não apresenta picos de fluorescência na região escolhida para análise pela técnica transadventícia.

Percebe-se que na região B de confinamento da droga houve aumento da taxa de concentração do corante na parede da artéria com evolução temporal. Após a retirada do fio de sutura observa-se uma tendência à estabilização da concentração dos corantes na parede da artéria, independente do tempo.

As intensidades relativas de fluorescência são comparáveis entre as regiões A, B e C estudadas, demonstrando a ocorrência de difusão das drogas mesmo com a constrição do vaso. Esta difusão pode tanto ocorrer devido à falha no processo de constrição, quanto pelo próprio tecido da parede do vaso.

Outro aspecto importante a ser observado é que, nos casos de fluxo interrompido para as regiões A, B e C, o ZnPc apresenta aumento do sinal de fluorescência, fato não observado com AIPc. Este fenômeno pode ser explicado pela

menor solubilidade apresentada pela ZnPc, fazendo com que durante o processo de difusão o maior adensamento desta estrutura dificulte sua penetração nos tecidos, mantendo-se em maior concentração junto a superfície interna do vaso.

Nas regiões A e C as drogas AIPc e ZnPc apresentam comportamento semelhante, nota-se no tempo zero, tanto para fluxo interrompido como para fluxo liberado, uma tendência de decaimento do sinal de fluorescência. Este comportamento pode ser considerado normal uma vez que a difusão da droga age sobre sua concentração reduzindo o sinal de fluorescência.

O sinal para ZnPc é longo enquanto o sangue com a droga é estancado, decrescendo fortemente após o *clamp* ser removido. O sinal fora da área clampeada é sempre pequeno e a média da absorção de ZnPc pela parede da artéria é pequena e quase não há difusão ao longo desta.

O comportamento é bem diferente para AIPc. O sinal de fluorescência dentro do *clamp* decai ligeiramente quando o fluxo sanguíneo é reiniciado. Ao mesmo tempo o sinal de fora da área clampeada aumenta com o tempo, e quando a droga é removida do sangue o sinal de fluorescência é inferior para AIPc vindo principalmente da absorção da droga pelas paredes arteriais e também a difusão da droga é grande ao longo do tecido.

Conclusão

Pode-se concluir que utilizando a técnica transadventícia é possível detectar a radiação fluorescente emitida pela droga fotossensibilizante, após a absorção da droga na parede da artéria ilíaca de coelhos.

As drogas fotossensibilizadoras AIPc e ZnPc utilizadas apresentaram-se basicamente com o mesmo comportamento, emitindo radiação fluorescente na região de 675 nm.

Verificou-se, também, que a AIPc tem maior lipossolubilidade que a ZnPc, e que a AIPc apresentou um pico de fluorescência maior que a ZnPc. Isto se deve ao fato desta droga ser menos solúvel e por isto agrega-se mais, portanto apresenta concentração mais alta em alguns locais. Sendo assim, comprovou-se que a AIPc se apresenta com um comportamento mais adequado para estudos de fluorescência utilizando drogas fotossensibilizantes.

Referências

- [1] KAPADIA, C.R. et al. Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy of Human Colonic Mucosa. *Gastroenterology*, vol 99(1), p. 150-157, 1990.
- [2] ANDERSSON-ENGELS, S. Et al. Laser-Induced Fluorescence in Medical Diagnostics,

Bellingham:SPIE, 1990. p. 76-96 (*Proceeding of SPIE*, v 1203).

- [3] DECKELBAUM, L.I. Fluorescence Spectroscopy in Cardiovascular Disease: Fundamental Concepts and Clinical Applications. *Trends in Cardiovascular Medicine*, v 1, n. 4, p. 171-176, 1991.

- [4] LOHMANN, W. Et al. Tissue Diagnostics Using Autofluorescence. Bellingham: SPIE, 1993. p. 10-24. (*Proceedings of SPIE*, v. 2081).

- [5] MANOHARAN, R. Et al. Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy of Colonic Dysplasia: Prospects for Optical Histological Analysis. Bellingham: SPIE, 1995. p. 417-421. (*Proceedings of SPIE*, v. 2388).

- [6] YANG, Y. ET AL. Optical Spectroscopy Methods to Detect Colon Cancer. Bellingham: SPIE, 1994. p. 36-39. (*Proceedings of SPIE*, v. 2135).

- [7] PANJEHPOUR, M. Et al. Spectroscopic Diagnosis of Esophageal Cancer: New Classification Model, Improved Measurement System. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 41, nn. 6, p. 577-581, 1995.

- [8] VO-DINH, T. Et al. *In Vivo* Cancer Diagnosis of the Esophagus Using Laser-Induced Fluorescence. Bellingham: SPIE, 1995. p. 15-21. (*Proceedings of SPIE*, v. 2387).

- [9] SVANBERG, K. Et al. Tissue Characterization in Some Clinical Specialities Utilizing Laser-Induced Fluorescence. Bellingham: SPIE, 1994. p. 2-15. (*Proceedings of SPIE*, v. 2135).

- [10] MOAN, J.; PETERSEN, E. O.; CHRISTENSEN, T. The mechanism of photodynamic inactivation of human cell in vitro in the presence of haemaphysporin. *Br. J. Cancer* 39: 398 – 407, 1979.

- [11] PENG, Q. Et al. Correlation of subcellular and intratumor photosensitizer localization with ultrastructural feature after photodynamic therapy. *Ultrastruct. Phathol.* V. 20, p. 109-129, 1996.

- [12] TRIVERDI, N.S. et al. Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. *Photochem. Photobiol.* V. 71, n.5, p. 634-639, 200.

- [13] LIMA, C. J. Et al. Development of catheters with low fiber background signal for Raman spectroscopic diagnosis applications. *Artif. Organs.* V. 24, p. 231-234, 2000.

- [14] ZÂNGARO, R.A. et al. Rapid Multi-Excitation Fluorescence Spectroscopy System for In Vivo Tissue Diagnosis, *Applied Optics*, v.35, p.5211-5219, 1996.