

FRACIONAMENTO DE DOSE DE ENERGIA APLICADA A TERAPIA FOTODINÂMICA

RZ Busanello¹, R. Hage¹, RL Amorim², RA Zângaro¹

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, Brasil, 12244-000, Fone: +55(12) 3947-1021, Fax: (12) 3947-1015.

²Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade do Estado de São Paulo (UNESP) Botucatu, SP, Brasil, 18610-000, Fone: +55 (14) 6802-6280, Fax: + 55 (14) 6802-6067.
rzeb@univap.br, zangaro@univap.br

Resumo: Trabalhos recentes sugerem que o efeito da Terapia Fotodinâmica (TFD) pode ser aumentado através do fracionamento de dose de energia ou redução da taxa de fluência. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do fracionamento de dose de luz em língua de rato. Nesta experiência foram utilizados 25 ratos Wistar, sendo que 20 foram sensibilizados com Photosan[®]-3. (4 mg kg⁻¹ i.v), dois dias antes de irradiação com laser de Hélio-Neônio ($\lambda = 632,8$ nm), com fluência de 80 J cm⁻² e irradiância de 150 mW cm⁻². A irradiação contínua (80 J cm⁻²) foi comparada com um regime fracionado de energia (16 J cm⁻² e 64 J cm⁻²) com um intervalo de escuro de 150 s. Cinco animais constituíram o grupo controle. Decorridos 7 dias do procedimento experimental, os animais foram sacrificados, as línguas removidas e analisadas histologicamente. No grupo controle não foi observado qualquer alteração histológica nos tecidos analisados. Nos animais que receberam irradiação contínua, evidenciou-se a presença de células musculares atroficas e degeneradas, discreto infiltrado inflamatório mononuclear entre as miofibrilas e grupos de células musculares eosinofílicas e atroficas. No grupo submetido à irradiação fracionada evidenciou-se estes achados histológicos em maior grau, com edema e danos intersticiais mais intensos. O aumento dos efeitos da TFD através do fracionamento de luz pode ser atribuído ao aumento de oxigênio intracelular durante o intervalo de escuro, decorrente do aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, concordando com vários estudos que utilizaram terapia com laser de baixa potência. Estudos futuros serão necessários para avaliar se o fracionamento de luz permitiria uma redução nas doses normalmente utilizadas de diferentes fotossensibilizantes vislumbrando a redução dos efeitos colaterais das mesmas, mantendo a mesma eficiência da TFD.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; fracionamento de dose; laser.

Área de Conhecimento: III – Engenharias

1 – INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um processo que se inicia após a administração, tópica ou sistêmica, ao paciente de uma droga fotossensibilizante. A toxicidade somente é desenvolvida após expor a área de interesse do paciente à luz, cujo comprimento de onda é específico para excitar a droga. Ocorrem então, reações fotoquímicas entre o fotossensibilizante excitado e o oxigênio molecular (³O₂) resultando na formação de espécies de oxigênio reativo (ROS), tal como oxigênio singleto (¹O₂) que é o principal responsável pela morte celular (WEISHAAPT, GOMER, DOUGHERT, 1976; MOAN, SOMMER, 1985; OLEINICK, EVANS, 1998). Durante este processo, ³O₂ pode ser totalmente consumido e se o consumo ultrapassar a taxa de reoxigenação, poderá

ocorrer hipóxia tecidual aguda, limitando assim a geração de ¹O₂ e a citotoxicidade da TFD (FOSTER *et al*, 1993).

Um dos efeitos indesejáveis da TFD é a fotossensibilidade prolongada após o tratamento. Uma das características desejáveis do tratamento é que as drogas apresentem baixa toxicidade no escuro e tendência elevada a acumular-se no tecido doente, evitando-se que áreas adjacentes acidentalmente iluminadas sejam danificadas (LEVY, 1995; STERNBERG, DOLPHIN, 1996).

Esforço considerável tem sido feito para aumentar a efetividade da TFD, variando-se a dose dos fotossensibilizantes (BARR *et al*, 1990; GOSSNER *et al*, 1994; MESSMANN *et al*, 1995); aumentando o suprimento de oxigênio (GOSSNER *et al*, 1991) visando minimizar efeitos locais adversos, tal como

fotossensibilidade cutânea (ROUGEE *et al*, 1988; TRUSCOTT, 1991; ABULAFI, 1991; PENG *et al*; 2001), mantendo ou até mesmo melhorando o efeito do tratamento. Além destas, uma maneira que tem se mostrado eficaz para aumentar a efetividade da TFD é através da variação da dosagem de luz (THOMAS *et al*, 1987; GOSSNER *et al*, 1994; MESSMANN *et al*, 1995) além do uso de doses fracionadas de energia, ao invés de irradiações contínuas (TROMBERG, 1990; MESSMANN *et al*, 1995; TSUTSUI *et al.*, 2002). Resultados positivos têm sido reportados VAN DER VEEN, VAN LEENGOED e STAR (1994), PE *et al* (1994), CURNOW *et al* (1999), ROBINSON *et al.* (2000), TSUTSUI *et al.* (2002), que entregam doses de luz em duas frações. TROMBERG (1990). MESSMANN *et al.* (1995) e CURNOW *et al.* (1999) constataram que com uma única interrupção de 150 s, após irradiação de 20% da energia total, obtiveram resultados semelhantes a vários fracionamentos de energia. Por outro lado, VAN DEN BOOGERT *et al.* (2001) e PECH *et al.* (2002) aplicando TFD em câncer de esôfago de Barrett, não observaram vantagem do fracionamento de energia quando comparada com irradiações contínuas.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do fracionamento de energia em língua normal de rato, usando o fotossensibilizante polihematoporfirina-sódio (Photosan[®]-3).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Animais

Foram utilizados 25 ratos Wistar, machos, com peso entre 250 – 300 g, que previamente aos experimentos, foram mantidos em um biotério de passagem do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP (IP&D / UNIVAP), sob condições naturais de iluminação, temperatura e umidade, sendo alimentados com dieta padrão de laboratório (Moinho Primor[®]) e água *ad libitum*.

2.2 – Fotossensibilizante

Foi utilizado o fotossensibilizante polihematoporfirina-sódio (Photosan[®]-3) na dose de 4 mg kg⁻¹ por via intravenosa (i.v.), 48 horas antes da irradiação laser.

2.3 – Sistema Laser

Foi utilizado como fonte de excitação do fotossensibilizante um laser de Hélio-Neônio (Uniphase[®]), operando em 632,8 nm, irradiância de 150 mW cm⁻², e fluência total de 80 J cm⁻².

2.4 – Método Experimental

Após 48 h da administração do fotossensibilizante, os animais foram anestesiados, possibilitando a realização de irradiação laser na porção direita do dorso da língua. O protocolo anestésico constou de medicação pré-anestésica, acepromazina (Acepran[®] 0,2%) e butorfanol (Torbugesic[®]), na dose de 1 mg Kg⁻¹ e 2 mg Kg⁻¹, respectivamente, por via intramuscular (HALL *et al.*, 1999; COOK, 2000). Após 15 minutos, foi administrado Zolazepan e Tiletamina (Zoletil[®] 50) na dose de 30 mg Kg⁻¹ para indução e manutenção anestésica (THURMON, TRANQUILI, BENSON, 1999).

Vinte animais receberam o fotossensibilizante. O primeiro grupo, de 10 animais, foi irradiado com 80 J cm⁻² sem intervalo de escuro. O segundo grupo, também de 10 animais, foi irradiado com 16 J cm⁻² de energia, submeteu-se então a um intervalo de escuro de 150 s, reiniciando a irradiação até totalizar os 80 J cm⁻². O terceiro grupo, de 5 animais, formou o grupo controle.

Após 7 dias do procedimento fototerapêutico, os animais foram sacrificados, os espécimes removidos e fixados em solução conservadora de formalina 10%. Foi realizado estudo histológico, utilizando-se as técnicas de coloração de rotina (HE).

Em cumprimento ao disposto na Lei Federal nº 6.638, de 8 de maio de 1979, o protocolo deste experimento foi submetido à Comissão de Ética do IP&D, resguardando-se condições de cuidados adequados aos animais, evitando-se seu sofrimento e sacrifício desnecessários.

3 - RESULTADOS

No grupo de irradiação contínua, observou-se a presença de agrupados multifocais de fibras musculares atroficas e eosinofílicas, núcleos picnóticos e raros focos de destruição celular (Figura 1).

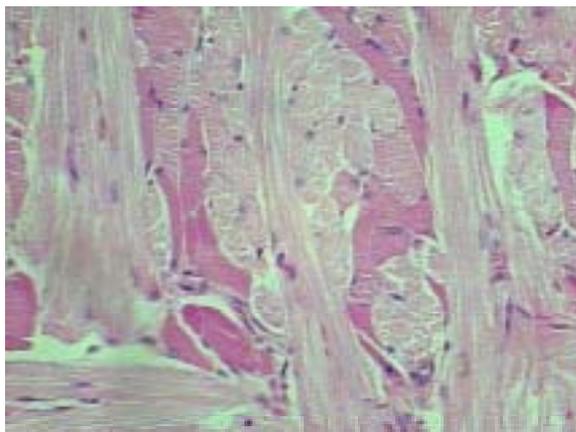


Figura 1 – Destruição celular ocorrida após a irradiação contínua, 80 J cm^{-2} (HE 40x).

O grupo de irradiação fracionada, Figura 2, apresentou um grande número de células musculares atroficas e eosinofílicas, com núcleos picnóticos e discreto infiltrado de células mononucleares. Diversas regiões apresentaram destruição celular muito mais intensa, quando comparadas com o primeiro grupo.

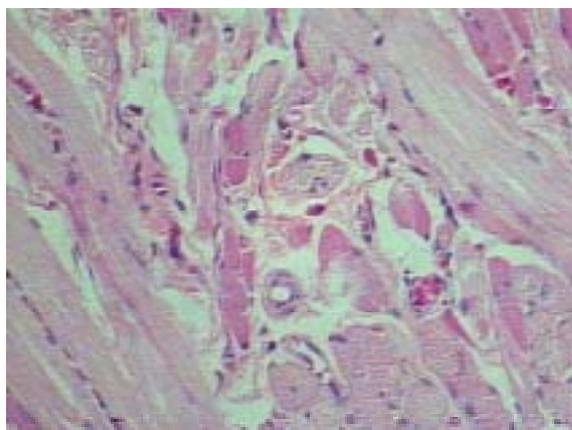


Figura 2 – Destruição celular ocorrida após a irradiação fracionada, ($16 \text{ J cm}^{-2} + 64 \text{ J cm}^{-2}$, intervalo de 150 s de escuro entre as irradiações) (HE, 40x).

4 - DISCUSSÃO

Embora a terapia fotodinâmica seja um método promissor para o tratamento do câncer as condições ideais referentes às diferentes variáveis envolvidas nesta modalidade terapêutica, ainda não estão completamente definidas.

Uma das principais variáveis que determinam a eficácia da TFD é a dose de

energia e forma de irradiação do tecido alvo, contínua ou fracionada.

A dose de energia utilizada neste trabalho baseou-se nos achados obtidos por BIEL et al (1995) que avaliou os efeitos da TFD em língua normal de cães utilizando diversas doses de energia constatando que a dose de 80 J cm^{-2} foi a que produziu melhores resultados.

Neste trabalho verificou-se, no grupo de irradiação fracionada uma maior intensidade dos efeitos relacionados à TFD, quando comparados com o grupo de irradiação contínua, concordando com os achados obtidos por BOWN et al. (1986) em fígado normal de rato, STAR et al (1986) em tumor de glândula mamária, ambos utilizando o fotossensibilizante hematoporfirina, e de MESSMANN et al. (1995) e CURNOW et al. (2000), em cólon normal e ROBINSON et al. (2000) em pele de ratos, que utilizaram um intervalo de escuro de 150 s e a pró-droga fotossensibilizante, o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA).

VAN GEEL et al. (1996) em modelo tumoral RIF1 e MIKVVY et al. (1997) utilizando modelo de câncer pancreático em hamster, tendo como fotossensibilizante meta-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC) e, MESSMANN et al. (1997) em pacientes portadores de carcinoma de esôfago, utilizando Photosan[®], obtiveram resultados semelhantes em que verificaram maior eficácia da TFD com diferentes regimes de fracionamento de luz. Entretanto, o mesmo não foi evidenciado por VAN GEEL et al. (1996) que utilizou o mesmo modelo tumoral RIF1 mas tendo o Photofrin[®] como agente fotossensibilizante.

As diferenças observadas entre os resultados demonstrados na literatura podem estar associadas à grande diversidade entre os modelos estudados, envolvendo desde diferenças de vascularização dos tumores ou áreas irradiadas, dose e tipos de drogas, regimes de fracionamento, além dos métodos analíticos empregados.

Diante dos melhores resultados evidenciados quando da utilização do regime de irradiação fracionada várias hipóteses foram levantadas com intuito de elucidar os reais fatores envolvidos nesta diferença. Segundo BOWN et al. (1986) e STAR et al. (1986) a razão mais provável para o aumento dos efeitos com doses fracionadas de energia decorre do aumento da oxigenação tecidual e retardo na vasoconstrição associada ao início da irradiação laser. MESSMANN et al. (1995) reforça a hipótese anterior, sugerindo a possibilidade de reversão da vasoconstrição inicial, secundária a irradiação, durante o intervalo de escuro, permitindo a reoxigenação

da área de interesse, tornando-a mais suscetível à uma subsequente aplicação laser. ROBINSON et al. (2000) atribuiu estes resultados à ressíntese de protoporfirina IX, durante o período de escuro.

Através da análise histológica verificou-se diferenças concernentes à intensidade e extensão das alterações teciduais, entre os grupos de irradiação contínua e fracionada, não sendo observadas alterações significativas no padrão de morte celular.

Em vista da presença de discreto infiltrado de células mononucleares, pode-se aventar a possibilidade da morte celular ter ocorrido por apoptose. LAM et al. (2001), utilizando ftalocianina, e HSIEH et al. (2003), Photofrin[®], sustentam a hipótese da indução da perda de potencial da membrana mitocondrial, gerando a liberação de citocromo c e fatores pró apoptóticos, com conseqüente ativação da caspase-3, culminando com a apoptose.

5 - CONCLUSÃO

Concluiu-se através deste estudo que o regime de doses de energia fracionada, propiciou uma maior intensidade dos efeitos desejáveis da TFD. Novos estudos são necessários visando avaliar, se doses fracionadas de energia permitiriam uma redução na dose do fotossensibilizante, levando à diminuição dos efeitos adversos, sem reduzir a eficácia da TFD.

6 – AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), para a realização deste trabalho.

7 – REFERÊNCIAS

ABULAFI, AM et al. Cutaneous phototoxicity in photodynamic therapy: clinical experience with and without histamine antagonists photosensitivity. **Lasers Med Sci.** V. 6, p.179-82, 1991.

BARR, H et al. Selective necrosis in dimethyl hydrazine-induced rat colon tumors using phthalocyanine photodynamic therapy. **Gastroenterology.** V. 98, n. 6, p.1532-37, 1990.

BIEL, MA; JANSSEN, W; TRUMP, MF. Photodynamic therapy to the oral cavity, tongue and larynx: a canine normal tissue tolerance study. **Lasers Med Sci.** V. 10, p.13-18, 1995.

BOWN SG et al. Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation:

quantitative studies in normal rat liver. **Br J Cancer.** V. 54, n. 1, p.43-52, 1986.

COOK, LL. Ventricular enlargement and the lithium/pilocarpine seizure model: possible explanation for agonistic behaviour. **Int J Neurosci.** V. 100, n. 1-4, p.117-23, 2000.

CURNOW A et al. Light dose fractionation to enhance photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in the normal rat colon. **Photochem Photobiol.** V. 69, n. 1, p.71-6, 1999.

CURNOW, A; HALLER, JC; BOWN, SG. Oxygen monitoring during 5-aminolevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon: comparison of continuous and fractionated light regimes. **J Photochem Photobiol B.** V. 58, p.149-55, 2000.

FOSTER, T.H. et al. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. **Cancer Res.** V.53, p.1249-54, 1993.

GOSSNER, L. et al. Dose-dependent destruction of human gastrointestinal neoplasms by photodynamic therapy: a quantitative pilot study in athymic nude mice. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** V. 6, p.159-165, 1994.

GOSSNER, L. et al. Terapamyl and hematoporphyrin derivative for tumor destruction by photodynamic therapy. **Br J Cancer.** V. 64, p.84-6, 1991.

HALL, TL. et al. The effect of opioid and acepromazine premedication on the anesthetic induction dose of propofol in cats. **Can Vet J.** V.40, p.867-870, 1999.

HSIEH YJ; et al. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. **J Cell Physiol.** V. 194, n. 3, p.363-75, 2003.

LAM, M; et al. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. **The Journal of Biological Chemistry.** V. 276, n. 50, p.47379-86, 2001.

LEVY, JG. Photodynamic therapy. **Trends Biotechnol.** V. 13, n. 1, p. 14-8, 1995.

MESSMANN, H et al. Enhanced effectiveness of photodynamic therapy with laser light fractionation in patients with esophageal cancer. **Endoscopy.** V. 29, p.275-80, 1997.

MESSMANN, H et al. Enhancement of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin photosensitisation in normal rat colon by threshold and light fractionation studies. **Br J Cancer.** V. 72, p.589-94, 1995.

MIKVY, P; et al. Photodynamic therapy of a transplanted pancreatic cancer model using meta-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC). **Br J Cancer.** V. 76, n. 6, p.713-8.1997.

- MOAN, J; SOMMER, S. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. **Cancer Res.** V. 45, p. 1608-10, 1985.
- OLEINICK NL; EVANS HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. **Radiat Res.** V. 150:S146-56, 1998.
- PE, BM; IKEDA, H; INOKUCHI, T. Tumor destruction and proliferation kinetics following periodic, low power light, haematoporphyrin oligomers mediated photodynamic therapy in the mouse tongue. **Eur J Cancer B Oral Oncol.** V. 30, p.174-178, 1994.
- PECH O; et al. Photodynamic therapy of human Barrett's cancer using 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX: an in-vivo dosimetry study in athymic nude mice. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** V. 14, n. 6, p.657-62, 2002.
- PENG Q; et al. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. **Cancer Res.** V. 61, p.5824-32, 2001.
- ROBINSON DJ; et al. Topical 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy of hairless mouse skin using two-fold illumination schemes: PpIX fluorescence kinetics, photobleaching and biological effect. **Photochem Photobiol.** V. 72, n. 6, p.794-802, 2000.
- ROUGGE, M. et al. Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds: possible protectors against skin photosensitivity. **Photochem Photobiol.** V. 47, p.485-9, 1988.
- STAR, WM et al. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed *in vivo* sandwich observation chambers. **Cancer Res.** V. 46, n. 5, p.2532-40, 1986.
- STERNBERG, E; DOLPHIN, D. Pyrrolic Photosensitizers. **Curr Med Chem.** V. 3, n. 4, p.239-272, 1996.
- THOMAS, RJ et al. High-dose photoradiation of esophageal cancer. **Ann Surg.** V. 206, n. 2, p.193-9, 1987.
- THURMON, JC; TRANQUILLI, WJ; BENSON, GJ. Essentials of Small Animal Anesthesia & Analgesia. Lippincott Williams & Wilkins, p.536-562, 1999.
- TROMBERG, BJ et al. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.** V. 52, n. 2, p.375-85, 1990.
- TRUSCOTT, TG. The use of all-*trans* beta-carotene to ameliorate PDT-induced skin photosensitivity. **Journal Photochemistry Photobiology.** V.11, p.381-2, 1991.
- TSUTSUI H; et al. Optimisation of illumination for photodynamic therapy with mTHPC on normal colon and a transplantable tumour in rats. **Lasers Med Sci.** V. 17, p.101-9, 2002.
- VAN DEN BOOGERT J; et al. Fractionated illumination for oesophageal ALA-PDT: effect on blood flow and PpIX formation. **Lasers Med Sci.** V. 16, p.16-25, 2001.
- VAN DER VEEN, N; VAN LEENGOED, HLLM; STAR, WM. *In vivo* fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid-induced prophyrin: increased damage after multiple irradiations. **Br J Cancer.** V. 70, p.867-72, 1994.
- VAN GEEL IP et al. Influence of fractionation and fluence rate in photodynamic therapy with Photofrin or mTHPC. **Radiat Res.** V. 145, n. 5, p.602-9, 1996.
- WEISHAUPT, KR; GOMER, CJ; DOUGHERT, TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in cancer photoinactivation. **Cancer Res.** V. 36, p.2326-29, 1976.