

EDMYR ROSA DOS REIS

***GLÂNDULA HARDERIANA DE RATOS WISTAR
COMO MODELO PARA O ESTUDO DE EFEITOS
FOTODINÂMICOS***

CAMPINAS

2004

EDMYR ROSA DOS REIS

***GLÂNDULA HARDERIANA DE RATOS WISTAR
COMO MODELO PARA O ESTUDO DE EFEITOS
FOTODINÂMICOS***

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Ester M. D. Nicola

CAMPINAS

2004

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

R277g

Reis, Edmyr Rosa dos

Glândula harderiana de ratos wistar , como modelo para o estudo de efeitos fotodinâmicos. / Edmyr Rosa dos Reis. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Jorge Humberto Nicola, Ester Maria Danielli Nicola

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Glândula de harder. 2. *Protoporfirina. 3. *Agentes fotossensibilizantes. 4. *Fototerapia. 5. *Lasers. I. Jorge Humberto Nicola. II. Ester Maria Danielli Nicola. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

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

Membros:

1. Profa. Dra. Martha Ribeiro Simões

2. Prof. Dr. Orlando Parise

3. Prof. Dr. Eliermes Arraes Menezes

4. Prof. Dr. Konradin Metze

5. Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola

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

Data: 27/02/2004

DEDICATÓRIA

A meus filhos, Gabriel e Nathália, por serem, sempre, a expressão viva da energia, da simplicidade que me dão força para continuar.

A Soely, que soube se fazer presente em todos os momentos, proporcionando-me ajuda e incentivo com muito amor e carinho.

*Aos meus pais, LEOCYR e NILSE, a minha maior gratidão,
pelos ensinamentos de honestidade, confiança e coragem
frente aos desafios*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola, por sua orientação dedicada e precisa e a amizade.

À Profa Dra. Ester Maria Danielli Nicola, por sua incansável orientação, dedicação, confiança e amizade constante.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, pelas valiosas sugestões ao trabalho, e por permitir a utilização do seu laboratório para confecção dos cortes histológicos.

A Sra. Maria Dionísia Oliveira sempre prestativa na ajuda técnica, minha gratidão pela dedicação e paciência.

Aos funcionários do laboratório de Anatomia Patológica, Sérgio Paulo Magalhães e Léa de Magalhães, pela contribuição na confecção de lâminas histológicas para microscopia óptica e fluorescência.

Às secretárias do Departamento de Otorrinolaringologia, Sras. Cristina e Ana, pela amizade, tolerância e apoio constante desde o meu ingresso na Pós-Graduação.

À Dra Cândida Aparecida da Conceição Passos, pela agradável convivência, apoio, amizade e ajuda na impressão da tese.

Aos colegas do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental que, de alguma forma, tornou possível o término deste trabalho.

Aos colegas do grupo Laser, pela amizade, carinho e apoio.

Ao Sr. Jorge Airton Cicalla, pelo apoio e colaboração no setor de informática

Ao Sr. Mário Moreira da Silva, pela assistência e explicações de informática

Ao Sr. Péricles Florencis da Silva, pela contribuição valiosa no registro fotográfico dos experimentos.

Aos funcionários da Técnica Cirúrgica, que sempre estiveram dispostos a me atender.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À secretaria Marcinha pela amizade, apoio e tolerância no tocante às normas da Pós-Graduação da FCM.

À Pós-Graduação, pelo apoio financeiro, para que eu pudesse participar dos congressos.

O que escrevo nasce do meu próprio amadurecimento, um trajeto de altos e baixos, pontos luminosos e zonas de sombra. Nesse curso entendi que a vida não tece apenas uma teia de perdas mas nos proporciona uma sucessão de ganhos.

O equilíbrio da balança depende muito do que soubermos e quisermos enxergar.

Lya Luft (2003)

SUMÁRIO

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRACT	<i>xviii</i>
INTRODUÇÃO GERAL	20
OBJETIVOS	26
CAPÍTULOS	28
Capítulo I: Glândula harderiana de ratos como produtora de PpIX: Estudo de Revisão.....	29
Capítulo II: Photodynamic effect produced HeNe by radiation in Harderian glands of Wistar rats: a model for PDT studies.....	52
Capítulo III: Constructing and evaluating a non-laser Optical System For Photodynamic Process Excitation.....	63
Capítulo IV: Follow up of the photodynamic activity in Harderian glands of Wistar rats by monitoring PpIX photoproducts.....	74
CONCLUSÕES GERAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO	98

LISTA DE ABREVIATURAS

HeNe	Laser hélio neônio
GH	Glândula harderiana
HG	Harderian gland
PpIX	Protoporfirina IX
HpD	Derivados de hematoporfirina
ALA	Ácido δ - Aminolevulínico
PDD	Fotodiagnóstico do inglês <u>P</u> hoto <u>D</u> ynamic <u>D</u> yagnosis
PDT	Terapia Fotodinâmica do inglês <u>P</u> hoto <u>D</u> ynamic <u>T</u> herapy
NAT	N-acetil transferase
MAO	Monoamino oxidase
HIOMT	Hidróxindole – O - Metiltransferase
HPLC	Cromatografia de alta performance
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
UV	Ultravioleta
EV	Endovenosa
HE	hematoxilina - eosina
FDA	Food and Drug Administration

LISTA DE TABELAS

Pág

Table 1 - Estimated mean values of the ratios between fluorescence maximums at C (I_C) and A (I_A), for the different fluences used in the experiment. The calculation was performed after subtract the spectra background....	83
---	----

CAPÍTULO I

	<i>Pág</i>
Figura 1 - Crânio de rato <i>Wistar</i> . A seta indica a localização da glândula harderiana (GH).....	34
Figura 2 - Exposição cirúrgica da glândula harderiana de rato <i>Wistar</i> . Observe: parte da glândula, indicada na ponta da pinça, parte do olho direito (OD) e olho esquerdo (OE).....	34
Figura 3 - Corte histológico do fragmento da glândula harderiana de ratos <i>Wistar</i> , fixado em paraformaldeído 5% e corado em HE para análise em microscopia óptica. Nota-se no interior do ácino o conteúdo secretado pela glândula.(aumento original 100x).....	37
Figura 4 - Corte histológico da glândula harderiana de ratos <i>Wistar</i> , em microscopia de fluorescência, Nota-se intensa fluorescência vermelha no interior dos ácinos devido à presença de PpIX. (aumento original 40x).....	37
Figura 5 - Fluxograma da biossíntese dos produtos indóis que ocorrem na glândula harderiana de ratos. (JONES E HOFFMAN, 1976).....	40
Figura 6 - Fluxograma da biossíntese da molécula de protoporfirinaIX. Nota-se a sequência dos passos metabólicos com as respectivas enzimas (JONES e HOFFMAN, 1976).....	43

CAPÍTULO II

	<i>Pág</i>
Figure 01 - Harderian gland (HG) of Wistar rat, surgically exposed and prepared for the present work.....	55
Figure. 02 - Harderian gland: (a) as seeing when illuminated by white light and, (b) fluorescence of the same gland obtained with 365 nm light source.....	56
Figure. 03 - Normal (control) Harderian gland epithelial cells of the tubuli composed of epithelial cells (3a) which shows yellow - green autofluorescence of the cytoplasm under fluorescence light examination (b). Amorphous porphyrinlipid complexes are found inside the lumina (3a) with red autofluorescence (3b). (aumento original 40x).....	57
Figure. 04 - Harderian gland removed immediately after exposure to laser light: necrosis with fragmentation of the tubular epithelial cells is the predominant feature. (4a) (aumento original 20x) Examination with UV light shows that the protoporphyrin-lipid complexes (red fluorescence) are mixed together with necrotic cell fragments. Absence of inflammatory infiltrate (4b).(aumento original 40x).....	58
Figure. 05 - Harderian gland tissue 24 hours after laser irradiation: marked cellular fragmentation of the necrotic epithelial cells Porphyrinlipid complexes are nearly totally absent (5a)(aumento original 20x). Marked edema and presence of granulocytes was observed. With the help of UV light remnants of protoporphyrin-lipid-complexes can only be rarely detected (arrows) (5b)(aumento original 40x).....	58

CAPÍTULO III

	<i>Pág</i>
Figure 01 - Schematic developed system. All the components are explained in the text.....	66
Figure 02 - Illustration of the developed optical system. Note that in this picture the system includes an optical fiber for special applications, not described in this work.....	67
Figure 3 - Emission spectrum of a 500 W tungsten lamp used for constructing the non-laser optical system.....	67
Figure 4 - Emission spectrum of the output light from the system.....	68
Figure 5 - Photomicrograph of histological section of the Harderian gland kept as control.....	70
Figure 6 - Fluorescence spectrum of the Harderian gland kept as control.....	70
Figure 7 - Photomicrograph of histological section of the treated Harderian gland, after a 30 minutes period.....	71
Figure 8 - Fluorescence spectrum of the treated Harderian gland, after a 30 minutes period.....	71

CAPÍTULO IV

	<i>Pág</i>
Figure 1 - Typical photography of harderian gland of Wistar rats, surgically exposed, obtained with ambient light (white light) before PDT,.....	78
Figure 2 - Typical photography of harderian gland of Wistar rats, surgically exposed, obtained with ultraviolet light (365 nm).before PDT.....	78

Figure 3 -	Typical spectrum of fluorescence of the harderian gland before PDT, excited by ultraviolet light. Peak A at 636.2 nm and peak B at 705.8 nm. (<u>au</u> , means: arbitrary units).....	79
Figure 4 -	Harderian gland of Wistar rats surgically exposed, photographed with ambient light (white light) after 45 minutes treatment (27 joules/mm ²). Arrow shows damaged area.....	80
Figure 5 -	Harderian gland of Wistar rats surgically exposed, photographed PDT with ultraviolet light (365 nm) after 45 minutes treatment (27 joules/mm ²). Arrow shows damaged area.....	80
Figure 6 -	Recordings of the ultraviolet fluorescence spectra taken after 15 minutes treatment with 632.8 HeNe laser light (fluence 9 joules/mm ²). Peak C, at 680 nm, denotes the maximum of the photoproduct fluorescence band. The intensity is in arbitrary units. (<u>au</u> , means: arbitrary units).....	80
Figure 7 -	Recordings of the ultraviolet fluorescence spectra taken after 30 minutes treatment with 632.8 HeNe laser light (fluence 18 joules/mm ²). Peak C, at 680 nm, denotes the maximum of the photoproduct fluorescence band. The intensity is in arbitrary units. (<u>au</u> , means: arbitrary units).....	81
Figure 8 -	Recordings of the ultraviolet fluorescence spectra taken after 45 minutes treatment with 632.8 HeNe laser light (fluence 27 joules/mm ²). Peak C, at 680 nm, denotes the maximum of the photoproduct fluorescence band. The intensity is in arbitrary units. (<u>au</u> , means: arbitrary units).....	81



RESUMO

O presente trabalho mostra, experimentalmente, que é possível a utilização de glândulas harderianas de ratos *Wistar* para o estudo de fotodinâmica aplicada ao diagnóstico (PDD – do inglês, Photo Dynamic Diagnosis) e tratamento médico (PDT – do inglês, Photo Dynamic Therapy). No caso, a ação fotodinâmica tem como fotosensibilizador a protoporfirina IX (PpIX), abundantemente produzida na referida glândula, dispensando, portanto, a etapa de administração de substâncias exógenas, como nos estudos de PDD e PDT convencionais.

No trabalho é mostrado que a fotodestruição tecidual (PDT) na glândula harderiana de tais ratos é acompanhada por alteração no padrão do espectro de fluorescência da mesma, indicando que as moléculas de PpIX não permanecem íntegras, caracterizando-se, portanto, como o processo fotodinâmico em que as células hospedeiras das moléculas de PpIX são destruídas em decorrência da transformação destas em fotoprodutos, conhecido como: Processo Tipo I.

Adicionalmente mostra-se que, tal alteração no espectro de fluorescência original da PpIX é dependente da energia óptica utilizada (fluência), caracterizando-se pelo aparecimento de uma nova banda espectral e pela diminuição de intensidade do padrão fluorescente inicial. Em decorrência desta observação, propõe-se o acompanhamento de medidas de fluorescência em tempo real para o monitoramento da terapia propriamente dita, quando o processo for do Tipo I.

O trabalho, portanto, propõe um modelo para estudos fotodinâmicos que é simples e de acesso fácil à maioria dos laboratórios congêneres. Ressalta-se que foi utilizado, para o PDT, um laser de HeNe assim como uma fonte de luz de construção relativamente simples e, para o PDD, uma lâmpada de ultravioleta comercial. O espectrômetro utilizado, embora importado, também é de custo relativamente baixo.



ABSTRACT

The present work shows, experimentally, that the use of harderian glands of Wistar rats for the study of photodynamic applied to the diagnosis (PDD - of the English, Photo Dynamic Diagnosis) and medical treatment is possible (PDT - of the English, Photo Dynamic Therapy). In the case, the photodynamic action has as photo-sensitizer protoporphirin IX (PpIX), abundantly produced in the related gland, excusing, therefore, the stage of exogenous substance administration, as in the studies of conventional PDD and PDT.

In the work it is shown that the tissue photodestruction (PDT) in the harderian gland of such rats is followed by alteration in the standard of the spectrum of fluorescence of the same one, indicating that the molecules of PpIX do not remain complete, characterizing itself, therefore, as the photodynamic process where the cells hostesses of molecules of PpIX are destroyed in result of the transformation of these in photoproducts, known as: Process Type I.

Additionally we show that, such alteration in the spectrum of the original fluorescence of the PpIX is dependent on the optic energy (fluency) used, characterizing itself for the appearance of a new spectral band and for the reduction of intensity of the initial fluorescent standard. In result of this comment we consider the accompaniment of measures of fluorescence in real time for the monitoring of the therapy properly said, when the process will be of Type I.

The work, therefore, considers a model for photodynamics studies that is simple and of easy access to the majority of the laboratories of same types. A laser of HeNe, as well as a source of light of relatively simple construction was used for the PDT, and for the PDD a commercial light bulb of ultraviolet. The used spectrometer, despite of imported is also of relatively low cost was used.



INTRODUÇÃO GERAL

A terapia fotodinâmica (PDT) é caracterizada por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos. Esta técnica parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado, com um composto não tóxico (fotossensibilizador) previamente injetado ou ativado no organismo, juntamente com oxigênio celular, resulta em espécies químicas reativas capazes de induzir à morte celular. Convencionalmente, dois caminhos sequenciais de eventos (pathway) caracterizam a PDT. No primeiro, conhecido como Tipo I, o fotossensibilizador sofre, por ação direta da luz, uma transformação química, resultando em novas moléculas tóxicas às células hospedeiras. No segundo, conhecido como Tipo II, a molécula do fotossensibilizador é preservada, participando do processo apenas como um elemento capaz de transferir (por um processo conhecido em Física como, ressonância) a energia recebida da fonte de luz ao oxigênio celular, levando-o do estado físico original, tripleto, ao estado singleto. Neste estado final, o oxigênio é quimicamente reativo, o que causa oxidações a componentes da célula hospedeira, levando-as a morte. A excitação do oxigênio por processo ótico direto, do estado tripleto ao estado singleto, é, sabidamente, proibido.

Em ambos os tipos de processos de PDT, a sequência de eventos começa com a absorção ou estimulação de um fotossensibilizador pelo tecido a ser tratado e que, por razões ainda pouco esclarecidas, permanece por mais tempo nas células cancerígenas. Na sequência, luz de comprimento de onda adequado é utilizada para deflagrar o processo fotodinâmico de destruição celular que ocorrerá apenas onde o fotossensibilizador permanecer. Isto é, os tecidos íntegros serão preservados.

A técnica da PDT teve suas origens há muitos anos atrás, quando Hipócrates estudou a influência da luz solar no corpo humano (helioterapia) com resultados satisfatórios, introduzindo-a como ciência empírica. Nestes experimentos utilizou pacientes do seu sanatório na ilha de Kós para o tratamento de icterícia neonatal, bem como de outras doenças específicas (SIEBER 1993).

Na Europa, o estudo da fototerapia teve seu início no século XIX com o médico dinamarquês Niels Ryberg Finser, ao demonstrar que a luz ultravioleta emitida pelo sol foi eficaz no tratamento de *lupus vulgaris*. Nesta época muitas indagações foram feitas, e explicações não convincentes e sem fundamentos foram dadas, fazendo com que a medicina moderna se afastasse da fototerapia (KENNEDY, et al., 1992).

RAAB (1898), estudando os efeitos tóxicos do corante acridina em protozoários *paramecium caudatum* observou que estes organismos sofriam uma sensibilização levando-os à morte e este fato não dependia apenas da concentração do corante, mas também da intensidade de luz (KENNEDY et al., 1992)

TAPPEINER no início do século XX, tendo como base os estudos realizados por Oscar Raab descreveu possíveis aplicações clínicas da PDT utilizando corantes, (KENNEDY et al., 1992).

TAPPEINER E JESIONEK (1903) foram os primeiros a utilizar a técnica de fototerapia com substâncias químicas (corante eosina) que eram previamente injetadas nos organismos e luz branca, para o tratamento de doenças de pele, tais como: *Ptyriasis versicolor*, *Herpes tonsurans*, *Molluscum contagiosum*, *Psoriasis vulgaris* e carcinoma basocelular, com excelentes resultados. Em 1907, TAPPERNIER e JODBAUER motivados com os resultados destes trabalhos, postularam a teoria da “ação fotodinâmica”. (KENNEDY et al., 1992).

A partir de então, muitos trabalhos relacionados à PDT, vêm sendo desenvolvidos com resultados bastante promissores, principalmente com a descoberta de muitas outras substâncias fotossensibilizadoras encontradas na natureza, como as porfirinas, clorofila e as ftalocianinas. Outras substâncias sintetizadas quimicamente, como a acridina, eosina e mais recentemente o derivado de hematoporfirina (HpD) e o ácido δ aminolevulínico (ALA), os quais vêm sendo largamente estudados.

Ao lado da PDT, existe um outro processo, também fotodinâmico, de grande importância e bastante explorado para a área biomédica. Trata-se da fluorescência óptica, usada para alguns diagnósticos não invasivos. Neste caso, fluorescências provocadas por luz geralmente ultravioleta, de substâncias endógenas ou exógenas são utilizadas para, através de comparação entre espectros medidos e espectros padronizados, avaliar estados patológicos de tecidos. De uma forma geral, a fluorescência, assim utilizada em medicina, é conhecida por *diagnóstico fluorescente* ou PDD.

Com a invenção do laser e de outros tantos desenvolvimentos recentes em fotônica, a PDT e PDD, em conjunto ou separadamente, passaram a despertar interesses de pesquisadores, tanto da área médica como de outras áreas, tais como Física e Química.

Além disto, profissionais médicos passaram a adotar as práticas de terapias e diagnósticos fotodinâmicos em clínicas e hospitais, contando com aprovação do Food and Drug Administration - EEUA (FDA) para certos casos.

Para o aprofundamento do conhecimento do processo fotodinâmico, aplicado tanto ao tratamento como ao diagnóstico, é usual e necessário que estudos sejam feitos por áreas específicas do conhecimento com forte interação entre as mesmas. A sequência de eventos (*pathway*) para a PDT, acima descrito de forma simplificada, mostra que estudos experimentais podem ser levados a cabo em função de vários parâmetros, tais como:

- natureza de diferentes fotossensibilizadores;
- quantidade de fotossensibilizador utilizado para uma dada massa tecidual em estudo;
- natureza do tecido em tratamento;
- comprimento de onda de excitação;
- fluência;
- oxigenação;

Desta forma, a procura por modelos experimentais de fácil reprodução é desejável. Por exemplo, hoje a protoporfirina IX (PpIX) como fotossensibilizador exógeno ou como fotossensibilizador de produção localizada, estimulada pelo ácido δ aminolevulínico (ALA) é considerada importante para pesquisas como para tratamentos clínicos. O laser de corante excitado por laser de argônio (Argon – Dye laser), apesar de custo elevado, é bastante utilizado por propiciar fácil sintonização (em comprimento de onda) bem como por oferecer um ajuste de potência adequada.

No presente trabalho, em função de resultados experimentais, glândulas harderianas de ratos Wistar são apresentadas como um modelo particular para estudos da PDT, podendo contribuir para o entendimento e avanços desta terapia.

Em ratos, a glândula harderiana produz e armazena uma alta concentração de lipídios e porfirinas, mais precisamente a PpIX. Embora muitos aspectos relacionados a este mecanismo de síntese de porfirinas ainda não sejam suficientemente entendidos, a caracterização da PpIX em ratos Wistar é bem definida.

O fato de se dispor de um tecido que apresenta o fotossensibilizador PpIX de forma endógena, representa por si só um ganho importante para o leque de possíveis experimentos em PDT. Em outras palavras, para experimentos cujo interesse seja a determinação do efeito de destruição fotodinâmica celular em função de comprimento de onda da luz de excitação, da fluência da fonte ou, mesmo, da influência da oxigenação do tecido (situação hiperbárica) o modelo aqui proposto poderá ser bastante importante.

O aspecto diagnóstico da fotodinâmica também se encontra em evolução conceitual e prática. Em Medicina e Odontologia existe um interesse clínico muito grande por métodos diagnósticos não invasivos e de resultados rápidos. Métodos ópticos, simples e complexos, têm sido utilizados na avaliação de pacientes. A observação direta da alteração de cor da pele de indivíduos ictericos é um exemplo comum do uso da absorção e reflexão óptica. Várias outras alterações de coloração de pele como o albinismo, a hemossiderose e as porfirias evidenciam a deposição ou ausência patológica de substâncias endógenas como, por exemplo, melanina, hemossiderina, porfirinas, lipo-pigmentos, e outras. Geralmente, tais substâncias são fluoróforos (WEAGLE et al 1988), possibilitando a sua identificação por fluorescência quando excitadas por luz de comprimento de onda conveniente, trazendo, assim, informações adicionais sob o estado do tecido.

O uso clínico de diagnóstico por fluorescência (PDD) a que se refere o presente trabalho, é, geralmente obtido, através do emprego de derivados de hematoporfirina (HpD), injetados endovenosamente em pacientes com suspeita de câncer ou produzido em consequência da injeção de uma substância precursora (ALA), concentra-se essencialmente no tecido cancerígeno. A presença de fluorescência no tecido, característica do fluoróforo (GUSMÃO 1992, ZECELL e NICOLA 1993, COLUSSI et al 1996), sugere a malignidade do mesmo, constituindo um método diagnóstico pouco invasivo para câncer.

No caso específico da glândula harderiana íntegra, o espectro de fluorescência observado é o da PpIX, equivalendo a uma situação semelhante à colocada no parágrafo anterior (PDD), entretanto, de caráter endógeno. É de se esperar, portanto, que um processo fotodinâmico de destruição das células da glândula harderiana, produtoras e hospedeiras da PpIX, seja acompanhado por alterações no espectro de fluorescência do tecido e, neste caso, servindo como monitoramento da evolução do processo de destruição celular específico, como no caso da PDT.

O presente trabalho não trata do efeito fotodinâmico propriamente dito, mas sim da apresentação e discussão de um modelo experimental novo com a finalidade de facilitar alguns estudos sistemáticos nesta área. Uma revisão sobre PDT e PDD pode ser encontrada em HENDERSON and DOUGHERT, 1992; NICOLA et al, 1997; REIS et al, 2000.

Quatro capítulos independentes, em forma de trabalhos completos, compõem esta tese, cobrindo aspectos já ressaltados aqui nesta introdução. O primeiro capítulo: *Glândula harderiana de ratos como produtora de PpIX – estudo de revisão*, traz um apanhado geral sobre o que se conhece hoje sobre esta glândula, direcionado à produção de PpIX, portanto, focalizando interesses aos estudos fotodinâmicos. O segundo capítulo: *Photodynamic effect produced by HeNe radiation in Harderian glands of Wistar rats*, mostra que glândulas harderianas, cirurgicamente expostas e íntegras, se comportam frente a uma aplicação fotodinâmica com luz vermelha de laser de HeNe (6280 angstroms) como em processos de PDT por PpIX e baixa fluência. No terceiro capítulo: *Constructing and evaluating a non-laser optical system for photodynamic process excitation*, é descrita a construção de uma fonte não-laser com emissão de radiação centrada na região dos 630 nanômetros que pode ser usada, também, para a excitação do processo fotodinâmico em glândulas harderianas, com resultados semelhantes aos obtidos com o laser de HeNe. No quarto e último capítulo apresentado: *Follow up of the photodynamic activity in harderian glands of Wistar rats by monitoring PpIX photoproducts*, mostra-se que o processo fotodinâmico de destruição de células da glândula harderiana, como nos capítulos anteriores, acarreta uma alteração nos espectros de fluorescência da mesma, não somente em intensidades absolutas mas também em intensidades relativas entre picos, inclusive com aparecimento de novas estruturas, denotando transformações moleculares que levam a crer que, neste caso, o processo fotodinâmico de destruição celular é, predominantemente, do Tipo I.

Em geral, pode ser dito que a fotodinâmica traz para a medicina inúmeras frentes de trabalhos científicos e práticos e que o somatório de pequenas contribuições é que deverá levar ao entendimento do todo.



OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a glândula harderiana de ratos Wistar como modelo para estudos fotodinâmicos experimentais em diagnóstico (PDD) e tratamento (PDT).

Específicos:

- Reunir, de forma sistemática, informações sobre a glândula harderiana, pertinentes ao objetivo geral.
- Desenvolver metodologia que facilite o manuseio de glândulas harderianas, visando estudos fotodinâmicos experimentais.
- Identificar, através de espectroscopia de fluorescência óptica, o fluoróforo produzido e armazenado pela glândula harderiana de ratos Wistar.
- Validar o uso de uma lâmpada de luz não-laser, desenvolvida localmente, como fonte óptica para a destruição fotodinâmica de tecidos (PDT).
- Utilizar a fluorescência, produzida por luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda (λ) igual a 364 nm, da PpIX, presente na glândula harderiana de ratos *Wistar*, para monitorar a evolução de efeito fotodinâmico de destruição celular, obtido com luz de $\lambda = 632,8$ nm, proveniente de laser de HeNe.



CAPÍTULOS

CAPÍTULO I

GLÂNDULA HARDERIANA DE RATOS COMO PRODUTORA DE PpIX: ESTUDO DE REVISÃO

Trabalho em fase de redação final para submissão a periódico
especializado indexado, editado em português

RESUMO

Em 1694, Johann Jacob Harder observou uma glândula, inicialmente considerada como lacrimal, localizada junto ao globo ocular da grande maioria dos animais com múltiplas e variadas funções, de acordo com a espécie em que está presente. No presente trabalho, desenvolve-se extensa revisão da literatura sobre esta glândula, denominada harderiana, de ratos, motivado, em especial, pelo fato de, em roedores, esta glândula produzir e armazenar grande quantidade de PpIX, potente fotossensibilizador utilizado em Terapia Fotodinâmica. Acompanhou-se o estudo da literatura com avaliações anatômicas e histológicas, estas tanto em nível de microscopia óptica como de fluorescência. Estes estudos permitiram evidenciar a presença de PpIX não apenas no lúmen como no interior das células que constituem os ácinos. Procurou-se entender a presença desta substância e quais estudos estão sendo realizados no sentido de esclarecer, adequadamente, sua histofisiologia, nesta espécie de animais. Embora a literatura seja extensa em relação à glândula harderiana, ainda são escassos os trabalhos que esclareçam de forma objetiva sua função nos roedores.

ABSTRAT

Almost three hundred years ago, John Jacob Harder described, for the first time, the Harderian gland, located near the eye of the great majority of animals. This gland has multiple and varied functions according to the animal specie it belongs. In the present work, we developed an extense review of the literature focused on the Harderian gland of rats considering the great amount of protoporphyrin IX (PpIX) produced in the gland of rodents. This substance is an adequate photosensitizer largely used for photodynamic purposes. Along with the literature review, we developed anatomic and histological studies in Harderian glands of *Wistar* rats to comprove the presence of PpIX in these species. Through our studies, we detected the presence of PpIX either in the lumen and in the interior of acinar cells, which could also be evidenced by fluorescence microscopy. These evidences along with literature review enabled us to propose the Harderian gland as an experimental model for PDT studies.

GLÂNDULA HARDERIANA

Johann Jacob Harder¹, em 1694, estudando o gamo *Dama vulgaris* descobriu uma glândula que descreveu como sendo do tipo lacrimal. A partir de então muitas informações sobre a mesma vêm sendo acumuladas. Esta glândula passou a ser conhecida como glândula de Harder ou harderiana. Em ratos a glândula harderiana produz protoporfirina IX (PpIX), despertando, portanto, interesse como modelo experimental em estudos de fluoróforos endógenos.

SAKAI e YOHRO, 1981, estudando as glândulas harderianas de algumas classes de animais, observaram sua presença na maioria dos vertebrados terrestres, como: anfíbios (anuros), répteis, aves e mamíferos, estando, entretanto, ausente em morcegos, bovinos, eqüinos, carnívoros terrestres, grandes primatas e no homem.

De uma maneira geral não são encontradas variações microscópicas significativas da glândula harderiana entre as diferentes classes de animais. Ela pode ser do tipo tubular (PAULE, 1957; PAYNE, 1994;) ou pode ser do tipo túbulo acinar / túbulo alveolar (HOFFMAN, 1971).

A glândula harderiana sintetiza uma diversidade muito grande de substâncias de acordo com as diferentes espécies de animais, tais como: secreção mucolipídica pelos anfíbios, mucosserosa pelos répteis, serosa (essencialmente água) pelas cobras e lipídica pelas aves. Em mamíferos, ocorrem três tipos de secreções: lipídios, produtos indóis e as porfirinas, que são características de alguns tipos de roedores, dentre os quais, os ratos (DARRIEN e TURCHINI, 1924; GRAFFLIN, 1942; THOMPSON et al., 1984; PAYNE, 1994).

¹ HARDER, JJ. *apud* Brownscheidle CM., Niewenhuis RJ. Ultrastructure of the harderian gland in male albin rats. **Anatomical Records**, 190: 735-754, 1978

Em razão da grande diversidade de endógenos sintetizados pela glândula, várias hipóteses (CHIEFFI et al., 1996) para a descrição do seu funcionamento já foram propostas, o que, entretanto, ainda não está bem esclarecido. Sabe-se que, para cada classe de animal ela apresenta uma diversidade de função, tal como: lubrificação do olho e da membrana nictante nos mamíferos CHIEFFI et al., 1996; sítio de resposta imune, particularmente em pássaros (MONTGOMERY et al., 1992); produção de ferormônios (MINUCCI et al., 1989); secreção seromucosa para lubrificar o olho e a membrana nictante em anfíbios (DI MATTEO et al., 1989); produção de saliva em alguns quelônios (Payne, 1994); osmorregulação em répteis (CHIEFFI BACCARI et al., 1990); fotoproteção nos ratos, regulando a quantidade de luz incidente na retina (HUGO et al., 1987); fotorrecepção, detectadas através de uma série de experimentos com ratos recém-nascidos (WETTERBERG et al., 1970) e termorregulação bem como fatores de crescimento, em roedores (CHIEFFI et al., 1996).

ASPECTOS ANATÔMICOS

Anatomicamente, a glândula harderiana está situada na região retroorbital (VENABLE e GRAFFLIN, 1940), lançando-se medianamente no espaço interno entre o globo ocular e a extremidade da órbita e sua superfície posterior, limita-se com o osso frontal (SMITH, 1976). Na classe dos mamíferos, a glândula apresenta-se muito desenvolvida, principalmente nos roedores tais como: ratos, hamsters, gerbils, camundongos e porcos da Índia, (CHIEFFI et al., 1996). As figuras abaixo exemplificam a situação anatômica desta glândula em relação ao crânio (Figura 1) e órbita de ratos *Wistar* (Figura 2).

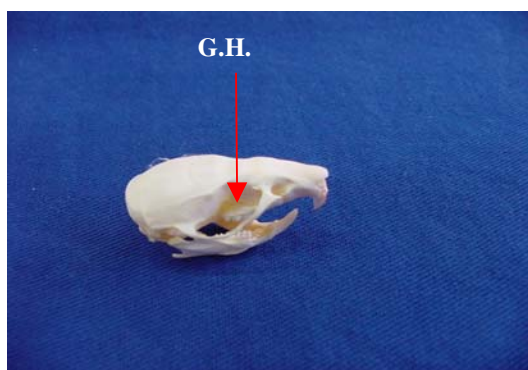


Figura 1- Crânio de rato *Wistar*. A seta indica a localização da glândula harderiana (GH)

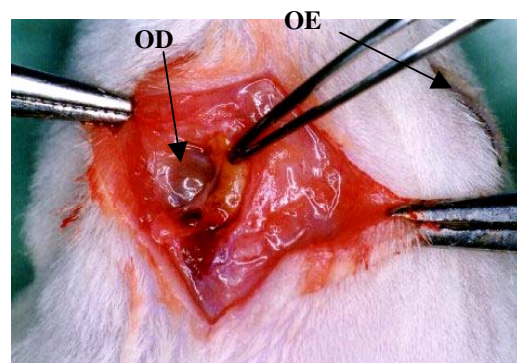


Figura 2 - Exposição cirúrgica da glândula harderiana de rato *Wistar*. Observe: parte da glândula, indicada na ponta da pinça, parte do olho direito (OD) e olho esquerdo (OE).

A estrutura anatômica da glândula harderiana foi detalhada em várias espécies de roedores do deserto (SAKAI e YORO, 1981). Nos ratos, a glândula harderiana se apresenta como uma estrutura unitária de forma irregular, tendo três fissuras (VENABLE e GRAFFLIN, 1940). Em uma destas fissuras passa o nervo óptico e, nas demais, passam fibras musculares extra-oculares.

Nos ratos *Wistar*, a glândula harderiana é envolvida por uma cápsula de tecido conectivo, composta principalmente por pacotes densos de fibras de colágeno, sendo a extremidade da glândula constituída de túbulos ramificados com uma extensa lâmina basal, alinhados por uma camada simples de células do epitélio (DJERIDANE, 1994). Apesar da formação de vários lóbulos, a glândula harderiana apresenta apenas um ducto excretor com abertura no saco da conjuntiva do olho, na membrana nictante (JOHNSTON et al., 1987).

ASPECTOS HISTOLÓGICOS

Muitos trabalhos vêm sendo relacionados com a histologia da glândula harderiana (HOFFMAN, 1971; SAKAI, 1992; DJERIDANE 1992) Nos mamíferos, em geral, as glândulas harderianas são formadas por um epitélio simples, composto por células

de forma cubóide. Neste epitélio são observados dois tipos celulares, com determinadas especializações intracelulares que caracterizam as glândulas de cada espécie (PAYNE, 1996).

AURELI, em 1957, estudando a estrutura histológica da glândula harderiana à microscopia óptica, observou que, em algumas espécies de ratos, as glândulas apresentavam um padrão estrutural repetitivo próprio. Mais tarde, outros trabalhos relacionados com a ultra-estrutura deste órgão, observaram que o mesmo apresentava apenas dois tipos de células (HOFFMAN, 1971; CHIEFFI et al., 1996). BROWNSCHIEDLE e NIEWENHUIS, 1978, estudando estes dois tipos celulares da glândula harderiana de ratos, observaram diferenças morfológicas entre as células que constituem o tecido glandular. Fragmentos da glândula harderiana, corados com azul de toluidina, permitiram identificar os dois tipos de células do epitélio glandular, recebendo diferentes denominações por diferentes autores como células A e B (SHIRAMA e HOKANO, 1991), ou células tipo 1 e tipo 2 (WOOLEY e WORLEY, 1954). As células tipo 1 são mais freqüentes e constituem a maior parte do epitélio colunar, cerca de 75%, e são caracterizadas por apresentar citoplasma acidófilo e um grande número de vacúolos lipídicos. As células tipo 2 estão em menor número e caracterizam-se por ter citoplasma basófilo. Seus vacúolos lipídicos são grandes e estão em menor número. É comum encontrar-se, em ambos os tipos celulares, células binucleadas. Células mioepiteliais também podem ser encontradas, dispostas paralelamente à membrana basal. No lúmen dos túbulos é encontrada, freqüentemente, secreção de cor vermelho-acastanhado, o que caracteriza a presença de porfirinas (CARRIERI, 1985).

JOHNSTON et al., 1985, estudando glândulas harderianas de ratos da planície *Pseudomys australis*, observaram a presença de um terceiro tipo celular que ocupa de 11 a 29% das células do epitélio e tem como principal característica núcleo grande, ocupando a região central da célula.

As glândulas harderianas, de uma maneira geral, são formadas por apenas um ducto excretor simples, que se abre no hilo (DJERIDANE, 1994). Este ducto é dividido em dois segmentos distintos: sinuoso proximal com abertura direta na ampola e um seguimento distal, mais retilíneo, que se esgota na superfície côncava da membrana nictante. Estes segmentos são revestidos por um epitélio estratificado. Os ductos são envolvidos por uma

camada fina de tecido conectivo denso. No interstício da glândula harderiana são encontrados vasos sangüíneos, fibroblastos, fibras nervosas, células plasmáticas e macrófagos (BROWNSCHEIDLE e NIEWEHUIS, 1978; CARRIERI 1985, DJERIDANE, 1994;).

ULTRA-ESTRUTURA DA GLÂNDULA HARDERIANA DE RATOS WISTAR

BROWNSCHEIDLE e NIEWENHUIS, 1978 estudando a ultra-estrutura dos tipos celulares da glândula harderiana de ratos *Wistar*, concentraram atenção na composição do material a ser excretado no interior dos vacúolos secretores, observando concentrações variadas de substâncias, tais como: lipídios, substâncias indóis, cristais de protoporfirinas e material fibrogranular.

As mitocôndrias presentes nas células tipo 1 são maiores do que as encontradas nas células tipo 2 e a sua matriz é relativamente difícil de ser visualizada. O retículo endoplasmático rugoso encontra-se mais evidente neste último tipo celular.

Nas células do tipo 2 são encontrados vacúolos cheios de secreções assim como vacúolos elétrons densos. As mitocôndrias das células tipo 2 são numerosas e se apresentam, geralmente, de forma esférica ou alongada com matriz densa, sendo facilmente identificadas contra um citoplasma que se apresenta com um grau de densidade menor. Estas organelas são menores em tamanho do que as observadas nas células do tipo 1 e localizam-se ao redor dos vacúolos secretores. As vesículas do retículo endoplasmático rugoso estão empacotadas ou empilhadas, compreendendo um modelo tipo “veneziana”.

Nas células do epitélio da glândula harderiana observam-se microvilosidades no ápice e, na superfície basal, um contorno plano. Entre as células, há um complexo juncional. No citoplasma celular próximo aos microtúbulos são encontrados lipossomos. A lâmina basal é composta por células mioepiteliais, desmossomos e junções mioneurais, entretanto não foram observadas associações com fibras nervosas. Capilares encontrados nos septos do tecido conectivo são formados por um endotélio não fenestrado. Fibras nervosas são encontradas numa associação fechada com capilares da glândula CHIEFFI B, 1996.

As demais organelas não apresentam diferenças significativas entre as células de outras espécies de ratos.

ENDÓGENOS PRODUZIDOS PELA GLÂNDULA HARDERIANA DE RATOS WISTAR

DARRIEN e TURCHINI, 1924, foram os primeiros a caracterizar a presença de porfirinas nas glândulas harderianas de ratos. Inicialmente, supunham que a glândula harderiana era simplesmente um depósito de porfirinas, sendo estas macromoléculas originadas por células imaturas do sangue, que vinham pela circulação sangüínea e eram depositadas no lúmen dos ácinos da glândula harderiana sob a forma de cristais. Mais tarde, pesquisas realizadas com células do epitélio da glândula harderiana *in vitro*, demonstraram que este órgão possuía um complexo enzimático, suficiente para sintetizar porfirinas, mais precisamente protoporfirina IX (PpIX), a partir de precursores apropriados, assim como, armazená-la no interior do seu lúmen (COHN, 1955; DAVIDHEISER e FIGGE, 1955; THOMIO e GRINSTEIN 1968; MARGOLIS, 1971; JONES e HOFFMAN, 1976; JACKSON et al., 1976)., além de lipídeos (WATANABE, 1980) e produtos indóis (BUBENIK et al., 1976).

A glândula harderiana dos ratos por apresentar uma alta concentração de protoporfirina IX, quando irradiada com luz ultravioleta, emite uma fluorescência característica deste fluoróforo (GRAFLIN, 1942). As Figuras 3 e 4 evidenciam a presença de fluorescência característica da PpIX no interior de ácinos da glândula harderiana.

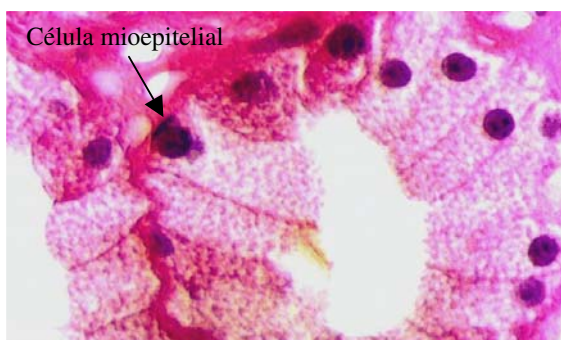


Fig. 3 - Corte histológico do fragmento da glândula harderiana de ratos *Wistar*, fixado em paraformaldeído 5% e corado em HE para análise em microscopia óptica. Nota-se no interior do ácino o conteúdo secretado pela glândula. (objetiva 100x)

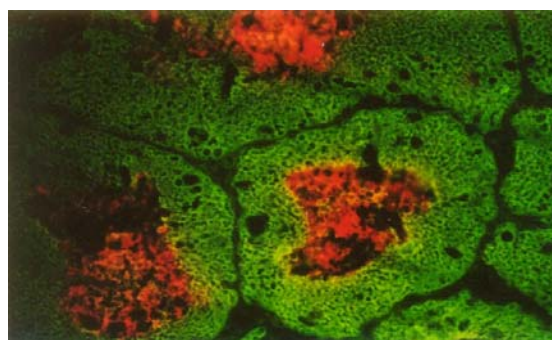


Fig. 4 - Corte histológico da glândula harderiana de ratos *Wistar*, em microscopia de fluorescência. Nota-se intensa fluorescência vermelha no interior dos ácinos devido à presença de PpIX. (objetiva 40x)

HOFFMAN, 1971, analisando células do epitélio glandular da harderiana, de hamster dourado, sugeriu dois mecanismos de secreção: apócrino e holócrino. No mecanismo apócrino, encontram-se fragmentos microscópicos de citoplasma celular juntamente com cristais de protoporfirinas no lúmen dos ácinos. No holócrino, após a morte celular, estas células destacam-se do epitélio, tornando-se a própria secreção da glândula. O resultado deste estudo foi posteriormente, confirmado em trabalhos realizados com outras espécies de ratos (STRUM e SHEAR, 1982; CARRIERE, 1985; JOHNSTON et al, 1985).

BROWNSHEIDLE et al., 1978, estudando a ultra-estrutura da glândula harderiana de ratos albinos, observaram que o processo de secreção das células do epitélio glandular ocorre de uma maneira contínua: vacúolos liberam o seu conteúdo para o lúmen da glândula, enquanto que vacúolos adjacentes se movem em direção ao ápice das células, situando-se logo abaixo da membrana plasmática, tornando-se aptos à realização do próximo evento de secreção.

CARRIERI, 1985, estudando glândula harderiana de ratos observou que o limite da membrana dos vacúolos secretores une-se à membrana plasmática das células, sendo o conteúdo vacuolar descarregado no lúmen dos ácinos. Neste caso, a membrana plasmática era mantida intacta em todo o processo, não havendo extrusão maciça dos componentes citoplasmáticos. Neste caso, o mecanismo de secreção é do tipo merócrino, onde a excreção do produto elaborado pelas células secretoras ocorre por um processo de exocitose não havendo perda do conteúdo citoplasmático.

PAYNE et al., 1985, relataram restos celulares no espaço luminal da glândula harderiana. Esta observação deve-se ao fato de que glândula harderiana normalmente perde células do epitélio colunar pelo processo fisiológico de renovação celular. Estas mudanças podem ocorrer espontaneamente com a idade do animal (SPIKE et al., 1988) como também podem ser resultantes de alterações hormonais, naturais ou induzidas (SPIKE, 1985, 1986).

Anos mais tarde, JOHNSTON et al., 1985, estudando o processo de armazenamento e/ou excreção dos endógenos pelos vacúolos, observaram que este processo era semelhante entre as diferentes espécies de ratos.

DJERIDANE, 1994, descreveu nos ratos uma particularidade interessante: a concentração de porfirinas é maior nas fêmeas do que nos machos. A síntese dessas macromoléculas nestes animais é influenciada pelos hormônios sexuais. Isso é comprovado uma vez que, após a ovariectomia, ocorre uma diminuição acentuada na síntese dessas porfirinas. O oposto ocorre com os ratos machos castrados, em que se observa um aumento acentuado de porfirinas. Resultados semelhantes, também foram encontrados por CHRISTENSEN e DAN, 1953; WOLLEY e WORLEY, 1954; HOFFMAN, 1971 e PAYNE et al., 1977; 1985. CARRIERE, 1985, descreveu três etapas metabólicas das porfirinas encontradas no citoplasma das células secretoras da glândula harderiana.

As secreções lipídicas sintetizadas pelas células da glândula harderiana dos mamíferos, em geral, constituem o produto de maior concentração, perfazendo cerca de 35% do peso seco da glândula (WATANABE, 1980). Cada vacúolo maduro contém uma gota de lipídio envolvido por uma estrutura semelhante a uma membrana simples, que em muitos casos dá um formato de meia-lua ao material amorfo que se localiza entre a gota e a membrana (WEITERHAGER e KÜTNEL, 1983; JONSTON, 1987).

Muitos pesquisadores vêm caracterizando bioquimicamente os lipídios encontrados nas glândulas harderianas dos ratos, observando que há uma variação nos grupos dessas moléculas, de acordo com as espécies. Isto é o que acontece com os camundongos, porcos da Índia, e hamster dourado, que têm como estrutura fundamental os lipídios do grupo alquil (grupos constituídos por hidrocarbonos) e acil (grupos ácidos) (SEYAMA et al., 1992). Já os ratos e gerbil da Mongólia apresentam lipídios do grupo éster como componente predominante nos vacúolos. Algumas espécies de ratos também apresentam alguns lipídios neutros como mono, di e trigliceróis, assim como colesterol fosfolipídios (fosfatidilcolina e fosfatidiletalona e esfingomielina), e grupo dos glicolipídios, sendo os mais frequentes os cerebrosídeos (SEYAMA et al., 1992).

Outros produtos secretados pela glândula harderiana são da família dos indóis. No início, acreditava-se que estes produtos eram sintetizados na glândula pineal, mas com a identificação da molécula de melatonina na glândula harderiana, feita por BUBENIK et al., em 1976 e por PENG et al., 1980, através da técnica de imunocitoquímica, observou que esta era sintetizada pelas células da glândula.

LOPEZ–GONZALES et al., 1991, encontraram na glândula harderiana, enzimas que estão envolvidas no metabolismo das moléculas indóis tais como, N-acetil transferase (NAT) e hidróxindole –O- metiltransferase (HIOMT) na glândula

PAYNE et al., 1994, observaram que a glândula harderiana possui a capacidade de sintetizar produtos indóis e esquematizaram os passos da síntese destes produtos, conforme ilustrado na Figura 5.

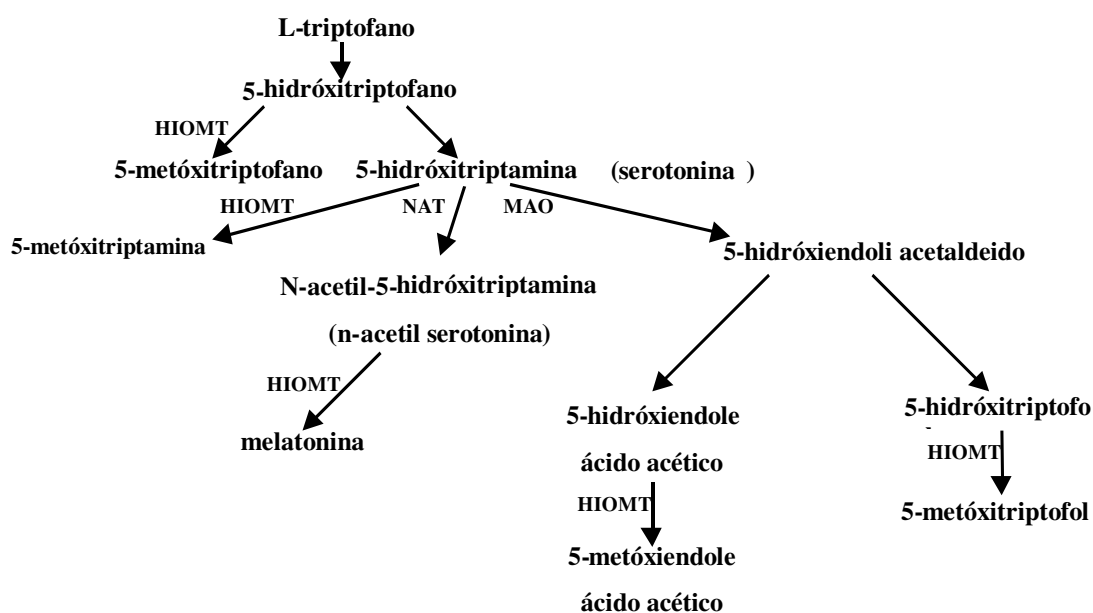


Figura 5 - Fluxograma da biossíntese dos produtos indóis que ocorrem na glândula harderiana de ratos. (JONES E HOFFMAN, 1976)

CHIEFFI et al., 1996, utilizando técnicas mais precisas como radioimunoensaios e cromatografia de alta performance (HPLC) e histoenzimologia, comprovaram que a glândula harderiana contém elementos necessários para a síntese de tais moléculas. Entretanto, como ainda pairavam algumas dúvidas quanto à síntese desses produtos, postularam três hipóteses: (1) as moléculas indóis encontradas na glândula harderiana seriam produzidas em outra parte do corpo do animal; (2) as moléculas indóis seriam produzidas na glândula harderiana e (3) ocorrem as duas situações na síntese destas moléculas.

Estudos recentes de DJERIDANE, 2001, relata a presença de produtos indóis em células de glândulas harderianas dos ratos, tais como: serotonina, N-acetilserotonina, 5-methoxitriptamina, 5-metoxitriptofol, 5-hidroxitriptofol e ácido acético 5-hidróxindole. Além disso, refere a síntese pelo tecido da glândula *in vitro* de algumas moléculas indóis como a 5-metoxindole.

Existem algumas diferenças entre a glândula harderiana e a glândula pineal no controle do metabolismo das moléculas indóis, um exemplo disso é que a síntese que ocorre na glândula harderiana parece ser independente do sistema nervoso autônomo (PAYNE,1994).

A síntese de produtos indóis pela glândula harderiana está relacionada a diversos fatores tais como, diferenciação sexual, ritmo circadiano, fatores sazonais e idade. Em relação à diferenciação sexual tem sido observado que os ratos fêmeas possuem níveis de melatonina bem mais elevado que os ratos machos e que a castração de machos em idade pré-puberal leva não só ao aumento na produção de melatonina como à substituição de células tipo 1 em tipo 2, com conseqüente aumento na produção de PpIX (RODRIGUES KALUNGA et al., 1992; DJERIDANE, 1998).

Estudos realizados por autores como PEVET et al., 1980; HOFFMAN et al., 1985; BUZZEL et al., 1991 e DJERIDANE, 2001, demonstram que os níveis de melatonina, serotonina, 5-hidróxitriptofol e a atividade da enzima hidróxiindóle-O-metil transferase (HIOMT), encontram-se todos aumentados nos períodos em que os animais permanecem no escuro.

CHIEFFI et al., 1996, submetendo ratos em condições artificiais de variações sazonais observaram que, ocorre uma variação acentuada no metabolismo dos produtos indóis e que dias longos, acarretam variações na concentração de melatonina.

DJERIDANE, 2001, demonstrou redução ou mesmo ausência de 5-metóxi-triptamina e triptofano na secreção da glândula harderiana de ratos, no verão. Este mesmo autor avaliou o efeito da idade no conteúdo de melatonina associada às atividades das enzimas NAT e HIOMT da glândula harderiana e observou que a concentração de melatonina no plasma diminui de acordo com a idade do animal, embora na glândula harderiana não ocorram alterações nos níveis de síntese, em estudo comparativo realizado entre ratos de 22 meses e ratos de quatro meses de idade.

PROTOPORFIRINA IX

A protoporfirina IX é o endógeno produzido nas glândulas harderianas de ratos que, por sua ação fotodinâmica, merece um estudo destacado.

SPIKE et al., em 1990, estudando as porfirinas da glândula harderiana de ratos, observaram a presença de várias espécies de porfirinas. Estas são definidas por substituições de radicais que ocorrem nos carbonos nas posições 1 a 8 do anel tetrapirrólico.

As principais porfirinas encontradas na glândula harderiana de ratos são: harderoporfirina, uroporfirina, coproporfirina (pentacarboxílica, hexacarboxílica e heptacarboxílica), e protoporfirina IX. Esta última em maior concentração, atingindo 72% do total de porfirinas.

Muitos outros trabalhos vêm sendo desenvolvidos sobre as porfirinas da glândula harderiana de ratos, principalmente na tentativa de responder interrogações sobre a sua presença, em grande quantidade, levando em consideração que este órgão não apresenta uma ligação direta conhecida com o resto do organismo do animal.

Sob o ponto de vista fotodinâmico, a importância desta substância recai no fato de que a mesma fluoresce na região do vermelho, quando excitada com luz ultravioleta (UV). Esta molécula, também pode servir como mediadora para o oxigênio tripleto excitar-se para o estado singlete, o que leva à oxidação localizada, com a conseqüente destruição celular. Este processo é conhecido como Tratamento Fotodinâmico (PDT, do inglês) do tipo II.

Conforme JONES e HOFFMAN, 1976, o processo de síntese de PpIX na glândula harderiana dos ratos é descrito pelo esquema apresentado na figura 6.

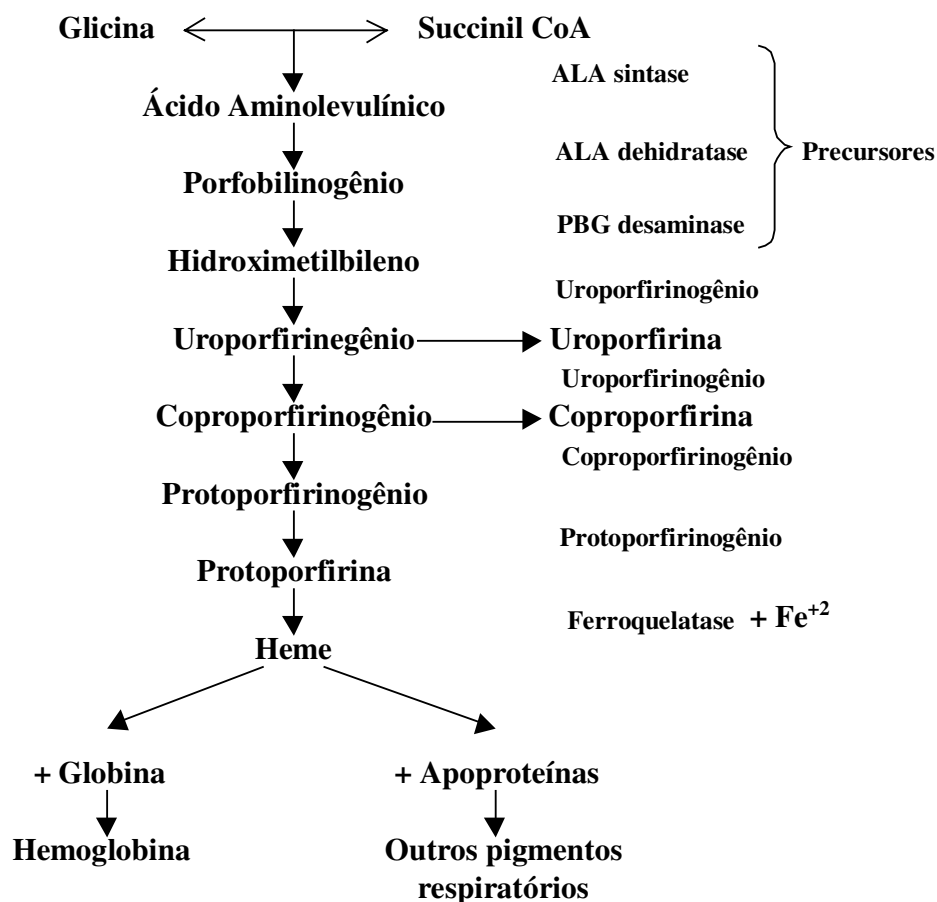


Figura 6 - Fluxograma da biossíntese da molécula de protoporfirina IX. Nota-se a sequência dos passos metabólicos com as respectivas enzimas (JONES e HOFFMAN, 1976).

GLÂNDULA HARDERIANA E PROCESSOS FOTODINÂMICOS

O fato da glândula harderiana de ratos sintetizar e armazenar uma grande quantidade de protoporfirina IX possibilita o seu uso em experimentos fotodinâmicos, semelhantes àqueles relacionados à Terapia Fotodinâmica de tecidos malignos (PDT) com derivados de hematoporfirinas (HpD). Neste caso, os trabalhos experimentais ficam facilitados pelo fato de que o fluoróforo é de origem endógena, dispensando a administração de agentes estranhos ao organismo em estudo.

Neste sentido, realizam-se experimentos pioneiros, confirmando a hipótese colocada acima (REIS. et al., 2000; NICOLA. et al., 2001).

CONCLUSÃO

A literatura sobre esta glândula, cobrindo aspectos anatômicos, tanto macroscópicos como microscópicos e aspectos fisiológicos é expressiva. No entanto, sob o ponto de vista de possível utilização da glândula harderiana em estudos de fotodestruição tecidual, como mostrado nas referências acima citadas, nada foi encontrado.

O trabalho de revisão sobre glândula harderiana, aqui desenvolvido, destaca seu grande potencial como modelo para estudos teóricos e experimentais de processos fotodinâmicos, de interesse tanto no diagnóstico como no tratamento de determinadas alterações quer benignas ou malignas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURELI G. La ghiandola di Harder nel maiale. Ricerche morfologiche ed istochimiche. *Revista di Istochimica Normale & Patologica*, 3,113-126, 1957 - In Payne A. P. Review The Harderian Gland: A Tercentual Review. **Journal. Anatomical**, **185**: 1-49, 1994.

BROWNSCHIEDLE C.M., NIEWENHUIS R.J. Ultrastructure of the harderian gland in male albin rats. **Anatomical Records**, **190**: 735-754, 1978.

BUBENIK G.A., BROWN G.M., Grota L.J. Immunohistochemical localization of melatonin in the mat harderian gland. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **24**: 1173-1177, 1976.

BUZZEL G.R., MENENDEZ-PELAEZ A, PORKKA-HEISKANEN T., PANGERL B., VAUGHAN M.K., REITER R.J. Bromocriptine prevents the castration-induced rise in porphyrin concentration in the harderian glands of the male Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. **Journal Experimental Zoology**, **249**: 172-176, 1989.

BUZZEL G.R., PANGERL B., MENENDEZ-PELAEZ A, VAUGHAN M.K., LITTLE J.C. Melatonin and porphyrin in the harderian gland of the Syrian hamster: circadian patterns and response to autumnal conditions. **International Journal of Biochemistry**, **22**: 1465-1469, 1990.

CARRIERI R. Ultrastructural Visualization of Intracellular Porphyrin in the Rat Harderian Gland. **Anatomical Record**, **213**: 496-504, 1985.

CHIEFFI B. Organogenesis of the harderian gland. A comparative survey. **Microsc. Res. Tech.**, **34**: 6-15, 1990.

CHIEFFI G, CHIEFFI BG, DI MATTEO L, D'ISTRIA M, MINUCCI S, VARRIALE B. Cell biology of the harderian gland. **International Review of Citology**, **168**: 1-80, 1996.

CHRISTENSEN F, DAM H. A sexual dimorphism of the harderian gland in hamsters. **Acta Physiol. Scand.** **27**: 333-336, 1952.

COHN S.A. Histochemical observations on the harderian gland of the albino mouse. **Journal. Histochemistry. Cytochemistry**,**3**: 342-353, 1955.

DAVIDHEISER RH, FIGGE F.H.J. Comparoson of porphyrin producing enzyme actves in harderian glands of mice and other rodents. **Prooceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **97**: 775-777, 1955.

DERRIEN E, TURCHINI J. Sur'l acumulation d' une porphirine dans la gland de Harder des rongeurs dugense mus et sin son mode d' excretion. **Compte Rendu des Seances de la Société de Biologiet de ses Filiarles**. **91**: 637-639, 1924.

DI MATEO L, MINUCCI S, CHIEFFI BACARI G, PELLICIARI C, D'ISTYRIA M, CHIEFFI G. The harderian gland of the frog, *Rana esculenta*, during the annual cycle: histology, histochemistry and ultrastructure. **Basic Appl. Histochem.**, **(33)**, 93-112, 1989.

DJERIDANE Y. The harderian gland of desert rodents: a histological and ultrastructural study. **Journal of Anatomy** **180**: 465-480, 1992

DJERIDANE Y. The harderian gland and its excretory duct in the *Wistar* rat. A histological and ultrastructural study. **J. Anat.** **184**: 553-566, 1994.

DJERIDANE Y, VIVEN-ROELS B. SIMINNEAUX, V., MIGUEZ, JM., AND PEVET, P. Evidence for melatonin sythesis in rodent harderian gland: a dynamic in vitro study. **J. Pineal Res.**, **25**:54-64, 1998.

DJERIDANE Y, TOUITOU Y. Melatonin synthesis in the rat harderian gland: age and time related effects. **Exp. Eye Res.**, **72**: 487-492, 2001.

GRAFFLIN A.L. Histological observations upon the porphyrin excreting harderian gland of the albino rat. **American Journal of Anatomy**, **71**: 43-64, 1942.

HARVEY DJ. Identification by gas chromatography and mass spectrometry of lipids from the rat harderian gland. **J. Chromatography**, **565**: 27-34, 1991.

HOFFMAN R A. Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the harderian glands of golden hamster. **American Journal Anatomy**, **132**: 463-478, 1971.

HOFFMAN R.A; JONHSON L.B., REITER R.J. Harderian glands of golden hamsters temporal and sexual differences in immuno reactive melatonin. **Journal. Pineal Research**, **2**: 161-168, 1985.

HUGO J, KRIJT J, VOKURKA M, JANOUSEK V. Secretory response to light in rat harderian gland: possible photoprotective role of harderian porphyrin. **General Physiology and Biophysics**, **6**:401-404, 1987.JACKSON AHD, KENNER G.W., SMITH K.M, SUCKLING C.J. Pyrroles and related compounds. XXXVII. **Harderoporphyrim Tetrahedron**, **32**: 2757-2762, 1976.

JOHNSTON (A), H.S., MC GADEY J., PAYNE .A.P, THOMPSON G.G, MOORE M.R. The harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the plains mouse (*Pseudomys australis*). **Journal of Anatomy**, **140**: 337-350, 1985.

JOHNSTON,(B) H.S., MC GADEY J., PAYNE .A.P., THOMPSON G.G., MOORE M.R. The harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*). **Journal of Anatomy**, **153**: 17-30, 1987.

JONES C.W. AND HOFFMAN, R.A. .Porphyrin concentration of the hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland: effects of incubation with delta-aminolevulinic acid and various hormones. **International Journal. Biochemistry**. **7**: 135-139, 1976.

KENNEDY J.C., POTTIER, R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**: **14**: 275-292, 1992.

LOPEZ-GONZALES M.^a, CLVO J.R., GOBERNA R AND GUERREIRO J.M. Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rats. **Life Sci.** ,**48**: 1165-1171, 1992.

MARGOLIS F.L. Regulation of porphyrin biosynthesis in the harderian gland of inbred mouse strains. **Archives Biochemistry Biophysics**, **145**: 373-381, 1971.

MINUCCI S., CHIEFFI B.G., CHIEFFI G. A sexual dimorphism of the harderian gland of the toad, *Bufo viridis*. **Basic and Applied Histochemistry** **33**: 299 – 310, 1989.

MONTGOMERY R.D., MASLIN W.R. A comparison of the gland of harder response and head-associated lymphoid tissue (HALT) morphology in chicken and turkeys. **Avian Disease** (36): 755-759, 1992.

NICOLA, J.H., REIS, E.R., NICOLA, E.M.D., METZE, K., MESQUITA, R.C. Efeito fotodinâmico em glândula harderiana de ratos *Wistar*. **Revista da Sociedade Brasileira de Laser**. **1**(4): 21-23, 2001.

PANG S.F., YU S., SUEM H.C., BROWN G.M. Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm., **Journal. Endocrinology**, **87**: 89-93, 1980.

PAULE WJ. The comparative histochemistry of the Harderian gland. Dissertation, Ohio State University Columbus, Ohio.- In CHIEFFI, G, BACARI, CG; DI MATEO, L. ;D'ISTRIA, M.; MINUCCI, S. VARRIALE, B. Cell biology of the harderian gland intern. **Review of Cytology**, **168**1957: 1-80,1996.

PAYNE AP, MC GADEY J, MOORE MR, THOMPSON GG. Androgenic control of the harderian gland in the male golden hamster. **Journal of Endocrinology**, **72**: 41, 1977.

PAYNE AP, MC GADEY J, JOHNSTON HS. The structure of the Harderian gland of the golden hamster. In Harderian gland effects (Ed. S. M. Weeb; R. A. Hoffman; Puig-Domingo & R. J. Reiter) pp **53-67**, **Berlin Springer**, 1985. - In Payne, AP. The harderian gland: atercentual review. **Journal. Anatomical**, **185**: 1-49,1994.

PAYNE AP. The harderian gland: a tercentennial review. **Journal. Anatom.**,**185**: 1-49, 1994.

PÉVET P, BALEMANS MGM, LEGERSTEE W, VIVIEN-ROELS B. Circadian rhythmicity of the activit of hydroxindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina and harderian gland of the golden hamster. **Journal. Neural Transm.**, **49**: 229-245, 1980.

REIS, E.R. NICOLA, E.M.D., METZE, K., NICOLA, J.H. "Photodynamic effect produced by HeNe radiation in Harderian glands of Wistar rats: an experimental model for PDT studies". In laser-tissue interaction XI: Photochemical, photothermal, and photomechanica, DONALD D. DUNCAN; JEFFREY O. HOLLINGER; STEVEN L. JACQUES, Editors, Proceedings of SPIE: 3914, 40-45, 2000.

RODRIGUES-COLUNGA MJ, RODRIGUES C, ANTOLIN I., URÍA H., TOLIVIA D., VAUGHAN MK, MENÉNDEZ-PELAEZ, A. Development and androgen regulation of the secretory cells types of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland. **Cell tissue Res.**, **274**: 189-197, 1993.

SAKAI T, YOHRO T. A histological study of the harderian gland of Mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. **Anatomical Record**, **100**: 259-270, 1981.

SAKAY, T. Comparative anatomy of the mammalian Harderian glands. In Harderian glands: Porphyrin metabolism, Behavioral and endocrine effects (ed S.M.WEBB, R.A. HOFFMAN, M. L. PUIG-DOMINGO AND R. J. REITER). Berlin Springer, 7-23, 1992. In PAYNE, A P. The harderian gland: a tercentual review. **Journal Anatomy** **185**:1-49, 1994.

SEYAMA OY, KASAMA T, YASUGI E, PARK SH, KANO K. Lipids in Harderian glands and their significance. In harderian glands; porphirin metabolism, behavioral and endocrine effects, (Ed. S. M. Weeb, RA. Hoffman Puig-Domingo & R. J. Reiter), pp 195-217 Berlin, Springer 1992. - In Chieffi G, Chieffi BG., Di Matteo L., D'Istria M, Minucci S. and Varriale B. (1997),. Cell biology of the harderian gland. **International Review of Citology**, **168**: 1-80.

SHIRAMA K, HOKANO M. Electron microscopic studies on the maturation of secretory cells in the mouse harderian gland. **Acta Anatomica**, **140**: 304-312, 1991.

SIEBER, F. Phototherapy, photochemoterapy and bone marow transplantation. **J. Hematol.** **2**: 43-62, 1993.

SMITH C.J.D. Gross anatomical and microscopic observations on the orbit and its contents in *Natomys alexis*. **Australian Journal Zoological**, **24**: 479-489,. 1976.

SPIKE, R.C., JOHNSTON, H.S., MCGADEY, J., MOORE, M.R., THOMPSON, G.G., PAYNE, A.P. Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the harderian gland on the female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. **Journal of Anatomy** **142**: 59-72, 1985.

SPIKE, R.C., JOHNSTON, H.S., MCGADEY, J., MOORE, M.R., THOMPSON, G.G., PAYNE, A.P. Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the harderian gland on the female golden hamster. II. The time course of changes after ovariectomy. **Journal of Anatomy** **145**: 67-77, 1986.

SPIKE RC, PAYNE AP, MOORE, MR. The effect of age on the structure and porphyrin synthesis of the harderian gland of the female golden hamster. **Journal Anatomy**, **160**: 157-166, 1988.

SPIKE RC, STEWART SL, MURRAY K, KELLY FM, MAHARAJ JA, PAYNE PA, MOORE MR. Porphirin synthesis in the harderian gland and other tissues of golden hamster during pregnancy and lactation. **Mol. Aspects. Med.** **11**: 151-152, 1990.

Strum JM, Shear CR. Harderian glands in mice: fluorescence, peroxidase activity and fine structure. **Tissue and Cell**, **14**: 135-148, 1982.

THIESSEN D.D. The function of the harderian gland in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. In harderian glands: porphirin metabolism. Behavioral and endocrine effects. (S. M. Webb, R. A. Hoffman, M. L. Perig-Domingo and R. J. Reiter, eds), pp 127-140. Springer-Verlog, Berlin, 1992. In Payne AP. The harderian gland: atercentual review. **Journal Anatomy**, **185**: 1-49,1994.

THOMPSON GG, HORDOVATZI X, MOORE MR, MC GADEY J, PAYNE AP. Sex differences in haen biosynthesis and porphirin content in the harderian gland of the golden hamster. **International Journal of Biochemistry**, **16**: 849-852, 1984.

TOMIO JM, GRISTEIN M. Porphyrin biosynthesis 5. Biosynthesis of protoporphyrin IX in harderian glands. **European Journal of Biochemistry** **6**: 80-83,1968,.

VENABLE JH, GRAFFLIN AL. Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat. **Journal of Mammalogy**, **21**: 66-71, 1940.

WATANABE M. Na autoradiographic biochemical and morphological study of the harderian gland of mouse. **Journal of Morphology**, **163**: 349-365, 1980.

WETTERBERG L, GELLERE, YUWILLER A. Harderian gland: na extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? **Science**, **118**: 416-417, 1970.

WINTERHAGER E, KÜHNEL W. Membrane specialisations of the cells of the harderian gland of the rabbit with particular reference to the mecanism of exocytosis. **Cell Tissue Res.**, **231**: 623-636,1983.

WOODING F.B.P. Lipid droplet secretion by the rabbit harderian gland. **J. Ultrastruct. Res.**, **71**: 68-78, 1980.

WOOLEY GM, WORLEY J. Sexual dimorphism in the harderian gland of the hamster (*Cricetus auratus*). **Anatomical Records**, **118**: 416-4171, 1954.

CAPÍTULO II

PHOTODYNAMIC EFFECT PRODUCED HeNe BY RADIATION IN HARDERIAN GLANDS OF WISTAR RATS: A MODEL FOR PDT STUDIES.

Publicado Proc. Spie 3914, 40-45, 2000

ABSTRACT

In rats, the Harderian Gland secret Protoporphirin IX which is retained at acinar lumina. Since this photosensitizer is important for PDT of malignant tumors, we propose to study this gland as a model to help understanding PDT with endogenous photosensitizers. Twenty Wistar SPF adult rats were submitted to surgical exposure of both Harderian glands, revealing red fluorescence upon UV, characterizing the protoporphirin IX presence. After that, one gland of each pair (one kept as control) was irradiated with an 8mW HeNe (6328 angstrom) for 45 minutes, delivering about 21,6 joules/mm². After 24 hours a group of 10 animals were sacrificed and the glands removed for histological analysis. The remaining animals were subjected to the same procedure but the glands were removed immediately after laser treatment. Histological and fluorescence analysis immediately after laser irradiation showed cell fragmentation with loss of acinar architecture with diffusion of protoporphirin in the cytoplasm of damaged cells, as well as interstitial edema. After 24 hours these alterations were more pronounced with accentuated loss of intraluminal protoporphirin and beginning of leukocytic demarcation of necrotic areas. The innate Harderian glands of rats, exposed to HeNe laser, showed a similar behavior as other pathological tissues under phototherapy.

Keywords: Harderian gland; protoporphyrin IX; PDT; endogenous

1 - INTRODUCTION

Optical absorption, reflection and fluorescence are physical methods capable to characterize different matters, in special biologic tissue¹. Particularly Photodynamic Therapy of malignant tumors (PDT) is an optical process either for diagnostic procedure² or for therapy³. PDT is well described in the literature (see for example Dougherty, 1993)⁴. Photosensitizers like protoporphirin IX, among others structurally related compounds, is a substance that can be injected in the subject allowing the diagnostic or treatment of malignant tissue^{5, 6}. A more recent approach to PDT involves endogenous photosensitization by administration of 5-aminolevulinic acid (ALA)^{7, 8}, which is converted by the heme biosynthesis pathway to protoporphyrin IX⁵, an efficient photosensitizer.

Some biologic tissues present endogenous substances that may fluoresce or absorb optical radiation in a similar way to PDT process. Harderian gland, named after the Swiss physician Johann Jakob Harder,^{9, 10} of rats can sintetize high concentration of protoporphirin IX¹¹. This substance is retained at the lumen of the acinos¹² and is easily identified by UV fluorescence, readily differentiated from blood.

Various physiological functions have been attributed to the rat Harderian gland. It appears to serve, like the pineal gland, as an extraretinal photoreceptor^{10, 13, 14, 15, 16, 17, 18}. Harderian porphyrin may have a photoprotective role, as it is increasingly secreted in response to light exposure and as other porphyrins show an intense absorption of light⁵.

The Harderian gland acinus cell secrets protoporphirin IX in a considerable quantity, this photosensitiser is abundant found in the acinar luminae as well as in the acinar cells, which can be identified by fluorescence or by the frozen cuts under fluorescence microscopy.

Many attempts are doing to explain the PDT mechanism^{19, 20} and, based on the facts described above we hope the study of photodynamic response of Harderian gland secretion, may contribute to this development.

2 - MATERIAL AND METHODS

For this work we have used 20 SPF (Specific Pathogen Free) Wistar rats of both sex, 7 weeks old and body mass from 150 to 200 g. The animals was maintained in polypropylene cages and had access to standard rodent show and water *ad libitum*. The anesthetic procedures were developed according to ethical international protocols, with intravenous sodium hypinol. The glands were exposed by means of microsurgery (Figure 01).

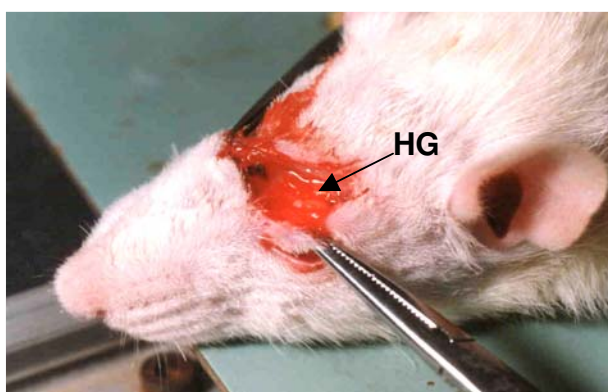


Fig. 01 - Harderian gland (HG) of Wistar rat, surgically exposed and prepared for the present work.

The fluorescence of Harderian gland was produced using a 20 Watts UV lamp with maximum output at 365 nm, positioned 5 cm away from the gland and, the intense red fluorescence was compared with the protoporphirin IX fluorescence and registered photographically. Figure 02(a) shows the Harderian gland photographed with regular light and, (b), the same gland when illuminated with UV light, showing its red fluorescence.

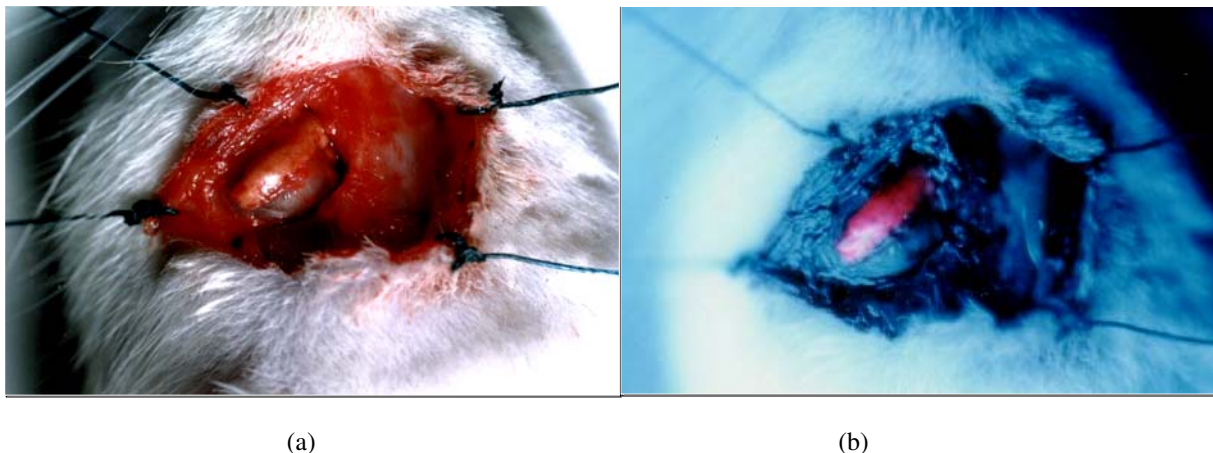


Fig. 02 – Harderian gland: (a) as seen when illuminated by white light and, (b) fluorescence of the same gland obtained with 365 nm light source.

An HeNe, 8 mW, was the light source used for the absorption process. The red, 6328 angstrom light, emitted by this laser, is in good agreement with the absorption energy level of the protoporphyrin found in the glands. Left and right side glands of each animal were exposed, allowing to keep one gland of each pair as a non irradiate control to be compared with the irradiated one.

We irradiated the glands under study for 45 minutes, providing a fluence of 21.6 J/mm^2 . Four groups of five animals were sorted. The rats of first group were sacrificed and the glands were excised 72 hours after laser irradiation; the second group at 48 hours; the third group at 24 hours and the fourth group of rats, immediately after laser irradiation.

For regular microscopy we have fixed the material in buffered 4 % formaldehyde for 24 h and embedded in paraffin. Step sections perpendicular to the surface were cut, mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin for examination by light microscopy. For fluorescence microscopy studies the tissue was frozen, hematoxylin and eosin-stained as well as unstained, and cut to 5 microns and mounted in glass slides. The photos presented in this work were all taken from frozen cuts.

3 - RESULTS AND DISCUSSION

Before proceeding with the photodynamic experiments we have identified the occurrence of protoporphirin IX by fluorescence experiment, using an UV lamp (365 nm line output). The Harderian gland displays the characteristic protoporphirin IX red fluorescence as registered photographically (Fig. 2a). The full spectrum of this fluorescence will be registered and published in the near future. The microscopic analysis of the material identifies the tubules of the normal rat Harderian gland, composed of a single layer of columnar epithelial cells surrounded by myoepithelial cells (figure 3a, b). In the lumina there are deposits of yellow brown amorphous masses (3a), which show the red fluorescence of porphyrin and are composed of porphyrin-lipid complexes (3b).

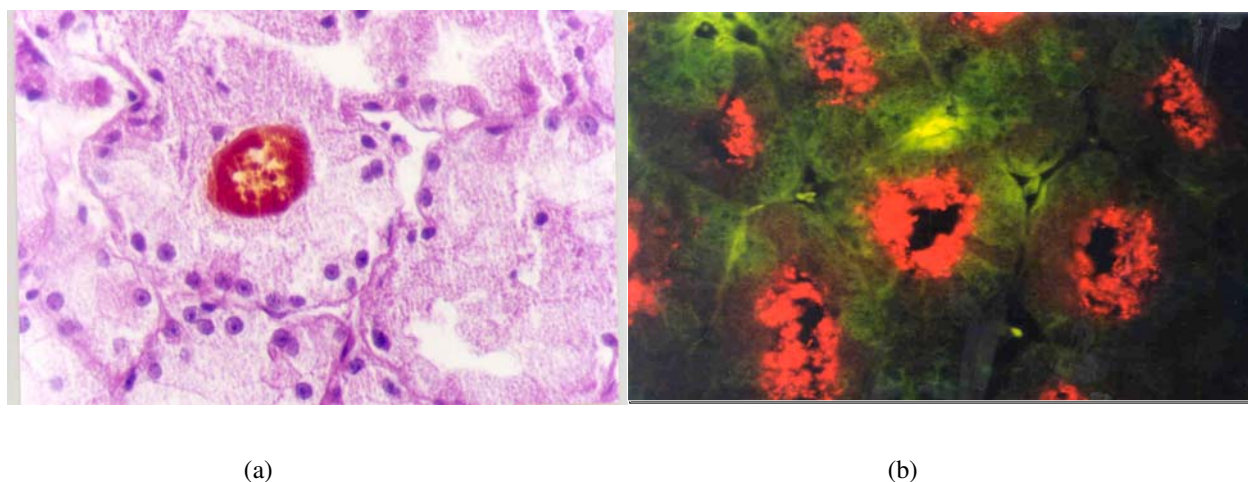


Fig. 03 - Normal (control) Harderian gland epithelial cells of the tubuli composed of epithelial cells (3a) which shows yellow - green autofluorescence of the cytoplasm under fluorescence light examination (b). Amorphous porphyrinlipid complexes are found inside the lumina (3a) with red autofluorescence (3b). (Obj. 40x)

Immediately after exposure to laser light, necrosis of the tubular cells characterized by fragments of the epithelial cells (Fig. 4a and 4b – next page) admixed with porphyrinlipid complexes, can be observed (figure 4 b). The basement membrane of the tubuli may still be intact.

After 24 hours a marked interstitial edema with granulocytic infiltration in the previously irradiated area is found. The fragmentation of the necrotic epithelial cells is more advanced. (Fig. 5a) Remnants of the porphyrin-lipid complexes can only rarely be detected by fluorescence microscopy in the area of necrosis (figure 5b).

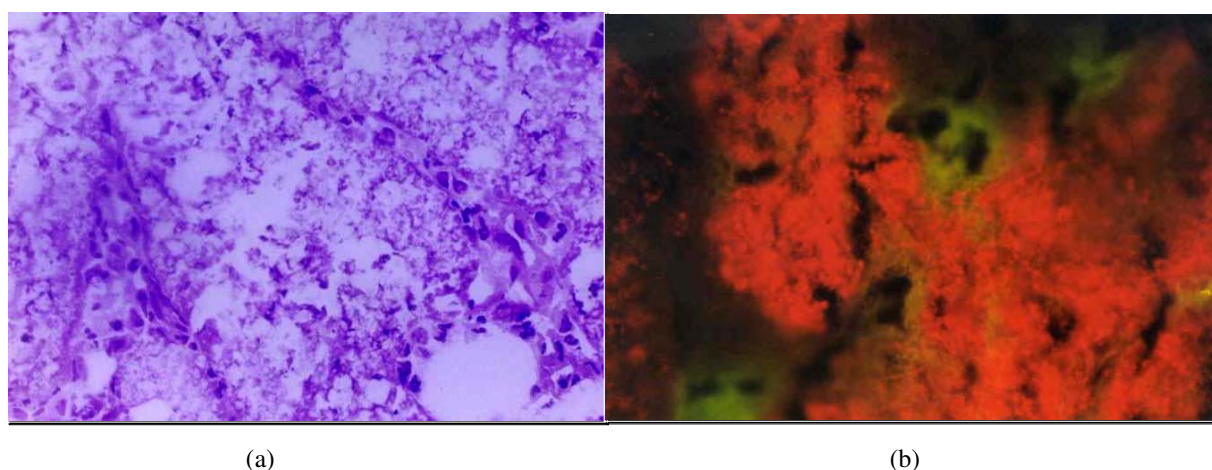


Fig. 04 - Harderian gland removed immediately after exposure to laser light: necrosis with fragmentation of the tubular epithelial cells is the predominant feature. (4a) (Obj. 20x) Examination with UV light shows that the protoporphyrin-lipid complexes (red fluorescence) are mixed together with necrotic cell fragments. Absence of inflammatory infiltrate (4b).(Obj. 40x)

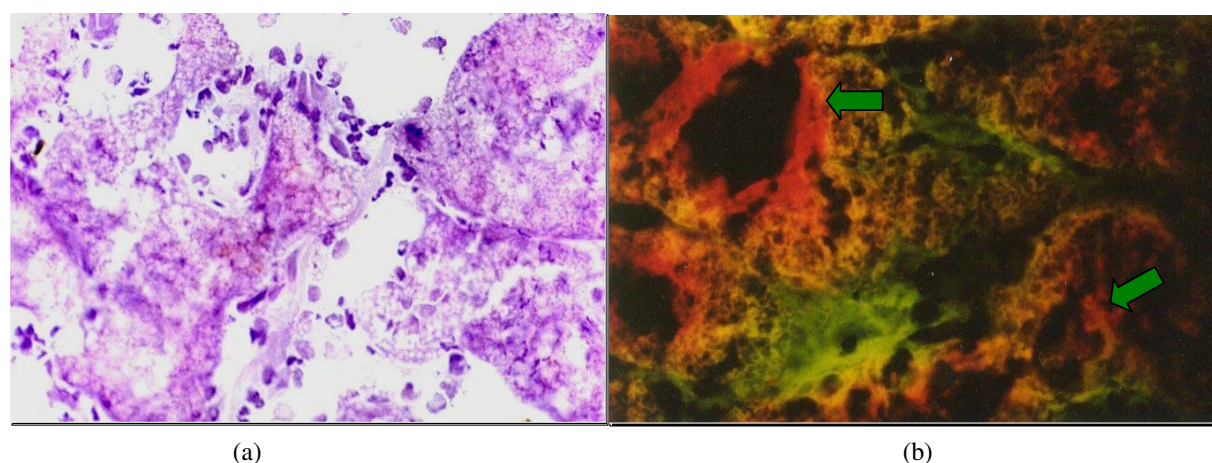


Fig. 05 – Harderian gland tissue 24 hours after laser irradiation: marked cellular fragmentation of the necrotic epithelial cells Porphyrinlipid complexes are nearly totally absent (5a)(Obj. 20x). Marked edema and presence of granulocytes was observed. With the help of UV light remnants of protoporphyrin-lipid-complexes can only be rarely detected (arrows) (5b)(Obj. 40x).

The contralateral sham-operated Harderian glands, kept as control, showed neither necrosis nor inflammatory infiltrate (figure not presented).

Previously studies demonstrated that exposure to intensive sun light for one day may cause severe necrosis of the glandular cells, with edema and cellular infiltration of the Harderian gland adjacent to the retina. The red fluorescence was faint in areas injured by exposure to light for 4 and 8 days, and porphyrin content of the gland decreased after 4 and 8 days. Thus exposure to high-intensity light induced necrosis of the glandular cells in the Harderian glands, probably as a result of photodynamic action on the porphyrins in the gland.

In order to contribute to the knowledge of the photodynamic mechanism we have studied the effect of HeNe laser on endogenous protoporphyrin IX of Harderian gland. The process of necrosis has to be interpreted as due to a photodynamic effect. Damage caused by porphyrins causes essentially necrosis not apoptosis, as seen in our study, in contrast to the photodynamic therapy of the Walker tumor²².

4 - CONCLUSIONS

The Harderian glands of rats present an intense red fluorescence which can be easily perceived by stimulation with ultra violet lamp, or in frozen cuts under fluorescence microscopy. This fluorescence is due to a photosensible substance with a red emission (630 – 635 nm) which has been identified as protoporphirin IX.

When irradiated with an HeNe laser source (6328 angstroms), the gland presented a photodestruction effect very similar to the one found in tumor tissue treated with ALA, which leads to protoporphirin IX formation and retention in tumor cells.

Thus the Harderian gland, through its intense production and retention of protoporphirin IX represents a very good and easy to handle model for the study of photodynamic effects that result in cell destruction.

5 - ACKNOWLEDGEMENT

Special thanks to Dr. Valdir C. Colussi for helping in early stages of this work.

6 - REFERENCES

1. A. P. Payne, J. Mc Gadey, and H. S. Johnston. "The structure of the Harderian gland of the golden hamster. In Harderian gland effects", (Ed. Weeb S. M., Hoffman R. A., Puig-Domingo & R. J. Reiter) pp 53-67, Berlin Springer, 1992
2. O. Raab, "Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria". *J. Biol.*, **39**: pp 524, 1900
3. H. Tappenier. & A. Jesionek, "Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen". *Muench. Med. Wochenschr.*, **1**: pp 2042-2044, 1903
4. T. J. Dougherty, "Photodynamic therapy: Yearly Review", *Photochem. Photobiol.*, **58** (6), pp 895-900, (1993)
5. C. J. Bayne, L. V. Marshall, and A. D. Ward, "The composition of Photoporphyrin II", *J. Photochem. Photobiol.*, **6**, pp 13-27, 1990
6. V. C. Colussi, E. D. Nicola, and J. H. Nicola, "Fototerapia, Fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores", *Rev. Ass. Med. Brasil*, **42** (4), pp 229-236, 1996
7. E. E. Gallegos, I. De Leon Rodrigues, G. L. Martinez, and Z. A. J. Perez, "In vitro study of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix". *Arch. Med. Res.*, **30** (3), pp 163-170, 1999.
8. S. L. Gibson, M. L. Nguyen, J. J. Havens, Barbarin, and R. Hilf, "Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells in vitro", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, nov. **19**, 265(2), pp 315-321, 1999.

9. T Sakai; T. Yohro, "A histological study of the Harderian gland of Mongolian gerbils", Sakai and R. B. Burns (1992), "The Harderian gland in birds: histology and immunology. In the Harderian glands: Porphirin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects", (Ed. S. M. Webb, R. A. Hoffman, M. L. Puig-Domindo & R. J. Reiter), pp 155-163, Berlin Springer, 1981
10. G. Chieffi, B. G. Chieffi, L Di Matteo, M D'Istria, S Minucci, and B Varriale, "Cell Biology of the Harderian Gland", *International Review of Cytology*, **168**, pp 1-80, 1997
11. R. C. Spike, S. L. Stewart., K Murray., F. M. Kelly, J. A. Maharaj, P. A. Payne, and M. R Moore, "Porphirin synthesis in the Harderian gland and other tissues of golden hamster during pregnancy and lactation", *Mol. Aspects. Med.* **11** pp 151-152, 1990
12. J. Hugo, J. Krijt, M. Vokurka, and V. Janousek., "Secretory response to light in rat Harderian gland: Possible photoprotective role of Harderian porphyrin", *Gen. Physiol. Biophys.* **6**, pp 401-404, 1987
13. T. R Scott, M. L. Savage. and I. Oláh, "Plasma cells of the chicken Harderian gland", *Poult. Sci.*, **72**, pp 1273-1279, 1993
14. S Minucci., B. G Chieffi, I. Di Mateo, and G. Chieffi, "A sexual dimorphism of the Harderian gland of the toad, *Bufo viridis*", *Basic. Appl. Histochem.*, **33**, 299-310, 1989
15. B. G. Chieffi, S Minucci, L. Di Mateo, "The orbital glands of the terrapin *Pseudemys scripta* in response in osmotic stress: a light and electron microscope study", *J. of Anatomy*, **18**, pp 21-33, 1993
16. B. Chieffi "Organogenesis of the Harderian Gland. A comparative survey", *Microsc. Res. Tech.*, **34**, 6-15, 1996
17. P. Pevet, G. Heth, A. Hiamand, E. Nevo, "Photoperiod perception in the blind male rat (*Sphalex Chenbergi*, Mehring): Involvement of the Harderian gland atrophied eyes and melatonin", *J. Exp. Zool.*, **232**, 41-50, 1984

18. D. D. Thiessen, The function of the Harderian gland in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. In *Harderian glands: Porphirin metabolism. Behavioral and endocrine effects*. (S. M. Webb, R. A. Hoffman, M. L. Perig-Domingo and R. J. Reiter, eds), pp 127-140. *Springer-Verlag, Berlin*, 1992
19. K.R. Weishaupt, C.J. Gomer and T.J. Dougherty, "Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in cancer photoinactivation of a murine tumor", *Cancer Res* **36**, pp 2326-2329, 1976
20. B.W. Henderson and T.J. Dougherty, "How does photodynamic therapy work?", *Photochem Photobiol* **55**, pp 145-157, 1992
21. K. Kurisu, O. Sawamoto, .H Watanabe and A. Ito, "Sequential changes in the Harderian gland of rats exposed to high intensity light" .*Lab Anim Sci* **46** (1):71-6, 1996
22. J. H. Nicola, V. C. Colussi, E. M. D. Nicola, and K. Metze, "Enhancement of Photodynamic Therapy due to Hyperbaric Hyperoxia: an experimental study of Walker 256 tumors in rats". - *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy VI*, Thomas J. Dougherty; Ed. Vol. **2972**, pp 88 - 94 1997.

Mailing address

e-mail: jhnicola@fcm.unicamp.br

CAPÍTULO III

CONSTRUCTING AND EVALUATING A NON-LASER OPTICAL SYSTEM FOR PHOTODYNAMIC PROCESS EXCITATION

Trabalho em fase de revisão final para submissão à periódico
especializado Internacional.

ABSTRACT

Using a 500 W tungsten lamp and optical filters, it has been developed a non-laser light source that can be used to produce photodynamic effect via porphyrin. Light source emission is centered around (636 ± 9) nm, giving a power density of 11.3 mW/cm^2 . Photodynamic effect produced by the equipment was studied in a Harderian glands of Wistar rats model. Twenty rats were used for the experiment. Each animal had its two Harderian gland surgically exposed, so one of them was treated with the system while the other was kept as control. After a 30 minutes period of treatment, the animals were sacrificed and their glands were removed for histological analysis. Results from this analysis showed a photo destruction similar to that produced by HeNe laser, in a situation of same energy doses.

1 - INTRODUCTION

First information about photodynamic applied to cancer therapy dates from the seventies. Since then, many patients with certain malignant tumors have been treated with Photodynamic Therapy (PDT), presenting results that justify its efficiency^[1-3].

Photodynamic process is obtained by light action on a photoactive substance, which in the presence of oxygen causes the destruction of the hostess cell. This technique has increased its use in cancer treatment, and there is a sequence of physical, chemical and biological effects.

Molecular oxygen can exist in two possible states: singlet ($^1\text{O}_2$) and triplet ($^3\text{O}_2$). The latter is the fundamental and stable state of the molecule, and is mostly found in any cell. Chemically, singlet oxygen is more reactive than triplet oxygen, forming new compounds and releasing energy. Transition from the fundamental state of the oxygen into singlet state results in a destruction of the hostess cell by oxidation of its constituents. This transition corresponds to the absorption of a 632 nm photon, and is not allowed to occur by direct absorption, according to conservation laws of physics (spin and angular momentum conservation). It is possible to do this transition only by non-radiative energy absorption (Fermi resonance).

Some substances, like Hematoporphyrin derivative (HpD), can absorb 632 nm photons directly. These molecules, known as photosensitizer, when near to a $^3\text{O}_2$ molecule, intermediate the oxygen excitation process. In fact, these substances can absorb the photon directly and transfer its energy to oxygen^[4-5].

In the specific case of PDT, the photosensitizer is injected in the patient and is kept inside cancer cells for a time longer than in normal cells. So, the photon absorption and the consequent energy transfer to oxygen will occurs only inside cancer cells, as explained above.

In the Harderian gland model^[6-8], for photodynamic studies, the presence of endogenous protoporphyrin IX eliminates the need of photosensitizer injection^[9].

For activating the photosensitizer substances in photodynamic process, it is necessary to use light in the resonant frequency with the optical absorption level of the substance. Generally, lasers are the most useful equipment in this process, thank to their very high collimation and power density, joined with their excellent monochromaticity. Fast laser development and their prices decreasing discourage the use of lamps for PDT. There are few works that present common light sources for activating photodynamic process^[10-11]. However, there are doubts about economic advantages of lasers, principally when PDT is used for superficial cancer or experimental situations.

2 - OPTICAL SYSTEM CONSTRUCTION

With a commercial 500 W tungsten lamp, optical filters and lenses, it has been projected and developed a non-laser light source as sketched in figure 01 and photographically showed in figure 02.

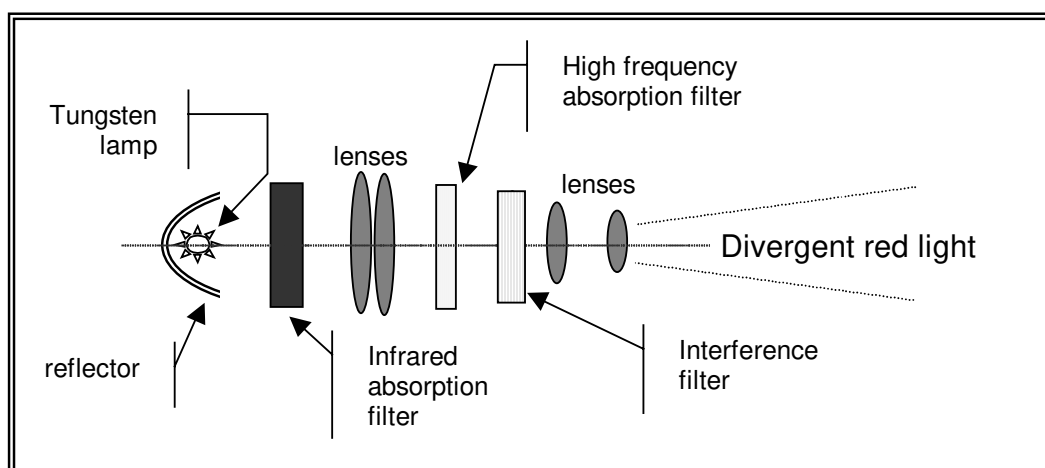


Figure 01 – Schematic developed system. All the components are explained in the text.

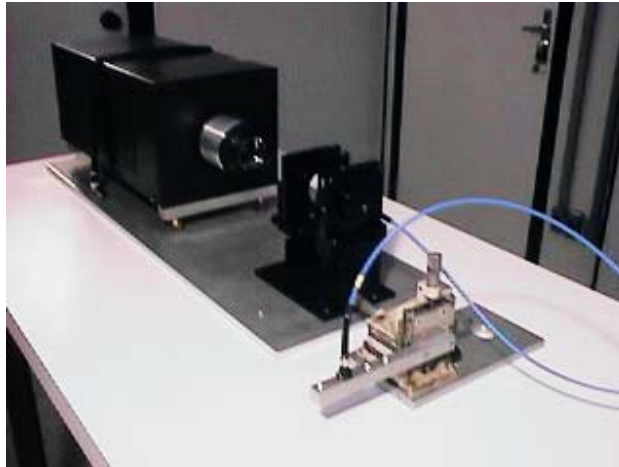


Figure 02 – Illustration of the developed optical system. Note that in this picture the system includes an optical fiber for special applications, not described in this work.

The emission spectrum of the tungsten lamp is shown in figure 3. This spectrum shows that the light source of the system emits photons from the visible to the near infrared region, in a continuous way.

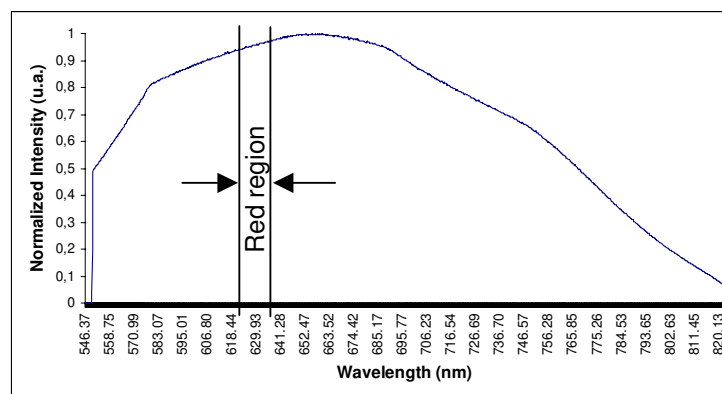


Figure 3 – Emission spectrum of a 500 W tungsten lamp used for constructing the non-laser optical system.

A fraction of light rays emitted from the lamp, is absorbed by the walls or transmitted outside the equipment, causing some losses and converting energy into heat. It was necessary to use micro ventilators in order to cool the developed system. A fraction of

the remaining rays go through the sequence of filters and lenses. For this system, it has been used an infrared absorption filter and an interference filter with 630 nm region band-pass. We have used two more lenses for converging the light beam, besides another absorption filter in blue and near ultraviolet region (high frequency).

Finally, light beam enters into another lens with variable focus in order to collimate it. All system components were fixed with movable supports, in order to permit an optimization of light concentration at the end. The resultant spectrum can be seen in figure 4, and it displays the characteristic gaussian shape of interference filters, centered at 636 nm with a measured width at half height of 18 nm, resulting in a light source of (636 ± 9) nm emission.

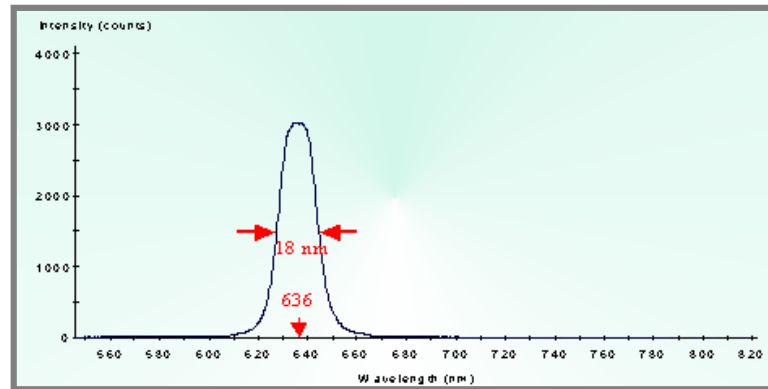


Figure 4 – Emission spectrum of the output light from the system.

At a distance of 27 cm from the last lens of the equipment, almost all output energy is concentrated in an area of 0.93 cm^2 . At this position, with aid of a power meter, it was possible to establish the output power of the system, which is 10.5 mW, giving a power density of 11.3 mW/cm^2 . Since the system is a non laser light source, the beam can not be focused to small areas so, this is the highest power density achieved by the system.

One important property of laser beam is its high collimation. For instance, a HeNe laser beam can be focused in areas smaller than 0.1 mm^2 , leading to high power densities, even for small lasers. Comparing the final power density of our non laser light source with the achieved power density of a 7 mw (nominal 8 mw) HeNe laser^[4] our

system is in great disadvantage but, for PDT application in larger areas, the non laser system can be preferable. For instance, the power density of the HeNe laser, if the beam is expanded to cover a area of 0.93 cm^2 , is 7.56 mw/cm^2 , which is only 67 % of the power density achieved by our system.

As a consequence, the required time to irradiate tumor areas of 0.93 cm^2 (or even greater), to achieve a fixed fluence with the non laser system, will be 23% smaller than the time required by the mentioned HeNe laser.

3 - EVALUATION OF THE PHOTODYNAMIC EFFECT WITH THE NON LASER ILLUMINATOR SYSTEM

To analyze photodynamic effect produced by the non-laser system, we used the Harderian gland of Wistar rats model^[4]. A group of 20 SPF (Specific Pathogen Free) Wistar rats, all males, 7 weeks old and body mass from 150 to 200 g, has been submitted to an anesthetic procedure according to ethical international protocols, with intravenous sodium hypinol. Each animal had its two Harderian glands surgically exposed by means of microsurgery, so one of them was treated with the system developed while the other was kept as control.

After a 30 minutes period of treatment, giving to the gland an energy density of 20.34 J/cm^2 , the animals were sacrificed according to established bioethics protocols. Both of their glands (control and treated one) have been removed for histological analysis by optical microscopy.

From the literature, fluorescence spectroscopy of Harderian glands show two peaks (635 nm and 710 nm) in the visible range, due to the presence of PpIX^[12-14]. When photodynamic effect is produced, a characteristic fluorescent peak at 675 nm region is also observed, because of the photoproducts formation. In our experiment, we also observed fluorescence spectrum of the glands before and after the treatment, in order to prove the appearance of photoproduct fluorescence peak and consequently, the produced photodynamic process. For this, we used a 20 W UV lamp with maximum output at 365 nm, positioned 5 cm away from the gland, as excitant radiation.

4 - RESULTS

Figures 5 and 6 show histological aspect and fluorescence spectrum of a typical healthy Harderian gland, respectively. This situation was found at the beginning of the experiment on both glands.

Fluorescence spectrum shows two peaks, at 636 nm and 708 nm, as explained above. Histological analysis characterizes a typical acinar pattern arrangement of the tissue, round nuclei, with clearly defined limits. It is possible to identify the tubules of a normal rat Harderian gland, composed of a single layer of columnar epithelial cells.

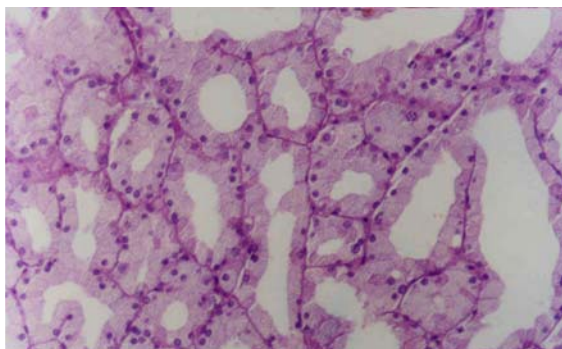


Figure 5 - Photomicrograph of histological section of the Harderian gland kept as control. (Obj. 20x)

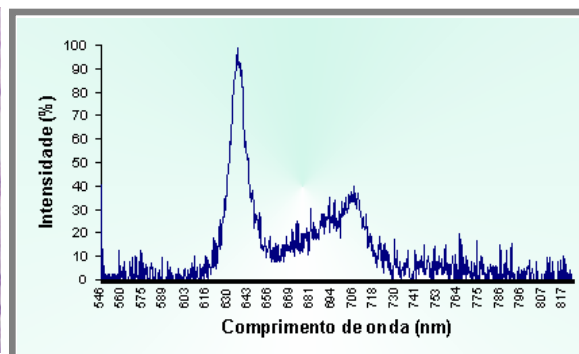


Figure 6 - Fluorescence spectrum of the Harderian gland kept as control.

After a 30 minutes period of treatment with the non laser light source, and immediately after exposure to light, necrosis of the tubular cells characterized by fragments of the epithelial cells can be observed (figure 7) in the treated gland. Fluorescence measurements also show modifications after non laser light exposure in treated Harderian gland (figure 8). The origin of the new fluorescence at 675 nm band is known to be due to formation of fluorescent photoproducts^[14].

The contra lateral operated Harderian gland, kept as control, showed neither necrosis nor inflammatory infiltrate. These standard behavior of both gland have been observed for all animals of the sample.

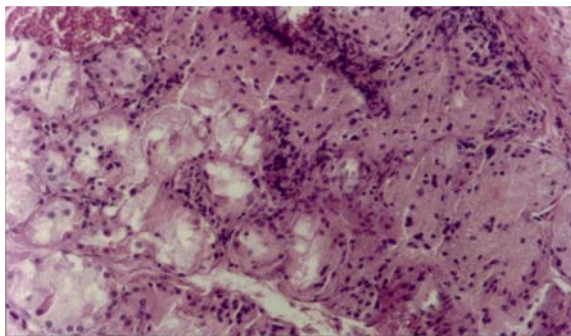


Figure 7 - Photomicrograph of histological section of the treated Harderian gland, after a 30 minutes period. (Obj. 20x)

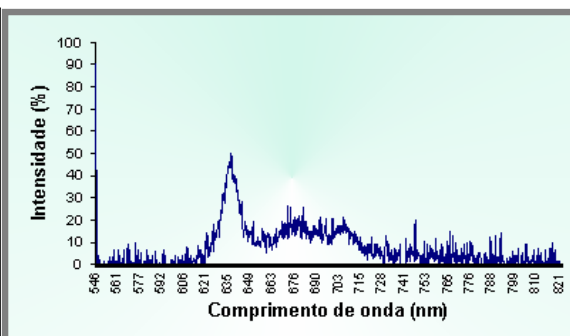


Figure 8 - Fluorescence spectrum of the treated Harderian gland, after a 30 minutes period.

5 - DISCUSSION

Results presented above indicate that the photo destruction effect produced by a non laser light is, as expected, similar to produced by HeNe laser light, for a situation of same energy doses^[9].

The new equipment developed has an effective power density in larger areas (covering surfaces of about 1 cm²), on the contrary of HeNe laser. This is an excellent advance, principally for photodynamic therapy applications in superficial lesions, like skin cancer.

6 - CONCLUSION

The construction of a suitable light source for PDT use, where low fluence is required, is relatively simple. Despite the fact that the light beam from the non laser source can not be focused to the same limits of laser beam, it can be used in situations where large areas of superficial lesions must be covered.

7 - REFERENCES

- [1] SCHUITMAKER, J.J. "Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment fo cancer". **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, **34**: 3-12, 1996.
- [2] DOUGHERTY T. J.. "Photodynamic therapy: yearly review". *Photochem. Photobiol.*, **58** (6), pp. 895-900 1993
- [3] HENDERSON B.W. and DOUGHERTY T.J.. "How does photodynamic therapy work?". *Photochem. Photobiol.*, **55**, pp. 145-157 1992.
- [4] NICOLA, J.H., COLUSSI, V.C., NICOLA, E.M.D., METZE, K., "Enhancement of Photodynamic Therapy due to Hyperbaric Hyperoxia: an experimental study of Walker 256 tumors in rats". - *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy VI*, Thomas J. Dougherty; Ed. **Vol. 2972**: 88 - 94 1997.
- [5] COLUSSI, V.C, NICOLA, E.D, NICOLA, J.H. "Fototerapia, Fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores", **Rev. Ass. Med. Brasil**, **42** (4): 229-236, 1996.
- [6] PAYNE A.P.. "The harderian gland: a tercentennial review". *J. Anat.*: **185**, pp. 1-49 1994.
- [7] CHIEFFI, G., CHIEFFI, B.G., DI MATTEO, L., D'ISTRIA, M., MINUCCI, S., VARRIALE, B. "Cell Biology of the Harderian Glasnd", **International Review of Cytology**, **168**: 1-80, 1996.
- [8] CHIEFFI B.. "Organogenesis of the Harderian gland: a comparative survey". *Microsc. Res. Tech.*, **34**, pp. 6-15 1996.
- [9] REIS, E.R. NICOLA, E.M.D., METZE, K., NICOLA, J.H. "Photodynamic effect produced by HeNe radiation in Harderian glands of Wistar rats: an experimental model for PDT studies". In *laser-tissue interaction XI: Photochemical, photothermal, and photomechanica*, Donald D. Duncan; Jeffrey O. Hollinger; Steven L. Jacques, Editors, *Proceedings of SPIE*: 3914, 40-45, 2000.

- [10] McCAUGHAN J. S., GUY J. T., HAWLEY P., HICKS W., INGLIS, W., LAUFMAN L., MAY E., NIMS T. A., SHERMAN RAND. “ Hematoporphyrin-Derivative and photoradiation therapy of malignant tumors”. **Lasers in Surgery and Medicine**, **3**: 199-209, 1983.
- [11] BEYER W.. “Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy”. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 36, pp. 153-156 1996.
- [12] KÖNIG, K., SCHNECKENBURGER, H., RÜCK, A. ”In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins”. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol**, **18**: 287-290, 1993.
- [13] KLINTBERG C., ENEJDER A M.K., WANG I., ANDERSON-ENGELS S., SVANBERG S., SVANBERG K. “Kinetic fluorescence studies of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in basal cell carcinomas”. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol**, **49**: 120-128, 1999.
- [14] GUDGIN DICKSON E.F. and POTTIER, R.H. “On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy”. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 29, pp. 91-93 1995.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Maria Dionisia for helping in many stages of this work, which is supported by FAPESP and FAEP – UNICAMP.

CAPÍTULO IV

***FOLLOW UP OF THE PHOTODYNAMIC ACTIVITY IN HARDERIAN
GLANDS OF WISTAR RATS BY MONITORING PpIX
PHOTOPRODUCTS.***

Submitted to publication in “Physics in Medicine and Biology”.

ABSTRACT

We hereby present the results of an experimental study on the photodynamic activity of endogenous protoporphyrin IX products in the Harderian glands of Wistar rats. The experiment was conducted on 20 rats and a 632.8 nm wave length of HeNe laser light was utilized for the photo destruction of cells. The follow up consisted of recordings of the fluorescence spectra excited by ultraviolet radiation at 365 nm. Photo destruction was mainly Type I, with light activity degrading the photoactive substance and causing the death of the host cells. This degradation or photobleaching caused a significant alteration in the original fluorescence spectrum. The peak intensities, characteristic of PpIX at 636.2 nm and 705.8 nm, diminished as treatment fluence increased and gave way to a relatively wide peak in the 663.8 – 729.7nm interval, with maximum at 680 nm, of the fluorescence spectrum. A systematic observation of the evolution of the fluorescence spectrum during this experiment, even at very low fluencies, suggests that the Harderian glands provide an excellent experimental model for the study of the photodynamic process.

1 - INTRODUCTION

Photodynamic therapy is a less invasive optical technique that can be used in medicine as an alternative technique in the diagnosis and treatment of several types of malignant and non-malignant lesions. This technique is based on the principle that, adequate wavelengths of light can interact with non-toxic compounds (photosensitizers) previously injected into the organism [Henderson and Dougherty 1992] or even endogens, and produce characteristic diagnostic fluorescence or even activate specific oxygen in the malignant cells, producing effective therapy.

Contributions towards the understanding of the photodynamic mechanism are important in the areas of biology, chemistry, medicine and physics. When the photodynamic process is utilized for diagnosis in medicine, it is known as Photodynamic Diagnosis – PDD, while its therapeutic application is known as Photodynamic Therapy – PDT.

Phototherapy or conventional photodynamic therapy (PDT) is based on the activity of one exogenous photosensitizer present in the region that is being treated (tumoral or dysplastic). This photosensitizer absorbs photons from adequate wavelengths of light, generally laser light, and is able to transfer energy to stable molecules of oxygen (triplet oxygen) that in turn become chemically reactive (singlet oxygen). The immediate chemical reaction of oxygen with pathological tissue components results in the selective destruction of the host tissues [Ferandez *et al* 1997]. Since the eighties, this has been considered a promising technique for the diagnosis and treatment of certain types of tumors.

Some tissues or biological organs present endogenous substances that can absorb optical radiation and become fluorescent, strongly resembling the photodynamic process in exogenous substances. From the viewpoint of physics, there is no difference between the two cases, therefore, studies of the photodynamic process in situations that by-pass the stage of accumulation of strange substances in the organism are definitely desirable as the process becomes easier.

The existence of the “Harderian gland” has been known since 1694, due to the work done by John Jacob Harder [Payne 1994]. This gland, which is found in the majority of terrestrial vertebrate classes, with the exception of equines, bovines, superior primates and man, has several functions [Chieffi *et al* 1997]. It also produces a large variety of secretions according to the class of animals [Payne 1994, Chieffi *et al* 1997]. In rats, the Harderian gland (HG) produces and stores a high concentration of lipids and porphyrins, more precisely protoporphyrin IX (PpIX) [Djeridane 1994].

Recently, aminolevulinic acid (ALA), a precursor of the biosynthesis of hemoglobin, chlorophyll cytochromes, biliary pigments and other porphyrins is being used in phototherapy. In this case, the ALA activates protoporphyrin IX synthesis, increasing the concentration of this macromolecule, so that it enters into the blood stream and ends up fixed to the surface of the tumoral cells [Konig *et al* 1994]. Therefore, PpIX is a photoactive substance that is responsible for photodynamic activity.

Hence, the presence of PpIX in the HG of rats provides an excellent experimental model, easily accessible for photodynamic studies.

2 - MATERIAL

This present study was conducted on 20 Wistar rats, both sexes, Specific Pathogen – Free (SPF), minimum age - seven weeks and body mass between 150 to 200 grams. The animals were maintained under normal environmental and feeding conditions in an animal laboratory. All the procedures that were executed obeyed the international ethics on the management of experimental animals. The anesthetic utilized was Sodium Thiopental 25mg/ml and a dose of 0.3ml/100gr was intravenously injected.

Optical irradiation was obtained using an Helium Neon Laser (HeNe), 8 mW nominal power on the red line, wavelength of $\lambda=632.8$ nm, producing 10 mW/mm² beam power focused on the gland. An ultraviolet lamp (Hg lamp, 20 W, 365 nm) was used for fluorescent excitation. The spectra were recorded with an Ocean Optics PC2000 plug-in spectrometer with optical resolution better than 1.7 nm in the red region.

3 - METHOD

After all the animals were anesthetized with an intravenous injection of 0.3ml/100 grams of Sodium Thiopental, their Harderian glands were surgically exposed and one of them received HeNe laser treatment for 45 minutes maximum. The contra-lateral gland was used as a control and was also kept exposed during the experiment, but did not receive any photodynamic treatment. The fluorescent spectrum, excited by the UV lamp, of the control gland and the gland regions that were being treated of the 20 rats, was recorded at 15 minute intervals (zero, 15, 30 and 45 minutes) utilizing an optical fiber with 400 μm diameter coupled to the plug in spectrometer. Also, photographs were recorded with a Kodacolor ASA 100 film, using both ultraviolet and white light illumination. The animals remained alive during the photodynamic study.

4 - RESULTS

Soon after the surgical exposure of the glands, they were photographed with ambient lighting (Figure 1) and ultraviolet irradiation (Figure 2), which revealed the fluorescence emitted by endogenous protoporphyrin IX.



Figure 1 – Typical photograph of Harderian gland of Wistar rats, surgically exposed, obtained with ambient light (white light) before PDT,.

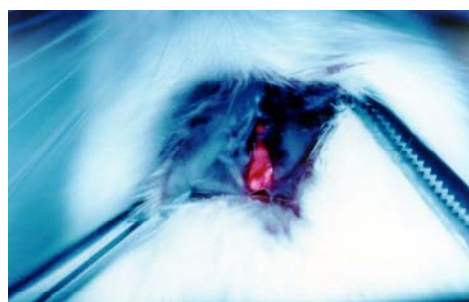


Figure 2 – Typical photograph of Harderian gland of Wistar rats, surgically exposed, obtained with ultraviolet light (365 nm).before PDT

The fluorescence was also recorded by the spectrometer before photodynamic treatment and revealed the two characteristics protoporphyrin IX peaks in the red region (Figure 3), peak “A” having a 636.2 nm wavelength and peak “B” maximum wavelength of 705.8 nm, covering the 663.8 - 729.7 nm interval.

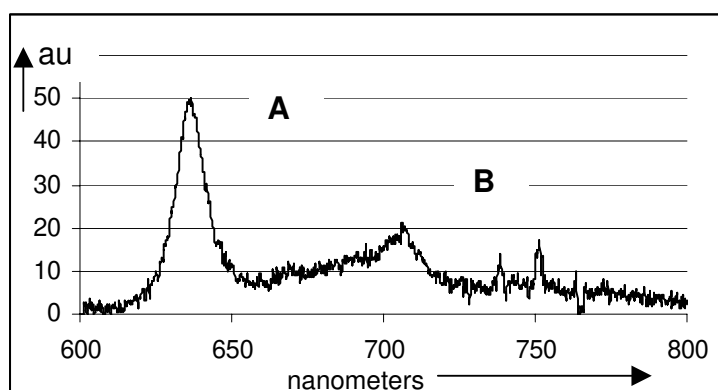


Figure 3 – Typical spectrum of fluorescence of the harderian gland before PDT, excited by ultraviolet light. Peak A at 636.2 nm and peak B at 705.8 nm. (au, means: arbitrary units).

This fluorescent pattern was maintained by all the glands that were analyzed before the treatment.

New photographic as well as fluorescent recordings were taken of the treated and control glands at 15, 30, and 45 minutes after the HeNe laser treatment (corresponding to a fluence of 9, 18 and 27 joules/mm², respectively).

Figure 4 demonstrates conventional photographic recordings of photodynamically treated glands during 45 minutes, while Figure 5 demonstrates ultraviolet illuminated photographic recordings of the same situation.

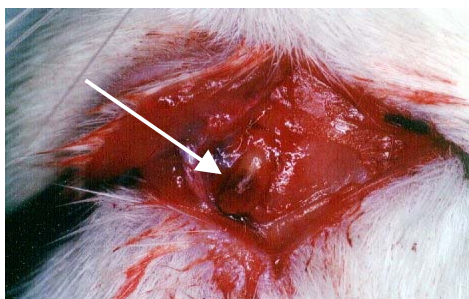


Figure 4 – Harderian gland of Wistar rats surgically exposed, photographed with ambient light (white light) after 45 minutes treatment (27 joules/mm²). Arrow shows damaged area.

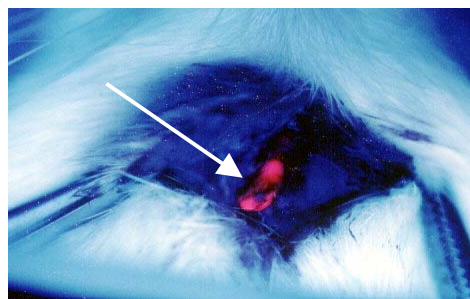


Figure 5 – Harderian gland of Wistar rats surgically exposed, photographed PDT with ultraviolet light (365 nm) after 45 minutes treatment (27 joules/mm²). Arrow shows damaged area.

Figures 6, 7 and 8 display recordings of the ultraviolet fluorescent spectra sequence of treated glands taken at 15, 30 and 45 minutes of treatment, respectively.

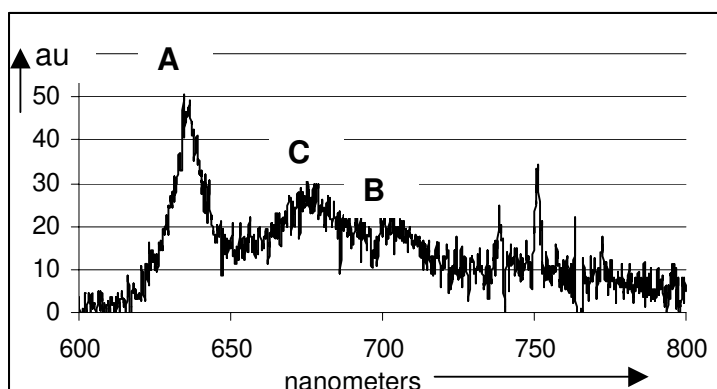


Figure 6 – Recordings of the ultraviolet fluorescence spectra taken after 15 minutes treatment with 632.8 HeNe laser light (fluence 9 joules/mm²). Peak C, at 680 nm, denotes the maximum of the photoproduct fluorescence band. The intensity is in arbitrary units. (au, means: arbitrary units).

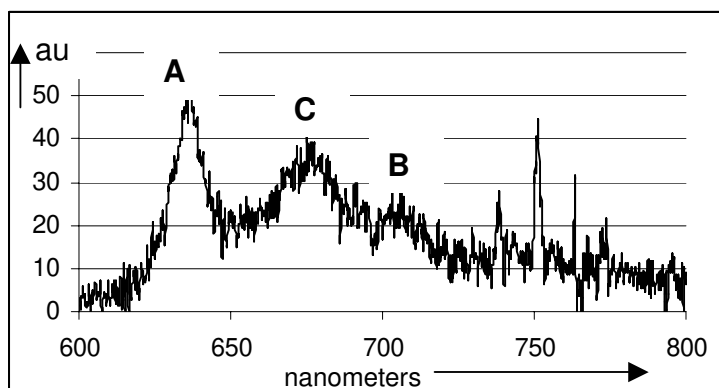


Figure 7 – Recordings of the ultraviolet fluorescence spectra taken after 30 minutes treatment with 632.8 HeNe laser light (fluence 18 joules/mm²). Peak C, at 680 nm, denotes the maximum of the photoproduct fluorescence band. The intensity is in arbitrary units. (au, means: arbitrary units).

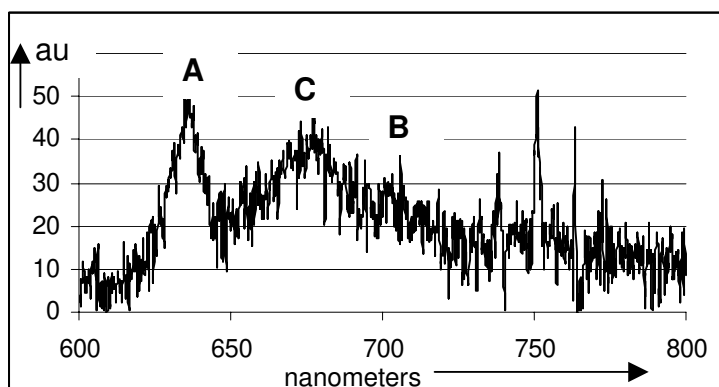


Figure 8 – Recordings of the ultraviolet fluorescence spectra taken after 45 minutes treatment with 632.8 HeNe laser light (fluence 27 joules/mm²). Peak C, at 680 nm, denotes the maximum of the photoproduct fluorescence band. The intensity is in arbitrary units. (au, means: arbitrary units).

5 - DISCUSSION

The optical and photochemical processes begin when the sensitizer absorbs a photon and, consequently, one of its electrons passes to an energetically higher orbital state with no spin alteration, resulting in a triplet excited state. These triplet states have a short life time (from 1 to 100 micro seconds) [Moan 1990, Fernandez *et al* 1997]. Some of the excited electrons return almost immediately to their fundamental energy state in the form of

heat, vibration relaxation or light emission (fluorescence). The remaining electrons may undergo spin inversion to the singlet state with two unmatched electrons. Sensitizers excited to a triplet state have a long life time which increases the probability of collision with other molecules, such as oxygen, while they are still in an excited state, thereby transferring energy to the latter. In this case, if oxygen is involved, the resulting $^1\text{O}_2$ species (excited oxygen) is extremely reactive to biological systems and interacts with proteins, lipids and other biological molecules, causing cell death. In general, it is assumed that this pathway, known as type II reaction, occurs with photosensitizers such as Hematoporphyrin derivative (HpD) and is characterized by the preservation of the photosensitizing molecules that only act as agent capable to transfer non radiative energy to triplet oxygen.

Another photodynamic pathway, designated type I, is characterized by the process of photobleaching the photosensitizer, which transforms the molecular structure by the action of light. This, in consequence, causes the destruction of the host cells, which are the malignant cells in photodynamic therapy.

A follow up of the treated region was performed with the naked eye and photographic records taken at convenient moments. After 15 minutes of HeNe laser application, tissue reaction, indicated by a darkened tissue, could be observed, being more pronounced at 45 minutes laser application (Figures 4 and 5).

Rotomskis and collaborators [Rotomskis *et al* 1996.] described the possible formation of two chlorine-type protoporphyrin photoproducts during the photodynamic process. According to this author, these photoproducts are due to a reduction in the double bond of two different isomers formed by the action of light on protoporphyrin IX. As these are differentiated molecules of the original PpIX, their fluorescent spectra are expected to differ and, therefore, behave as photodynamic fluorescent markers.

The spectra sequence obtained at 15, 30 and 45 minutes (Figure 6) revealed the appearance of a fluorescent band picked (C) at 680 nm, while the spectra of the untreated regions continued with the initial characteristics of PpIX. The characteristic PpIX peaks (A, at 636.2 nm and B at 705.8nm) in the treated regions of these spectra, diminished with the use of higher fluence.

Table I shows the mean values and standard deviations for the intensity ratios between maximums at C and A, for the different fluences used in the experiment, calculated from the data obtained with the 20 rats used (Appendix). This data can be used as a quantitative follow up of the PDT when the treatment involves PpIX.

Table 1 – Estimated mean values of the ratios between fluorescence maximums at C (I_C) and A (I_A), for the different fluences used in the experiment. The calculation was performed after subtract the spectra background.

Time (minutes)	Fluence (joule/mm ²)	I_C/I_A (mean)	Standard deviation
Zero	zero	zero	
15	9	0.38	0.10
30	18	0.51	0.10
45	27	0.63	0.17

6 - CONCLUSION

Photodynamic therapy is a process that acts against carcinogenic tumors and has clearly demonstrated its clinical importance in the retardation of malignant cell growth as well as its complete eradication. This present study demonstrates the existence in nature of an endogenous model, the Harderian glands in rats, easily accessible for conducting experimental studies on this process.

Follow up the optical fluorescence of a harderian gland, during photodynamic treatment, highlighted the photo destruction of the gland tissue at low fluencies, and demonstrated that when systematically utilized, the fluorescence technique is adequate for a semi-quantitative analysis of the effectiveness of the therapeutic activity of light on PpIX photosensitizer.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank FAEP/UNICAMP and FAPESP for the financial support granted to this project and Valeria Lobo for the English version of this study.

REFERENCES

- CHIEFFI G, CHIEFFI, B G, DI MATTEO L, D'ISTRIA M, MINUCCI S. AND VARRIALE B. 1997. *Cell Biology of the Harderian Gland. International Review of Cytology*, **168**: 1-80.
- DJERIDANE Y 1994 The harderian gland and its excretory duct in the Wistar rat. A histological and ultrastructural study. *J. Anatomic*, **184**: 553 – 566.
- FERANDEZ J M, BILGIM M D AND GROSSWEINER L I 1997 Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **37**: 131 – 140.
- HENDERSON B W, DOUGHERTY TJ 1992 How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*, **55 (1)**: 145-157.
- KÖNIG K, KIENLE A, BOEHNCKE W H, KAUFMANN R, RÜCK A, MEIER T AND STEINER R. 1994 Photodynamic tumor therapy and on-line fluorescence spectroscopy after ALA administration using 633-nm light as therapeutic and fluorescence excitation radiation. *Optical Engineering*, **33 (9)**: 2945 – 2952.
- PAYNE A P 1994 The harderian gland: a tercentennial review. *J. Anat.*, **185**: 1– 49.
- ROTOMMSKIS R, BAGDONAS S AND STRECKYTE G 1996 Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **33**: 61 – 67.
- REIS E R, NICOLA E M D, METZE K AND NICOLA J H 2000 Photodynamic effect produced by HeNe radiation in Harderian glands of Wistar rats: an experimental model for PDT studies *Proc. SPIE* **3914**: 40–45.
- MOAN J 1990 On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissue *J Photochem Photobiol.*, **B 6**: 343-344.

APPENDIX

Ratio between fluorescence intensities at maximums “C” and “A” measured for the animals (1 to 20) and for the 3 different fluences (or time) used in the experiment.

15 minutes	
rat #	IC/IA
1	0.39
2	0.37
3	0.37
4	0.38
5	0.36
6	0.39
7	0.36
8	0.40
9	0.39
10	0.38
11	0.40
12	0.37
13	0.39
14	0.38
15	0.39
16	0.38
17	0.37
18	0.40
19	0.38
20	0.36

Mean	0.38
Standard deviation	0.10

30 minutes	
rat #	IC/IA
1	0.49
2	0.52
3	0.50
4	0.53
5	0.52
6	0.49
7	0.49
8	0.52
9	0.49
10	0.49
11	0.49
12	0.52
13	0.52
14	0.50
15	0.53
16	0.51
17	0.50
18	0.52
19	0.52
20	0.50

Mean	0.51
Standard deviation	0.10

45 minutes	
rat #	IC/IA
1	0.64
2	0.63
3	0.62
4	0.61
5	0.63
6	0.66
7	0.64
8	0.65
9	0.61
10	0.64
11	0.60
12	0.60
13	0.64
14	0.64
15	0.61
16	0.60
17	0.66
18	0.61
19	0.60
20	0.64

Mean	0.63
Standard deviation	0.17



CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES:

O tecido da glândula harderiana de ratos Wistar, por produzir e armazenar intracelularmente o fluoróforo protoporfirina IX, comporta-se frente à luz vermelha de comprimento de onda em torno de 630 nm, de forma análoga a tecidos hospedeiros de PpIX endógena ou exógena, como ocorre em PDT com derivado de Hematoporfirina (HpD). Constitui-se, assim, em candidato natural como modelo facilitador de estudos de efeitos fotodinâmicos, permitindo as seguintes conclusões específicas:

- A revisão da literatura relativa à glândula harderiana, que faz parte do presente trabalho, mostrou que existem elementos perfeitamente estabelecidos que são indicadores de que tal glândula produz e armazena substância fotoativa, representando um modelo útil para estudos de efeitos fotodinâmicos, em tecidos vivos.
- A disposição anatômica e as dimensões das glândulas harderianas de ratos Wistar se mostram propícias para exposição cirúrgica, com mínimo dano ao animal de experimentação que, sob ação anestésica, permanece vivo, permitindo estudos, tipo dose – efeito, de ação fotodinâmica de destruição tecidual, acompanhada por registros de fluorescência.
- O espectro de fluorescência da glândula harderiana corresponde ao espectro de fluorescência conhecido da protoporfirina IX.
- O sistema de iluminação não-laser, desenvolvido pelo grupo de trabalho, emite luz vermelha centrada em 630 nanômetros com densidade de potência suficiente para provocar efeito fotodinâmico de destruição celular, via PpIX, em glândula harderiana, de forma semelhante àquela produzida por feixe de laser de HeNe, quando espalhado sob superfícies da ordem de 1 cm².
- O espectro de fluorescência da glândula harderiana mostra evolução significativa, em função da fluência de luz vermelha utilizada para produzir efeito fotodinâmico de destruição celular na mesma glândula. O registro da fluorescência pode ser feito simultaneamente com o tratamento fotodinâmico, permitindo o acompanhamento do mesmo.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

AURELI, G. La ghiondola di Harder nel maiale. Ricerche morfologiche ed istochimiche. Revista di Istochimica Normale & Patologica, 3,113-126, 1957 - In Payne A. P. Review The Harderian Gland: A Tercentual Review. **Journal. Anatomical**, **185**: 1-49, 1994.

BALEMANS, M.G.M., PÉVET, P., VAN BENTHEM, J., HALDAR-MIRSA, C., SMITH, I., HENDRIKS, H. Day / night rhythmicity in the methylating capacities for different 5-hidroxyndoles in the pineal, the retina and the Harderian gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) during the annual seasons. **Journal of Neural Transmission**, **56**: 53 – 72, 1983.

BAYNE, C.J, MARSHALLSAY, L.V, WARD, A.D. The composition of Photophrin II, **J. Photochem. Photobiol.**, **6**:13-27, 1990.

BEYER, W.. “Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy”. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, **36**: 153-156, 1996.

BROWNSCHIEDLE, C.M., NIEWENHUIS, R.J. Ultrastructure of the harderian gland in male albin rats. **Anatomical Records**, **190**: 735-754, 1978.

BUBENIK, G.A., BROWN, G.M, GROTA, L.J. Immunohistoshemical Localization of Melatonin in the Rat Harderian Gland. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **24**: 1173-1177, 1976.

BUZZEL, G.R, MENENDEZ-PELAEZ, A, PORKKA-HEISKANEN, T., PANGERL, B., VAUGHAN, M.K, REITER, R.J. Bromocriptine prevents the castration-induced rise in porphyrin concentration in the harderian glands of the male Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. **Journal Experimental Zoology**, **249**: 172-176, 1989.

BUZZEL, G.R., PANGERL, B., MENENDEZ-PELAEZ, A., VAUGHAN, M.K, LITTLE, J.C. Melatonin and porphyrin in the harderian gland of the Syrian hamster: circadian patterns and response to autumnal conditions. **International Journal of Biochemistry**, **22**: 1465-1469, 1990.

CARRIERI, R. Ultrastructural Visualization of Intracelular Porphyrin in the Rat Harderian Gland. **Anatomical Record**, **213**: 496-504, 1985.

CHIEFFI, B. Organogenesis of the Harderian Gland. A comparative survey. **Microsc. Res. Tech.**, **34**: 6-15, 1996.

- CHIEFFI, B.G., MINUCCI, S., DI MATEO, L. The orbital glands of the terrapin *Pseudemys scripta* in response in osmotic stress: a light and electron microscope study, **Journal. of Anatomy**, **18**: 21-33, 1993.
- CHIEFFI, G., CHIEFFI, B.G., DI MATTEO, L., D'ISTRIA, M., MINUCCI, S., VARRIALE, B. "Cell Biology of the Harderian Gland", **International Review of Cytology**, **168**: 1-80, 1996.
- CHRISTENSEN, F., DAM, H. A sexual dimorphism of the harderian gland in hamsters. **Acta Physiol. Scand.** **27**: 333-336, 1952.
- COHN, S.A. Histochemical observations on the harderian gland of the albino mouse. **Journal. Histochemistry. Cytochemistry.**, **3**: 342-353, 1955.
- COLUSSI, V.C, NICOLA, E.D, NICOLA, J.H. Fototerapia, Fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores, **Rev. Ass. Med. Brasil**, **42 (4)**: 229-236, 1996.
- DAVIDHEISER, R.H., FIGGE, F.H.J. Comparison of Porphyrin Producing Enzyme Actives in Harderian Glands of Mice and Other Rodents. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **97**: 775-777, 1955.
- DERRIEN, E., TURCHINI, J. Sur l'accumulation d'une porphyrine dans la glande de Harder des rongeurs d'espèce mus et son mode d'excrétion. **Compte Rendu des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales**. **91**: 637-639, 1924.
- DI MATEO, L., MINUCCI, S., CHIEFFI BACARI, G., PELLICIARI, C., D'ISTYRIA, M., CHIEFFI, G. The harderian gland of the frog, *Rana esculenta*, during the annual cycle: Histology, histochemistry and ultrastructure. **Basic Appl. Histochem.**, **(33)**, 93-112, 1989.
- DJERIDANE, Y., TOUITOU, Y. Melatonin synthesis in the rat harderian gland: age and time related effects. **Exp. Eye Res.**, **72**: 487-492, 2001.
- DJERIDANE, Y., VIVEN-ROELS, B., SIMINNEAUX, V., MIGUEZ, JM., PEVET, P. Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. **J. Pineal Res.**, **25**:54-64, 1998.
- DJERIDANE, Y. The Harderian gland and its excretory duct in the Wistar rat. A histological and ultrastructural study. **J. Anat.** **184**: 553-566, 1994.

- DJERIDANE, Y. The harderian gland of desert rodents: a histological and ultrastructural study. **Journal of Anatomy** **180**: 465-480, 1992.
- DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy: yearly review. **Photochem. Photobiol.**, **58** (6): 895-900, 1993.
- FERANDEZ, J.M., BILGIM, M.D., GROSSWEINER, L.I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, **37**: 131 – 140, 1997.
- GALLEGOS, E.E., DE LEON RODRIGUES, I., MARTINEZ, G.L., PEREZ, Z.A.J., In vitro study of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix. **Arch. Med. Res.**, **30** (3): 163-170, 1999.
- GIBSON, S.L., NGUYEN, M.L., HAVENS, J., BARBARIN, J., HILF, R. Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells in vitro, **Biochem. Biophys Res. Commun.**, nov. **19**, **265**(2): 315-321, 1999.
- GRAFFLIN, A.L. Histological observations upon the porphyrin excreting Harderian gland of the albino rat. **American Journal of Anatomy**, **71**: 43-64, 1942.
- GUDGIN DICKSON, E.F., POTTIER, R.H. On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, **29**: 91-93, 1995.
- GUSMÃO, R.J. **Diagnósticos de neoplasias malignas através da ação fotodinâmica do derivado de hematoporfirina (HpD): Desenvolvimento de um modelo experimental local**. Campinas. 1992. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).
- HARVEY, D.J. Identification by gas chromatography and mass spectrometry of lipids from the rat Harderian gland. **J. Chromatography**, **565**: 27-34, 1991.
- HENDERSON, B.W., DOUGHERTY, T.J. “How does photodynamic therapy work?”. **Photochem. Photobiol.**, **55**: 145-157, 1992.
- HOFFMAN, R.A. Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamster. **American Journal Anatomy**, **132**: 463-478, 1971.

- HOFFMAN, R.A.; JONHSON, L.B., REITER, R.J. Harderian glands of golden hamsters temporal and sexual differences in immuno reactive melatonin. **Journal. Pineal Research**, **2**: 161-168, 1985.
- HUGO, J., KRIJT, J., VOKURKA, M., JANOUSEK, V. Secretory response to light in rat harderian gland: possible photoprotective role of harderian porphyrin. **General Physiology and Biophysics**, **6**:401-404, 1987.
- JACKSON, A.H.D., KENNER, G.W., SMITH, K.M., SUCKLING, C.J. Pyrroles and Related Compounds. XXXVII. **Harderoporphylin Tetrahedron**, **32**: 2757-2762, 1976.
- JOHNSTON (a), HS, MC GADEY, J., PAYNE, .A.P., Thompson GG, Moore MR. The Harderian Gland, its Secretory duct and Porphyrin content in the Plains Mouse (*Pseudomys australis*). **Journal of Anatomy**, **140**: 337-350, 1985.
- JOHNSTON,(b) H.S., MC GADEY, J, PAYNE, .A.P., THOMPSON, G.G., MOORE, M.R. The Harderian Gland, its Secretory duct and Porphyrin content in the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*). **Journal of Anatomy**, **153**: 17-30, 1987, 1985.
- JONES. C.W., HOFFMAN, R.A. .Porphyrin concentration of the hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland: Effects of incubation with delta-aminolevulinic acid and various hormones. **International Journal. Biochemistry**. **7**: 135-139, 1976.
- KENNEDY J.C., POTTIER, R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, **14**: 275-292, 1992.
- KLINTBERG C., ENEJDER A M.K., WANG I., ANDERSON-ENGELS S., SVANBERG S., SVANBERG K. “Kinetic fluorescence studies of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in basal cell carcinomas”. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol**, **49**: 120-128, 1999.
- KÖNIG, K., KIENLE, A., BOEHNCKE, W. H., KAUFMANN, R., RÜCK, A, MEIER, T STEINER, R. Photodynamic tumor therapy and on-line fluorescence spectroscopy after ALA administration using 633-nm light as therapeutic and fluorescence excitation radiation. **Optical Engineering**, **33 (9)**: 2945 – 2952, 1994.

KÖNIG, K., SCHNECKENBURGER, H., RÜCK, A. "In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins". **J. Photochem. Photobiol. B: Biol**, **18**: 287-290, 1993.

KURISU, K., SAWAMOTO, O, WATANABE, H., ITO, A. Sequential changes in the Harderian gland of rats exposed to high intensity light. **Lab Anim Sci** **46** (1):71-6, 1996.

LOPEZ-GONZALES, M.A., CLVO, J.R., GOBERNA, R. GUERREIRO, J.M. Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rats. **Life Sci.**, **48**: 1165-1171, 1992.

MARGOLIS, F. L. Regulation of porphyrin biosynthesis in the harderian gland of inbred mouse strains. **Archives Biochemistry Biophysics**, **145**: 373-381, 1971.

McCAUGHAN J. S., GUY J. T., HAWLEY P., HICKS W., INGLIS, W., LAUFMAN L., MAY E., NIMS T. A., SHERMAN RAND. " Hematoporphyrin-Derivative and photoradiation therapy of malignant tumors". **Lasers in Surgery and Medicine**, **3**: 199-209, 1983.

MINUCCI S, CHIEFFI BG, CHIEFFI G. A sexual dimorphism of the harderian gland of the toad, *Bufo viridis*. **Basic and Applied Histochemistry** **33**: 299 – 310, 1989.

MOAN, J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissue **J Photochem Photobiol.**, **B 6**: 343-344, 1990.

MONTGOMERY, R.D., MASLIN, W.R. A comparison of the gland of harder response and head-associated lymphoid tissue (HALT) morphology in chicken and turkeys. **Avian Disease** (36): 755-759, 1992.

NICOLA, JH., REISER, NICOLA, EMD., METZE, K., MESQUITA, RC. Efeito fotodinâmico em glândula harderiana de ratos *Wistar*. **Revista da Sociedade Brasileira de Laser**. **1(4)**: 21-23, 2001.

NICOLA, J.H., COLUSSI, V.C., NICOLA, E.M.D., METZE, K., Enhancement of Photodynamic Therapy due to Hyperbaric Hyperoxia: an experimental study of Walker 256 tumors in rats. - Optical Methods for Tumor Treatment and Detection Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy VI, Thomas J. Dougherty; Ed. **Vol. 2972**: 88 - 94 1997.

- PANG, S.F., YU S., SUEM, H.C., BROWN, G.M. Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm., **Journal. Endocrinology**, **87**: 89-93, 1980.
- PAULE, W.J. The comparative histochemistry of the Harderian gland. Dissertation, Ohio State University Columbus, Ohio.- In Chieffi, G, Bacari, CG; Di Mateo, L. ;d'Istria, M.; Minucci, S. Varriale, B. Cell Biology of the Hrderian Gland Intern. **Review of Cytology**, **168**1957: 1-80,1996.
- PAYNE, A.P. The harderian gland: a tercentennial review. **J. Anat.**, **185**: 1 – 49, 1994.
- PAYNE, A.P., MC GADEY, J., JOHNSTON, H.S. The structure of the Harderian glan of the golden hamster. In Harderian gland effects (Ed. S. M. Weeb; R. A. Hoffman; Puig-Domingo & R. J. Reiter) 53-67, **Berlin Springer**,. 1985. - In Payne, AP. The harderian gland: atercentual review. **Journal. Anatomical**, **185**: 1-49,1994.
- PAYNE, A.P., MC GADEY, J., MOORE, M.R., THOMPSON, G.G. Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. **Journal of Endocrinology**, **72**: 41, 1977.
- PÉVET, P., BALEMANS, M.G.M., LEGERSTEE, W., VIVIEN-ROELS, B. Cyrcadian rhythmicity of the activit of hydroxindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina and harderian gland of the golden hamster. **Journal. Neural Transm.**, **49**: 229-245, 1980.
- PÉVET, P., HETH, G., HIAMAND, A., NEVO, E. “Photoperiod perception in the blind male rat (Sphalex Chenbergi, Mehring): Involvement of the Harderian gland atrophied eyes and melatonin”, **J. Exp. Zool.**, **232**: 41-50, 1984.
- RAAB, O., Üeber die wirkung fluorescierender stoffe auf infusoria. **J. Biol.**:**39**: 524, 1900.
- REIS, E.R. NICOLA, E.M.D., METZE, K., NICOLA, J.H. Photodynamic effect produced by HeNe radiation in Harderian glands of Wistar rats: an experimental model for PDT studies. In laser-tissue interaction XI: Photochemical, photothermal, and photomechanica, Donald D. Duncan; Jeffrey O. Hollinger; Steven L. Jacques, Editors, Proceedings of SPIE: 3914, 40-45, 2000.
- RODRIGUES-COLUNGA, M.J., RODRIGUES, C., ANTOLIN, I., URÍA, H., TOLIVIA, D., VAUGHAN, M.K., MENÉNDEZ-PELAEZ, A. .Development and androgen regulation of the secretory cells types of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland. **Cell tissue Res.**, **274**: 189-197, 1993.

ROTOMMSKIS, R., BAGDONAS, S., STRECKYTE, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, **33**: 61 – 67, 1996.

SAKAI, T., YOHRO, T. A histological study of the Harderian gland of Mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. **Anatomical Record**, **100**: 259-270, 1981.

SAKAY, T. Comparative anatomy of the mammalian Harderian glands. In Harderian glands: Porphyrin metabolism, Behavioral and endocrine effects (ed S.M.Webb, R.A. Hoffman, M. L. Puig-Domingo and R. J. Reiter). Berlin Springer, 7-23, 1992. In Payne, A P. The harderian gland: a tercentual review. **Journal Anatomy** **185**:1-49, 1994.

SAKAI, T., BURNS, R.B. The Harderian gland in birds: histology and immunology. In the Harderian glands: Porphirin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects, (Ed. S. M. Webb, R. A. Hoffman, M. L. Puig-Domindo & R. J. Reiter), Berlin Springer 155-163, 1992.

SCHUITMAKER, J.J. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment fo cancer. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, **34**: 3-12, 1996.

SCOTT, T.R., SAVAGE, M.L., OLÁH, I. “Plasma cells of the chicken Harderian gland”, **Poult. Sci.**, **72**: 1273-1279, 1993.

SEYAMA, O.Y., KASAMA, T., YASUGI, E., PARK, S.H., KANO, K. Lipids in Harderian glands and their significance. In Harderian glands; Porphirin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects, (Ed. S. M. Weeb, RA. Hoffman Puig-Domingo & R. J. Reiter), pp 195-217 Berlin, Springer 1992. - In CHIEFFI, G., CHIEFFI, B.G., DI MATTEO, L., D’ISTRIA, M., MINUCCI, S., VARRIALE, B. (1997),. Cell Biology of the Harderian Glasnd. International **Review of Citology**, **168**: 1-80.

SHIRAMA, K., HOKANO, M. Electron Microscopic Studies on the Maturation of Secretory Cells in the Mouse Harderian Gland. **Acta Anatomica**, **140**: 304-312, 1991.

SMITH, C.J.D. Gross Anatomical and Microscopic Observations on the Orbit and its Contents in *Natomys alexis*. **Australian Journal Zoological**, **24**: 479-489,. 1976.

SIEBER, F. Phototherapy, photochemoterapy and bone marow transplantation. **J. Hematol.** **2**: 43-62, 1993.

SPIKE, R.C., PAYNE, A.P., MOORE, M.R. The effect of age on the structure and porphyrin synthesis of the Harderian gland of the female golden hamster. **Journal Anatomy**, **160**: 157-166, 1988.

SPIKE, R.C., JOHNSTON, H.S., MCGADEY, J., MOORE, M.R., THOMPSON, G.G., PAYNE, A.P. Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland on the female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. **Journal of Anatomy** **142**: 59-72, 1985.

SPIKE, R.C., JOHNSTON, H.S., MCGADEY, J., MOORE, M.R., THOMPSON, G.G., PAYNE, A.P. Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland on the female golden hamster. II. The time course of changes after ovariectomy. **Journal of Anatomy** **145**: 67-77, 1986.

SPIKE, R.C., STEWART, S.L., MURRAY, K., KELLY, F.M., MAHARAJ, J.A., PAYNE, P.A., MOORE, M.R. Porphirin synthesis in the Harderian gland and other tissues of golden hamster during pregnancy and lactation. **Mol. Aspects. Med.** **11**: 151-152, 1990.

STRUM, J.M., SHEAR, C.R. Harderian glands in mice: fluorescence, peroxidase activity and fine structure. **Tissue and Cell**, **14**: 135-148, 1982.

TAPPENIER, H., JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffe. **Muench. Med. Wochschr.**, **1**: 2042-2044, 1903.

THIESSEN, D.D. The function of the Harderian gland in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. In Harderian glands: Porphirin metabolism. Behavioral and endocrine effects. In WEBB S. M., HOFFMAN R. A., PERIG-DOMINGO M. L., REITER R. J., EDS), pp 127-140. Springer-Verlog, Berlin, 1992. In PAYNE, A.P The Harderian gland: atercentual review. **Journal Anatomy**, **185**: 1-49,1994.

THOMPSON, G.G., HORDOVATZI, X., MOORE, M.R., MC GADEY, J., PAYNE, A.P. Sex differences in haen biosynthesis and porphirin content in the Harderian gland of the golden hamster. **International Journal of Biochemistry**, **16**: 849-852, 1984.

TOMIO, J.M., GRISTEIN, M. Porphyrin Biosynthesis 5. Biosynthesis of Protoporphyrin IX in Harderian Glands. **European Journal of Biochemistry** **6**: 80-83,1968.

VENABLE, J.H., GRAFFLIN, A.L. Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat. **Journal of Mammalogy**, **21**: 66-71, 1940.

WATANABE, M. (Na autoradiographic biochemical and morphological study of the harderian gland of mouse. **Journal of Morphology**, **163**: 349-365, 1980.

WEAGLE, G., PETERSON, P.E., KENNEDY, J., POTTIER, R. The nature of the chromofore responsible for naturally occurring fluorescence in mouse skin. **J.Photochem. Photobiol. B.**, **(2)**: 313-320, 1988.

WEISHAUP, K.R., GOMER, C.J., DOUGHERTY, T.J., Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in cancer photoinactivation of a murine tumor, **Cancer Res** **36**: 2326-2329, 1976.

WETTERBERG, L., GELLERE, E., YUWILLER, A. Harderian gland: na extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? **Science**, **118**: 416-417, 1970.

WINTERHAGER, E., KÜHNEL, W. Membrane specialisations of the cells of the harderian gland of the rabbit with particular reference to the mecanism of exocytosis. **Cell Tissue Res.**, **231**: 623-636, 1983.

WOODING, F.B.P. Lipid droplet secretion by the rabbit harderian gland. **J. Ultrastruct. Res.**, **71**: 68-78, 1980.

WOOLEY, G.M., WORLEY, J. Sexual dimorphism in the Harderian galnd of the hamster (*Cricetus auratus*). **Anatomical Records**, **118**: 416-4171, 1954.

ZEZELL, M.D. **Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores**. Campinas, 1991. (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).



ANEXO



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 218-1, sobre "Estudo das Propriedades ópticas de tecidos biológicos da glândula Harderiana de ratos wistar" como modelo de terapia fotodinâmica, sob a responsabilidade de EDMIR ROSA DOS REIS esta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 20.03.2001. Este certificado expira em 19.03.2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 218-1, about "Study of the optical properties of biological tissues of the Harderian gland of wistar rats", is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in 03/20/2001. Expiration date 03/19/2002.

Campinas, 20 de março de 2001.

Albuquerque
Prof(a) Dr(a) Alba R M Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP

Armando Ferreira Lima
Prof. Dr. ARMANDO FERREIRA LIMA
Secretário(a) – CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP -13 081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE (019) 781.7116
FAX (019) 289.3124