UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da associação dos precursores da
PPIX (ALA e MAL) em epitélio suíno

ALESSANDRA KEIKO LIMA FUJITA

São Carlos
2016

ALESSANDRA KEIKO LIMA FUJITA

Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da associação dos precursores da
PPIX (ALA e MAL) em epitélio suíno

Versão Corrigida
Original na Unidade

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento
Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

F961a Fujita, Alessandra Keiko Lima
Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da
associação dos precursores da PpIX (ALA e MAL) em
epitélio suíno / Alessandra Keiko Lima Fujita;
orientador Vanderlei Salvador Bagnato. São Carlos,
2016.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciências e Engenharia de Materiais e Área de
Concentração em Desenvolvimento Caracterização e
Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. 5-ALA. 2. 5-MAL. 3. Terapia fotodinâmica. 4.
Imagem de fluorescência de campo amplo. 5.
Espectroscopia de fluorescência . 6. Microscopia
confocal de fluorescência. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **ALESSANDRA KEIKO LIMA FUJITA**.

Título da tese: "Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da associação dos precursores da PpIX (Ala e Mal) em epitélio suíno".

Data da defesa: 23/05/2016.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Dra. Priscila Fernanda Campos de Menezes
(Orientadora designada)
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

APROVADA

Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira
(Universidade Federal de São Carlos)

Aprovado

Prof. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins
(Universidade Federal do ABC/UFABC)

Aprovado

Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino
(Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP)

Aprovada

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gentijo Guimarães
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo suporte e apoio nos meus estudos, ao meu irmão pela admiração, e a Kaori por sempre acreditar em mim, não deixando que me desanimasse com os obstáculos. Á minha imensa gratidão a vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e por guiar-me com serenidade, coragem e sabedoria.

Ao professor Vanderlei S. Bagnato, pela oportunidade de contribuir com os estudos para otimização da TFD tópica, por conhecer a sua mente brilhante como um grande pesquisador e por confiar em mim como aluna para este importante projeto.

À Priscila F.C. Menezes pela grande ajuda nessa minha jornada e, mesmo finalizando o pós-doc seguiu me ajudando até o fim em meu doutorado. Pelo eterno aprendizado nas discussões do projeto e principalmente pela amizade. Obrigada.

Aos colegas, técnicos e professores que de alguma forma contribuíram com o meu doutorado, especialmente, o Clóvis, Ramon e Thereza pelas ajuda nos processamentos dos dados.

Aos amigos, Javier, Maria, Dilleys, Yurika, Rodrigo, Léo, Ana pelos momentos de convivência e por deixar a saudade da família mais leve.

Aos professores Andriago Barbosa de Nardi e André Escobar, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP–Jaboticabal, minha gratidão pela colaboração no projeto, atenção e respeito pelos animais. À Rozana Wendler pela atenção e cuidados com os animais enquanto realizávamos os experimentos, projeto no qual não seria possível ser realizado sem ajuda desses profissionais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – nº 140370/2012-9), ao Instituto Nacional de Óptica e Fotônica (INOF) e ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF), pelo apoio financeiro.

À todos a minha gratidão!

EPÍGRAFE

*“Substitua uma atitude de julgamento por
uma atitude de curiosidade.”*

Amy J.C. Cuddy, Psicóloga
Social de Havard.

RESUMO

FUJITA, A. K. L. **Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da associação dos precursores da PPIX (ALA e MAL) em epitélio suíno.** (2016) 113p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A terapia fotodinâmica (TFD) utilizando ácido 5-aminolevulinico (ALA) e derivados em aplicação tópica e, como precursor da protoporfirina IX (PPIX) apresenta alguns limitantes relativos a baixa permeação das substâncias na pele. Comportamento este que afeta a produção e homogeneidade da distribuição da PPIX na superfície e camadas mais profundas da pele. Para resolver essa limitação muitos autores propõem alternativas modificando a molécula do ALA e derivados, bem como modificando as propriedades químicas da fase externa da emulsão (mais hidrofílica ou hidrofóbica) ou então o sistema de entrega para a emulsão. O objetivo desse estudo é avaliar qual a proporção de ALA e metil-5-aminolevulinato (MAL) que quando misturados levam ao aumento da quantidade e uniformidade da formação da PPIX na superfície e em profundidade na pele. Para esse estudo foi realizada análises de fluorescência e histologia. O estudo foi conduzido *in vivo* e *ex vivo* usando biópsias de pele de porco cultivadas *in vitro*. A produção de PPIX foi monitorada utilizando espectroscopia de fluorescência, imagem de fluorescência de campo amplo e microscopia confocal de fluorescência. E para a aplicação da TFD os parâmetros usados foram de 125 mW/cm² de intensidade e 150 J/cm² de dose. A análise do dano causado pela irradiação foi realizada por meio de histologia da pele após 24 e 48 horas da aplicação da TFD. O ALA e MAL na concentração de 20% foram misturados nas seguintes proporções: ALA ou M, M2 (80% ALA - 20% MAL), M3 (60% ALA – 40% MAL), M4 (50% ALA – MAL), M5 (40% ALA – 60% MAL), M6 (20% ALA – 80% MAL) e MAL como M7. As diferentes proporções foram incorporadas em emulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). De acordo com os resultados, as misturas M3, M4 e M5 mostraram maior produção de PPIX na superfície da pele segundo as medidas de fluorescência em 3h de incubação e, no estudo da cinética mostraram produzir PPIX em menor tempo. No estudo de permeação do creme *in vitro* em pele *ex vivo*, por microscopia confocal de fluorescência, observou-se que as misturas M3, M4 e M5 produziram mais PPIX nas camadas da pele do que ALA e MAL. As análises histológicas das misturas apresentaram maior dano fotodinâmico na superfície e profundidade das camadas da pele após a TFD, independente da emulsão. A análise em até 48h observou-se predominantemente a fase do processo de reparo referente à fase inflamatória, mas existem indícios ao longo das análises tanto macroscópicas e histológicas que o processo de reparo referente as fases subseqüentes de proliferação e remodelamento estão iniciando-se em paralelo. A mistura M4 em ambas as emulsões apresentou elevada quantidade de formação de PPIX em menor tempo de incubação. M4 em emulsão O/A apresentou menor dano fotodinâmico já que a evolução do processo reparo foi mais rápida sugerindo-se potencial de aplicação em TFD voltado para área cosmética-estética. Já M4 em emulsão A/O levou a um maior dano fotodinâmico já que a evolução do processo de reparo foi mais lenta sugerindo-se potencial de aplicação em TFD voltado para área oncológica e de doenças de pele. De modo geral o estudo proposto apresentou impacto positivo para a otimização da terapia fotodinâmica em aplicação tópica.

Palavras-chave: 5-ALA MAL. Terapia fotodinâmica. Imagem de fluorescência de campo amplo. Espectroscopia de fluorescência. Microscopia confocal de fluorescência.

ABSTRACT

FUJITA, A. K. L. **Photodynamic effect evaluation from the association of the precursors of PPIX (ALA and MAL) in swine epithelium.** (2016) 113p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Photodynamic therapy (PDT) using 5-aminolevulinic acid and derivatives on topical application and as a precursor of protoporphyrin (PPIX) has some limitations for low permeation of substances into the skin. This behavior affects PPIX production and homogeneous distribution on the surface and deeper layers of the skin. To resolve this limitation, many authors propose alternatives such as modifying the molecule of ALA and its derivatives, as well as changing the chemical properties of the external phase of the emulsion (more hydrophilic or hydrophobic) or the delivery system to the emulsion. The aim of this study is to assess the proportion of ALA and methyl-5-aminolevulinate (MAL) that when mixed leads to an increase in the amount and uniformity of the PPIX formation on surface and deep skin. For this study we performed fluorescence analysis and histology. The studies were conducted in vivo and also using pig skin biopsies (ex vivo) cultured in vitro. The PPIX production was monitored using fluorescence spectroscopy, widefield fluorescence imaging, and fluorescence confocal microscopy. For the application of PDT an intensity of $125 \text{ mW} / \text{cm}^2$ and a dose $150 \text{ J} / \text{cm}^2$ were used. Analysis of the damage caused by irradiation was performed through skin histology after 24 and 48 hours after PDT application. ALA and MAL in concentration of 20% were mixed in the following proportions: ALA or M, M2 (80% ALA - 20% MAL), M3 (60% ALA - 40% MAL), M4 (50% ALA - MAL) M5 (40% ALA - 60% MAL), M6 (20% ALA - 80% MAL) MAL and as M7. Different proportions were incorporated in oil-in-water emulsions (O / W) and water-in-oil (W / O). The fluorescence measurements for 3h of incubation showed better PPIX production in the skin surface for mixtures M3, M4 and M5. Moreover, the kinetics study showed PPIX production in less time for these mixtures. In the study of cream permeation of ex vivo skin in vitro by confocal fluorescence microscopy, we observed that the mixtures M3, M4 and M5 produced more PPIX in the skin layers than ALA and MAL. The histological analyses of the mixtures showed higher photodynamic damage on the surface and deeper layers of the skin after PDT, independent of the emulsion. The analysis in 48 hours predominantly observed the phase of the healing process regarding the inflammatory phase but there are signs along both macroscopic and histological analysis that the healing process concerning the subsequent stages of proliferation and remodeling are initiating in parallel. The mixture M4 in both emulsions had high amounts of PPIX formation in shorter incubation time. M4 emulsion O / A showed a lower photodynamic damage since the evolution of the healing process was faster suggesting to potential application in PDT facing cosmetic-aesthetic area. M4 already in W / O emulsion led to a greater photodynamic damage since the evolution of the healing process was slower suggesting to potential application in PDT facing oncology and skin diseases. Overall the proposed study had a positive impact on the optimization of photodynamic therapy for topical application.

Keywords: 5-ALA MAL. Photodynamic therapy. Widefield fluorescence imaging. Fluorescence spectroscopy. Confocal fluorescence microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - DIAGRAMA DE JABLONSKI ADAPTADO, MOSTRANDO OS NÍVEIS ENERGÉTICOS DE UM FS AO SER EXCITADO, E POSSÍVEIS EVENTOS QUE OCORRE COM A MOLÉCULA AO ABSORVER ENERGIA DE UM FÓTON. ADAPTADO DE: GRECCO (2009).31
- FIGURA 2 - ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DA PPIX, APRESENTANDO ABSORBÂNCIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (BANDA DE Soret) E NAS REGIÕES DO VERDE E VERMELHO (BANDAS QS). ADAPTADO DE: TOREZAN (2009).....33
- FIGURA 3 – (A) ABSORBÂNCIA RELATIVA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA, INDICANDO A REGIÃO DA JANELA ÓPTICA BIOLÓGICA. FONTE: PLAETZER (2008). (B) PROPAGAÇÃO DA LUZ DENTRO DO TECIDO. ADAPTADO DE: AGOSTINIS ET AL. (2011).34
- FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ALA, MAL E PPIX.....36
- FIGURA 5 - MECANISMO DA SÍNTESE DO ALA NA BIOSÍNTESE DO GRUPO HEME. O ALA É SINTETIZADO A PARTIR DA GLICINA E SUCCINIL-CoA. APÓS SER METABOLIZADO POR DIFERENTES ENZIMAS É CONVERTIDO EM PPIX. ADAPTADO DE: TOREZAN (2009)..37
- FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO DO TECIDO NAS DIVERSAS CAMADAS DA PELE, MOSTRANDO O NÚMERO DE DIAS RELATIVO ÀS PRINCIPAIS CÉLULAS DURANTE AS TRÊS FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO. FONTE: ISAAC ET AL. (2010).....38
- FIGURA 7 - FASES DO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL PELO TEMPO, MOSTRANDO QUE AS FASES SE SOBREPÕEM UMAS AS OUTRAS. ADAPTADO DE: ISAAC (2010).41
- FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO DA DIFERENÇA DA FASE INTERNA E EXTERNA DAS EMULSÕES AGUA EM ÓLEO (A/O) E ÓLEO EM ÁGUA (O/A).....47
- FIGURA 9 - (A) SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. (B) MOMENTO DA COLETA DOS ESPECTROS DA AUTOFLUORESCÊNCIA DA PELE DO SUÍNO ATRAVÉS DO SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.50
- FIGURA 10 - ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA COLETADO APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DO ALA E MAL NA PELE DO SUÍNO.....51
- FIGURA 11 - (A) SISTEMA DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO (EVINCE, MM OPTICS, BRASIL) ACOPLADO A CÂMERA FOTOGRÁFICA. (B) MOMENTO DA COLETA DA IMAGEM DA AUTOFLUORESCÊNCIA DA PELE SUÍNA COM O SISTEMA DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO.53
- FIGURA 12 - (A) IMAGEM DA AUTOFLUORESCÊNCIA E (B) IMAGEM DA PRODUÇÃO DA PPIX ADQUIRIDA PELO SISTEMA DE IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO.54

FIGURA 13 - (A) BIOPSIA SEM TRATAMENTO RETIRADA DA PELE DO ANIMAL, AUTOFLUORESCÊNCIA, E OS TRAÇOS DOS PERFIS DE INTENSIDADES. (B) MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE DA AUTOFLUORESCÊNCIA PELA PROFUNDIDADE DA PELE..	55
FIGURA 14 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> COM PELE <i>EX VIVO</i>	56
FIGURA 15 - (A) SISTEMA DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA E SOFTWARE DE AQUISIÇÃO DE IMAGEM, (B) E PROCEDIMENTO DE LEITURA NO MICROSCÓPIO CONFOCAL.	57
FIGURA 16 - (A) IMAGEM CONTROLE ADQUIRIDA POR MICROSCOPIA CONFOCAL E TRATADA NO PROGRAMA DA ZEN E A DEMONSTRAÇÃO DOS PERFIS DE INTENSIDADE REALIZADOS PELA ROTINA DO MATLAB. (B) GRÁFICO DA MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE PELA PROFUNDIDADE.	58
FIGURA 17 - (A) LINCE, SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO E PARA A TERAPIA FOTODINÂMICA. (B) DISPOSITIVOS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA AVULSOS, “CANETAS”. (C) E MOMENTO DO TRATAMENTO UTILIZANDO O SISTEMA LINCE E “CANETAS”.....	59
FIGURA 18 - MARCAÇÃO EM TRIPLICATAS DAS ÁREAS DE 1 CM DE DIÂMETRO, ONDE FORAM APLICADOS OS CREMES NO DORSO DO SUÍNO NO ESTUDO PILOTO.	60
FIGURA 19 - (A) MARCAÇÃO DO DORSO DO ANIMAL COM MÁSCARAS FÍSICAS PARA A APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS. (B) ÁREAS PROTEGIDAS DA LUZ POR MÁSCARAS OCLUSIVAS APÓS A APLICAÇÃO DOS CREMES.....	62
FIGURA 20 - FASES DO REPARO CICATRICIAL OBSERVADAS NAS LÂMINAS EM HE DE PELE SUÍNA TRATADAS COM TFD. INDICAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUE OCORREM NAS FASES DE REPARO E MOSTRANDO QUE AS FASES SE SOBREPÕEM AO LONGO DO TEMPO. (1) ESTRATO CÓRNEO, (2) EPIDERME, (3) PAPILA DÉRMICA, (4) DERME PAPILAR, (5) DERME RETICULAR, (6) AUSÊNCIA DAS PAPILAS DÉRMICAS (7) INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS, (8) EDEMA, (9) REPITELIZAÇÃO, (10) FIBROPLASIA E (11) REMODELAÇÃO.....	65
FIGURA 21 - PRODUÇÃO DA PPIX APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DOS CREMES E OS DANOS E REPARO NA SUPERFÍCIE DA PELE CAUSADO PELA TFD AO LONGO DO TEMPO.	68
FIGURA 22 - MÉDIA DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA COLETADO DOS ANIMAIS APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM EMULSÃO O /A.	70
FIGURA 23 - TESTE ESTATÍSTICO ANOVA QUE COMPARA AS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS EM EMULSÃO O /A, DADOS ADQUIRIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	71

FIGURA 24 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PPIX PELO TEMPO DE 5 HORAS USANDO A EMULSÃO O /A NAS MISTURAS. DADOS ADQUIRIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA; (A) ALA E MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 E (F) M6.	73
FIGURA 25 - MÉDIA DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA COLETADOS APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM EMULSÃO A/O.	76
FIGURA 26 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PPIX PELO TEMPO DE 5 HORAS USANDO A EMULSÃO A/O NAS MISTURAS. DADOS ADQUIRIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA; (A) ALA E MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 E (F) M6.	77
FIGURA 27 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO DA SUPERFÍCIE DA PELE SUÍNA EM TRIPLICATAS (A, B E C) APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DOS CREMES EM EMULSÃO O/A.	81
FIGURA 28 - MÉDIA DA CONTAGEM DE PIXELS DAS IMAGENS ADQUIRIDAS PELO SISTEMA DE IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO, COLETADAS APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM EMULSÃO O/A.	82
FIGURA 29 - TESTE ESTATÍSTICO ANOVA QUE COMPARA AS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS EM EMULSÃO O/A, DADOS ADQUIRIDOS PELO SISTEMA DE IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO.	83
FIGURA 30 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PPIX PELO TEMPO DE 5 HORAS USANDO A EMULSÃO O /A NAS MISTURAS. DADOS ADQUIRIDOS POR IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO; (A) ALA E MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 E (F) M6.	84
FIGURA 31 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM EMULSÃO O/A; (A) ÁREA EM QUE APLICAMOS AS AMOSTRAS E O CIRCULO BRANCO INDICA O PONTO ONDE FOI TIRADA A BIOPSIA, E (B) IMAGENS DAS BIOPSIAS.	87
FIGURA 32 - MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DAS IMAGENS DAS BIOPSIAS PELA PROFUNDIDADE, EMULSÃO O/A; (A) ALA E MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 E (F) M6.	88
FIGURA 33 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO DA SUPERFÍCIE DA PELE SUÍNA EM DUPLICATAS (A, B) APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DOS CREMES EM EMULSÃO A/O.	90
FIGURA 34 - MÉDIA DA CONTAGEM DE PIXELS DAS IMAGENS ADQUIRIDAS PELO SISTEMA DE IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO, COLETADAS APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM EMULSÃO A/O.	90
FIGURA 35 - TESTE ESTATÍSTICO ANOVA QUE COMPARA AS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS EM EMULSÃO A/O, DADOS ADQUIRIDOS PELO SISTEMA DE IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO.	91

FIGURA 36 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PPIX PELO TEMPO DE 5 HORAS USANDO A EMULSÃO A/O NAS MISTURAS. DADOS ADQUIRIDOS POR IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO; (A) ALA E MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 E (F) M6.....	93
FIGURA 37 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM EMULSÃO A/O; (A) ÁREA EM QUE APLICAMOS AS AMOSTRAS E O CIRCULO BRANCO INDICA O PONTO ONDE FOI TIRADA A BIOPSIA, E (B) IMAGENS DAS BIOPSIAS.....	96
FIGURA 38 - MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DAS IMAGENS DAS BIOPSIAS PELA PROFUNDIDADE, EMULSÃO A/O; (A) ALA E MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 E (F) M6.	97
FIGURA 39 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA ADQUIRIDA APÓS 5 HORAS DA APLICAÇÃO DO ALA E MAL, E (A) MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE PELA PROFUNDIDADE.	100
FIGURA 40 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA ADQUIRIDA APÓS 5 HORAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS M2, M3, M4, M5 E M6, E (A, B, C, D, E E F) MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE PELA PROFUNDIDADE.	103
FIGURA 41 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA ADQUIRIDA APÓS 7 HORAS DA APLICAÇÃO DO ALA E MAL, E (A) MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE PELA PROFUNDIDADE.	104
FIGURA 42 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA ADQUIRIDA APÓS 7 HORAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS M2, M3, M4, M5 E M6, E (A, B, C, D, E E F) MÉDIA DOS PERFIS DE INTENSIDADE PELA PROFUNDIDADE.	107
FIGURA 43 - A) IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA PPIX FORMADA APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO O/A E, B) O DANO FOTODINÂMICO APÓS 24 HORAS REALIZADA A TFD.....	109
FIGURA 44 - A) IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA PPIX FORMADA APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO O/A E B) O DANO FOTODINÂMICO APÓS 48 HORAS REALIZADA A TFD.....	110
FIGURA 45 - A) IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA PPIX FORMADA APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO A/O E, B) O DANO FOTODINÂMICO APÓS 24 HORAS REALIZADA A TFD.....	110
FIGURA 46 - A) IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA PPIX FORMADA APÓS 3 HORAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO A/O E, B) O DANO FOTODINÂMICO APÓS 48 HORAS REALIZADA A TFD.....	111

- FIGURA 47 - HISTOLOGIA DA PELE SUÍNA (CONTROLE) SEM NENHUM TRATAMENTO, CORADA EM HE; (1) ESTRATO CÓRNEO, (2) EPIDERME, (3) PAPILA DÉRMICA, (4) DERME PAPILAR E (5) DERME RETICULAR.....113
- FIGURA 48 - HISTOLOGIA DA PELE SUÍNA DERIVADA DA APLICAÇÃO DO ALA E MAL EM EMULSÃO O/A APÓS 24 E 48 HORAS DA TFD. RETÂNGULO PRETO INDICA INFILTRADO INFLAMATÓRIO E RETÂNGULO BRANCO INDICA REGIÕES DE CONFORMAÇÃO E COESÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO.114
- FIGURA 49 - HISTOLOGIA DA PELE SUÍNA DERIVADA DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS M2, M3, M4, M5 E M6 EM EMULSÃO O/A APÓS 24 E 48 HORAS DA TFD. RETÂNGULO PRETO INDICA INFILTRADO INFLAMATÓRIO E RETÂNGULO BRANCO INDICA REGIÕES DE CONFORMAÇÃO E COESÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO.118
- FIGURA 50 - IMAGENS DAS LAMINAS DA APLICAÇÃO DO ALA E MAL (EMULSÃO A/O) NA PELE SUÍNA APÓS 24 E 48 HORAS DA TFD. RETÂNGULO PRETO INDICA INFILTRADO INFLAMATÓRIO E RETÂNGULO BRANCO INDICAM REGIÕES DE CONFORMAÇÃO E COESÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO.121
- FIGURA 51 - HISTOLOGIA DA PELE SUÍNA DERIVADA DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS M2, M3, M4, M5 E M6 EM EMULSÃO A/O APÓS 24 E 48 HORAS DA TFD. RETÂNGULO PRETO INDICA INFILTRADO INFLAMATÓRIO E RETÂNGULO BRANCO INDICAM REGIÕES DE CONFORMAÇÃO E COESÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DAS PROPORÇÕES MASSA A MASSA DO ALA E MAL NAS AMOSTRAS AVALIADAS NA PESQUISA.....	45
TABELA 2 - MODIFICAÇÕES OBSERVADAS NAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS APÓS 24 E 48 HORAS DA REALIZAÇÃO DA TFD. NA TABELA, '0' INDICA AUSÊNCIA DA CARACTERÍSTICA, E O SÍMBOLO DE '+' INDICA A PRESENÇA DA CARACTERÍSTICA COMPARADA AO CONTROLE.	66
TABELA 3 - VALORES DO IF ₅₀ ADQUIRIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO DA CINÉTICA E COLETADOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, DERIVADAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO O/A.....	74
TABELA 4 - VALORES DO IF ₅₀ ADQUIRIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO DA CINÉTICA E COLETADOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, DERIVADAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO A/O.....	78
TABELA 5 - VALORES DO IF ₅₀ ADQUIRIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO DA CINÉTICA E COLETADOS POR IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO, DERIVADAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO O/A.	85
TABELA 6 - VALORES DO IF ₅₀ ADQUIRIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO DA CINÉTICA E COLETADOS POR IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO, DERIVADAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS EM EMULSÃO A/O.	94
TABELA 7 - MODIFICAÇÕES OBSERVADAS NAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA APLICAÇÃO DO ALA E MAL EM EMULSÃO O/A APÓS 24 E 48 HORAS DA REALIZAÇÃO DA TFD. NA TABELA, '0' INDICA AUSÊNCIA DA CARACTERÍSTICA, E O SÍMBOLO DE '+' INDICA A PRESENÇA DA CARACTERÍSTICA COMPARADA AO CONTROLE.	116
TABELA 8 - MODIFICAÇÕES OBSERVADAS NAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS M2, M3, M4, M5 E M6 EM EMULSÃO O/A APÓS 24 E 48 HORAS DA REALIZAÇÃO DA TFD. NA TABELA, '0' INDICA AUSÊNCIA DA CARACTERÍSTICA, E O SÍMBOLO DE '+' INDICA A PRESENÇA DA CARACTERÍSTICA COMPARADA AO CONTROLE.	120
TABELA 9 - MODIFICAÇÕES OBSERVADAS NAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA APLICAÇÃO DO ALA E MAL EM EMULSÃO A/O APÓS 24 E 48 HORAS DA REALIZAÇÃO DA TFD. NA TABELA, '0' INDICA AUSÊNCIA DA CARACTERÍSTICA, E O SÍMBOLO DE '+' INDICA A PRESENÇA DA CARACTERÍSTICA COMPARADA AO CONTROLE.	122
TABELA 10 - MODIFICAÇÕES OBSERVADAS NAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA APLICAÇÃO DAS MISTURAS M2, M3, M4, M5 E M6 EM EMULSÃO A/O APÓS 24 E 48 HORAS DA REALIZAÇÃO DA TFD. NA TABELA, '0' INDICA AUSÊNCIA DA CARACTERÍSTICA, E O	

SÍMBOLO DE '+' INDICA A PRESENÇA DA CARACTERÍSTICA COMPARADA AO CONTROLE.
..... 126

LISTA DE ABREVIATURAS

TFD – Terapia Fotodinâmica

FS – Fotossensibilizador

PPIX - Protoporfirina IX

ALA – Ácido 5- aminolevulínico

MAL - Metil-5-aminolevulinato

PMN - Leucócitos Polimorfonucleares

O/A – Óleo em água

A/O – Água em óleo

DMSO – Dimetilsulfóxido

HE – Hematoxilina e Eosina

TM - Tricrômico de Masson

PSR - Picro-Sirius Red (PSR).

Nd³⁺:YAG - Neodímio YAG (ítrio-alumínio-granada)

IF₅₀ – Índice de Fluorescência médio

nm – nanômetro

cm – centímetro

mm - milímetro

kg – quilograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	TERAPIA FOTODINÂMICA	31
1.2	PRECURSORES DA PPIX – ALA E MAL.....	35
1.3	PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO E REPARO TECIDUAL.....	38
1.3.1	Fase inflamatória	39
1.3.2	Fase de proliferação	39
1.3.3	Fase de remodelamento	40
2	OBJETIVO GERAL	43
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA APLICAÇÃO TÓPICA DA TFD	45
3.2	EMULSÕES.....	46
3.2.1	Emulsão óleo em água (O/A).....	46
3.2.2	Emulsão água em óleo (A/O).....	46
3.3	PROTOCOLO DE ANESTESIA.....	48
3.4	TÉCNICAS DE FLUORESCÊNCIA.....	49
3.4.1	Sistema de espectroscopia de fluorescência	49
3.4.2	Sistema de imagem de fluorescência de campo amplo	52
3.4.3	Sistema de microscopia confocal de fluorescência.....	55
3.5	SISTEMA PARA O TRATAMENTO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)	58
3.6	ESTUDO PILOTO <i>IN VIVO</i>	59
3.7	APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS NA PELE DO ANIMAL.....	60
3.9	ANÁLISE MICROSCÓPICA	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1	ANÁLISES DO ESTUDO PILOTO.....	67
4.2	ANÁLISE DA FORMAÇÃO DA PPIX POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	69
4.2.1	Emulsão O/A: análise da formação da PPIX por espectroscopia de fluorescência.....	70
4.2.2	Emulsão A/O: análise da formação da PPIX por espectroscopia de fluorescência.....	75
4.2.3	Discussão dos dados coletados por espectroscopia de fluorescência	79

4.3	ANÁLISES DA FORMAÇÃO DA PPIX POR IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CAMPO AMPLO .	79
4.3.1	Emulsão O/A: análise da formação da PPIX por imagem de fluorescência de campo amplo	80
4.3.2	Emulsão O/A: análise da formação da PPIX nas biopsias por imagem de fluorescência de campo amplo	86
4.3.3	Emulsão A/O: análise da formação da PPIX por imagem de fluorescência de campo amplo	89
4.3.4	Emulsão A/O: análise da formação da PPIX nas biopsias por imagem de fluorescência de campo amplo	95
4.3.5	Discussão dos dados coletados por imagem de fluorescência de campo amplo..	98
4.4	ANÁLISE DA FORMAÇÃO DA PPIX POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA.....	99
4.4.1	Discussão dos dados coletados por microscopia confocal de fluorescência.....	107
4.5	ANÁLISES DO DANO APÓS TFD.....	108
4.5.1	Análise macroscópica.....	109
4.5.1.1	Emulsão O/A: análise macroscópica.....	109
4.5.1.2	Emulsão A/O: análise macroscópica.....	110
4.5.2.1	Emulsão O/A: análise microscópica.....	113
4.5.2.2	Emulsão A/O: análise microscópica.....	121
4.5.2	Discussão da análise do dano após TFD	127
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVA.....	129
	REFERÊNCIAS¹	133
	ANEXOS.....	145

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele no Brasil é o tipo de câncer mais frequente. Ele pode ser do tipo melanoma e não melanoma. E apesar do câncer de pele ser o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no País, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, sendo o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. Segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA, a estimativa de novos casos em 2016 é cerca de 5670 do tipo não melanoma (INCA, 2016).

O tratamento mais indicado para o câncer de pele é a cirurgia. A radioterapia (radiação ionizante) e a quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer. Embora esses tratamentos obtenham sucesso, eles possuem efeitos colaterais diversos, e ainda por intervenção cirúrgica trata-se da remoção física do tumor, independente do tamanho ou profundidade, havendo a necessidade de infraestrutura de um hospital, internações e anestesiistas, aumentando os custos para o tratamento. Na cirurgia normalmente é removido um volume maior do que a região tumoral como margem de segurança. Com esse procedimento pode-se comprometer a função e anatomia do órgão bem como se compromete a autoestima do paciente e sua relação social.

Neste sentido a comunidade científica tem realizado estudos propondo alternativas no tratamento de alguns tipos de câncer. Dentro deste contexto a terapia fotodinâmica (TFD ou em inglês Photodynamic Therapy – PDT) tornou-se uma alternativa no tratamento do câncer já que apresenta diversas vantagens sobre os métodos tradicionais de tratamento de neoplasias malignas como, por exemplo; dano seletivo às células malignas e efeitos colaterais menos agressivos e controlados, já que se trata de um tratamento local e não sistêmico.

No Brasil atualmente existe um programa de Terapia Fotodinâmica para o tratamento do câncer de pele que consiste na implantação de centros clínicos de tratamento pelo país afora. Este programa é financiado pelo BNDES com a participação de empresas como a MMOPTICS e PDTPHARMA, possibilitando o desenvolvimento de

equipamentos e medicamentos respectivamente. A implantação da TFD possibilita atender uma grande parte da população necessitada de tratamento alternativos, diminuindo custos na rede do SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE –SUS bem como diminuindo os procedimentos de mutilação em pacientes que ocorre frequentemente em procedimentos cirúrgicos (BAGNATO,2015).

A TFD é uma modalidade de tratamento que tem principal aplicação no tratamento de lesões tumorais malignas e não malignas. Mas também têm aplicações na fotoinativação microbiana como no caso da desinfecção bucal, na eliminação de larvas do mosquito da dengue, no tratamento da onicomicose, e na área estética voltada para o tratamento das disfunções estéticas faciais (acne, rugas e linhas, cicatrizes e manchas) (BAGNATO, 2015).

E na TFD tópica temos os precursores metabólicos da protoporfirina IX (PPIX) com destaque para o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seus derivados, que podem ser incorporados em emulsões e usados em forma de creme para aplicação tópica. Os estudos utilizando o ALA e derivados de aplicação tópica permitiu um grande avanço da TFD na dermatologia, em que o ALA e seu derivado metil-5-aminolevulinato (MAL) são os mais utilizados na área dermatológica (TOREZAN, 2009).

A TFD na dermatologia juntamente com os precursores da PPIX, vem sendo utilizada para tratamento e diagnóstico de diferentes tipos de tumores de pele e esta ocupando um espaço cada vez maior na área dermatológica no tratamento de outras doenças de pele como da acne vulgar severa, infecções por vírus de papiloma humano (HPV), psoríase e na inativação de fungos e bactérias. Além disso, deve-se enfatizar que cada vez mais o ALA tem sido aplicado no tratamento do rejuvenescimento da pele visto que atua diminuindo as rugas e linhas de expressões, a hiperpigmentação assim como as telangiectasias, atuando na prevenção e tratamento do envelhecimento celular (AGOSTINI et al, 2011), (UEBELHOER e DOVER, 2005).

A TFD para câncer de pele atinge 90% da eliminação tumoral com um ciclo de tratamento. Porém é necessário obter melhorias no tratamento, como a compreensão da permeação do creme na pele e da taxa de produção da PPIX nas camadas da pele, epiderme e derme. Todavia, na TFD tópica existe a limitação da permeação desses precursores na pele normal, já que o estrato córneo funciona como uma barreira

seletiva e impermeável, bem como a consequente formação da PPIX através das camadas da pele em quantidade e homogeneidade.

Dessa forma o grande problema desta aplicação tópica concerne à permeação destes pró-fármacos na pele, visto que tanto a pele tumoral e a pele sadia envelhecida apresentam alterações na barreira de proteção da pele. Assim como a pele jovem, não envelhecida que apresenta o extrato córneo funcional quanto a sua barreira de proteção efetiva (permeabilidade seletiva) dificultando a permeação de substância através da pele (via transdérmica). A presença de tumores de pele bem como o próprio envelhecimento leva a modificações no processo de renovação celular levando a uma hiperqueratinização que também diminuem a permeabilidade de substâncias através da pele.

Neste contexto configura-se que a aplicação tópica em TFD ainda é uma questão delicada e merece atenção quanto a pesquisas que realmente viabilizem a aplicação tópica (superficial) e transdérmica (nas camadas da pele) elevando cada vez mais a aplicação desta terapêutica no tratamento do câncer e envelhecimento celular da pele.

As limitações da aplicação tópica e transdérmica da TFD quanto à baixa penetração do ALA e seus derivados na pele leva consequentemente a um baixo efeito fotodinâmico. Com isso avaliar a formação da PPIX na pele por meio de técnicas de fluorescência podem elucidar o conhecimento da permeação do precursor na pele e sua consequente indução da formação do precursor endógeno da PPIX (VALENTINE et al., 2011).

Entre os fatores que influenciam na penetração do ALA e seus derivados na pele resumem-se em: características físico-químicas da molécula bem como do tipo de veículo que o mesmo se encontra, características do sistema de irradiação e dosimetria de luz adequada, características da superfície tumoral e finalmente a aplicação conjunta de técnicas mecânicas que favorecem a penetração destes precursores de PPIX na pele.

Atualmente as tecnologias disponíveis para a otimização da TFD resume-se em dispositivos mecânicos como, aplicação conjunta com microrolers ou microagulhas,

aplicação de pressão negativa, tape stripping, sistemas de injeção de alta pressão sem agulha, ultra-som, laser de Er: YAG (MENEZES, REQUENA e BAGNATO, 2014).

Melhorar a tecnologia de veiculação destes pró-fármacos (ALA e seus derivados) de aplicação tópica e transdérmica leva a impactos positivos no tratamento do câncer de pele o que torna pesquisas nesta área de extrema importância e relevância científica levando a TFD a um novo patamar de terapia efetiva e alternativa as outras utilizadas que apresentam efeitos indesejáveis.

A proposta deste trabalho consiste na utilização da associação do ALA e MAL, em diferentes proporções em determinado tipo de emulsão (creme), e assim avaliar a produção de PPIX (superficial e em camadas mais profundas), distribuição (uniformidade e homogeneidade) e o dano fotodinâmico causado no tecido irradiado após 24 e 48 horas. Este trabalho foi realizada em modelo de pele suína que apresenta-se mimético a pele humana sugerindo deste modo elevada capacidade de predição dos resultados em humanos.

A relevância deste estudo consiste em conseguir uma proporção capaz de agregar os benefícios do ALA, quanto à elevada produção de PPIX na pele sugerindo maior dano fotodinâmico consequentemente, e os benefícios do MAL relativo à maior permeação no tecido biológico.

Neste contexto o efeito sinérgico e ou antagônico da associação das moléculas de ALA e MAL em diferentes proporções em formulação tópica (creme) foram avaliadas. A melhor mistura entre ALA e MAL foram avaliadas quanto à capacidade de produzir PPIX em quantidade, homogeneidade (superfície e profundidade) e em menor tempo de incubação (cinética); utilizando para isso técnicas óticas (espectroscopia de fluorescência, imagem de fluorescência de campo amplo e microscopia confocal de fluorescência) e histológicas para avaliação do dano fotodinâmico após a TFD. A associação destes dois compostos na mesma formulação para a aplicação da TFD tópica apresenta novas possibilidades e resultados potencialmente satisfatórios para a terapia.

1.1 Terapia Fotodinâmica

A TFD depende de uma fonte de luz, fotossensibilizador (FS) e do oxigênio molecular, no qual o FS é uma molécula fotossensível, que quando aplicado em um tecido alvo e exposto a uma fonte de luz de comprimento de onda específico faz com que o oxigênio presente nos meios biológicos apresente um efeito citotóxico na célula (MENEZES, 2006).

Dessa forma o mecanismo da TFD consiste na interação da luz de comprimento de onda adequado para o FS, e o oxigênio, resultando na morte do tecido alvo por necrose ou apoptose. No diagrama de Jablonski adaptado (Figura 1) estão os detalhes dos níveis energéticos de um FS e possíveis eventos que podem ocorrer quando a molécula de FS absorve energia a partir de um fóton.

Figura 1 - Diagrama de Jablonski adaptado, mostrando os níveis energéticos de um FS ao ser excitado, e possíveis eventos que ocorrem com a molécula ao absorver energia de um fóton. Adaptado de: Grecco (2009).

O FS se encontra no estado fundamental, estado singlete (S_0), e quando absorve um fóton é excitado para um estado eletrônico (S_n) de maior energia. Após o elétron alcançar o menor nível vibracional do estado eletrônico (S_1), por conversão interna (CI) o FS pode sofrer decaimento, retornando para o estado (S_0) emitindo fluorescência. E ainda no estado (S_1) pode ocorrer o cruzamento inter-sistema, em que

o FS passa para o estado tripleto excitado (T_1), assim o FS nesse estado pode decair para o estado (S_0) emitindo fosforescência.

O FS no estado tripleto excitado (T_1) pode sofrer duas reações: a reação tipo I, o FS no estado excitado pode reagir abstraindo um átomo de hidrogênio de uma molécula o substrato biológico (fosfolipídios, colesterol, proteínas entre outros) ou transferindo elétrons, gerando íons radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental resultando em produtos oxidados responsáveis pela cadeia de radicais livres gerados (O_2^- , H_2O_2 ou OH) que provocam lesões celulares e a subsequente morte da célula; a reação tipo II, o FS no estado tripleto transfere energia ao oxigênio no estado fundamental (tripleto) produzindo oxigênio singleto que é uma espécie reativa de oxigênio altamente citotóxica, com isso retornando para o estado fundamental (COLUSSI, 1996). Portanto observa-se que a TFD depende da oxigenação do tecido, e isso é um dos fatores que limitam a técnica, bem como a dificuldade de quantificar as propriedades ópticas da região do tecido que necessita de tratamento, a distribuição da luz no tecido e a concentração do FS.

A protoporfirina IX (PPIX) apresenta alta absorbância na região do ultravioleta (banda de Soret) e outras regiões do verde e vermelho (bandas Q). Apesar das bandas Q apresentarem picos menores, muitos estudos da TFD são realizados utilizando fonte de luz na região do vermelho (630-640 nm), região que apresenta maior penetração no tecido, alcançando camadas mais profundas da pele. As bandas de absorbância da PPIX estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Espectro de absorvância da PPIX, apresentando absorvância na região do ultravioleta (banda de Soret) e nas regiões do verde e vermelho (bandas Qs). Adaptado de: Torezan (2009).

A Figura 3 mostra a absorvância dos principais cromóforos presentes na pele e observa-se que a água, é um dos principais constituintes do tecido e possui alta absorvância acima de 900nm. Dessa forma a janela óptica biológica está na faixa de 600 a 1200 nm, região onde a penetração da luz no tecido é máxima. Com isso novos FSs têm sido sintetizados com a finalidade de aumentar ou deslocar bandas de absorvância para a região da janela óptica biológica, infravermelho, evitando assim a absorção do tecido biológico para comprimentos de ondas mais curtos (mecanismos competitivos com melanina e hemoglobina) bem como em comprimentos de onda elevadas aonde a absorção da água é intensa (MENEZES, 2006), (BAGNATO, 2015).

Figura 3 – (A) Absorbância relativa em função do comprimento de onda, indicando a região da janela óptica biológica. Fonte: Plaetzer (2008). (B) Propagação da luz dentro do tecido. Adaptado de: Agostinis et al. (2011).

1.2 Precusores da PPIX – ALA e MAL

Os principais FSs eficazes na TFD no tratamento do câncer de pele não melanoma são os de primeira geração, derivados de porfirina, incluindo as hematoporfirinas, porém a fotossensibilidade cutânea prolongada com o uso destas drogas sistêmicas fez com que os mesmos fossem substituídos por FSs tópicos. Com isso novas drogas foram desenvolvidas, como o ácido 5-aminolevulínico (ALA), uma substância tópica precursora da porfirina endógena (PPIX). Assim, o ALA quando aplicado topicamente é capaz de induzir fotossensibilidade localizada e seletiva na área a ser tratada (KENNEDY e POTTIER, 1992).

A TFD na dermatologia normalmente baseia-se na aplicação tópica de precursores da PPIX como o ALA e seus derivados, no qual esses compostos são indicados para a aplicação da TFD com irradiação na região de comprimento de onda na faixa do vermelho (entre 630-640 nm). Todavia o ALA e derivados não são fotossensibilizadores propriamente dito, e sim substâncias precursoras da hematoporfirina endógena.

O ALA e derivados vem sendo estudado a nível tópico como um pró-fármaco associado à TFD. A penetração do ALA na pele difere em um tecido normal de um tumoral já que o ALA pode permear com facilidade na epiderme do tecido tumoral, devido principalmente ao metabolismo alterado, mas não através da epiderme normal, permitindo então a fotossensibilização altamente seletiva no tecido tumoral. No entanto é importante salientar que o tecido tumoral é caracterizado por uma diversidade celular apresentando-se como heterogêneo. Isto é, as células no tecido tumoral, apresentam-se morfológicamente diferente uma das outras. Além disso, em um tecido tumoral encontramos células cancerígenas e normais. Todas estas diferenças interferem significativamente na incorporação e ou penetração do ALA na pele (DONNELLY et al, 2005), (ZHANG et al, 2011). Outro ponto importante a se levar em consideração na permeabilidade do ALA na pele tem relação com a profundidade da lesão tumoral e a espessura da pele (GIUNTINI et al, 2008), (MAISCH et al, 2010).

O ALA é sintetizado no interior das células por meio do mecanismo da biossíntese do grupo Heme. E o MAL é um composto derivado do ALA, na qual a diferença em sua estrutura química está na molécula metil (CH_3), obtendo uma característica lipofílica que apresenta a vantagem de maior permeação no tecido. A estrutura química do ALA, MAL e PPIX está representada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura química do ALA, MAL e PPIX.

O ALA é captado na membrana plasmática da célula por transporte ativo e convertido em PPIX após ser difundido dentro das células. O ALA é sintetizado no interior da mitocôndria, a partir da glicina e succinil – CoA, Já no citoplasma da célula, a enzima ALA-deshidratase induz 2 moléculas de ALA para produzir 2 moléculas de água e porfobilinogênio (PBG), Assim, a junção de 4 moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio III, que é convertido em coproporfirinogênio III e exposto à enzima coproporfirina oxidase III, produzindo protopofirinogênio IX. E pela ação da protopofirinogênio oxidase, ele é convertido em PPIX, formando o Heme devido a presença do ferro. Porém na presença de excesso de ALA caracterizado pela aplicação

de um precursor da PPIX, a PPIX se acumula devido a atividade lenta da ferroquelatase.

O MAL quando aplicado topicamente, a molécula é rapidamente hidrolisada em ALA e sofre o mesmo processo de sintetização do ALA. A Figura 5 mostra o mecanismo simplificado da síntese do ALA na biossíntese do grupo Heme.

Figura 5 - Mecanismo da síntese do ALA na biossíntese do grupo Heme. O ALA é sintetizado a partir da glicina e succinil-CoA. Após ser metabolizado por diferentes enzimas é convertido em PPIX. Adaptado de: Torezan (2009).

A limitação na penetração do ALA pelo estrato córneo e membranas celulares é devido a sua natureza hidrofílica em pH fisiológico, com isso a formação da PPIX é restrita as camadas superficiais do tecido. Já o MAL em estudos demonstrou maior penetração em lesões cancerosas devidas sua natureza lipofílica e seu transporte por aminoácidos apolares por meio da difusão passiva, facilitando a capacidade de atravessar as barreiras biológicas atingindo maiores profundidades no tecido desejado, porém, a produção de PPIX não é tão expressiva como no ALA (LOPEZ et al.,2004), (PENG et al., 2001).

Dessa forma a diferença entre o ALA e o MAL está na quantidade de produção de PPIX nas diferentes camadas da pele e a capacidade de atravessar as barreiras biológicas da pele devido seu caráter hidrofílico ou lipofílico (LOPEZ, 2004).

1.3 Processos de cicatrização e reparo tecidual

O processo cicatricial da pele e reparo tecidual acontece mediante a um dano ou falso estímulo na pele capaz de desencadear diferentes etapas (Figura 6) que levam ao reparo tecidual como pode ser observado na Figura 6 abaixo.

Figura 6 - Ilustração do processo de reparo do tecido nas diversas camadas da pele, mostrando o número de dias relativo às principais células durante as três fases do processo de cicatrização. Fonte: Isaac et al. (2010).

As fases do processo cicatricial dividem-se em 3 grandes fases: 1) fase inflamatória, 2) fase proliferativa e 3) fase de remodelamento ou remodelação.

Imediatamente após o surgimento da ferida ou dano inicia-se o processo de coagulação altamente dependente da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. E posteriormente inicia-se a fase inflamatória (ISAAC et al., 2010).

1.3.1 Fase inflamatória

Na Fase Inflamatória (até 4 dias) ocorre o recrutamento de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), os macrófagos e os linfócitos. Os PMN chegam ao momento da injúria e são responsáveis pela fagocitose das bactérias. Também é recrutada maior quantidade de macrófagos, que possuem a função de produzir fatores de crescimento - TGF- β , TGF- α , fatores de crescimento dos fibroblastos, entre outros – promovendo a proliferação da células e a síntese da matriz extracelular (MEC). Os fatores de crescimento possuem a função de acelerar ou prejudicar o processo de cicatrização pela sua atividade imunomoduladora (RAMIREZ, 2012).

1.3.2 Fase de proliferação

A Fase Proliferativa (4 a 14 dias) que sucede a fase de intensa inflamação é subdividida em 3 subfases e é responsável pelo “fechamento” da lesão:

1) Reepitelização: Fase em que ocorre a migração dos queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais levando a reconstrução da epiderme e conseqüentemente das papilas dérmicas (maior integração entre epiderme e derme). Os fatores de crescimento são recrutados na fase inflamatória e permanecem na fase proliferativa e são responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio já que induzem a diferenciação e proliferação celular das células epiteliais - queratinócitos (BALBINO, 2005), (ISAAC et al., 2010).

2) Fibroplasia e formação da matriz: Fase extremamente importante na formação do tecido de granulação, tecido este formado por diferentes tipos de células, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, extracelular com as biomoléculas fibronectina, glicosaminoglicanas, elastina, ácido hialurônico, colágeno e outros. Nesta fase ocorre a neocolagenese processo que dá

origem ao novo colágeno na pele seguido da degradação do colágeno velho da pele. No caso damos ênfase à formação do colágeno, pois o mesmo apresenta-se em torno de 70% quando comparado a outras biomoléculas da derme, mas em paralelo as outras biomoléculas mencionadas acima também são formadas (BALBINO, 2005), (ISAAC et al., 2010).

A formação do tecido de granulação depende das células de fibroblasto, responsável pela formação de todas as biomoléculas da derme responsáveis pelo desbridamento (remoção da necrose, do tecido morto) e remodelamento fisiológico.

3) Angiogênese: Fase em que ocorre a formação de novos vasos estes essenciais para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Após a fase de proliferação sucede-se o processo de contração da ferida levando ao movimento centrípeto das bordas (BALBINO, 2005), (ISAAC et al., 2010).

1.3.3 Fase de remodelamento

A fase de remodelamento ou remodelação (8 a 21 dias, 1 mês, 3 meses a 1 ano) é a última fase do processo cicatricial que vai gerar consequentemente o reparo tecidual. Esta fase ocorre principalmente na derme onde o colágeno III (fibras frouxas e menos densas) formado na fase de proliferação (neocolagenese) é substituído pelo colágeno I (fibras compactas e mais densas). Este processo inicia-se após em média 8 dias e ocorre na derme estruturando todas as biomoléculas da matriz extracelular, e permanece por meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Responsável pela reorganização e estruturação das fibras de colágeno e na melhoria nos seus componentes e na reabsorção de água (BALBINO, 2005).

As fases do reparo tecidual não apresentam início e final definido, às mesmas se sobrepõem umas às outras, como se observa na Figura 7.

Figura 7 - Fases do processo de reparo tecidual pelo tempo, mostrando que as fases se sobrepõem umas as outras. Adaptado de: Isaac (2010).

2 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem por objetivo aumentar a eficiência e a eficácia da aplicação tópica da terapia fotodinâmica, associando ALA e MAL, aumentando a formação da PPIX na pele.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Avaliação do processo do reparo tecidual na superfície da pele suína *in vivo* (dano macroscópico) induzido pela terapia fotodinâmica ao longo de 8 dias (avaliação do processo cicatricial).
- 2) Padronização do método de estudo em pele de porco suína *in vivo* utilizando-se técnicas óticas e histológicas;
- 3) Avaliação da formação de PPIX após 3 horas (incubado) e durante 5 horas (estudo cinético) de aplicado as amostras por espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo em pele suína *in vivo*.
- 4) Avaliação da produção de PPIX após 3 horas de aplicado as amostras por imagem de fluorescência de campo amplo em biopsias de pele suína;
- 5) Avaliação macroscópica (superfície da pele - visual) e microscópica (histologia) do reparo do tecido induzido na pele suína *in vivo* pela terapia fotodinâmica após 24 e 48h.
- 6) Avaliação da formação de PPIX nas diferentes camadas da pele por microscopia confocal de fluorescência após 5 e 7 horas de incubação com ALA, MAL e misturas em aplicação tópica em creme em pele de porco *ex vivo* cultivadas *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substâncias utilizadas para aplicação tópica da TFD

Os precursores metabólicos da PPIX utilizados foram o ácido 5-aminolevulínico e o seu derivado metil aminolevulinato (ALA e MAL) na concentração 20%. Ambas as substâncias foram obtidas de forma comercial com a PDT-PHARMA (Cravinhos, São Paulo - Brazil) e foram utilizadas de acordo com recomendações.

As diferentes proporções de ALA e MAL em pó foram solubilizadas diretamente nos cremes (emulsões) em base óleo e água (O/A) e água em óleo(A/O).

Os cremes foram preparados com menos de vinte e quatro horas antes de realizar o experimento sendo conservado na geladeira em frascos não transparentes para que não ocorresse a oxidação dos componentes interferindo consequentemente no estudo. Para certificar que as amostras não sofressem oxidação durante a semana em que realizamos os experimentos medimos o pH das amostras durante quatro dias e não houve alteração do pH.

Foram preparadas sete amostras para cada tipo de base sendo uma contendo somente ALA e outra MAL, e o restante misturando ALA em MAL em proporções massa a massa, como descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das proporções massa a massa do ALA e MAL nas amostras avaliadas na pesquisa.

Amostras	ALA (%relativa)	MAL (%relativa)
ALA	100	0
M2	80	20
M3	60	40
M4	50	50
M5	40	60
M6	20	80
MAL	0	100

3.2 Emulsões

Os cremes utilizados neste trabalho foram emulsões com caráter mais hidrofílico com fase externa aquosa de maior volume (emulsão óleo em água – O/A) e outra com caráter mais oleoso, com fase externa oleosa de maior volume (emulsão água em óleo – A/O).

3.2.1 Emulsão óleo em água (O/A)

A emulsão O/A já é bem utilizada em vários trabalhos clínicos do grupo de Óptica (IFSC-USP). A emulsão óleo em água (O/A) de fase externa de maior volume em água apresenta: água (~60-70%), óleos, manteigas e álcoois graxos (~5%), agente emulsificante (O/A) próximo a 20%, conservantes, agente viscosidade como gomas, polímeros, silicones e álcoois graxos (~15%), agentes umectantes (glicerina) e hidratantes (ureia e propilenoglicol), BHT (0,05%), EDTA (0,15%) e DMSO (5%).

3.2.2 Emulsão água em óleo (A/O)

A emulsão água em óleo (A/O) de fase externa de maior volume em óleo apresenta: água (~40-50%), óleos, manteigas e álcoois graxos (20%), agente emulsificante (A/O) ~ 20%, conservantes, agente viscosidade como gomas, polímeros, silicones e álcoois graxos (~25%), agentes umectantes (glicerina) e hidratantes (ureia e propilenoglicol), BHT (0,05%), EDTA (0,15%) e DMSO (5%).

A ideia de testar uma emulsão A/O com fase externa de maior volume em óleo foi avaliar a influência do aumento da carga oleosa na lipofilicidade da molécula do

MAL, ajudando tanto na produção da PPIX na superfície quanto na camada mais interna da pele. Além disso; tentar melhorar os parâmetros de produção de PPIX nas camadas da pele para as misturas.

Neste sentido, a ideia foi avaliar as diferenças quanto à formação de PPIX e o dano fotodinâmico induzido nas duas emulsões verificando se a concentração de ALA e MAL na mistura seria influenciada pelo tipo de característica química da emulsão. E se a mistura que apresenta o melhor comportamento em uma emulsão mais hidrofílica deverá apresentar-se melhor desempenho também em uma emulsão mais lipofílica.

Figura 8 - Ilustração da diferença da fase interna e externa das emulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A).

3.3 Protocolo de anestesia

O protocolo de anestesia foi realizado da seguinte forma; primeiramente foi administrado via intramuscular a associação de quetamina (12 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg) e acepromazina (0,1 mg/kg). Após dez minutos foi possível levar o animal sedado para a sala de experimento, onde foi colocado um cateter 22G na veia auricular para a administração de drogas. A anestesia foi induzida com propofol (4 mg / kg), os animais foram entubados com um tubo endotraqueal de 6,5 mm, e a anestesia foi mantida em 1,0 a 1,5% de isoflurano diluído em 100% de oxigênio (1 L / min), sob ventilação espontânea. Os animais foram colocados em decúbito esternal e uma infusão de associação de morfina (10 mg), cetamina (15 mg) e lidocaína (150 mg) diluída em 500 ml de NaCl a 0,9% foi realizada a uma taxa de 10 ml / kg / h. Eletrocardiograma, pressão arterial invasiva, saturação periférica de oxigênio temperatura retal, frequência respiratória e dióxido de carbono expirado foram monitorados. Para manter a pressão arterial acima de 60 mmHg, a dobutamina foi administrada como uma infusão intravenosa (1-5 mg / kg / min). Após o procedimento da TFD, administrou-se o tramadol (4mg / kg IM) e meloxicam (0,2 mg / kg SQ) para analgesia pós-tratamento. O vaporizador de isoflurano foi desligado e os animais foram extubados. Deve-se enfatizar que o tramadol foi administrado a cada 8 horas e meloxicam a cada 24 horas até que os animais fossem eutanasiados. Os animais após retornarem da anestesia permaneceram em ambiente adequado, localizado na suinocultura, para posterior eutanásia com o mesmo protocolo de imobilização química descritos anteriormente e de 30 mg / kg de propofol (IV) após 24 e ou 48h.

3.4 Técnicas de fluorescência

3.4.1 Sistema de espectroscopia de fluorescência

Para a aquisição dos dados espectrais foi utilizado o sistema desenvolvido pelo Grupo de Óptica (IFSC/USP) que consiste de uma maleta contendo um espectrofotômetro (USB2000, Ocean Optics, Orlando, FL, EUA) acoplado a um notebook. O sistema de espectroscopia de fluorescência é composto por dois lasers para excitação, um emitindo em 408 nm e outro em 532 nm. A sonda de investigação em Y, possui uma fibra óptica de 600 μm de diâmetro que direciona o laser de excitação para o tecido e outra de mesma dimensão que coleta a luz re-emitida pelo tecido e entrega ao espectrofotômetro. Um filtro foi usado para remover a luz retroespalhada para que apenas a fluorescência seja coletada. O software para a aquisição dos dados permite que o tempo de exposição da medida seja controlado, evitando a saturação das medidas pela sensibilidade da coleta de luz por fibra óptica. A fibra óptica acoplada ao espectrofotômetro permite coletar a intensidade da luz de forma pontual, então para cada tempo de investigação foram realizada cinco leituras por mistura e autofluorescência, e foram considerados os valores médios obtidos em cada tempo de coleta (Figura 9).

(A)**(B)**

Figura 9 - (A) Sistema de espectroscopia de fluorescência. (B) Momento da coleta dos espectros da autofluorescência da pele do suíno através do sistema de espectroscopia de fluorescência.

Com as análises de fluorescência foi feito um acompanhamento da formação e da degradação da PPIX visando melhorar os parâmetros de tratamento, como o tempo adequado entre a aplicação de cada fotossensibilizador e a irradiação do tecido epitelial. E por meio da espectroscopia de fluorescência para o ALA e seu derivado MAL observou-se um espectro contendo 2 bandas, uma com emissão de fluorescência maior em ~636nm e outra banda menor em ~700nm (Figura 10).

Figura 10 - Espectro de fluorescência coletado após 3 horas da aplicação do ALA e MAL na pele do suíno.

As análises dos espectros de fluorescência foram avaliadas usando o programa OriginPro (© OriginLab Corporation), e como houve deslocamentos entre os espectros coletados para mesma amostra, então realizou-se a normalização dos espectros.

Primeiramente foi realizada uma linha de base para os cinco espectros coletados para cada amostra selecionando os pontos no comprimento de onda de 350-450 nm, assim calculou-se a média entre esses pontos e subtraímos os espectros pela média. Após, foi feito a normalização pela área total, integrando os espectros nos pontos de 450-800 nm e dividindo os espectros pela própria área. Em seguida foi realizada a subtração da autofluorescência normalizada (igualmente os passos anteriores) pelos os espectros de fluorescência normalizados. E feito a integral nos pontos da 2ª banda de emissão (660-720 nm) da fluorescência da PPIX, pois essa banda de emissão havia menos descolamento. Após fazer para todas as misturas foi calculado a média e erro padrão dos espectros entre os animais, e, também foi realizado um teste estatístico, ANOVA test (0.05%) para as misturas.

Para o estudo da cinética ao longo de 5 horas foi realizado o mesmo procedimento mencionado acima com os espectros de fluorescência coletados a cada

hora. A análise das curvas de crescimento e degradação da PPIX foi também realizado utilizando o programa OriginPro o *fitting* que mais se adequava as curvas das sete amostras. Foram fixados parâmetros iniciais (zero), e o parâmetro final dependendo do tipo da emulsão usada na coleta dos espectros de fluorescência. Depois de fixados os parâmetros, obtivemos o índice de fluorescência médio (IF_{50}), que significa o tempo necessário para atingir a metade da fluorescência (50%) em 5 horas.

3.4.2 Sistema de imagem de fluorescência de campo amplo

Para a aquisição das imagens da autofluorescência da pele suína e a fluorescência após a aplicação dos cremes foi utilizado um sistema de diagnóstico por imagem de campo amplo de fluorescência, tal sistema foi confeccionado em nosso Laboratório de Biofotônica (Grupo de Óptica, IFSC/USP) e atualmente tornou-se um dispositivo comercial sendo chamado de EVINCE (MMOPTICS).

O equipamento consiste em sistemas de irradiação, arranjo de filtros e espelhos e sistema de detecção. O sistema de imagem por campo amplo é constituído por um dispositivo de irradiação à base de LEDs, emitindo na região de 405 nm e 450 nm, filtro passa-alta (a partir de 475 nm, garante que a luz residual da excitação não vá para a câmera), espelho dicroico (transmissão em 480-560 nm e reflexão nas bandas de 350-460 nm e 560-625 nm, permiti que apenas a luz vinda da fluorescência seja transmitida), filtro passa-banda (390-460 nm que determina a região da fonte de luz para excitação), e uma câmera fotográfica digital (SONY CyberShot®, modelo DSC-H50) para aquisição de imagens. A câmera fotográfica usada no sistema é semiprofissional de 9,1 megapixels de resolução, zoom óptico de 15 vezes e foi acoplada a uma lente macro (Carl Zeiss).

A Figura 11A mostra o equipamento para a aquisição das imagens de fluorescência de campo amplo. E a Figura 11B mostra o momento da coleta da imagem da fluorescência da pele do animal.

Figura 11 - (A) Sistema de diagnóstico por imagem de fluorescência de campo amplo (Evince, MM Optics, Brasil) acoplado a câmera fotográfica. (B) Momento da coleta da imagem da autofluorescência da pele suína com o sistema de diagnóstico por imagem de fluorescência de campo amplo.

As imagens foram coletadas antes de aplicar os cremes (autofluorescência), durante a produção da PPIX (fluorescência) a cada hora por 5 horas (estudo da cinética), e 3 horas após a aplicação do creme antes de realizar a irradiação o tratamento com luz vermelha em 630nm (TFD). A Figura 12A mostra a imagem de autofluorescência e a Figura 12B mostra a imagem de fluorescência coletada após 3 horas de aplicação do ALA (emulsão O/A), adquiridas pelo sistema de imagem de campo amplo.

Figura 12 - (A) Imagem da autofluorescência e (B) imagem da produção da PPIX adquirida pelo sistema de imagem de fluorescência de campo amplo.

Com essa técnica obtivemos a imagem da fluorescência emitindo na região do vermelho e da autofluorescência emitindo na região do verde, isso ocorre devido a molécula da PPIX ser excitada na região próxima a 405 nm. As análises das imagens adquiridas pelo sistema de imagem de fluorescência por campo amplo foram avaliadas quantitativamente usando uma rotina escrita no programa Matlab® (The Math Works, EUA). O programa definiu uma matriz separando os canais vermelhos, verde e azul (RGB) e somou as intensidades dos pixels das imagens de autofluorescência e fluorescência. Os dados da intensidade de pixels nos proporcionou avaliar a fluorescência emitida pela aplicação dos fotossensibilizadores.

E para minimizar a influência da região verde da autofluorescência, da produção heterogênea de PPIX, e compensar os efeitos de diferentes tempos de exposição e configurações de ISO durante a aquisição das imagens foi feita a normalização por meio da razão do canal vermelho pelo canal verde. E assim a fluorescência emitida (intensidade de pixels) foi obtida pela soma das intensidades do canal vermelho dividido pela soma das intensidades do canal verde.

Com esse sistema foi realizada outra análise em que retiramos fragmentos da pele com punch (diâmetro= 3 mm, profundidade $\approx$ 5mm) e analisamos a produção da PPIX nas camadas da pele após 3 horas da aplicação dos cremes. Com as imagens das biopsias da pele analisou-se o perfil da produção da PPIX na derme e epiderme,

traçando perfis de intensidades da região do vermelho ao longo da biopsia formada pela permeação dos cremes, para isso foi realizado uma rotina no Matlab. A Figura 13A mostra a autofluorescência da biopsia retirada da pele do animal e como foram traçado os perfis de intensidades ao longo da biopsia e, Figura 13B representa a média dos perfis de intensidades pela profundidade da pele.

Figura 13 - (A) Biopsia sem tratamento retirada da pele do animal, autofluorescência, e os traços dos perfis de intensidades. (B) Média dos perfis de intensidade da autofluorescência pela profundidade da pele.

3.4.3 Sistema de microscopia confocal de fluorescência

Para o experimento *in vitro* foram retirados fragmentos da pele suína e acondicionadas em solução de meio de cultura (DMEM) por 24 horas. Após esse período, os fragmentos de pele foram transferidos para placas de cultura de células de 24 poços em meio de cultivo onde cada fragmento recebeu a aplicação das amostras em emulsão O/A na superfície e o volume de aplicação dos cremes foram $0,2 \text{ cm}^2$ e $0,35 \text{ mg/cm}^2$, respectivamente.

Os fragmentos de pele já com o creme ficaram incubados por 3, 5, 7 horas. Dado o tempo de incubação, retiraram-se os fragmentos de pele da placa de cultura, um fragmento de pele para cada amostra de creme, e congelou-se com nitrogênio líquido e um gel crioprotetor, chamado tissulyser, para serem então cortadas no criostato (50 μ m) e colocadas na lamina para posterior análise da produção de PPIX no microscópio confocal fluorescente.

A Figura 14 ilustra as etapas para a preparação da pele *ex vivo* para a aplicação do ALA, MAL e misturas.

Figura 14 - Procedimento experimental para avaliação da permeação *in vitro* com pele *ex vivo*.

O sistema de imagem para o estudo de permeação *in vitro* foi realizado em um microscópio confocal invertido para detecção da fluorescência (Zeiss – LSM780, Zeiss, Jena, Germany). As imagens foram obtidas utilizando uma luz laser de diodo (405 nm) e o sinal de fluorescência foi coletado em dois canais, um 430-580 nm (cor verde), para fluorescência endógena, e outro 630-670 nm para detecção da fluorescência da PPIX (cor vermelha). Todos os parâmetros tais como a intensidade do laser, ganho e o contraste de detecção foram os mesmos para todas as imagens. A Figura 15 mostra

uma imagem ilustrativa do sistema de microscopia confocal de fluorescência e o software de aquisição de imagem.

(A)

(B)

Figura 15 - (A) Sistema de microscopia confocal de fluorescência e software de aquisição de imagem, (B) e procedimento de leitura no microscópio confocal.

Para analisar as imagens adquiridas por esse sistema foi realizada uma rotina no Matlab para aquisição de perfis de intensidade de fluorescência nas camadas da pele, bem semelhante à rotina realizada para a análise das biopsias *in vivo* adquiridas pelo sistema de imagem de fluorescência de campo amplo. No Matlab selecionamos três perfis em toda extensão das imagens (Figura 16A), esses perfis detectam somente canal vermelho, e a partir daí obtivemos a média desses perfis de intensidade de fluorescência pela extensão das camadas da pele, profundidade (Figura 16B).

Figura 16 - (A) Imagem controle adquirida por microscopia confocal e tratada no programa da ZEN e a demonstração dos perfis de intensidade realizados pela rotina do Matlab. (B) Gráfico da média dos perfis de intensidade pela profundidade.

3.5 Sistema para o tratamento da terapia fotodinâmica (TFD)

O sistema empregado para a TFD é constituído por um laser com emissão em 630 nm (Lince, MM Optics, Brasil) e um dispositivo à base de LEDs centrados em 630 nm. A intensidade de 125 mW/cm^2 e dose de 150 J/cm^2 foram utilizadas para as áreas de tratamento, durante o tempo de 20 minutos (Figura 17).

Figura 17 - (A) Lince, sistema para diagnóstico e para a terapia fotodinâmica. (B) Dispositivos para terapia fotodinâmica avulsos, “canetas”. (C) E momento do tratamento utilizando o sistema Lince e “canetas”.

3.6 Estudo piloto *in vivo*

Primeiramente, foi realizado um estudo piloto com o animal de espécie suína, e esse estudo favoreceu a padronização do protocolo de TFD em modelo de pele suína *in vivo*.

Neste estudo avaliou-se por meio de medidas de fluorescência a formação da PPIX utilizando-se creme de ALA, MAL e as misturas de ambos. Os animais foram tricotomizados na região dorsal e estabeleceu-se áreas circulares de 1 cm de diâmetro para aplicação das amostras em triplicatas como mostrado na Figura 18. Após 3 horas da aplicação das amostras, realizou-se a terapia fotodinâmica e o acompanhamento da evolução do processo cicatricial pós-TFD realizado por meio de imagens macroscópicas e microscópicas (histológicas) durante 8 dias.

O estudo piloto foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Campus Botucatu, em parceria com o Prof^o Dr. Dirlei Antonio Berto.

Figura 18 - Marcação em triplicatas das áreas de 1 cm de diâmetro, onde foram aplicados os cremes no dorso do suíno no estudo piloto.

Em vista de algumas dificuldades encontradas ao longo do estudo piloto resolveu-se realizar os experimentos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Campus Jaboticabal onde ocorreu uma parceria com profissionais veterinários. Para então desenvolver a pesquisa o projeto foi encaminhado ao Comitê de ética do Uso de Animais - FCAV – UNESP-Jaboticabal sendo posteriormente aprovado (protocolo nº 007344/13).

3.7 Aplicação das amostras na pele do animal

Os experimentos foram realizados no animal de espécie suína e da raça derivada do cruzamento de F1 (fêmea) com Agrocetes (macho), pesando aproximadamente $20\text{kg} \pm 2$ e idade de 3 meses. Os procedimentos experimentais foram realizados com seis suínos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP – Campus Jaboticabal, onde fomos acompanhados por médicos veterinários anestesistas enquanto realizávamos os procedimentos para o estudo. Após anestesia realizou-se a tricotomia do dorso do animal usando um creme de barbear (Creme de barbear,

Gillette®) e barbeadores descartáveis (Mach 3®, Gillette) inibindo consequente a remoção das camadas mais superficiais da pele que poderia favorecer consequentemente a permeação das substâncias na pele. Além disso, a tricotomia foi realizada no sentido do pelo, evitando cortes no dorso, pois a ideia foi preservar a integridade da pele conservando até mesmo o estrato córneo se possível.

O dorso do animal foi dividido em colunas de sete linhas, o total de 28 áreas de 4 cm². As colunas foram definidas conforme o tipo de avaliação que havíamos proposto para o experimento.

As avaliações realizadas nos experimentos foram: produção de PPIX após 3 horas da aplicação das amostras e realização da TFD para posteriormente obter análise histológica, estudo da cinética e avaliação de PPIX nas biopsias. Sendo que essas avaliações foram realizadas para as bases O/A e A/O, então cada coluna recebeu um tipo de emulsão.

No caso do estudo da cinética não foi possível adquirir varias réplicas por causa da quantidade de horas que o animal permanecia anestesiado, isso acarretou na morte do animal ao final do experimento. Então focamos em avaliações que o tempo do experimento durasse no máximo 4 horas, com isso realizamos mais repetições dos estudos de formação de PPIX em 3 horas para a aplicação da TFD e a retirada de biopsias para análise da produção da PPIX nas camadas da pele.

A Figura 19A mostra o dorso do animal delimitado com máscaras físicas para a aplicação das amostras. E a Figura 19B mostra as máscaras confeccionadas de papel alumínio revestida com papel filme para proteger da luz ambiente e para não degradar o fotossensibilizador onde aplicamos os cremes.

Figura 19 - (A) Marcação do dorso do animal com máscaras físicas para a aplicação das amostras. (B) Áreas protegidas da luz por máscaras oclusivas após a aplicação dos cremes.

A posição das máscaras foi realizada conforme o local da pele estivesse excluído de pigmentos e pequenos cortes. No experimento ilustrado na Figura 19, o dorso do animal foi dividido em quatro colunas, as áreas das duas colunas da direita foram aplicadas as amostras de emulsão O/A sendo uma coluna para a realização da TFD após 3 horas da aplicação das amostras e a outra coluna para a retirada da biopsia também após 3 horas de aplicação das amostras. E as duas colunas da esquerda foram realizadas as mesmas avaliações, porém as amostras aplicadas foram em emulsão A/O. Em todas as áreas foram coletadas medidas de fluorescência em 3 horas de aplicação das amostras.

Cada área recebeu o creme com ajuda de uma espátula estéril, a quantidade foi o suficiente para cobrir toda a área com uma espessura de aproximadamente 2 mm, e cada área equivale a um tipo de amostra. Mas antes de aplicar o creme coletamos a

autofluorescência da pele do animal com o sistema de espectroscopia de fluorescência e de imagem de fluorescência de campo amplo.

Para as regiões em que realizamos o estudo da cinética foi necessário a cada hora retirar o creme e realizar as coletas de dados de fluorescência (espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo), e após repomos novamente o creme, e assim repetiu-se durante 5 horas. Enquanto as regiões que foram realizadas a TFD e a retirada das biopsias de pele permaneceram durante 3 horas incubadas e protegidas.

Os parâmetros de irradiação utilizados para cada área de aplicação da TFD foram 125 mW/cm^2 de intensidade, 150 J/cm^2 de dose e o tempo de 20 minutos.

Ao final do experimento, o dorso do animal recebeu uma bandagem com plástico preto e o animal foi vestido com roupa cirúrgica convencional, para proteção do mesmo devido à fotossensibilidade proporcionada pelos FSs ainda presentes no tecido, evitando também que as regiões investigadas sofressem efeito fotodinâmico adicional por conta da luz ambiente. Os animais permaneceram assim na baia até o momento da eutanásia e coleta do tecido para análise histológica, que ocorreu em 24 e 48 horas depois de realizado o tratamento.

3.8 Análise macroscópica

Após 24 e 48 horas de aplicação da TFD, as lesões na superfície da pele foram avaliadas macroscopicamente por meio de imagens adquiridas por uma câmera digital (SONY CyberShot®, modelo DSC-H50). Os parâmetros observados foram o reparo tecidual, como pontos inflamados, presença de edema e formação de crosta.

3.9 Análise microscópica

Para a análise histológica foram coletados após a eutanásia do animal, fragmentos da pele na área que foi feito o tratamento para cada amostra. A coleta foi

realizada depois de 24 e 48 horas pós-terapia fotodinâmica. Esses fragmentos da pele suína foram colocados em frascos plásticos (cassetes) contendo uma solução de formaldeído tamponado a 40% durante 48 horas para a fixação do material. Após este período o material foi lavado com água corrente por aproximadamente 10 horas.

E para o início do processo de desidratação dos fragmentos, os cassetes foram imersos em solução de álcool 70% por 24 horas, solução de álcool 80% por 1 hora, solução de álcool 90% por 1 hora, e 4 trocas a cada 1 hora em álcool absoluto e em solução de álcool e xilol. Finalizando esse processo, os cassetes reposaram no xilol por 3 horas, havendo troca da solução a cada 1 hora.

Seguindo o processo de preparado das lâminas histológicas, os cassetes foram mergulhados em solução de parafina (Histotec, Merck) por 1 hora com trocas em 4 momentos, essas trocas são realizadas para garantir que a desidratação no álcool não dilua a parafina prejudicando a fixação das peças. Os fragmentos permaneceram em parafina durante toda noite, e foram realizadas duas trocas de parafina na manhã seguinte.

Os cortes histológicos foram preparados em micrótomo (Leica Biosystems, RM 2265) com espessura de 5 μ m e as lâminas preparadas e coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e Picro-Sirius Red (PSR).

As imagens das lâminas foram adquiridas por meio do Microscópio (Eclipse Ti-S, Nikon, Japão), os ajustes dos parâmetros manuais e a lente de aumento utilizada nas imagens foram de 10x.

Os parâmetros observados nas imagens histológicas foram às fases do reparo tecidual e as principais características que ocorrem nessas fases, mostrando também que ao longo do tempo as fases se sobrepõem a outra (Figura 20). Para cada característica avaliada foi dada uma qualificação de 0, +, ++, +++; sendo 0 ausência e +++ grau máximo da presença característica (Tabela 2).

É importante deixar claro que observamos nas análises histológicas em 24 e 48h fase inflamatória com indícios de fase de proliferação e remodelamento como veremos nas análises a seguir.

Controle

Fase inflamatória

Fase inflamatória com indícios de fase de Proliferação

Fase inflamatória com indícios de fase de proliferação e Remodelamento

Figura 20 - Fases do reparo cicatricial observadas nas lâminas em HE de pele suína tratadas com TFD. Indicação das características que ocorrem nas fases de reparo e mostrando que as fases se sobrepõem ao longo do tempo. (1) estrato córneo, (2) epiderme, (3) papila dérmica, (4) derme papilar, (5) derme reticular, (6) ausência das papilas dérmicas (7) infiltrados inflamatórios, (8) edema, (9) repitelização, (10) fibroplasia e (11) remodelação.

Tabela 2 - Modificações observadas nas análises histológicas da aplicação das amostras após 24 e 48 horas da realização da TFD. Na tabela, '0' indica ausência da característica, e o símbolo de '+' indica a presença da característica comparada ao controle.

Fases	Modificação da pele	Amostras	
		24h.	48h.
Inflamação	↑ Infiltrados inflamatórios (extravasamento de células)		
	+ sinais de edema		
	Ausência das papilas dérmicas		
Proliferação	Reepitelização	Espessamento da epiderme	
		Presença das papilas dérmicas	
	Fibroplasia	Degradação das fibras de colágeno I ("estriamento")	
		Neocolagênese (↑ colágeno III)_ ↓ "estriamento"	
Remodelação	Início da substituição do colágeno III pelo I (maior quantidade de colágeno III sem observar degradação do colágeno I)		

É importante ressaltar que o termo "estriamento" ou "fibras de colágeno estriadas" é um termo criado pelo autor e refere-se ao processo de degradação das fibras de colágeno aonde as mesmas encontram-se modificadas quanto à conformação e direção. Em outros trabalhos do grupo o mesmo termo foi utilizado (REQUENA, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises do estudo piloto

No estudo piloto foram realizadas as medidas de fluorescência para estudo de produção de PPIX após 3 horas da aplicação das amostras, áreas (1 cm diâmetro) que foram aplicadas a TFD, e para o estudo da cinética, que acompanha a produção da PPIX por 5 horas. O estudo histológico do tecido também foi realizado, porém a coleta foi feita após 7 dias das aplicação da TFD e, ao analisar as lâminas histológicas não observou-se indícios do dano fotodinâmico.

Nesse estudo as imagens de fluorescência não ficaram nítidas, devido à movimentação do animal no momento da coleta dos dados, por este motivo os dados não serão apresentados aqui nesse documento. Após o estudo piloto aperfeiçoamos alguns aspectos para os próximos experimentos, como o tamanho da área de aplicação do creme que passou para 4 cm², a distância entre a área de um mistura para outra, modo de aplicação para que o creme não ultrapassasse a área demarcada, e o momento para eutanásia e coleta dos fragmentos de pele para análise histológica que passaram a ser 24 e 48 horas pós-TFD.

No entanto, nesse primeiro experimento foi possível observar o dano na superfície da pele causado pela TFD e como foi o comportamento de cicatrização da pele suína no decorrer de sete dias. A Figura 22 mostra a imagem de fluorescência de campo amplo após 3 horas da aplicação das misturas e o dano na superfície da pele pós-tratamento. Mostraremos até o tempo de 96 horas, pois foi o tempo que observamos as modificações relevantes no processo de regeneração da superfície da pele.

Figura 21 - Produção da PPIX após 3 horas da aplicação dos cremes e os danos e reparo na superfície da pele causado pela TFD ao longo do tempo.

Na Figura 21 observou-se como a formação da PPIX é heterogênea em pele sadia devido a presença do estrato córneo, e como o efeito da terapia fotodinâmica está relacionado ao ponto em que produziu PPIX. O ponto na área que formou PPIX é exatamente onde ocorreu o dano na superfície da pele pós-terapia. E nesse animal o dano causado pela aplicação do MAL foi mais evidente na superfície do que na aplicação do ALA.

Em 24 horas é possível observar que a TFD causou uma inflamação na pele, edema nos pontos que acumulou PPIX. Em 48 horas observou-se a formação de uma crosta que é um indicativo da evolução do processo de cicatrização da pele, que se segue ao longo dos 4 dias. Ao final do sétimo dia já não havia nenhuma marca superficial do dano causado pela TFD.

4.2 Análise da formação da PPIX por espectroscopia de fluorescência

Nas análises de espectroscopia de fluorescência as medidas foram coletadas utilizando laser com emissão na região do verde (532 nm), pois nessa região poderíamos analisar a formação de PPIX em nível superficial e um pouco mais profundo, alcançando junção da epiderme e derme, já que a penetração com luz verde está em torno de 0,4 mm ou 400 μ m (MENEZES et al., 2014).

De acordo com VALENTINE et al. (2011), não houve diferença para o aumento da quantidade de PPIX usando ALA e MAL quando analisados pela espectroscopia de fluorescência utilizando laser com emissão no azul (400 nm). A emissão no azul permite a avaliação da produção da PPIX em nível mais superficial (epiderme). No caso do nosso trabalho esta análise superficial foi realizada por meio da imagem de fluorescência por campo amplo. Esta técnica diferentemente da espectroscopia de fluorescência permite a avaliação da formação e homogeneidade sendo uma vantagem, visto que conforme resultados a formação da PPIX não é uniforme.

A análise por espectroscopia de fluorescência em regiões não heterogêneas de formação de PPIX pode levar a resultados falsos negativos, isto é, a comparação torna-se não adequada devido a grande variabilidade.

Com a análise dos espectros coletados a partir da produção da PPIX na pele suína foi possível verificar qual mistura acumulou mais PPIX em 3 horas de incubação, e também como é o comportamento da produção da PPIX para essas misturas por meio do estudo da cinética, coleta dos dados de fluorescência a cada hora durante cinco horas. Os espectros coletados para cada mistura e cada tempo foram tratados

como mencionado anteriormente e tirado a média entre a quantidade de animais que foram utilizados nos experimentos.

4.2.1 Emulsão O/A: análise da formação da PPIX por espectroscopia de fluorescência

Para análise dos espectros de fluorescência usando a emulsão O/A foram coletados os dados em 3 horas após aplicação dos cremes em três animais sendo um animal em triplicata e outros dois animais em duplicata, totalizando sete áreas para cada mistura. Já para a coleta de dados para o estudo da cinética das misturas foi possível realizar o experimento em dois animais. Lembrando que foram coletados cinco espectros para cada mistura aplicada.

O gráfico da Figura 22 representa a média dos espectros de fluorescência coletados após 3 horas de aplicação do creme, e durante esse tempo as áreas aplicadas foram protegidas do meio externo.

Figura 22 - Média dos espectros de fluorescência coletado dos animais após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão O /A.

Nos resultados espectrais observou-se que não houve grande diferença na média dos espectros de fluorescência coletados nas áreas aplicadas ALA e MAL, e nem para as misturas (M2, M3, M4 e M6), contando que eles estão dentro do erro padrão. Porém a mistura de proporção 40%ALA-60%MAL (M5) indicou maior acúmulo de PPIX em 3 horas do que as outras proporções, essa mistura ficou em torno de 0,10 (eixo y) pontos de intensidade de fluorescência maior do que o ALA, de acordo com a análise da Figura 22.

De acordo com os resultados da média dos espectros coletados foi possível realizar testes estatísticos comparando as misturas entre si. Como mostra o gráfico da Figura 23 que representa o ANOVA test das misturas.

Figura 23 - Teste estatístico ANOVA que compara as diferenças significativas entre as amostras em emulsão O /A, dados adquiridos por espectroscopia de fluorescência.

A análise estatística dos espectros de fluorescência para as misturas mostrou que houve diferenças significativas entre o ALA e o MAL, e o MAL e as misturas M3, M4 e M5. As demais comparações entre ALA e as misturas não houve diferenças significativas, mostrando que espectralmente as misturas indicam produção de PPIX em

mesma quantidade do que o ALA ou até mesmo em maior quantidade, como o caso da proporção de 40%ALA-60%MAL (M5).

A Figura 24 representa a média dos espectros de fluorescência coletados ao longo do tempo de 5 horas para as amostras em emulsão O/A.

Figura 24 - Estudo da produção de PPIX pelo tempo de 5 horas usando a emulsão O /A nas misturas. Dados adquiridos por espectroscopia de fluorescência; (A) ALA e MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 e (F) M6.

O estudo da cinética mostrou o comportamento da curva de formação da PPIX, em relação ao tempo de formação e o início da degradação da PPIX por meio da aplicação das amostras em emulsão O/A. Os parâmetros iniciais e finais utilizados para ajuste da curva e obtenção do *fitting* foram zero e 0,045, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta os valores IF_{50} da aplicação do ALA, MAL e das misturas na pele suína obtidos pela média dos espectros de fluorescência coletados.

Tabela 3 - Valores do IF_{50} adquiridos através do estudo da cinética e coletados por espectroscopia de fluorescência, derivadas da aplicação das misturas em emulsão O/A.

Amostras	IF_{50} (min.)
ALA	230 ± 7
MAL	131 ± 9
M2	$4365 \pm 36 \times 10^3$
M3	114 ± 16
M4	17 ± 20
M5	131 ± 17
M6	190 ± 25

Observando os valores de IF_{50} , vimos que o ALA ($IF_{50} = 230$ min.) demorou aproximadamente 100 minutos a mais pra acumular PPIX do que o MAL ($IF_{50} = 131$ min.), sendo assim o MAL indicou maior produção de PPIX em menos tempo do que o ALA. Mistura M5 ($IF_{50} = 131$ min.) tem o valor de IF_{50} igual ao MAL, mas o MAL indicou intensidade de fluorescência por volta de $y = 0,005$ a mais do que a intensidade de fluorescência da mistura M5 nesse tempo. E a mistura M4 indicou o valor de $IF_{50} = 17$ min menor do que as demais misturas e a quantidade de PPIX formada igual ao MAL ($y = 0,025$).

A mistura M3 obteve o $IF_{50} = 114$ min. menor do que MAL e M5. A mistura M6 indicou maior o valor de $IF_{50} = 190$ min. em relação às misturas. E a mistura M2 não se adequou a curva de crescimento usada para esse estudo, indicando o valor de IF_{50} muito alto, dessa forma não foi possível considera-lo.

As análises por espectroscopia de fluorescência não indicaram diferença na produção de PPIX entre o ALA e MAL após aplicação dos cremes e incubados por 3 horas, porém os dados do estudo da cinética mostrou que o MAL ($IF_{50} = 131$ min) tem o tempo de formação de PPIX menor do que o ALA ($IF_{50} = 230$ min). Assim podemos observar que em relação à profundidade, onde a coleta de fluorescência alcança a junção da derme e epiderme, temos que o MAL seria o mais adequado para o uso, pois produziu PPIX igualmente ao ALA e em menor tempo.

A mistura M5 se destacou na produção de PPIX após 3 horas de aplicação, mas no estudo da cinética, vimos que ele levou o tempo ($IF_{50} = 131$ min) próximo ao MAL para acumular PPIX. E a mistura M4, teve a produção de PPIX bem próxima ao ALA e MAL e seu tempo de acúmulo de PPIX foi $IF_{50} \approx 17$ min, o menor tempo entre todas as proporções. Contudo, a mistura M4 seria a melhor proporção para o uso, analisando pela quantidade de formação de PPIX e pelo tempo de formação.

4.2.2 Emulsão A/O: análise da formação da PPIX por espectroscopia de fluorescência

Os dados coletados para a aplicação da emulsão A/O foi executado em apenas dois animais (duplicata) para a análise após três horas de aplicação dos cremes, e um animal para o estudo da cinética.

A Figura 25 representa a média dos espectros de fluorescência coletados após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão A/O.

Figura 25 - Média dos espectros de fluorescência coletados após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão A/O.

Observou-se na Figura 25, que o MAL e M6 indicaram maior acúmulo de PPIX em 3 horas do que o restante das misturas, porém as barras de erro ficaram muito grande para considerarmos um resultado preciso. E as outras misturas (M2-5) indicaram produção de PPIX menor do que o ALA. Mas as misturas M3 e M5 indicaram intensidade de fluorescência melhor do que M2 e M4, mas considerando as barras de erros para cada mistura, podemos dizer que não houve grandes diferenças na produção de PPIX entre elas. Contudo ao realizar a análise estatística entre as amostras da emulsão A/O não se observa diferenças significativas, nem mesmo entre ALA e MAL.

A Figura 26 representa a média dos espectros de fluorescência coletados ao longo do tempo de 5 horas para as amostras em emulsão A/O.

Figura 26 - Estudo da produção de PPIX pelo tempo de 5 horas usando a emulsão A/O nas misturas. Dados adquiridos por espectroscopia de fluorescência; (A) ALA e MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 e (F) M6.

Os parâmetros iniciais e finais usados para obter o *fitting* nesse estudo foram zero e 0,06, respectivamente. Acredita-se que o fator para que o parâmetro final tenha sido maior para essa emulsão seja por causa da pequena quantidade de réplicas para obter a média nesse estudo, assim não podemos afirmar que a emulsão A/O proporcionou as amostras maior produção de PPIX na pele do animal. E o resultado obtido para o MAL indica que não foi possível distinguir uma curva de crescimento, não se adaptando a curva *fitting* usada para as demais amostras.

A Tabela 4 representa os índices de fluorescência (IF_{50}) para os dados coletados para o estudo da cinética. E de acordo com os valores de IF_{50} , vimos que o ALA $IF_{50}= 230$ min. indica produção de PPIX em menor tempo do que o MAL $IF_{50}= 2526$ min.. Porém, a porcentagem do erro obtido para o MAL foi muito grande, devido a não adequação do modelo da curva de crescimentos usada para esse estudo em ambas emulsões, com isso não é possível compará-los. E nessa emulsão vimos que a mistura M4 teve o menor $IF_{50}= 137$ min., indicando maior quantidade de PPIX produzida nesse tempo.

Como MAL e as misturas M2 e M6 obtiveram valores de IF_{50} muito altos, não consideramos esses valores, indicando que não se adequaram a curva de crescimento.

Tabela 4 - Valores do IF_{50} adquiridos através do estudo da cinética e coletados por espectroscopia de fluorescência, derivadas da aplicação das misturas em emulsão A/O.

Amostras	IF_{50} (min.)
ALA	230 ± 20
MAL	$2526 \pm 3 \times 10^3$
M2	420 ± 50
M3	210 ± 10
M4	137 ± 15
M5	183 ± 21
M6	$360 \pm 1 \times 10^2$

A análise da aplicação das amostras em emulsão A/O não indicaram diferenças significativas entre elas. E o estudo da cinética para essa condição nos mostrou que as misturas M3, M4 e M5 tiveram o comportamento de produção de PPIX melhor do que o ALA e o MAL, tanto em acúmulo de quantidade de PPIX, quanto em tempo de produção. Já as amostras MAL, M2 e M6 não se adequaram a curva de crescimento, gerando valores de IF_{50} muito maior. Já o ALA indicou o IF_{50} muito maior do que as misturas intermediárias (M3, M4 e M5), mostrando que misturar o ALA e o MAL em um mesmo creme é possível melhorar a produção de PPIX e o tempo de produção.

4.2.3 Discussão dos dados coletados por espectroscopia de fluorescência

As análises por espectroscopia de fluorescência por meio da aplicação das emulsões O/A e A/O, mostraram que M3, M4 e M5 apresentaram tempo de formação de PPIX mais rápido do que as demais. Mas somente a mistura M4 em ambas as emulsões apresentou menor tempo de formação de PPIX e produção de PPIX próximo ao ALA.

4.3 Análises da formação da PPIX por imagem de fluorescência de campo amplo

A produção de PPIX para as amostras contendo ALA, MAL e misturas foram analisadas tanto visualmente por meio das imagens de fluorescência de campo amplo, quanto quantitativamente por análise de contagem de pixels vermelhos dessas imagens utilizando para isso rotinas no programa Matlab. Essas análises tiveram como objetivo avaliar a produção e homogeneidade da distribuição da PPIX na superfície da pele.

Como descrito em estudos, o maior desafio do nosso trabalho foi otimizar a entrega dos precursores da PPIX (ALA, MAL e misturas de ambos) através das

camadas da pele bem como garantir a formação em quantidade e homogeneidade. Sabendo-se que o estrato córneo funciona como uma barreira de proteção da pele e este é estruturalmente uma camada heterogênea consequentemente a permeação destes precursores difere na extensão da pele do animal (SAKAMOTO et al., 2009); (MAJELLA, 2013).

Existem poucos trabalhos referentes à comparação do ALA e MAL em pele sadia de humano, porém LESAR et al. (2011) comparou a eficiência de formação da PPIX a partir destes precursores em diversas partes do corpo humano (braço, antebraço, costas e pernas) e acompanhou a fluorescência (4 -29 horas) após aplicação tópica. Eles então observaram que houve diferença na produção da PPIX, que independente do local aplicado o ALA acumulou mais PPIX, porém o local (costas) onde foi aplicado o *tape stripping* apresentou diferença após 24 horas, uma vez que a remoção das camadas superficiais da pele potencializa a permeação na pele. Estes resultados comprovam que existem diferenças entre ALA e MAL quanto à permeação na pele.

4.3.1 Emulsão O/A: análise da formação da PPIX por imagem de fluorescência de campo amplo

Na Figura 27, podemos observar as imagens obtidas 3 horas após aplicação do creme (emulsão O/A) em triplicatas de condições para as sete amostras em um mesmo animal.

Figura 27 - Imagens de fluorescência de campo amplo da superfície da pele suína em triplicatas (A, B e C) após 3 horas da aplicação dos cremes em emulsão O/A.

Observa-se na Figura 27 que a formação da PPIX em pele sadia é bem heterogênea para todas as amostras bem como essa formação é variável em uma mesma mistura quando em áreas diferentes. Portanto, apesar das misturas serem aplicadas sempre no dorso do animal, na mesma quantidade, houve diferenças na produção da PPIX entre as réplicas de condições experimentais em um mesmo animal e entre animais (réplicas entre experimentos). Isto se deve a variabilidade intrínseca de cada animal que apresenta assim como o modelo humano alterações em seu metabolismo e espessura da pele nas diferentes regiões, o que pode consequentemente, interferir na permeação das misturas de ALA e MAL e consequente formação e distribuição de PPIX na pele.

A Figura 28 mostra a média da contagem de pixels das imagens coletadas após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão O/A.

Figura 28 - Média da contagem de pixels das imagens adquiridas pelo sistema de imagem de fluorescência de campo amplo, coletadas após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão O/A.

De acordo com a análise de fluorescência de campo amplo obteve-se a fluorescência da PPIX formada nas camadas superficiais da pele, e verificou-se uma diferença maior na produção de PPIX entre o ALA e o MAL, já que o ALA produziu mais PPIX do que o MAL em 3 horas após a aplicação do creme. Esta diferença foi de aproximadamente 0,7 na contagem de pixels (eixo y). Para as misturas não indicou grande diferença, mas novamente a proporção 40%ALA-60%MAL (M5) se destacou, indicando a produção igual ou até maior do que o ALA. E as demais misturas (M2, M3, M4 e M6) indicaram a contagem de pixels maior do que o MAL, igualando a produção de PPIX do ALA.

De acordo com o trabalho de LESAR et al. (2011), obtivemos o resultado similar na pele de porco sadia, em que o ALA sozinho produziu mais PpIX do que o MAL, porém em alguns casos a produção não foi maior do que as amostras contendo ALA e MAL juntos.

Com o resultado da média de contagem de pixels das imagens de fluorescência, realizamos o teste estatístico para comparar a diferença significativa entre as amostras. A Figura 29 mostra essa diferença entre as misturas realizada pelo ANOVA test.

Figura 29 - Teste estatístico ANOVA que compara as diferenças significativas entre as amostras em emulsão O/A, dados adquiridos pelo sistema de imagem de fluorescência de campo amplo.

A análise estatística apontou que somente o MAL e M5 obtiveram diferenças significativas entre as misturas, mostrando que não houve diferença significativa entre as misturas ALA e MAL.

A Figura 30 representa o estudo da cinética ao longo do tempo de 5 horas por contagem de pixels vermelha da fluorescência da PPIX avaliada por fluorescência de campo amplo.

Figura 30 - Estudo da produção de PPIX pelo tempo de 5 horas usando a emulsão O /A nas misturas. Dados adquiridos por imagem de fluorescência de campo amplo; (A) ALA e MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 e (F) M6.

Com estudo da cinética das imagens de campo amplo foi possível analisar o comportamento do crescimento da produção de PPIX na superfície da pele ao longo de cinco horas. A Tabela 5 mostra os valores de IF_{50} para as imagens de fluorescência de campo amplo que foram coletados ao longo do tempo de 5 horas após aplicação dos cremes de emulsão O/A.

Tabela 5 - Valores do IF_{50} adquiridos através do estudo da cinética e coletados por imagem de fluorescência de campo amplo, derivadas da aplicação das misturas em emulsão O/A.

Amostras	IF_{50} (min.)
ALA	121 ± 12
MAL	70 ± 5
M2	134 ± 6
M3	44 ± 60
M4	130 ± 8
M5	97 ± 7
M6	120 ± 21

Observando o IF_{50} para as imagens de fluorescência de campo amplo, e apesar das imagens serem uma análise da superfície da pele o valor de IF_{50} para o MAL ($IF_{50}= 70$ min.) indicou ser menor do que o ALA ($IF_{50}= 121$ min), uma diferença de produção média de PPIX de aproximadamente 50 minutos. Esse comportamento também foi possível observar nos dados de espectroscopia de fluorescência, mostrando que as técnicas de fluorescência usadas para mensurar a produção de PPIX estão em acordo.

Já o IF_{50} para as misturas M3 e M5 apontou ser menor, $IF_{50}= 44$ min. e $IF_{50}= 97$ min., respectivamente, do que o ALA, e ainda M3 aponta IF_{50} menor do que o MAL, e também têm a taxa de erro maior do que as outras concentrações. Mas mesmo assim esse estudo indica que a mistura pode ser mais bem aproveitada em tratamentos do que somente usando o ALA ou MAL. E para a mistura M4 o valor de $IF_{50}= 1308$ min. indicou próximo ao ALA.

O ALA indicou produção de PPIX um pouco mais elevada do que o MAL após 3 horas de aplicação, mas conforme o estudo da cinética o MAL indicou acúmulo de PPIX em quase a metade do tempo do ALA. Já que não houve grande diferença na quantidade de produção de PPIX na superfície da pele entre o ALA e MAL, e o IF_{50} para o MAL foi a metade do tempo do ALA, então em relação ao tempo de produção o MAL poderia ser o componente melhor aproveitado na TFD do que o ALA.

A análise para as misturas, em relação à produção de PPIX após 3 horas de aplicação tópica das amostras não indicou diferenças significativas entre ALA e MAL. Entretanto indicou diferenças significativas entre o MAL e mistura M5, essa análise estatística mostrou que mesmo a mistura M5 indicasse maior produção de PPIX entre as amostras, mas ela se destacou somente em relação ao MAL e não ocorrendo diferenças significativas na produção de PPIX com o ALA.

Os dados obtidos por análise de cinética das misturas utilizando diferentes tempos de acúmulo de PPIX mostram diferentes valores de IF_{50} como: M3 ($IF_{50} = 44$ min), M4 ($IF_{50} = 130$ min) e M5 ($IF_{50} = 97$ min). M3 indicou menor tempo de produção de PPIX entre eles. Comparando os resultados mencionados anteriormente, M5 apresentou maior quantidade de produção de PPIX em 3 horas de incubação e na cinética a produção de PPIX foi em um tempo próximo ao ALA ($IF_{50} = 121$ min).

4.3.2 Emulsão O/A: análise da formação da PPIX nas biopsias por imagem de fluorescência de campo amplo

Para avaliar a formação da PPIX ao longo das camadas da pele (epiderme e derme); retiramos biopsias da pele com *punch* (diâmetro= 3 mm, profundidade $\approx$ 5mm) após 3 horas de aplicação das misturas. E adquirimos imagens de fluorescência da produção da PPIX nas camadas da pele com o sistema de imagem de fluorescência de campo amplo. A Figura 31 mostra as imagens da PPIX formada na superfície da pele e na biopsia. Essas imagens foram coletadas após 3 horas de aplicação tópica das amostras, e o círculo branco indica o local em que foi retirada a biopsia.

Figura 31 - Imagens de fluorescência de campo amplo após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão O/A; (A) Área em que aplicamos as amostras e o círculo branco indica o ponto onde foi tirada a biópsia, e (B) imagens das biópsias.

A Figura 32 mostra a média dos perfis de intensidade das biópsias pela profundidade.

Figura 32 - Média dos perfis de intensidade de fluorescência das imagens das biópsias pela profundidade, emulsão O/A; (A) ALA e MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 e (F) M6.

As análises do perfil da intensidade de fluorescência ao longo das biópsias de pele suína indicaram que na primeira camada da pele, epiderme ($x \sim 0,4$ mm), não houve grandes diferenças na intensidade de fluorescência para as amostras. Mas a grande diferença entre os perfis de intensidade de fluorescência das amostras foi o decaimento dessa intensidade ao longo da profundidade (derme $0,4 - 1$ mm).

A formação de PPIX nas biópsias indicaram que a permeação do MAL nas camadas da pele permanece constante até aproximadamente 1 mm de profundidade (epiderme e derme); enquanto ALA mostrou um perfil de decaimento no acúmulo de PPIX ao longo da profundidade, diminuindo a produção de PPIX no decorrer das camadas.

O perfil de intensidade para as biópsias em que foi aplicada a mistura M2 mostrou o comportamento do perfil de intensidade de fluorescência semelhante ao ALA, mas em profundidade indicou ter acumulado mais PPIX do que ele. A mistura M3 indicou acúmulo de PPIX constante entre as camadas da pele, aproximadamente 1 mm de profundidade, bem semelhante ao comportamento do perfil observado no MAL. Já as misturas M4 e M5 mostraram comportamento semelhante ao ALA, porém o decaimento da intensidade de fluorescência ao longo da biópsia foi maior depois de aproximadamente 1,2 mm de profundidade. E o resultado obtido na mistura M6 não pode ser exatamente interpretado, pois ocorreu a saturação da fluorescência nas imagens das biópsias para essa mistura.

4.3.3 Emulsão A/O: análise da formação da PPIX por imagem de fluorescência de campo amplo

A Figura 33 mostra a imagem de fluorescência em duplicata da produção de PPIX após a aplicação de 3 horas das amostras em emulsão A/O.

Figura 33 - Imagens de fluorescência de campo amplo da superfície da pele suína em duplicatas (A, B) após 3 horas da aplicação dos cremes em emulsão A/O.

É possível notar visualmente que a mudança na fase de maior volume (de água para óleo) da emulsão fez com que o MAL produzisse mais PPIX na área aplicada do que o ALA, mas a produção de todas as misturas continuou bem heterogênea.

A Figura 34 mostra a média de contagem de pixels das imagens coletadas após 3 horas da aplicação das misturas em emulsão A/O.

Figura 34 - Média da contagem de pixels das imagens adquiridas pelo sistema de imagem de fluorescência de campo amplo, coletadas após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão A/O.

A análise realizada da média dos pixels das imagens de fluorescência indicou que o ALA e o MAL produziram PPIX na superfície na mesma quantidade. Com isso é

possível dizer que a emulsão A/O contribuiu para aumentar a característica lipofílica do MAL produzindo mais PPIX do que quando solubilizado na emulsão O/A.

A mistura M4 apresentou produção de PPIX próximo ao ALA e MAL, e as misturas M2, M3, M5 e M6 indicaram produção de PPIX menor do que ALA e MAL. A mistura M5 mostrou que foi a proporção que menos acumulou PPIX, diferentemente do resultado que observou-se nessa proporção para a emulsão O/A, que indicou a maior produção de PPIX em relação as misturas.

Observando os resultados obtidos das diferentes emulsões, as misturas de emulsão A/O que contem maior proporção de MAL, como M5 e M6, indicou uma produção de PPIX menor do que essas proporções para a emulsão O/A, porém o resultado para a proporção 100% MAL obteve resultado melhor para a emulsão A/O.

A Figura 35 mostra a análise estatística entre a produção de PPIX das misturas na emulsão A/O realizada pelo ANOVA test.

Figura 35 - Teste estatístico ANOVA que compara as diferenças significativas entre as amostras em emulsão A/O, dados adquiridos pelo sistema de imagem de fluorescência de campo amplo.

A análise estatística apontou que não houve diferenças significativas entre as misturas usando a emulsão A/O. A Figura 36 mostra o comportamento do estudo da

cinética para as amostras em emulsão A/O e a curva de crescimento para cada amostra. Esse estudo foi realizado em apenas um animal.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

Figura 36 - Estudo da produção de PPIX pelo tempo de 5 horas usando a emulsão A/O nas misturas. dados adquiridos por imagem de fluorescência de campo amplo; (A) ALA e MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 e (F) M6.

Abaixo segue a Tabela 6 que mostra o índice de fluorescência para as curvas de produção de PPIX pelo tempo para as amostras em emulsão A/O.

Tabela 6 - Valores do IF₅₀ adquiridos através do estudo da cinética e coletados por imagem de fluorescência de campo amplo, derivadas da aplicação das misturas em emulsão A/O.

Misturas	IF50 (min.)
ALA	181 ± 25
MAL	680 ± 106
M2	6x10 ³ ± 42x10 ³
M3	323 ± 54
M4	108 ± 22
M5	250 ± 31
M6	250 ± 14

O IF₅₀ para técnica de imagens de fluorescência de campo amplo obteve o mesmo perfil que na técnica de espectroscopia de fluorescência, em que o ALA indica (IF₅₀=181 min) acúmulo de PPIX em menor tempo do que o MAL (IF₅₀=680 min) e a mistura M4 (IF₅₀=108 min) foi a proporção que indicou o menor tempo de acúmulo de PPIX.

As misturas M2, M3, M5 e M6 indicaram valores para o IF₅₀ muito alto, juntamente com o MAL, e ultrapassaram o tempo de aplicação usado em clínica que são de 3 horas (180 min) de incubação com o creme para depois ser realizado a TFD. Nesse caso não seria interessante utilizá-los, pois não otimizaria o tempo do tratamento.

Os resultados para imagens de fluorescências de aplicação das misturas na emulsão A/O foram realizada somente em um animal, uma área para cada mistura, e isso poderia ser o motivo para que o *fitting* não tenha se adequadado aos pontos, pois não houve média entre réplicas, e por isso o erro em algumas misturas ficaram tão grande.

Para os experimentos realizados com a emulsão A/O, vimos que a mudança de fase na emulsão contribuiu para a característica lipofílica do MAL, fazendo com que o

MAL indique quantidade de produção de PPIX igual ao ALA. A mistura M4 indicou pequena melhora na quantidade de PPIX produzida em 3 horas de aplicação, mas as misturas M2, M3, M5 e M6 indicaram diminuição na produção de PPIX. E M5 foi a mistura que mais indicou diminuição na quantidade de PPIX usando a emulsão O/A. Apesar dessa grande diferença negativa na produção de PPIX para a mistura M5, a análise estatística realizada entre as misturas não indicou diferenças significativas entre nenhuma amostra.

Em relação ao estudo da cinética de aplicação das amostras em A/O, obtiveram-se valores de IF_{50} maior do que o tempo de 3 horas usado em pacientes. As amostras MAL, M2, M3, M5 e M6 indicaram valores muito alto para IF_{50} , mostrando que não houve adequação ao *fitting* escolhido para a emulsão O/A e número de réplica pequeno para obtermos uma análise mais adequada. Contudo, para o estudo da cinética de aplicação de base A/O indicou menor IF_{50} para a mistura M4 ($IF_{50}=108$) e para o ALA ($IF_{50}= 181$), indicando que a mistura M4 é uma boa opção para diminuir o tempo de incubação para o tratamento.

4.3.4 Emulsão A/O: análise da formação da PPIX nas biopsias por imagem de fluorescência de campo amplo

A Figura 37 mostra as imagens da PPIX formada na superfície da pele e na biopsia. Essas imagens foram coletadas após 3 horas de aplicação tópica das amostras em emulsão A/O, e o círculo branco indica o local em que foi retirada a biopsia.

Figura 37 - Imagens de fluorescência de campo amplo após 3 horas da aplicação das amostras em emulsão A/O; (A) Área em que aplicamos as amostras e o círculo branco indica o ponto onde foi tirada a biópsia, e (B) imagens das biópsias

Os perfis de intensidade de fluorescência para as imagens das biópsias acima podem ser visualizados na Figura 38.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

Figura 38 - Média dos perfis de intensidade de fluorescência das imagens das biopsias pela profundidade, emulsão A/O; (A) ALA e MAL, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5 e (F) M6.

A análise da média do perfil de intensidade para o ALA e MAL indicou semelhança entre elas na produção de PPIX ao longo das camadas da pele suína, ocorrendo uma diminuição no acúmulo de PPIX próximo a 1 mm de profundidade. A mistura M2 indica intensidade constante em toda profundidade, sendo a mistura que não houve diferença na produção de PPIX na epiderme e derme. A mistura M3 é que apresentou maior declínio do acúmulo de PPIX ao longo da profundidade, e já M4 indicou decaimento no acúmulo de PPIX nas camadas da pele em aproximadamente 1,2 mm. E as misturas M5 e M6 indicaram uma diminuição na produção de PPIX somente após $x = 1$ mm de profundidade, e a queda na produção de PPIX para M6 foi quase imperceptível, pois ocorreu a saturação das imagens para a mistura.

Quando comparamos os resultados obtidos para os dois tipos de emulsões (O/A e A/O), observa-se que o ALA em emulsão A/O manteve o perfil de intensidade de fluorescência constante, ocorrendo decaimento na intensidade de fluorescência somente próximo a 1 mm de profundidade, isso mostra que a emulsão A/O pode ter colaborado na permeação do ALA na pele. Também observou-se a melhora na permeação do creme para as misturas M4 e M5. A mistura M3 não obteve um comportamento constante na intensidade de fluorescência versus a profundidade como na mesma mistura em emulsão O/A. Segundo NARVAEZ (2011), Quando associa-se substâncias em uma formulação pode-se obter efeitos biológicos sinérgicos e ou até mesmo efeitos antagônicos onde verificamos a diminuição dos efeitos desejados.

4.3.5 Discussão dos dados coletados por imagem de fluorescência de campo amplo

Analisando as imagens de campo amplo para ambas as emulsões observou-se que mudar a fase externa da emulsão para oleosa mostrou que contribuiu para melhorar a produção de PPIX do MAL, mas não notou-se o mesmo comportamento para as misturas de proporções contendo mais MAL, pelo contrário; houve uma diminuição da formação da PPIX. Observou-se também que as misturas mostraram melhores resultados quando comparado ao ALA ou MAL sozinhos, como no caso de

M5 que indicou alta quantidade de PPIX formada na emulsão O/A e valor de IF_{50} menor do que o ALA, e M4 que indicou boa produção de PPIX e menor IF_{50} em ambas as emulsões.

Com as análises das biopsias observou-se a melhora no perfil de produção de PPIX nas camadas da pele quando incorporado às amostras em emulsão A/O. O MAL formou mais PPIX em profundidade do que o ALA. Entre as misturas, M2 foi a mistura que demonstrou o perfil de intensidade constante independente da base.

4.4 Análise da formação da PPIX por microscopia confocal de fluorescência

O objetivo dessas análises foi estabelecer a relação entre os dados *in vivo* e *ex vivo in vitro* utilizando como modelo a pele suína, e propor a técnica de microscopia confocal de fluorescência como uma abordagem adequada para avaliação no tratamento da TFD. Os resultados puderam ser úteis, uma vez que o modelo *in vitro* apresenta menos variabilidade experimental em comparação aos experimentos *in vivo*. Além disso, tentou-se introduzir uma nova metodologia para realizar estudos de permeação transdérmica utilizando ALA e seus derivados em modelo de pele suína *ex vivo* cultivado *in vitro* por meio das análises de microscopia confocal de fluorescência.

O estudo foi realizado utilizando-se tempos de incubação de 3 a 24h. No entanto em 3h de incubação não observou-se a formação de PPIX (fluorescência vermelha) para nenhuma das amostras. De acordo com estes resultados verificamos que existe um atraso no tempo de formação da PPIX quando realizamos experimentos em modelos de pele suína *ex vivo in vitro*, *in vivo* observa-se que em 3h já evidenciamos a formação da PPIX para o ALA e derivados. A Figura 39 mostra as imagens adquiridas pela microscopia confocal das lamínas de pele suína que ficaram incubadas por 5 horas com ALA e MAL, e abaixo o perfil de intensidade de fluorescência dessas imagens.

Figura 39 - Imagem de microscopia confocal de fluorescência adquirida após 5 horas da aplicação do ALA e MAL, e (A) média dos perfis de intensidade pela profundidade.

O resultado das imagens de microscopia confocal para as amostras ALA e MAL em 5 horas indicou que nesse período de incubação os perfis de intensidades para ambas são semelhantes ao resultado obtido para a autofluorescência, concluindo assim que em 5 horas ainda não foi possível produzir PPIX.

Na Figura 40 mostra as imagens de microscopia confocal e a análise da média dos perfis de intensidade para as amostras M2, M3, M4, M5 e M6 após 5 horas de aplicação (incubação).

M2 **(B)** **M3** **(C)**

M4

(D)

M5

(E)

Figura 40 - Imagem de microscopia confocal de fluorescência adquirida após 5 horas da aplicação das misturas M2, M3, M4, M5 e M6, e (A, B, C, D, E e F) média dos perfis de intensidade pela profundidade.

As imagens *in vitro* adquiridas por microscopia confocal mostraram que as misturas intermediárias M3, M4 e M5 apresentaram maior intensidade de fluorescência em 5 horas de incubação com creme. Enquanto ALA, MAL, M2 e M6 em 5 horas ainda apresentaram o mesmo comportamento da medida realizada na autofluorescência da pele do suíno *ex vivo*. Mistura M3 indica um aumento na fluorescência entre 50 e 200 μm de profundidade, isso significa que em 5 horas já tem PPIX formada na epiderme e na derme. A mistura M4 indica um pico de fluorescência no início da epiderme ($x = 0 - 25 \mu\text{m}$ ou 250 nm), e após $x = 25 \mu\text{m}$ ocorre um decaimento, porém ainda indica maior fluorescência na epiderme do que ALA, MAL e o restante das misturas em 5 horas.

A Figura 41 mostra as lamina da pele suína que ficaram incubadas por 7 horas com ALA e MAL, e abaixo o perfil de intensidade de fluorescência dessas imagens.

(A)

Figura 41 - Imagem de microscopia confocal de fluorescência adquirida após 7 horas da aplicação do ALA e MAL, e (A) média dos perfis de intensidade pela profundidade.

As análises em 7 horas mostraram que ALA e MAL indicaram aumento na intensidade de fluorescência comparado a intensidade da autofluorescência e da análise feita em 5 horas. MAL mostrou maior intensidade ($y = 75$) até a profundidade de $x = 50\mu\text{m}$ do que o ALA, que nessa profundidade tem o valor de intensidade em torno de $y = 50$. Após $x = 100\mu\text{m}$ o comportamento deles são semelhantes.

A Figura 42 mostra as imagens de microscopia confocal e a análise da média dos perfis de intensidade para as amostras M2, M3, M4, M5 e M6 após 5 horas de aplicá-las.

M2 **(B)** **M3** **(C)**

M4 **(D)** **M5** **(E)**

Figura 42 - Imagem de microscopia confocal de fluorescência adquirida após 7 horas da aplicação das misturas M2, M3, M4, M5 e M6, e (A, B, C, D, E e F) média dos perfis de intensidade pela profundidade.

As misturas M3, M4 em 7 horas continuaram aumentando a intensidade de fluorescência e se destacando em produção de PPIX na faixa de até $x = 100 \mu\text{m}$ de profundidade. M5 não indicou grande diferença no aumento de intensidade comparado a análise realizada em 5 horas. No entanto a mistura M2 em 7 horas demonstrou grande aumento na intensidade de fluorescência, $y = 60$, até a profundidade de $x = 125 \mu\text{m}$. M6 indicou aumento na intensidade de fluorescência, $y = 50$, porém M6 é a amostra juntamente com o ALA que indicou menor evolução na intensidade de fluorescência de 5 para 7 horas.

4.4.1 Discussão dos dados coletados por microscopia confocal de fluorescência

As análises em 5 horas mostraram produção de PPIX somente para as misturas M3, M4 e M5, não indicando acúmulo de PPIX nas outras amostras e obtendo o mesmo perfil de intensidade de fluorescência da autofluorescência. Porém as análises

realizadas em 7 horas mostraram indicativo de formação de PPIX para todas as amostras e em toda extensão das camadas da pele.

Estes resultados sugerem que estudos de permeação de substâncias em modelos de pele de suíno *ex vivo* cultivadas *in vitro* podem ser úteis para prever o comportamento em estudos *in vivo*, como mostra o resultados de fluorescência realizados *in vivo* em que a mistura do ALA e MAL em proporções diferentes contribuíram para a melhoria na produção de PPIX. Da mesma forma que o estudo *in vitro* mostrou que é possível observar PPIX formada em 5 horas para as misturas M3, M4 e M5, o estudo *in vivo* mostrou que essas misturas podem formar PPIX na mesma quantidade que o ALA e em menor tempo de incubação. Apesar de existir diferenças no metabolismo a produção de PPIX ocorre da mesma forma para o modelo *in vivo*, sugerindo que esta metodologia pode ser uma alternativa para desenvolver novos protocolos que visam a otimização da TFD prevendo o comportamento e resultados durante o tratamento clínico em estudos de pele humana.

4.5 Análises do dano após TFD

Os fragmentos de pele para as análises histológicas foram coletadas após 24 e 48 horas do procedimento da TFD. Antes da coleta das biópsias de pele coletou-se imagens da superfície de cada área aonde foi aplicado o creme. Estas imagens têm por finalidade avaliar superficialmente o dano causado pela TFD e a evolução do processo de reparo. Avaliou-se tanto o dano causado na superfície da pele por meio de imagens bem como nas camadas mais profundas da pele por histologia. As análises foram feitas para as duas emulsões, O/A e A/O.

4.5.1 Análise macroscópica

Com a análise macroscópica por meio de imagem da superfície da pele tratada, foi observada evidências da evolução do processo de reparo, como edema e formação de crosta, após 24 e 48 horas do dano fotodinâmico induzido.

4.5.1.1 Emulsão O/A: análise macroscópica

A Figura 43 mostra o dano na superfície da pele do animal após 24 horas do tratamento, aonde observa-se a pele inflamada nesse período, sendo que os pontos inflamados são os mesmos pontos onde foi observado o acúmulo de PPIX após 3 horas de incubação, comprovando que o dano fotodinâmico esta diretamente relacionado à formação de PPIX na região.

Figura 43 - A) Imagem de fluorescência da PPIX formada após 3 horas da aplicação das misturas em emulsão O/A e, B) o dano fotodinâmico após 24 horas realizada a TFD.

O dano na superfície da pele 48 horas após o procedimento da TFD pode ser visto na Figura 44.

Após 48 horas observa-se a formação de crostas no local inflamado, evidenciando a evolução do processo de reparo da pele. Existem alguns pontos nas imagens de acúmulo de PPIX que nas imagens de dano da TFD não estão mais aparente, isto justifica-se pelo processo rápido de reparo da pele ou menor dano.

Figura 44 - A) Imagem de fluorescência da PPIX formada após 3 horas da aplicação das misturas em emulsão O/A e B) o dano fotodinâmico após 48 horas realizada a TFD.

4.5.1.2 Emulsão A/O: análise macroscópica

A Figura 45 e 46 mostra o dano na superfície da pele do animal após 24 e 48 horas após TFD, respectivamente, derivada da aplicação das amostras em emulsão A/O.

Figura 45 - A) Imagem de fluorescência da PPIX formada após 3 horas da aplicação das misturas em emulsão A/O e, B) o dano fotodinâmico após 24 horas realizada a TFD.

Figura 46 - A) Imagem de fluorescência da PPIX formada após 3 horas da aplicação das misturas em emulsão A/O e, B) o dano fotodinâmico após 48 horas realizada a TFD.

Observa-se nas imagens o dano superficial para a emulsão A/O, onde os pontos fluorescentes da PPIX também foram os mesmos pontos inflamados em 24 horas, porém em 48 horas esses pontos inflamados já não são tão aparentes como observado em 24 horas da aplicação das amostras em emulsão O/A, indicando o remodelamento da superfície da pele e processo de reparo superficial mais avançada do que para a aplicação das amostras em emulsão O/A.

4.5.2 Análise microscópica

As análises histológicas após 24 e 48 horas do tratamento foram avaliadas comparando como o tecido normal (controle), em que não houve nenhum tratamento, com as alterações dos tecidos tratados, e pontuados pelas características contidas na epiderme e derme. A pontuação é representada por símbolos (+), quanto mais símbolos, mais evidente é a presença das características relacionadas ao dano causado pela terapia fotodinâmica. E o símbolo (0) é a ausência do dano no tecido, isso quer dizer que não houve modificação em relação ao controle.

As características observadas ao longo da derme e epiderme são presença do estrato córneo; espessamento e aumento de número de células da epiderme que indica inflamação pela presença de infiltrados inflamatórios; aumento da conexão do tecido da epiderme e derme (papilas dérmicas), que é a presença da fase de proliferação e indicando ainda inflação e repitalização do tecido; presença de edema, o afrouxamento

das fibras de colágeno devido à presença de água; mudança da conformação e direcionamento das fibras de colágeno conhecido como fibroplasia; e remodelamento do tecido, em que a estrutura das fibras de colágeno volta a ser parecida com o controle.

É importante deixar claro que nos tempos analisados ~ 48h observa-se apenas o início da fase de remodelamento que são caracterizados pelo aumento da quantidade de colágeno III, que posteriormente serão substituídos pelo colágeno I (a partir de 14 dias a 1 mês, 3 meses a 1 ano). Diferentemente da fase proliferativa referente a derme, verifica-se a formação de colágeno III mas evidencia-se uma elevada degradação de colágeno velho (estriamento do colágeno – modificação das fibras de colágeno quanto a conformação e direção). Portanto a fase de proliferação e remodelação não está completamente em evidência. Sugere-se um início destas fases já que em algumas análises histológica verificamos que a fase de inflamação apresenta-se em menor evidência.

Nesse documento serão mostradas somente as análises das lâminas coradas com HE, em que tal corante nos possibilita observar a pele em toda sua extensão, epiderme e derme, e processos inflamatórios.

A Figura 47 mostra uma lâmina da pele normal do suíno (controle) com aumento de 10x corada com HE. Na imagem é possível observar as estruturas das camadas da pele como, estrato córneo, epiderme, papilas dérmicas, derme papilar e derme reticular.

Figura 47 - Histologia da pele suína (controle) sem nenhum tratamento, corada em HE; (1) estrato córneo, (2) epiderme, (3) papila dérmica, (4) derme papilar e (5) derme reticular.

É possível notar que na imagem da pele suína sem tratamento existe a presença de infiltrados inflamatórios, originando uma leve indicação de inflamação, com isso acreditamos que a presença dessa característica é devido ao metabolismo do animal, estresse do alojamento e processo da anestesia.

4.5.2.1 Emulsão O/A: análise microscópica

Na análise histológica dos tecidos tratados com TFD foi possível observar a ocorrência de infiltração de células circulantes (neutrófilos e monócitos) e a migração de células das áreas adjacentes como células epiteliais (queratinócitos). Em algumas amostras em fase inflamatória avançada, principalmente as imagens da pele coletada com 24 horas após TFD, e outras em fase inicial de remodelamento que é o caso das amostras coletadas em 48 horas.

Na Figura 48 são apresentadas imagens das lâminas histológicas, ALA e MAL, obtidas dos tecidos irradiados após 24 e 48 horas.

Figura 48 - Histologia da pele suína derivada da aplicação do ALA e MAL em emulsão O/A após 24 e 48 horas da TFD. Retângulo preto indica infiltrado inflamatório e retângulo branco indica regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

A Figura 48 referente à imagem do ALA - 24 horas, é possível notar o estreitamento da epiderme devido à falta das papilas dérmicas que conecta a epiderme à derme papilar, a presença de infiltrados inflamatórios, extravasamento de células e presença de edema (espaçamento das fibras) e a degradação das fibras de colágeno (“estriamento” modificação na conformação e direção das fibras) devido ao processo de proliferação. Em 48 horas, observa-se o aumento na espessura da epiderme e o início da formação das papilas dérmicas, e maior espessamento da epiderme e desordem das fibras de colágeno devido a degradação do colágeno (processo de proliferação).

Para a aplicação do MAL em 24 e 48 horas, não observou-se grandes danos na epiderme, as papilas dérmicas estão formadas, à estrutura da derme está semelhante

ao controle, sugerindo que a ação do MAL é em profundidade a nível da derme, conforme os dados de VALENTINE et al. (2011) e LESAR et al. (2011). Porém em 24 horas a derme possui presença de infiltrados inflamatórios, fibras de colágeno estão “estriadas”, ou seja, a conformação e direção estão modificadas (desordenadas) devido à degradação das mesmas. Em 48 horas, observa-se na derme menor quantidade de infiltrados inflamatórios e espaçamento (indicativo de edema), não observa-se mais o “estriamento ou fibras de colágeno estriadas” como em 24h, nota-se formação de um novo colágeno na pele sendo um indicativo do início da fase de remodelamento.

Na Tabela 7 apresentamos a classificação das alterações histológicas da pele decorrentes das fases do processo de reparo observadas para aplicação do ALA e MAL após 24 e 48 horas da realização da TFD.

Tabela 7 - Modificações observadas nas análises histológicas da aplicação do ALA e MAL em emulsão O/A após 24 e 48 horas da realização da TFD. Na tabela, '0' indica ausência da característica, e o símbolo de '+' indica a presença da característica comparada ao controle.

Fases	Modificação da pele	ALA		MAL	
		24h.	48h.	24h.	48h.
Inflamação	↑ Infiltrados inflamatórios (extravasamento de células)	+++	++	++	+
	+ sinais de edema	++	+	++	+
	Ausência das papilas dérmicas	+++	++	0	0
Proliferação	Repitelização	Espessamento da epiderme		0	+
		Presença das papilas dérmicas		0	+
	Fibroplasia	Degradação das fibras de colágeno I ("estriamento")		+	+++
		Neocolagênese (↑ colágeno III)_ ↓ "estriamento"		0	+
Remodelação	Início da substituição do colágeno III pelo I (maior quantidade de colágeno III sem observar degradação do colágeno I)	0	0	0	+

Na Figura 49 são apresentadas imagens das lâminas histológicas das misturas M2, M3, M4, M5 e M6, obtidas dos tecidos irradiados após 24 e 48 horas da TFD.

Figura 49 - Histologia da pele suína derivada da aplicação das misturas M2, M3, M4, M5 e M6 em emulsão O/A após 24 e 48 horas da TFD. Retângulo preto indica infiltrado inflamatório e retângulo branco indica regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Os cortes histológicos em 24 horas para as misturas de ALA e MAL também mostraram presença de inflamação da pele decorrente da presença de infiltrados inflamatórios e extravasamento de células (separação entre as fibras –frouxidão – edema). Na mistura M2 observa-se a deformação das papilas dérmicas e estriamento das fibras de colágeno na derme; e na mistura M3 observa-se o espessamento da epiderme, e na derme a presença de infiltrado inflamatório e o estriamento das fibras de colágeno que se mantem em 48h. A mistura M4 indica ausência das papilas dérmicas devido ao grande dano causado na epiderme, elevada presença de infiltrados inflamatórios, edema e fibras de colágeno desordenadas (conformação e direção) e frouxas. As misturas M5 e M6 não apresentaram danos na epiderme, conservando a estrutura das papilas dérmicas, o dano causado pelo tratamento foi maior na derme,

indicando fase de inflamação bem como de proliferação devido a degradação das fibras de colágeno indicando conformação e direção modificadas (desordenadas).

Em 48 horas visualizamos a fase referente ao processo de proliferação em estágio avançado onde observamos uma menor degradação do colágeno e uma maior neocolágenese do colágeno III. Aqui se sugere o início do processo de remodelamento das fibras presentes na derme, a estruturação da junção epiderme-derme com o fortalecimento das papilas dérmicas e renovação celular da pele (aumento da espessura e número de células da epiderme). A mistura M2 indica espessamento na região da epiderme e formação da estrutura das papilas dérmicas. M3 em 48 horas ainda possui dano vascular e não indicou grandes evoluções em relação a M3 em 24 horas.

Na mistura M4 em 48 horas observa o desprendimento da epiderme da derme, elevada presença de infiltrados inflamatórios e edema, e fibras de colágeno densas e espaçadas devido a inflamação. As Misturas M5 e M6 indicam estar em fase de proliferação já que apresentam fibras de colágeno desordenadas (conformação e direção) e “frouxas” e redução da fase inflamatória (diminuição do edema - menor espessamento das fibras) devido presença de regiões que estão em fase de modificação da conformação das fibras de colágeno, aumento das mesmas e diminuição do espaçamento entre elas.

Na Tabela 8 apresentamos a classificação das modificações da pele observadas para aplicação das misturas M2-M6 após 24 e 48 horas da realização da TFD.

Tabela 8 - Modificações observadas nas análises histológicas da aplicação das misturas M2, M3, M4, M5 e M6 em emulsão O/A após 24 e 48 horas da realização da TFD. Na tabela, '0' indica ausência da característica, e o símbolo de '+' indica a presença da característica comparada ao controle.

Fases	Modificação da pele	M2		M3		M4		M5		M6	
		24h	48h.	24h.	48h.	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Inflamação	↑Infiltrados inflamatórios (extravasamento de células)	++	++	++	++	++	+	++	+	++	+
	+ sinais de edema	++	+	+	++	+	++	++	+	++	+
	Ausência das papilas dérmicas	+	0	0	+	++	++	0	0	0	+
Proliferação	Repitelização: Espessamento da epiderme		++	++	++	0	0	0	0	0	0
	Presença das papilas dérmicas	+	++	++	++	0	0	++	++	++	+
	Degradação das fibras de colágeno I ("estriamento")	++	++	++	+	+	0	+	++	++	+
	Fibroplasia: Neocolagênese (↑ colágeno III)_ ↓ "estriamento"	0	0	0	++	0	++	0	+	0	++
Remodelamento	Início da substituição do colágeno III pelo I (maior quantidade de colágeno III sem observar degradação do colágeno I)	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0

4.5.2.2 Emulsão A/O: análise microscópica

Na Figura 50 são apresentadas imagens das lâminas histológicas, ALA e MAL, obtidas dos tecidos irradiados após 24 e 48 horas.

Figura 50 - Imagens das laminas da aplicação do ALA e MAL (emulsão A/O) na pele suína após 24 e 48 horas da TFD. Retângulo preto indica infiltrado inflamatório e retângulo branco indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Na lâmina para a aplicação do ALA em 24 horas observa-se processo inflamatório elevado decorrente do extravasamento das células epiteliais, ausência de papilas dérmicas em algumas áreas e edema indicando permanência na fase inflamatória. Em 48 horas, nota-se o espessamento da epiderme e a formação das papilas dérmicas (repitelização), mas ocorre o “estriamento” das fibras de colágeno na

derme já que as fibras de colágeno apresentam-se desordenadas (conformação e direção) e frouxas, sendo um indicativo da permanência na fase de proliferação do processo de reparo.

Para a aplicação do MAL em 24 horas observa-se processo inflamatório devido aos infiltrados inflamatório e edema, indicando dano maior na região da derme, pois a epiderme possui estrutura intacta e as papilas dérmicas também estão estruturadas. Em MAL-48 horas foi possível notar a derme com as fibras estriadas e menor espessamento entre elas, indicando a fase de proliferação.

Na Tabela 9 apresentamos a classificação das modificações da pele observadas para aplicação do ALA e MAL em emulsão A/O após 24 e 48 horas da realização da TFD.

Tabela 9 - Modificações observadas nas análises histológicas da aplicação do ALA e MAL em emulsão A/O após 24 e 48 horas da realização da TFD. Na tabela, '0' indica ausência da característica, e o símbolo de '+' indica a presença da característica comparada ao controle.

Fases	Modificação da pele	ALA		MAL		
		24h.	48h.	24h.	48h.	
Inflamação	↑Infiltrados inflamatórios (extravasamento de células)	+++	+	++	+	
	+ sinais de edema	+	+++	++	+	
	Ausência das papilas dérmicas	+++	0	0	0	
Proliferação	Repitelização	Espessamento da epiderme	0	+++	0	0
		Presença das papilas dérmicas	0	++	+++	++
	Fibroplasia	Degradação das fibras de colágeno I (“estriamento”)	+	+++	+++	+
		Neocolagênese (↑ colágeno III)_ ↓“estriamento”	0	0	0	++
Remodelação	Início da substituição do colágeno III pelo I (maior quantidade de colágeno III sem observar degradação do colágeno I)	0	0	0	0	

Na Figura 51 são apresentadas imagens das lâminas histológicas das misturas M2, M3, M4, M5 e M6, obtidas dos tecidos irradiados após 24 e 48 horas da TFD.

Figura 51 - Histologia da pele suína derivada da aplicação das misturas M2, M3, M4, M5 e M6 em emulsão A/O após 24 e 48 horas da TFD. Retângulo preto indica infiltrado inflamatório e retângulo branco indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno

Para M2 em 24 horas foi possível notar que existem processo inflamatório avançado e a epiderme está se desprendendo, devido à ausência das papilas dérmicas. Em 48 horas epiderme está se desprendendo, e na derme observa-se as fibras estriadas, indicando fase de proliferação. A mistura M3 em 24 horas possui indicação de edema, e ausência das papilas dérmicas; e em 48 horas, a epiderme não está se desprendendo e indica o início da formação da estrutura das papilas dérmicas, e se encontra em fase de proliferação avançada.

A mistura M4 em 24 horas está em processo inflamatório, possui uma pequena área em que a epiderme está se desprendendo, mas acredita-se que tenha sido causado no momento de preparo da lâmina e não pelo dano da terapia. Já em 48 horas observamos maior quantidade de fibras de colágeno “estriadas” (conformação e direção

estão modificadas) devido a degradação das mesmas indicando que está em fase de proliferação.

A mistura M5-24 horas indica desprendimento da epiderme, ausência das papilas dérmicas, maior área em fase inflamatória, em 48 horas observou a formação das papilas dérmicas, presença da epiderme, e fibras de colágeno “estriadas”, indicando está em fase de proliferação. Para a mistura M6 em 24 horas vimos que está em fase inflamatória, e a ausência da epiderme foi devido ao procedimento da lamina, no entanto na região do lado esquerdo ela está presente; e em 48 horas observa-se menor espessamento nas fibras de colágeno da derme, caracterizando a fase de proliferação.

Na Tabela 10 apresentamos a classificação das modificações da pele observadas para aplicação das misturas M2-M6 em emulsão A/O após 24 e 48 horas da realização da TFD.

Tabela 10 - Modificações observadas nas análises histológicas da aplicação das misturas M2, M3, M4, M5 e M6 em emulsão A/O após 24 e 48 horas da realização da TFD. Na tabela, '0' indica ausência da característica, e o símbolo de '+' indica a presença da característica comparada ao controle.

Fases	Modificação da pele	M2		M3		M4		M5		M6	
		24h	48h.	24h.	48h.	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Inflamação	↑Infiltrados inflamatórios (extravasamento de células)	++	+	+	++	+	+	++	+	++	+
	+ sinais de edema	+	++	+	++	++	+	+	+	++	+
	Ausência das papilas dérmicas	++	++	++	+	+	+	++	+	0	+
Proliferação	Epessamento da epiderme	0	0	0	++	0	0	0	+	0	0
	Reepitelização:										
	Presença das papilas dérmicas	0	0	0	++	+	++	0	+	+	+
	Degradação das fibras de colágeno I ("estriamento")	++	++	+	0	++	+	+	++	++	+
Fibroplasia:	Neocolagênese (↑ colágeno III)_ ↓"estriamento"	0	0	0	++	0	++	0	+	0	++
Remodelamento	Início da substituição do colágeno III pelo I (maior quantidade de colágeno III sem observar degradação do colágeno I)	0	0	0	+++	0	++	0	+	0	++

4.5.2 Discussão da análise do dano após TFD

A respeito do dano visual causado na superfície da pele pela TFD (dano macroscópico), observa-se que as imagens em que aplicou-se à emulsão A/O a evolução do processo de reparo que envolve todas as fases do processo cicatricial (Fase inflamação, proliferação e remodelamento) foi mais rápido do que a emulsão O/A, que ainda em 48 horas apresentava maior processo inflamatório (maior dano).

E como mencionado anteriormente, a emulsão A/O levou ao aumento da produção da PPIX para a aplicação do MAL, e dessa forma o dano causado tanto na superfície (dano visual macroscópico) quanto em profundidade por meio da análise histológica foi maior para amostra MAL em emulsão A/O. Foi possível notar que nas análises histológicas das amostras contendo mais MAL nas proporções (M5 e M6) em emulsão O/A, o dano maior foi na região da derme, mais profundo. Este resultado está de acordo com o fato de que a emulsão O/A apresenta-se mais localizada superficialmente e a A/O consegue permear através da epiderme e derme levando a um dano mais profundo corroborando com os danos histológicos.

A mudança na fase externa da emulsão de água (O/A) para óleo (A/O) melhorou a permeação do creme na pele, pois até mesmo as proporções contendo mais ALA (M2 e M3) obtiveram danos maiores nas camadas mais profundas da pele do que as amostras M2 e M3 em emulsão O/A. A mistura M4 foi à amostra que mais apresentou dano tanto na derme quanto na epiderme para ambas as emulsões aplicadas. Porém a mistura M5 tanto na emulsão A/O e O/A apresentou-se em fase inflamatória e proliferativa, evidenciando elevado dano fotodinâmico.

O ALA apresenta maior dano fotodinâmico ao longo de 48h independentemente do tipo de emulsão em sua aplicação já que permanece em fase inflamatória e proliferativa por mais tempo, sugerindo-se que a evolução do processo de reparo é mais lenta. Já o MAL apresenta menor dano fotodinâmico ao longo de 48h, sugerindo-se que a sua evolução no processo de reparo é mais rápida. No entanto deve-se enfatizar que quando aplicado em emulsão A/O, o MAL apresentou maior dano

fotodinâmico do que quando aplicado em emulsão O/A. E quanto às misturas observa-se que o dano fotodinâmico ao longo de 48h foi maior quando as mesmas foram aplicadas na emulsão A/O sugerindo-se que a sua evolução no processo de reparo é mais lenta.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Considerando os resultados obtidos neste trabalho podemos sugerir as melhores amostras para a realização do TFD médico voltado para a área de tratamento do câncer e doenças de pele e TFD dermatológico-estética voltada para o tratamento das disfunções estéticas faciais (acne, rugas e linhas, cicatrizes e manchas).

Dentro do contexto do TFD para aplicações tanto na área medica quanto dermatológico-estética sugere-se que a melhor mistura para aplicação da TFD seria a mistura M4 já que apresentou elevada quantidade de formação de PPIX em menor tempo de incubação. Na área médica oncológica sugeríamos a mistura 4 aplicada em emulsão A/O e na área dermatológico-estética quando aplicada em uma emulsão O/A. Esta sugestão vai de encontro ao fato que quando falamos de TFD dermatológico-estética temos em mente que devemos ocasionar um processo inflamatório menor do que quando falamos em TFD para a área oncológica que o objetivo final é levar a morte do tecido.

As alterações histológicas da pele na aplicação da TFD gira em torno dos aspectos relativos ao dano inflamatório, dano vascular que culmina na morte do tecido por apoptose e ou necrose. No entanto após a morte do tecido verifica-se um processo regenerativo do mesmo devido ao processo de reparo que acontece em paralelo. Neste sentido pode-se dizer que a TFD é a única terapia de tratamento do câncer que mata o tumor e ao mesmo tempo regenera o tecido levando a formação de uma nova pele no local (processo de reparo da pele).

Quando se fala de tratamento de pele normal avalia-se o dano gerado quanto à evolução do processo de reparo da pele e, portanto neste caso avaliamos danos inflamatórios relativos às células epiteliais e danos vasculares bem como danos relativos às fibras de colágeno.

Em vista de tudo mencionado podemos concluir que para a otimização da TFD é importante levar em conta a quantidade e uniformidade de PPIX formada pelos precursores ALA e MAL nas diferentes camadas da pele (epiderme e derme) bem como sua velocidade de formação (cinética). Além disso, é importante avaliar qual seria a

indicação da melhor mistura entre ALA e MAL em ambas as emulsões (A/O ou O/A) que favoreça um dano mais rápido e menos persistente e ou um dano mais lento e persistente.

De acordo com os resultados obtidos observou-se que utilizar ALA e MAL em uma mesma composição em diferentes proporções foi capaz de aumentar a formação de PPIX em quantidade tanto superficialmente quanto em profundidade, e também diminuir o tempo de incubação do creme na pele. Estes resultados serão de grande importância para aperfeiçoar cada vez mais os procedimentos da TFD.

Com a similaridade dos resultados adquiridos pelas medidas de fluorescência *in vivo* (espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo) calculou-se o coeficiente de correlação entre elas, e o resultado ($\rho \sim 0,8$) indicou uma forte correlação entre essas técnicas.

Como as medidas de fluorescência (espectroscopia e campo amplo) foram resultados obtidos da análise superficial da pele, as biópsias de pele adquiridas por imagem de fluorescência de campo amplo apresentou informações sobre a produção de PPIX nas camadas superficiais e profundas da pele (epiderme e derme). Portanto as análises realizadas nas biopsias mostraram que incorporar o ALA em uma emulsão A/O pode aumentar a permeação do creme e assim formando PPIX nas camadas mais profundas da pele.

De acordo com os dados de espectroscopia de fluorescência e imagem de fluorescência de campo amplo coletados para as aplicações utilizando as emulsões O/A e A/O não se pode sugerir qual foi a melhor emulsão, porque não foi coletado o mesmo número de réplicas e no mesmo animal, mas com os dados das medidas de fluorescência para ambas as emulsões foram possíveis concluir que a mudança de fase externa na emulsão proporcionou melhorias relativas à permeação e produção da PPIX pelo MAL bem como na permeação das outras amostras ao longo da pele (epiderme e derme).

Com o estudo realizado em modelo *ex vivo in vitro* e analisado por microscopia confocal de fluorescência foi possível desenvolver uma alternativa para prever melhores resultados em pele humana para uso clínico, otimizando a terapia, já que os resultados

de permeação obtido no modelo *in vivo* para as misturas foram similares para o modelo *ex vivo in vitro*, onde foi possível observar formação de PPIX em 5 horas.

Neste estudo foi possível demonstrar que a associação do ALA e MAL em um mesmo creme melhora a formação da PPIX em quantidade e tempo de incubação. E embora a mistura M5 tenha mostrado alta produção de PPIX nas medidas de fluorescência, tanto *in vivo* como *in vitro*, a mistura M4 mostrou para ambas as emulsões produção de PPIX igual ao ALA e obteve o menor tempo para produzir PPIX (formação de PPIX mais rápida), além de produzir a mesma quantidade PPIX nas camadas mais profundas da pele. E como o dano causado pela TFD depende da formação da PPIX, notou-se nas análises histológicas para a mistura M4 das emulsões O/A e A/O que o dano causado pela TFD atingiu tanto a epiderme como a derme. Contudo a mistura M4, independente da emulsão incorporada, irá proporcionar melhorias no protocolo da TFD, promovendo dano nas camadas da pele mais profundas e em menor tempo de incubação.

Como complementação desse trabalho propõe-se aplicar esse estudo em humanos, para que seja usado como alternativa da TFD na clínica.

REFERÊNCIAS¹

AGOSTINIS, P., et al. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. Ca-a Cancer. **Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281.

ANDRADE, C. T., (2012). Identificação de lesões de pele por detecção fotodinâmica mediada por ácido aminolevulínico. Dissertação (mestrado). Instituto de Física de São carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 109.

ALLISON, R., G. DOWNIE, R. CUENCA, X. HU, et al. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n.1, p. 27-42.

ALLISON, R. AND C. SIBATA. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n.2, p. 61-75.

AVCI, P., A. GUPTA, M. SADASIVAM, D. VECCHIO, et al. (2013). Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 41-52.

BABILAS, P., S. KARRER, A. SIDOROFF, M. LANDTHALER, et al. (2005) Photodynamic therapy in dermatology - an update. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 142-149.

BABILAS, P., S. SCHREML, M. LANDTHALER AND R. SZEIMIES. (2010). Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 26, n. 3, p. 118-132.

BAGNATO, V. S. (2008). Novas técnicas ópticas para áreas da saúde. **Livraria da Física**, p. 239.

BAGNATO, V. S. (2015). Terapia fotodinâmica dermatológica: Programa TFD Brasil. **Compacta Gráfica e Editora**, p. 313.

BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M., CURI. R. (2005). Mecanismos envolvidos na

cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciencias Farmacêuticas**, v. 41, n. 1.

BAROLET, D. (2008). Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n. 4, p. 227-238.

BRAGA, G., APARICIO, J. L., VILSINSKI, B. H., TESSARO, A. L. et al. (2014). Autoagregação da 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina (tmpp): estudos espectroscópicos e análises multivariadas. **Quim. Nova**, v. 37, n. 4, p. 648-652.

BREITINGER, H-G. (2012). Drug synergy – Mechanisms and methods of analysis, toxicity and drug testing. **Prof. Bill Acree (Ed.)**, ISBN: 978-953-51-0004-1, InTech, <http://www.intechopen.com/books/toxicity-and-drug-testing/drug-synergy-mechanisms-and-methods-ofanalysis>

BUNKE, A., O. ZERBE, H. SCHMID, G. BURMEISTER, et al. (2000). Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 10, p. 1335-1341.

BUTLER, A. AND S. GEORGE (1992). THE NONENZYMATIC CYCLIC DIMERIZATION OF 5-AMINOLEVULINIC ACID. **Tetrahedron**, v. 48, n. 37, p. 7879-7886.

CAMPBELL, S., J. TYRRELL, R. MARSHALL AND A. CURNOW (2010). Effect of MAL-photodynamic therapy on hypertrophic scarring. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 3, p. 183-188.

CASTANO, A., T. DEMIDOVA AND M. HAMBLIN (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293.

CASTANO, A., T. DEMIDOVA AND M. HAMBLIN (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three- Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106.

CASTANO, A., T. DEMIDOVA AND M. HAMBLIN (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-23.

CAVICCHINI, S., S. SERINI, R. FIORANI, V. GIRGENTI, et al. (2011). Long-term follow-up of methyl aminolevulinate (MAL)-PDT in difficult-to-treat cutaneous Bowen's disease. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 8, p. 1002-1005.

CHOI, J., G. PARK, E. NA, H. WI, et al. (2010). Molecular changes following topical photodynamic therapy using methyl aminolaevulinate in mouse skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 58, n. 3, p. 198-203.

CHRISTENSEN, E., T. WARLOE, S. KROON, J. FUNK, et al. (2010). Guidelines for practical use of MAL-PDT in non-melanoma skin cancer. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 5, p. 505-512.

COLUSSI, V. C.; NICOLA, E. M.; NICOLA, J. H. (1996). Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 229-236.

CORTI, M. AND C. MAINETTI (2010). Methylaminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy: The Patient's View. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 5, p. 697-702.

DIRSCHKA, T., P. RADNY, R. DOMINICUS, H. MENSING, et al. (2012). Photodynamic therapy with BF-200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a multicentre, randomized, observer-blind phase III study in comparison with a registered methyl-5-aminolaevulinate cream and placebo. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 1, p. 137-146.

DONNELLY, R.F., et al. (2009). Microneedle arrays permit enhanced intradermal delivery of a preformed photosensitizer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 195-204.

DOVER, J., A. BHATIA, B. STEWART AND K. ARNDT, (2005). Topical 5-aminolevulinic acid combined with intense pulsed light in the treatment of photoaging. **Archives of Dermatology**, v. 141, n. 10, p. 1247-1252.

ELFSSON, B., I. WALLIN, S. EKSBERG, K. RUDAEUS, et al. (1999). Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 87-91.

FAI, D., N. ARPAIA, I. ROMANO, M. VESTITA, et al. (2009). Methyl-aminolevulinate photodynamic therapy for the treatment of actinic keratoses and non-melanoma skin cancers: a retrospective analysis of response in 462 patients. **Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia**, v. 144, n. 3, p. 281-285.

FAI, D., I. ROMANO, N. CASSANO AND G. VENA (2012). Methyl-aminolevulinate photodynamic therapy for the treatment of actinic cheilitis: a retrospective evaluation of 29 patients. **Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia**, v. 147, n. 1, p. 99-101.

FERREIRA J. (2007) **Estudo e correlação de diferentes derivados de hematoporfirina e clorinas no processo de TFD**. 2007. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 128.

FRAGA, A. B. (2007). Peso médio do leitão, peso e tamanho de leitegada, natimortalidade e mortalidade em suínos no Estado de Alagoas. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.4, p. 354-363.

GADMAR, O., J. MOAN, E. SCHEIE, L. MA, et al. (2002) The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 67, n. 3, p. 187-193.

GAY, S., C. MARTOCCIA, M. ZELLWEGER, Q. WANG, et al. (2014) Study of the stability of the 5-aminolevulinic acid tyrosine ester in aqueous solution. **Arkivoc**, p. 228-238.

GHOLAM, P., K. DENK, T. SEHR, A. ENK, et al. (2010). Factors influencing pain intensity during topical photodynamic therapy of complete cosmetic units for actinic keratoses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 213-218.

GHOLAM, P., T. WEBERSCHOCK, K. DENK AND A. ENK (2011) Treatment with 5-Aminolaevulinic Acid Methyl ester Is Less Painful than Treatment with 5-Aminolaevulinic Acid Nanoemulsion in Topical Photodynamic **Therapy for Actinic Keratosis. Dermatology**, v. 222, n. 4, p. 358-362.

GIUNTINI, F., et al. (2008). A novel approach to improve cellular delivery of 5-aminolaevulinic acid: New ALA-containing peptide Prodrugs for photodynamic therapy. **Journal of Peptide Science**, v. 14, n. 8, p. 156-156.

GOULART, V. P. (2012). **Espectroscopia de fluorescência na otimização da terapia fotodinâmica em carcinoma espinocelular de pele e sua avaliação utilizando tomografia por coerência óptica**. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 94.

GRECCO, C. **Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando luz pulsada no regime de femtossegundos**. (2009). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 74p.

HERREROS, F., M. CINTRA, R. ADAM, A. DE MORAES, et al. (2007). Remodeling of the human dermis after application of salicylate silanol. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, n. 1, p. 41-45.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (2016). Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 10 abril 2016.

ISAAC, C., LADEIRA, P. R. S., RÉGO, F. M. P, ALDULANTE, J. C. B., FERREIRA, M. G. (2010). Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n. 3 -4, p. 125-31

ISSA, M. AND M. MANELA-AZULAY (2010). Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511.

JAFFE, E. AND J. RAJAGOPALAN (1990). nuclear-magnetic-resonance studies of 5-aminolevulinic acid demonstrate multiple forms in aqueous-solution. **Bioorganic Chemistry**, v. 18, n.4, p. 381-394.

JUZENAS, P., S. SHARFAEI, J. MOAN AND R. BISSONNETTE (2002). Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumours and normal skin of hairless mice after topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 67, n. 1, p. 11-17.

JUZENIENE, A., P. JUZENAS, L. MA, V. IANI, et al. (2004). Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 19, n. 3, p. 139-149.

KALISZEWSKI, M., M. KWASNY, A. JUZENIENE, P. JUZENAS, et al. (2007). Biological activity of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester after storage under different conditions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 87, n. 2, p. 67-72.

KARRER, S., E. KOHL, K. FEISE, D. HIEPE-WEGENER, et al. (2013). Photodynamic therapy for skin rejuvenation: review and summary of the literature - results of a consensus conference of an expert group for aesthetic photodynamic therapy. **Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. 2, p.137-148.

KENNEDY, J. AND R. POTTIER (1992). Endogenous protoporphyrin-IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 14, n. 4, p. 275-292.

KENNEDY, J., R. POTTIER AND D. PROSS (1990). photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin .9. basic principles and present clinical-experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 6, n.1-2, p. 143-148.

KLEINPENNING, M., P. VAN DE KERKHOF AND R. GERRITSEN (2010). The clinical efficacy of topical methyl-aminolevulinate photodynamic therapy in moderate to severe actinic keratoses of the face and scalp. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 21, n. 4, p. 252-257.

KNIGHT, K., J. MCCANN, C. VANDERKOLK, S. COE, et al. (1990). The redistribution of collagen in expanded pig skin. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 43, n. 5, p. 565-570.

KONAN, Y., R. GURNY AND E. ALLEMANN (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106.

KOZAK, R. (2014). **Terapia fotodinâmica para tratamento de carcinoma basocelular do tipo nodular: estudo comparativo entre o ácido 5-aminolevulínico (ALA) em nanoemulsão e o metil-ALA**. Dissertação (Mestrado em Nanociência e

Nanotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, p. 91.

LESAR, A., J. FERGUSON AND H. MOSELEY (2011). An investigation of the fluorescence induced by topical application of 5-aminolaevulinic acid and methyl aminolaevulinate at different body sites on normal human skin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 2, p. 97-103.

LI, Q., T. GAO, B. JIAO, X. HU, et al. (2011). Tumor Thickness Predicts Long-Term Complete Response of Facial Basal Cell Carcinomas in Asian Skin Types IV/V Treated with Methyl Aminolaevulinate Photodynamic Therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 7, p. 501-507.

LOPEZ, R., N. LANGE, R. GUY AND M. BENTLEY (2004). Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 1, p. 77-94.

LUKYANETS, E. (1999). Phthalocyanines as photosensitizers in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 3, n. 6-7, p. 424-432.

MAISCH, T., F. SANTARELLI, S. SCHREML, P. BABILAS, et al. (2010). Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 8, p. E302-E305.

MAJELLA E. L. (2013). Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 12-21.

MAXWELL, J. (2005) Party drugs: Properties, prevalence, patterns, and problems. **Substance Use & Misuse**, v. 40, n. 9-10, p. 1203-1240.

MELO, C., C. KURACHI, C. GRECCO, C. SIBATA, et al. (2004). Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 73, n. 3, p. 183-188.

MELO, C., A. LIMA, I. BRASIL, O. SILVA, et al. (2001). Characterization of light penetration in rat tissues. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 19, n. 4, p.

175-179.

MENEZES, P. F. C. (2006). **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 181.

MENEZES, P., M. REQUENA AND V. BAGNATO (2014) Optimization of Photodynamic Therapy Using Negative Pressure. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 5, p. 296-301.

MIKOLAJEWSKA, P., V. IANI, A. JUZENIENE AND J. MOAN (2009). Topical aminolaevulinic acid- and aminolaevulinic acid methyl ester-based photodynamic therapy with red and violet light: influence of wavelength on pain and erythema. **British Journal of Dermatology**, v. 161, n. 5, p. 1173-1179.

MOLONEY, F. AND P. COLLINS (2007). Randomised, double-blind, prospective study to compare topical 5-aminolaevulinic acid methylester with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 11, p. 2692-2692.

MORDON, S. (2014). A commentary on the role of skin temperature on the effectiveness of ALA-PDT in Dermatology. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 3, p. 416-419.

MORTON, C. (2007). Methyl aminolevulinate: Actinic keratoses and Bowen's disease. **Dermatologic Clinics**, v. 25, n. 1, p. 81-+.

MORTON, C., R. SCHOLEFIELD, C. WHITEHURST AND J. BIRCH (2005). An open study to determine the efficacy of blue light in the treatment of mild to moderate acne. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 16, n. 4, p. 219-223.

MOSELEY, H., A. LESAR AND J. FERGUSON (2009). Fluorescence induced by ala and mal in normal skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, p. 4-5.

NARVAEZ V., J. F. AND JIMENEZ C., C. (2011). Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks. **Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica**, v. 19, n. 1, p. 93-108.

OLIVEIRA, E. R. (2014). **Queratoses actínicas disseminadas de membros superiores: comparação da terapia fotodinâmica com ácido aminolevulínico 15% e metil aminolevulínico 15% através do protótipo kerato PDT.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, p. 77.

PARK, M., S. SOHN, E. LEE AND Y. KIM (2010). Photorejuvenation induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in patients with actinic keratosis: A histologic analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 62, n. 1, p. 85-95.

PENG, Q., J. MOAN, T. WARLOE, I. VLADIMIR, et al. (1996). Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 34, n. 1, p. 95-96.

PLAETZER, K., KRAMMER, J., BERR, F., KIESSLICH, T. (2008). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268.

RAMIREZ, D. P. (2012). **Avaliação da cicatrização da pele de rato wistar após múltiplas sessões de terapia fotodinâmica.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p.118.

RAMIREZ, D. P.; KURACHI, C.; INADA, N. M.; MORIYAMA, L. T.; SALVIO, A. G.; VOLLET FILHO, J. D. (2014). Experience and BCC subtypes as determinants of MAL–PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. **Photodiagnosis Photodynamics Therapy**, v. 11, n. 1, p. 22–26.

REGO, R. F. (2008). **Estudo comparative de precursores da protoporfirina IX (ALA e MAL) utilizados topicamente em terapia fotodinâmica.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 91.

REQUENA, M. B. (2015). **Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele normal de suínos e diferentes fotossensibilizadores.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 103.

RKEIN, A. M. AND OZOG, M. (2014). Photodynamica therapy. **Dermatol Clin**, v. 32, p.

415–425.

ROBERTSON, C., D. EVANS AND H. ABRAHARNSE (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8.

RODRIGUES, P., P. DE MENEZES, A. FUJITA, A. ESCOBAR, et al. (2015). Assessment of ALA-induced PPIX production in porcine skin pretreated with microneedles. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 723-729.

RODRIGUES, P., P. DE MENEZES, A. FUJITA, A. ESCOBAR, et al. (2014). Microneedles rollers as a potential device to increase ALA diffusion and PPIX production: evaluations by wide-field fluorescence imaging and fluorescence spectroscopy. **Proc. SPIE 8926, Photonic Therapeutics and Diagnostics X**, v.892614.

SAKAMOTO, F., Z. TANNOUS, A. DOUKAS, W. FARINELLI, et al. (2009). Porphyrin Distribution After Topical Aminolevulinic Acid in a Novel Porcine Model of Sebaceous Skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 2, p. 154-160.

SMITS, T. AND A. MOOR (2009). New aspects in photodynamic therapy of actinic keratoses. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 96, n. 3, p. 159-169.

STEBBINS, W. AND C. HANKE (2011). MAL-PDT for difficult to treat nonmelanoma skin cancer. **Dermatologic Therapy**, v. 24, n. 1, p. 82-93.

SZEIMIES, R. (2007). Methyl aminolevulinate-photodynamic therapy for basal cell carcinoma. **Dermatologic Clinics**, v. 25, n. 1, p. 89-+.

TYRRELL, J., S. CAMPBELL AND A. CURNOW (2010). Protoporphyrin IX photobleaching during the light irradiation phase of standard dermatological methylaminolevulinate photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 4, n. 7, p. 232-238.

TOREZAN, L., NIWA, A. B. M., NETO, C. F. (2009). Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.

84, n. 5, p. 445-59.

TYRRELL, J., S. CAMPBELL AND A. CURNOW (2010). The Relationship Between Protoporphyrin IX Photobleaching During Real-Time Dermatological Methyl-Aminolevulinate Photodynamic Therapy (MAL-PDT) and Subsequent Clinical Outcome. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 7, p. 613-619.

TYRRELL, J., C. THORN, A. SHORE, S. CAMPBELL, et al. (2011). Oxygen saturation and perfusion changes during dermatological methylaminolaevulinate photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 6, p. 1323-1331.

Uebelhoer, N.S. e J.S. Dover (2005). Photodynamic therapy for cosmetic applications. **Dermatologic Therapy**, v. 18, p. 242–252.

VALENTINE, R., S. IBBOTSON, C. BROWN, K. WOOD, et al. (2011). A Quantitative Comparison of 5-Aminolaevulinic Acid- and Methyl Aminolevulinate-Induced Fluorescence, Photobleaching and Pain During Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 1, p. 242-249.

VALLINAYAGAM, R. (2007). **Synthesis of Novel Prodrugs for Targeted Photodynamic Therapy**. These (Docteur ès Sciences par) - Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, Italy, p. 313.

WAN, M. T. AND LIN, J. Y. (2014). Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 145–163.

WANT, D., J. KENNEDY, M. BRUNDAGE AND D. ROTHWELL (1997). 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for superficial basal cell carcinoma. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 39, n. 2, p. 353-353.

WIEGELL, S., J. SKIVEREN, P. PHILIPSEN AND H. WULF (2008). Pain during photodynamic therapy is associated with protoporphyrin IX fluorescence and fluence rate. **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 4, p. 727-733.

WIEGELL, S. AND H. WULF (2006). Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. **Journal of the American Academy**

of Dermatology, v. 54, n. 4, p. 647-651.

ZANE, C., R. CAPEZZERA, R. SALA, M. VENTURINI, et al. (2007). Clinical and echographic analysis of photodynamic therapy using methylaminolevulinate as sensitizer in the treatment of photodamaged facial skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 3, p. 203-209.

Zhang, L.W., et al. (2011). Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 693-704.

ANEXOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007344/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da associação de diferentes fotossensibilizadores em epitélio suíno**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de Abril de 2013.

Jaboticabal, 11 de Abril de 2013.

Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA