UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CINTIA TELES DE ANDRADE

Avaliação dos efeitos vasculares e teciduais em modelo animal de pele
aplicando a terapia fotodinâmica combinada à radioterapia

São Carlos

2016

CINTIA TELES DE ANDRADE

Avaliação dos efeitos vasculares e teciduais em modelo animal de pele
aplicando a terapia fotodinâmica combinada à radioterapia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Co-orientador: Prof^o. Dr. Vanderlei S. Bagnato

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2016

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

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Andrade, Cintia Teles de

Avaliação dos efeitos vasculares e teciduais em
modelo animal de pele aplicando a terapia
fotodinâmica combinada à radioterapia / Cintia Teles
de Andrade; orientadora Cristina Kurachi; co-
orientador Vanderlei S. Bagnato - versão corrigida --
São Carlos, 2016.
135 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Radioterapia. 3.
Análises ópticas. 4. Efeito vascular. I. Kurachi,
Cristina, orient. II. Bagnato, Vanderlei S., co-
orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, as pessoas mais importantes da minha vida: Meus Pais. Minha mãe, Josefa, por todo apoio, confiança e amor incondicional de sempre e meu pai, Manuel, que, apesar do seu jeito teimoso de ser, me ensinou a trabalhar duro e lutar pelos meus objetivos. Amo vocês!

A todos os meus familiares que, cada um à sua maneira, acreditaram em mim, me apoiaram e me deram força para que eu pudesse aguentar todo esse tempo longe de casa.

Ao meu namorado, Higor, por todo o companheirismo, cumplicidade, amizade e, principalmente, pela paciência nos momentos de estresse.

Aos meus amigos de Aracaju que me deram muito apoio quando eu cheguei a São Carlos e que, mesmo 6 anos após a minha partida, continuam sendo chamados de AMIGOS.

A professora Cristina Kurachi, que sempre estava lá para me mostrar o quanto as coisas são mais simples do que eu penso e além de orientadora, se tornou uma conselheira e amiga.

Ao professor Vanderlei Bagnato pela oportunidade, ensinamentos, inspiração e, principalmente, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Biofotônica pelo companheirismo e ajuda no desenvolvimento desse projeto. Em especial a Natalia, pelos conselhos e conversas via Skype nos momentos críticos. A Layla, pelas viagens “emocionantes” para Ribeirão Preto para fazer os experimentos. Ao Sebastião e seus conselhos fundamentais. A Dora Patrícia, pelas tabelas que acrescentaram qualidade às discussões. A Lili pelas discussões e correções que acrescentaram muito ao projeto. Ao Didi, vulgo José Dirceu, pelas ajudas intelectuais, correções de texto e, principalmente, pelas 4 horas de conversa via Skype, no Natal, para discutir o texto. A turma do bandex, que tornaram meus almoços de R\$ 1,90 de um valor incalculável. E, por fim, as meninas do “Recanto das Princesas”, que tornaram meus dias de trabalho mais felizes e menos tensos, sem perder o foco.

A toda equipe colaboradora de Ribeirão Preto. Em especial a Profa Juliana F. Pavoni, por toda a ajuda com a parte de radioterapia e ao Prof Oswaldo Baffa, ambos da FFCLRP-USP. Ao Hermes M. de Oliveira, responsável pelo Biotério da Cirurgia experimental, que fornecia e alojava os animais durante os experimentos. Ao Prof Luis Fernando Tirapelli (FMRP-USP), pelas análises histológicas, e a toda equipe do setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas, liderados pelo Prof Harley F. de Oliveira.

A toda equipe do Dartmouth College, que me receberam muito bem e tornaram aquele lugar gelado em um lar aconchegante, entre eles: Jacqueline, Kayla, Jason, Kim, Chad e Sally. Em especial, gostaria de agradecer ao Prof Brian Pogue, um supervisor atencioso, calmo, presente e paciente com o inglês estrangeiro, que se preocupa com o aluno não só academicamente, mas em tornar a estadia em Hanover a mais agradável possível. Também gostaria de agradecer a Amy, mais que uma landlady, uma amiga, que descongelou meus dedos e cuidava das minhas costas toda vez que escorregava. E, por fim, muito obrigada a Ana, que tornou minha estadia em NH muito mais fácil, não só por me explicar como as coisas funcionavam e por me conseguir lugar para morar, mas pela amizade, companheirismo, discussões acadêmicas, por dividir horas de trabalho até tarde no laboratório ou no Salt Hill. Enfim, o período sanduiche foi uma experiência incrível, tanto acadêmica quanto pessoal, e não seria a mesma coisa sem a ajuda de vocês, obrigada!

A Isabelle Ferreira, patologista da UNIVAP, que fez a análise histológica do material de Dartmouth e a Fernanda Brandão, física médica da Santa Casa de São Carlos, que me permitia irradiar soluções para fazer alguns testes de absorção.

E, por fim, gostaria de agradecer a CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro por meio da bolsa de doutorado, uma em cada período; e a CAPES, pelo suporte financeiro por meio da bolsa para a realização do doutorado sanduiche.

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir”

Dalai Lama

RESUMO

ANDRADE, C. T. **Avaliação dos efeitos vasculares e teciduais em modelo animal de pele aplicando a terapia fotodinâmica combinada à radioterapia.** 2016. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A incidência de câncer tem aumentado nas últimas décadas, o que coloca essa doença como um problema de saúde pública mundial. Para melhorar o prognóstico do paciente, é necessário o desenvolvimento e/ou aprimoramento de técnicas que aumentem a efetividade e diminuam os efeitos adversos do tratamento. Entre as técnicas para tratamento local de lesões neoplásicas, destacam-se a terapia fotodinâmica (TFD) e a radioterapia (RT). A TFD consiste na interação entre fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular; que combinados causam morte celular. A RT, por sua vez, é uma técnica já consagrada clinicamente que utiliza radiação ionizante para o tratamento de tumores malignos. O efeito da combinação entre as técnicas não está claramente estabelecido, e poderia aumentar o dano causado ao tecido enquanto diminui os efeitos colaterais provenientes da RT. Neste contexto, o objetivo deste estudo é analisar os efeitos da TFD associada à RT quando comparados aos efeitos individuais de cada terapia, avaliando se existe um método preferencial de combinação das técnicas. A primeira etapa do estudo foi realizada na Universidade de São Paulo e tratou a pele sadia de ratos Wistar com diferentes protocolos que combinavam as técnicas em diversos protocolos. Análises clínicas, imunohistoquímica e histológica, além da coleta de espectros de fluorescência, foram realizadas com o intuito de observar a possível sinergia dos efeitos das terapias combinadas. Os resultados mostraram uma maior necrose tecidual para a combinação TFD+24h+RT. A combinação RT+24h+TFD não apresentou um dano tão expressivo quanto o grupo TFD+24h+RT, devido a ineficiência de produção de PpIX em tecido previamente irradiado, comprovado pelo espectro de fluorescência. Na segunda etapa, realizada no Dartmouth College, os grupos que apresentaram maior dano foram escolhidos para avaliação do dano vascular por análises de refletância, da qual foram extraídas informações sobre a saturação de oxigênio, concentrações de meta-hemoglobina e bilirrubina, fração de volume sanguíneo e raio do vaso, tanto em tecido sadio de ratos Wistar quanto em tumores cutâneos em

camundongos Nude. O recrescimento dos tumores também foi avaliado. A análise óptica se mostrou um método efetivo para monitorar o dano causado pela TFD na pele normal, mas ineficiente para monitorar o dano na combinação dos grupos, uma vez que a RT não apresenta dano vascular importante. Para os tumores, as análises ópticas não foram eficazes para monitorar o dano das terapias. A curva de crescimento do tumor mostrou que o grupo TFD+24h+RT foi a melhor combinação para TFD e RT. Estudar a combinação do uso de raios-X com o efeito fotodinâmico é muito importante para o entendimento de fatores associados ao tratamento de tumores malignos. Os resultados obtidos devem contribuir na escolha da melhor combinação entre os tratamentos, potencializando o resultado do tratamento de lesões, diminuindo o tempo de tratamento e os efeitos colaterais.

Palavras-chave: Radioterapia. Terapia fotodinâmica. Análises ópticas. Efeito vascular.

ABSTRACT

ANDRADE, C. T. **Evaluation of vascular and tissue effects in an animal model of skin by applying photodynamic therapy combined with radiotherapy.** 2016. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The cancer incidence has shown a great increase recently, making this disease a worldwide public health problem. Improving a patient's prognosis requires development and/or improvement of techniques that increase efficacy and reduce side effects of the treatment. Among the techniques for non-systemic treatment of cancer, photodynamic therapy (PDT) and radiotherapy stand out. PDT consists in an interaction between photosensitizer, light and molecular oxygen to induce cell death, whereas radiotherapy is a well-established technique which uses ionizing radiation for tumor treatment. The effect of the technique combination is not clear and is expected to increase the damage in the tissue while decreasing the side effects from RT. In this context, the aim of this study is to analyze the effects of PDT associated with RT compared to individual effects of each therapy, assessing whether there is a preferred method of combination of both. The first stage of the study was conducted at the University of Sao Paulo and treated healthy skin of Wistar rats with different protocols that combined the techniques in various protocols. Clinical, immunohistochemistry and histological evaluations, as well as collecting fluorescence spectra were conducted in order to observe the possible synergistic effects of combined therapies. The results showed greater tissue necrosis for combining PDT+24h+RT. The combination RT+24h+PDT did not show as significant damage as the PDT+24h+RT group, due to PpIX production inefficiency in previously irradiated tissue, evidenced by fluorescence spectrum. In a second stage, performed at Dartmouth College, vascular damage was evaluated for the groups that showed enhanced damage through reflectance analysis, which provided information about oxygen saturation, met-hemoglobin and bilirubin concentrations, blood volume fraction and vessel radius, both in healthy tissue of Wistar rats and skin tumors in Nude mice. The regrowth of tumors was also evaluated. The optical analysis proved to be an effective method to monitor the damage caused by PDT in normal skin. This is not, however, an efficient method for monitoring the damage on the combination of

groups, since the RT does not present any significant vascular damage. For tumors, the optical analysis did not show an effective method to monitor the damage of therapies. Tumor regrowth curves showed that the PDT+24h+RT group was the best combination for PDT and RT. The study of combination using X-rays and the photodynamic effect is very important to understand factors associated with the treatment of malignant tumors. The results should help in choosing the best combination of treatments and may be used to enhance the result of a lesion treatment, reducing treatment time and side effects.

Keywords: Radiotherapy. Photodynamic therapy. Optical analysis. Vascular effect.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Principais interações da luz com o tecido biológico. (A) representa a fluorescência, a transmissão primária (direta, sem espalhamento no meio) e a transmissão difusa (indireta, sofre espalhamento no meio). (B) representa a reflexão difusa (ângulo de reflexão diferente do ângulo de incidência), a reflexão especular (ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência), a absorção e a reflexão total interna (ocorre devido à diferença no índice de refração).....23
- Figura 2 – Diagrama ilustrando o efeito fotoelétrico, no qual o fóton interage com o átomo e ejetar um elétron de seu orbital (fotoelétron). O fóton incidente é absorvido e sua energia é usada em parte para superar a energia de ligação do elétron enquanto o restante aparece como energia cinética do fotoelétron resultante.25
- Figura 3 – Diagrama ilustrando o efeito Compton, no qual o elétron recebe parte da energia do fóton incidente e é ejetado com um ângulo θ . O fóton, com a energia reduzida, é espalhado com um ângulo ϕ . Esse efeito ocorre quando o fóton incidente tem energia muito maior que a energia de ligação do elétron.26
- Figura 4 – Diagrama ilustrando a formação de pares que, em meio biológico, ocorre quando um fóton de alta energia (maior que 1,02 MeV) interage com os átomos do meio. O fóton incidente interage com o campo eletromagnético do núcleo atômico e toda sua energia é então convertida na massa de um elétron negativo e um elétron positivo (pósitron). O excesso de energia do fóton incidente, além daquela necessária para a criação do par de partículas (1,02 MeV), se torna energia cinética.27
- Figura 5 – Tipo de interação dominante em função do número atômico do material absorvedor e da energia do fóton incidente.....28
- Figura 6 – Rota biossintética do grupo heme. O ALA, após penetrar no tecido, é convertido enzimaticamente em PpIX, e o uso dos inibidores da ferroquelatase permite seu acúmulo no tecido.29
- Figura 7 – Espectro de absorção da PpIX normalizado. Banda de Soret (região do UV-azul) e bandas Q (regiões do verde e vermelho).....30
- Figura 8 – Espectro de absorção dos principais componentes da pele. A janela óptica consiste na faixa de comprimento de onda que compreende o intervalo entre 600 e 1200 nm, uma vez que estes são menos absorvidos e espalhados pelos constituintes da pele.....31
- Figura 9 – Diagrama de Jablonski modificado mostrando processos que ocorrem na molécula do FS até o momento das reações do tipo I e II.....33

Figura 10 – Gráfico normalizado da distribuição da dose em função da profundidade para diferentes energias de feixe: 100 e 250 KV (fótons) e 6 MeV (elétrons).	35
Figura 11 – LINCE (MMOptics®, à esquerda) e equipamento de ortovoltagem Stabilipan (Siemens®, à direita), dispositivos utilizados para os tratamentos de TFD e RT.	45
Figura 12 – Laser de diodo (à esquerda) e LINAC (à direita), dispositivos utilizados para os tratamentos de TFD e RT, respectivamente.	50
Figura 13 – Dosímetro desenvolvido no Dartmouth College utilizado para medir refletância de luz branca e sinal de fluorescência.	52
Figura 14 – Os gráficos A, B, C, D, E e F são exemplos dos resultados do processamento dos dados obtidos pelo dosímetro. A figura A corresponde ao gráfico da refletância antes da TFD, e B é a refletância 24 horas após a terapia, nos quais a curva pontilhada representa o dado obtido e a curva em vermelho é o ajuste. Já a figura C corresponde ao gráfico da fluorescência excitada com a luz azul antes da TFD, enquanto D é a fluorescência com a mesma excitação após a terapia. E corresponde ao gráfico da fluorescência com excitação no vermelho antes do tratamento, já F é a fluorescência com a mesma excitação após a terapia. Para os gráficos C, D, E e F, a curva pontilhada é o dado obtido, a curva em vermelho é o ajuste, e as curvas em azul, preto e verde fornecem os dados obtidos após os cálculos realizados no programa e correspondem a fluorescência endógena, a fluorescência da PpIX e a fluorescência dos subprodutos, respectivamente.	53
Figura 15 – A) Injeção intradérmica de 10^6 células de carcinoma epidermóide, A431, no camundongo. B) Medida do volume do tumor utilizando um paquímetro.	56
Figura 16 – Imagens macroscópicas de luz branca das lesões formadas 10 dias após a RT. A) 10 Gy. B) 15Gy.	58
Figura 17 - Fotomicrografia das lâminas histológicas: avaliação histológica dos danos teciduais dos tratamentos de acordo com a dose utilizando a técnica de coloração por HE. A) 10 Gy, onde a seta aponta para uma crista epidérmica, estrutura que não está presente quando o tecido foi tratado por 15 Gy. Além disso, esse grupo também apresenta uma maior espessura da epiderme, que indica um tecido em recuperação. B) 15 Gy, que apresentou um grande dano da região da epiderme mesmo 10 dias após o tratamento, ainda sem sinais de recuperação da região e com grande quantidade de células inflamatórias.	59
Figura 18 – Espectros de fluorescência em diferentes etapas de tratamento, por grupo experimental. “Eutanásia” representa a coleta uma semana após os tratamentos.	61
Figura 19 – Razão das intensidades entre os picos (630 nm/500 nm) em diferentes etapas de tratamento, por grupo experimental. “Eutanásia” representa a coleta uma semana após os tratamentos.	62

Figura 20 – Fotomicrografia do grupo tratado somente com TFD com expressão proteica de Caspase 3 (setas) em células da derme.....	64
Figura 21 – Percentual de células positivas para Caspase 3 em função do grupo avaliado.	64
Figura 22 – Imagem de luz branca das lesões formadas na pele dos ratos, coletadas uma semana após os tratamentos, de acordo com seus respectivos grupos.	66
Figura 23 – Fotomicrografia das lâminas histológicas: avaliação histológica dos danos teciduais dos tratamentos de acordo com o grupo, utilizando a técnica de coloração por HE.....	68
Figura 24 – Fotomicrografia das alterações histológicas observadas utilizando a técnica de TM. A) Animal do grupo 3, mostrando grande foco hemorrágico (H). B) Animal do grupo 3 mostrando grande foco de necrose (N). C) Animal do grupo 4 mostrando área de edema (E) e vasos sanguíneos contendo alguns neutrófilos no seu interior (setas), além de algumas fibras colágenas normais (FC). D) Animal do grupo 4 mostrando grande foco necrótico contendo células com núcleo picnótico (N) e um vaso sanguíneo contendo alguns neutrófilos no seu interior (setas).....	70
Figura 25 – Espectro de absorção do Photogem®, em diferentes escalas para as bandas de Soret (< 470 nm) e Q (470-650 nm), após receber diversas doses de RT: 0, 1, 3, 5, 7 e 9 Gy; praticamente não há alteração na absorção.	73
Figura 26 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo controle.	75
Figura 27 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado apenas por TFD.	76
Figura 28 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado apenas por RT.....	77
Figura 29 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado por RT + 24h + TFD.	78
Figura 30 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado por TFD + 24h + RT.....	80
Figura 31 – Valores de sO ₂ obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de sO ₂ como função do tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.....	82
Figura 32 - Valores de BVF obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de BVF com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.....	84
Figura 33 - Valores de RV obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa RV com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.....	86

Figura 34 - Valores de BIL obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de BIL com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.....	87
Figura 35 – Valores de MetHb obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de MetHb com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.	89
Figura 36 – Gráficos dos principais parâmetros para acompanhar os danos vasculares causados pela TFD. A) sO ₂ antes e 24h após a terapia; B) concentração de BIL antes e 48 horas após o tratamento e C) Concentração de MetHb antes e 48 horas após a TFD.....	91
Figura 37 – Fluorescência da PpIX com o tempo para cada grupo de tratamento. A linha vermelha é para a excitação utilizando um laser vermelho e a azul é para a excitação na região do azul do espectro eletromagnético.	93
Figura 38 - Fotomicrografia das lâminas histológicas: avaliação histológica dos danos teciduais dos tratamentos de acordo com o grupo, utilizando a técnica de coloração por HE. As setas (→) indicam figuras de mitose; o asterisco (*) corresponde a uma fissura nuclear; as estrelas (), à citoplasma claro e halo perinuclear, e o triângulo (▲) identifica múltiplos nucléolos. As fotomicrografias dos grupos controle, TFD e RT foram feitas com um aumento de 200X, enquanto as dos grupos RT+24h+TFD e TFD+24h+RT, foram realizadas com o aumento de 400X, para facilitar a visualização das alterações do tecido.....	97
Figura 39 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo controle.	100
Figura 40 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo tratado somente por TFD.....	101
Figura 41 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo tratado somente por RT.....	101
Figura 42 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo RT+24h+TFD.....	102
Figura 43 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo TFD+24h+RT.....	103
Figura 44 - Valores de sO ₂ obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de sO ₂ com o tempo.....	104
Figura 45 – Valores de FVS obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de FVS com o tempo.....	106
Figura 46 – Valores de RV obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa o RV com o tempo.....	107

Figura 47 – Valores de BIL obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de BIL com o tempo.	109
Figura 48 – Valores de MetHb obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de MetHb com o tempo.	111
Figura 49 – Curva de Kaplan-Meier. Eixo y mostra a porcentagem de animais que ainda não atingiram o ponto de corte e o eixo x representa o número de dias para o tumor atingir 10 vezes o seu volume inicial.....	112
Figura 50 – Fluorescência da PpIX com o tempo para cada grupo de tratamento. A linha vermelha é para a excitação utilizando um laser vermelho e a azul é para a excitação na região do azul do espectro eletromagnético.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido 5-aminolevulínico
BIL	Bilirrubina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH	Flavina adenina dinucleotídeo
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
FS	Fotossensibilizador
FVS	Fração de volume sanguíneo
HC-FMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HE	Hematoxilina-eosina
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
LED	Diodos emissores de luz
LIP	Luz intensa pulsada
MetHb	Meta-hemoglobina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS	Organização mundial da saúde
PpIX	Protoporfirina IX
RT	Radioterapia
RV	Raio do vaso
sO ₂	Saturação de oxigênio
TFD	Terapia Fotodinâmica
TM	Tricômico de Masson
UNIVAP	Universidade do Vale do Paraíba
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Interação da radiação com o tecido biológico	22
1.1.1 Interação da radiação não-ionizante com o tecido	22
1.1.2 Interação da radiação ionizante com o tecido	24
1.2 Terapia Fotodinâmica.....	28
1.2.1 Fotossensibilizador.....	28
1.2.2 Fonte de luz.....	30
1.2.3 Ação fotodinâmica	32
1.3 Radioterapia	33
1.4 Combinação dos tratamentos.....	36
1.5 Monitoramento da TFD por técnicas ópticas	38
2 OBJETIVO.....	41
2.1 Objetivos específicos	41
3 MATERIAL E MÉTODO	43
3.1 Estudo conduzido na Universidade de São Paulo.....	43
3.1.1 Modelo animal	43
3.1.2 Terapia Fotodinâmica.....	44
3.1.3. Radioterapia	45
3.1.4. Anestesia.....	45
3.1.5 Procedimento experimental.....	46
3.1.6 Métodos de investigação tecidual	46
3.2 Estudo conduzido no Dartmouth College	48
3.2.1 Tecido Normal	49
3.2.2 Tecido Tumoral	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57

4.1 Estudo conduzido na Universidade de São Paulo	57
4.1.1 Escolha da subdose de tratamento.....	57
4.1.2 Eficiência de produção de PplX.....	60
4.1.3 Avaliação de marcadores de apoptose.....	63
4.1.4 Avaliação da morte celular por necrose.....	65
4.1.5. Avaliação do dano tecidual	70
4.2 Estudo conduzido no Dartmouth College.....	74
4.2.1 Tecido Normal.....	74
4.2.2 Tecido Tumoral	99
4.3 Comparação dos resultados obtidos.....	116
4.4 Possibilidades oferecidas pela combinação das técnicas.....	118
5 CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS	123
APÊNDICES	131
APÊNDICE 1	133
APÊNDICE 2	135

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o resultado da proliferação desordenada de células anormais e abrange um conjunto de mais de 100 tipos de doenças. Sua origem se dá por motivos multifatoriais relacionados a fatores ambientais, comportamentais e alterações celulares devido ao envelhecimento ou predisposições genéticas. (1-2)

A incidência de câncer tem apresentado um grande aumento nas últimas décadas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no mundo, no ano 2030, são esperados 21 milhões de novos casos de câncer, 13 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer. No Brasil, a estimativa para o ano de 2016 é de aproximadamente 596 mil novos casos. (1,3)

Esses dados colocam o câncer como uma das principais causas de morte, em todos os países, independente das condições econômico-sociais, o que torna essa doença um problema de saúde pública mundial. E esses números devem aumentar em todo o mundo devido ao crescimento e envelhecimento da população. A adoção de comportamentos e estilo de vida que são conhecidos por aumentar o risco de câncer, como o tabagismo, a má alimentação e o sedentarismo, ajudaram a aumentar o número de casos em países emergentes, como é o caso do Brasil. (1,4)

Para combater o câncer são necessárias ações de prevenção, tais como o controle do tabagismo, vacinação, bem como a promoção de atividade física e de alimentação saudável. Contudo, quando a doença se estabelece, sofrimento adicional e morte prematura podem ser atenuados por meio de técnicas para um diagnóstico precoce e de tratamentos que melhorem as condições clínicas do paciente com perda mínima de sua qualidade de vida. (1,4) Neste contexto, enquadram-se as técnicas de terapia fotodinâmica (TFD) e radioterapia (RT), que representam abordagens diferentes para o tratamento do câncer.

1.1 Interação da radiação com o tecido biológico

A TFD e a RT são técnicas abordadas neste estudo que utilizam diferentes tipos de radiação: uma em um regime entre o início do espectro eletromagnético da luz visível e do infravermelho próximo, e outra em uma região do espectro de raios-X. A primeira porção chamaremos de região de "radiação não-ionizante", ou apenas "luz", e a segunda, de "radiação ionizante". Assim, para melhor compreensão dos processos que ocorrem em ambas, é necessário entender como essas radiações interagem com o tecido biológico.

1.1.1 Interação da radiação não-ionizante com o tecido

A luz pode interagir com a matéria de diferentes maneiras, e alguns efeitos podem alterar a sua propagação. O tecido biológico é constituído por elevado número moléculas que interagem diferentemente com a luz, chamadas de cromóforos. As interações da luz com o tecido biológico são determinadas pelas composições bioquímicas e estruturais do tecido e os principais tipos de interação são: reflexão, espalhamento, absorção e transmissão (Figura 1). (4-5)

Figura 1 - Principais interações da luz com o tecido biológico. (A) representa a fluorescência, a transmissão primária (direta, sem espalhamento no meio) e a transmissão difusa (indireta, sofre espalhamento no meio). (B) representa a reflexão difusa (ângulo de reflexão diferente do ângulo de incidência), a reflexão especular (ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência), a absorção e a reflexão total interna (ocorre devido à diferença no índice de refração).

Fonte: Adaptada de PRATAVIEIRA. (5)

A reflexão especular ocorre quando a luz é refletida na superfície do tecido com um ângulo igual ao ângulo de incidência em relação à reta normal à superfície do tecido; para que isso ocorra, a superfície tem que ser lisa e com irregularidades pequenas em comparação ao comprimento de onda da radiação incidente. Quando as irregularidades da superfície refletora são maiores que o comprimento de onda, ocorre a reflexão difusa. A reflexão difusa é a mais comum em tecidos biológicos, uma vez que a superfície da maioria dos tecidos não é regular – ao contrário, apresenta rugosidade expressiva. Também são somados à reflexão difusa os fótons que sofreram múltiplos espalhamentos no interior do tecido e saíram pela superfície. (5–7)

O espalhamento ocorre quando a luz sofre várias mudanças de direção dentro do tecido, devido à interação com as moléculas presentes. O tamanho das partículas espalhadoras, a distância entre elas e o comprimento de onda da radiação incidente são fatores que influenciam no espalhamento. (4-5)

Quando ocorre absorção, uma conversão parcial da energia luminosa pode ser convertida em vibração molecular e luminescência pelas moléculas absorventes, ou podem ser induzidas reações de estado excitado. Assim, a intensidade da luz incidente é atenuada à medida que passa através do meio. A capacidade de um meio para absorver a luz depende, principalmente, da constituição eletrônica dos seus átomos e moléculas, do comprimento de onda da radiação incidente, da espessura da camada absorvedora, e de características teciduais, como temperatura e composição bioquímica, especialmente a concentração de absorvedores. (4-5)

Por fim, transmissão é a luz que atravessa a camada de tecido e pode ser detectada do outro lado atravessando novamente a interface tecido/meio externo, sem sofrer absorção, espalhamento ou reflexão. A transmissão difusa ocorre quando a luz que atravessa o tecido biológico sofreu alterações em seu percurso devido a espalhamentos, mas cruzou o tecido e emergiu através da interface sem modificações em termos de energia, i.e. mantendo seu comprimento de onda. A intensidade de luz que será transmitida depende da composição do tecido e do comprimento de onda e intensidade da luz incidente. (4-5)

Quando a luz é aplicada em tecidos biológicos há uma série de mecanismos que podem ocorrer, e as características do tecido e o comprimento de onda da luz são fatores determinantes para resultar em uma maior ou menor importância de cada um dos tipos de interação. (5-6) A interação luz-tecido pode ser empregada tanto como ferramenta para tratamento (como terapia fotodinâmica e outras fototerapias) quanto para diagnóstico (técnicas ópticas diversas de detecção, como detecção de luminescência e refletância).

1.1.2 Interação da radiação ionizante com o tecido

O processo pelo qual um átomo neutro adquire carga positiva ou negativa é conhecido como ionização. Partículas carregadas, como prótons, elétrons e partículas α e β , tem energia suficiente para produzir ionização por colisão quando estas penetram em um material, é a chamada radiação diretamente ionizante. As partículas não carregadas, como neutrons e fótons, são as radiações indiretamente

ionizantes, as quais produzem radiação diretamente ionizante quando interagem com a matéria. Os fótons que passam através da matéria transferem a sua energia por três processos principais: efeito fotoelétrico, espalhamento Compton e produção de pares. (7-8)

No efeito fotoelétrico, o fóton interage com o átomo e ejeta um elétron de seu orbital (fotoelétron). Nesse processo, fóton incidente é absorvido e a energia é usada para superar a energia de ligação do elétron e o restante aparece como energia cinética do fotoelétron resultante (Figura 2). Assim, a energia cinética do fotoelétron é igual à energia do fóton incidente menos a energia de ligação do elétron:

$$\text{Energia cinética do fotoelétron} = h\nu - E_b$$

Onde h é a constante de Planck, ν é a frequência do fóton, $h\nu$ é a energia do fóton incidente, e E_b é a energia de ligação do elétron. O fotoelétron ejetado perde energia pelas ionizações secundárias de modo a deixar toda a energia do fóton incidente depositada no tecido irradiado. Após o fotoelétron ser ejetado do átomo, a vacância criada é preenchida por um elétron de um orbital exterior do mesmo átomo, com a emissão de raio-X característico. Em tecidos biológicos, o efeito fotoelétrico é o mecanismo de transferência de energia dominante para raios-X e raios gama com energias abaixo de 50 keV, porém, é menos importante em maiores energias. (7-8)

Figura 2 – Diagrama ilustrando o efeito fotoelétrico, no qual o fóton interage com o átomo e ejeta um elétron de seu orbital (fotoelétron). O fóton incidente é absorvido e sua energia é usada em parte para superar a energia de ligação do elétron enquanto o restante aparece como energia cinética do fotoelétron resultante.

Fonte: Adaptada de KHAN. (8)

O efeito Compton ocorre quando o fóton incidente tem energia muito maior que a energia de ligação do elétron. Nessa interação, o elétron recebe parte da energia do fóton incidente e é ejetado com um ângulo θ . O fóton, com a energia reduzida, é espalhado com um ângulo ϕ (Figura 3). O efeito Compton provoca, então, a ionização do átomo devido à perda de um elétron, e esse elétron gerado perde energia em outros eventos de ionização e excitação e toda a energia do fóton incidente é depositada no material. Esse efeito diminui com o aumento da energia do fóton incidente e é dependente do número atômico da molécula absorvedora. É o principal mecanismo para fótons de energia intermediária (100 KeV – 10 MeV). (7-8)

Figura 3 – Diagrama ilustrando o efeito Compton, no qual o elétron recebe parte da energia do fóton incidente e é ejetado com um ângulo θ . O fóton, com a energia reduzida, é espalhado com um ângulo ϕ . Esse efeito ocorre quando o fóton incidente tem energia muito maior que a energia de ligação do elétron.

Fonte: Adaptada de KHAN. (8)

A produção de pares em meio biológico ocorre quando um fóton de alta energia (maior que 1,02 MeV) interage com os átomos do meio. O fóton incidente interage fortemente com o campo eletromagnético do núcleo atômico, doando toda sua energia no processo e é então convertido na massa de um elétron negativo e um elétron positivo (pósitron) – Figura 4. O par de partículas de cargas opostas é emitido e causam danos na forma de partículas carregadas secundárias. O excesso de energia do fóton incidente, além daquela necessária para a criação do par de partículas (1,02 MeV), se torna energia cinética, imprimindo momento às partículas.

Como o processo depende da interação com o campo eletromagnético do núcleo, a probabilidade de sua ocorrência aumenta com o número atômico. (7-8)

Figura 4 – Diagrama ilustrando a formação de pares que, em meio biológico, ocorre quando um fóton de alta energia (maior que 1,02 MeV) interage com os átomos do meio. O fóton incidente interage com o campo eletromagnético do núcleo atômico e toda sua energia é então convertida na massa de um elétron negativo e um elétron positivo (pósitron). O excesso de energia do fóton incidente, além daquela necessária para a criação do par de partículas (1,02 MeV), se torna energia cinética.

Fonte: Adaptada de KHAN. (8)

O processo pelo qual os fótons serão absorvidos na matéria depende de sua energia e do número atômico do material de absorção. A Figura 5 mostra o gráfico com a probabilidade dominante de cada efeito em função da energia do fóton incidente e do número atômico do material absorvedor.

Figura 5 – Tipo de interação dominante em função do número atômico do material absorvedor e da energia do fóton incidente.

Fonte: YOSHIMURA. (10)

1.2 Terapia Fotodinâmica

A TFD é uma técnica que tem sido cada vez mais utilizada para o tratamento de câncer. (11–15) Essa técnica consiste na interação de três elementos: um agente fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular. Esta interação promove a formação de espécies reativas de oxigênio, que levam à morte celular por meio de necrose e/ou apoptose. (11,15)

1.2.1 Fotossensibilizador

O ácido 5-aminolevulínico (ALA, do inglês *aminolaevulinic acid*) é utilizado comumente como pró-fármaco em TFD, por ser precursor da protoporfirina IX (PpIX) – que é, atualmente, um dos FS mais utilizados em tratamentos dermatológicos com aplicações tópicas da terapia. (11,16–19) O ALA é um agente hidrofílico que penetra nas células por transporte ativo. Esse processo é lento e depende do pH e da temperatura, mas tende a ser um pouco mais acelerado em células malignas. (20)

Nas aplicações tópicas, para facilitar a penetração do ALA e o posterior acúmulo da PpIX são misturados o dimetilsulfóxido (DMSO) e o ácido etilenodiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*, ou EDTA). O DMSO é uma substância que facilita a penetração do pró-fármaco, enquanto o EDTA inibe a enzima ferroquelatase. A inibição da ferroquelatase é importante porque sua ação impede o acúmulo das moléculas formadas de PpIX, transformando-as em moléculas do grupo heme, cujo excesso é degradado pela mitocôndria por um mecanismo de *feedback* negativo. (20)

A PpIX é um FS endógeno encontrado naturalmente no organismo, estando presente na rota biossintética do grupo heme (Figura 6), porém em pequena quantidade. Após a aplicação do ALA, este penetra no tecido e é convertido enzimaticamente em PpIX, e o uso dos inibidores da ferroquelatase permite seu acúmulo no tecido, que é favorecido em células tumorais. Essa preferência no acúmulo não é bem compreendida, mas pode ser causada pela alteração na penetração das membranas e pela imaturidade das fibras de colágeno das células anormais. (10,18-19) Este acúmulo da PpIX no tecido tumoral, a partir do ALA, demora de 3 a 6 horas para ocorrer na pele, sendo este, portanto, o tempo de espera entre a aplicação do creme e a aplicação da TFD. (11,21)

Figura 6 – Rota biossintética do grupo heme. O ALA, após penetrar no tecido, é convertido enzimaticamente em PpIX, e o uso dos inibidores da ferroquelatase permite seu acúmulo no tecido.

Fonte: CARVALHO. (22)

1.2.2 Fonte de luz

A escolha da fonte de luz é muito importante para o sucesso da TFD. Uma das características fundamentais é que a luz deve ter o comprimento de onda adequado para ser absorvido pelo FS. As porfirinas como a PpIX apresentam um espectro de absorção muito típico, com o maior pico em cerca de 405 nm, a chamada banda de Soret, e outros picos de absorção inferiores, as chamadas bandas Q, que são encontrados em torno de 510, 545, 580 e 630 nm (Figura 7). (10-11,22-23)

Figura 7 – Espectro de absorção da PpIX normalizado. Banda de Soret (região do UV-azul) e bandas Q (regiões do verde e vermelho).
Fonte: Adaptada de REQUENA. (25)

Além da absorção do FS, a luz precisa também ser adequada para penetrar no tecido até uma profundidade que seja suficiente para atingir todo o tumor. Para esse fim, no tratamento utilizando porfirinas, a luz vermelha (630 nm) é comumente escolhida, por apresentar maior penetração tecidual dentre as possibilidades apresentadas pelos picos de absorção do FS. (11,20) A escolha do pico de absorção em geral depende do comprimento de onda estar contido na chamada “janela óptica biológica”, também conhecida como janela terapêutica, ilustrada na Figura 8. A janela terapêutica consiste em uma faixa de comprimentos de onda (intervalo entre 600 e 1200 nm) que comumente apresenta menor atenuação na profundidade do

tecido, uma vez que estes são menos absorvidos e espalhados pelos principais constituintes da pele (água, hemoglobina, oxi-hemoglobina e melanina). E, assim, a irradiação nesses comprimentos de onda apresenta maior eficácia quando se necessita uma maior penetração da luz, ou seja, maior volume de tratamento nos tecidos biológicos. (11,23,26)

Figura 8 – Espectro de absorção dos principais componentes da pele. A janela óptica consiste na faixa de comprimento de onda que compreende o intervalo entre 600 e 1200 nm, uma vez que estes são menos absorvidos e espalhados pelos constituintes da pele.

Fonte: Adaptada de PLAETZER. (26)

Várias fontes de luz podem ser utilizadas em TFD. Para a irradiação, dispositivos a base de laser e fontes não coerentes – diodos emissores de luz (LED, do inglês *light emitting diode*), lâmpadas e luz intensa pulsada (LIP) – têm sido utilizadas. Para aplicações endoscópicas, onde a luz tem de ser entregue por meio de fibras ópticas, o laser é a fonte de luz mais indicada. Já para aplicações em dermatologia, laser e LED são ambas fontes de luz amplamente utilizadas, pela banda estreita de emissão, potência e facilidade de transporte. (11,23)

1.2.3 Ação fotodinâmica

Ao iluminar o tecido a ser tratado, o fóton de luz absorvido excita o FS, que passa do estado singleto fundamental (S_0) para um estado excitado (S_n). Os estados são ainda divididos nos chamados níveis vibracionais, e qualquer S_n é energeticamente menos preferível que o estado fundamental. Assim, o tempo de vida dos S_n é muito curto, e o decaimento até o menor nível vibracional de S_n ocorre muito rápido, processo conhecido como relaxação vibracional. Esse processo pode levar o elétron até o menor estado vibracional do S_1 (imediatamente acima do estado fundamental S_0). A partir dessa condição, o FS pode voltar ao estado fundamental emitindo fluorescência, ou pode passar para um estado tripleto excitado (T_1), através de um processo chamado cruzamento intersistema (uma mudança na configuração de *spin* do elétron durante a relaxação, o que é normalmente proibido pelas regras de seleção da mecânica quântica). No T_1 , que é um estado metaestável – pois o decaimento a partir dele exige nova mudança de configuração de *spin*, o que espontaneamente é pouco provável e, portanto, demora a ocorrer – o FS pode ainda voltar ao estado fundamental emitindo fosforescência, ou pode induzir alterações químicas em biomoléculas adjacentes, que é o processo interessante para a TFD. (6,24-25)

Essas interações do FS num estado tripleto metaestável com as biomoléculas resultam em dois tipos de reações que ocorrem por mecanismos distintos: reação de transferência de elétrons (ou “reação do tipo I”) e reação de transferência de energia (ou “reação do tipo II”). Na reação do tipo I, ocorre a transferência de elétrons entre as moléculas, formando radicais livres que são susceptíveis a interagir com o oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). A reação do tipo II ocorre quando o FS, no estado tripleto, transfere energia para o oxigênio molecular, cujo estado fundamental também se encontra no estado tripleto (portanto, uma transição de estados permitida). Essa transferência de energia proveniente da reação do tipo II, no entanto, leva o oxigênio a um estado tripleto excitado de curta duração, que rapidamente decai para um estado singleto excitado, comumente chamado apenas de oxigênio singleto (1O_2), que é altamente reativo. Ambos os tipos de reações ocorrem em paralelo, e a proporção depende de vários parâmetros, sendo os mais importantes o fotossensibilizador escolhido e a concentração de oxigênio disponível. (25-26) Os processos que ocorrem na molécula do FS até o

momento das reações do tipo I e II estão representados em uma adaptação do diagrama de Jablonski mostrada na Figura 9.

Figura 9 – Diagrama de Jablonski modificado mostrando processos que ocorrem na molécula do FS até o momento das reações do tipo I e II.
Fonte: Elaborada pela autora.

As espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela morte da célula, possuem um tempo de vida muito curto devido à alta reatividade, tornando o seu raio de ação extremamente reduzido e, conseqüentemente, o efeito da TFD bastante localizado. A disponibilidade tecidual de oxigênio molecular, portanto, é fator crucial no sucesso da TFD, já que as espécies reativas formadas serão os mediadores do dano celular estabelecido. (11,23,28)

A TFD não apresenta grandes efeitos colaterais, sendo o mais comum deles um incomodo relatado na forma de dor, conforme o sítio anatômico da lesão, (28-29) e as suas limitações são principalmente relacionadas à penetração da luz e do pró-fármaco no tecido, impossibilitando o uso efetivo da técnica em tumores muito profundos ou volumosos. (11)

1.3 Radioterapia

A RT é uma técnica que utiliza radiação ionizante no tratamento de tumores. O objetivo da técnica é induzir a morte das células neoplásicas com o máximo de preservação das células saudáveis. (2,31) Dados da OMS mostram que

aproximadamente 70% dos pacientes com diagnóstico de câncer serão submetidos à RT em alguma fase de seu tratamento, seja isoladamente ou associada à outra forma de tratamento. (32)

A finalidade da RT pode ser curativa ou paliativa. A RT curativa tem por objetivo a cura total do tumor. Ela divide-se em: adjuvante, quando é associada à cirurgia ou quimioterapia, e neoadjuvante, utilizada para reduzir o tumor antes da cirurgia. Já a RT paliativa é indicada para tumores em estágios avançados, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente. (31-32)

Para que o efeito biológico atinja maior número de células neoplásicas e a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, a dose total de radiação é administrada num regime fracionado, com doses diárias, podendo o ciclo durar de duas a sete semanas. A terapia fracionada baseia-se nas diferenças entre as propriedades radiobiológicas do tumor e do tecido normal, que amplificam a vantagem de sobrevivência dos tecidos normais com base numa melhor capacidade de reparar os danos subletais da radiação ionizante. As células normais proliferam mais lentamente em comparação com as células cancerosas e, portanto, têm tempo para reparar os danos antes de replicação. (31,33)

Dependendo da localização do tumor, a RT é feita de uma das duas modalidades: externa (ou teleterapia) ou interna (braquiterapia). A braquiterapia é uma terapia de curta distância, onde fontes de radiação ficam inseridas ou em contato com o paciente. Entrega uma alta dose de radiação em um curto alcance e, portanto, é indicado apenas para tumores bem localizados e pequenos. Na teleterapia, tipo de tratamento mais utilizado na clínica, a radiação é emitida de fontes que ficam afastadas do paciente; ela utiliza fontes externas de raios-X, elétrons, prótons ou raios gama. (2,30,32-33)

Quando se trata de radioterapia aplicada externamente, os feixes são divididos em feixes de baixa energia, com até 200 kV; de energia média, de 200 kV a 1 MV (ortovoltagem e supervoltagem) – usados para tratamentos de tumores mais superficiais; e de alta energia, também chamados de megavoltagem, entre 1 e 25 MV – mais comuns para tratamentos de tumores profundos, cujos feixes são disponíveis através de aceleradores lineares. (34-35)

Os equipamentos de ortovoltagem são mais utilizados para tratamentos de lesões de pele, uma vez que praticamente toda a sua energia é depositada na superfície do tecido. Se o objetivo for tratar algum tipo de tumor que não esteja na pele, esta não seria poupada dos danos causados pela radiação ionizante. (34) Também utilizados para tratar tumores mais superficiais, incluindo tumores de pele, os feixes de elétrons são produzidos por aceleradores lineares e não penetram muito profundamente no tecido. Porém, esse tipo de feixe difere na maneira como sua energia é depositada no tecido alvo. A forma da curva de dose em profundidade é considerada uma vantagem do feixe de elétrons, pois com ele a dose máxima é depositada seguida de uma rápida queda, poupando os tecidos mais profundos. (31,36) O gráfico da distribuição de dose em função da profundidade para diferentes energias de feixe está representado na Figura 10.

Figura 10 – Gráfico normalizado da distribuição da dose em função da profundidade para diferentes energias de feixe: 100 e 250 KV (fótons) e 6 MeV (elétrons).

Fonte: Adaptada de RETIF. (35)

O dano causado pela radiação ionizante pode ser direto, quando o efeito ocorre nas biomoléculas componentes das células, principalmente o DNA, ou pode ser indireto, quando a radiação interage com as moléculas de água, formando radicais livres. Como resultado, as células podem: sofrer apoptose; processo de divisão que termina em morte ou aberração celular; permanecerem funcionais,

porém perdendo a capacidade de se dividir; apresentar danos subletais, ou seja, reparáveis; e, por fim, as células podem não sofrer dano algum. (35-36)

Outro fator importante para a resposta tumoral à radiação ionizante é a quantidade de oxigênio presente no tecido. O oxigênio reage com os radicais livres das biomoléculas, tornando o dano permanente. Se a quantidade de oxigênio é menor, a chance de reparo é maior. A presença de oxigênio pode aumentar a radiosensibilidade do tecido em até 3 vezes. Assim, em condições de hipóxia, é necessária uma maior dose para causar dano ao tumor. O fracionamento da dose de radiação ajuda na reoxigenação tecidual, processo pelo qual as células com hipóxia podem se tornar reoxigenadas após a remoção de algumas células oxigenadas. (9,34,36,38)

Os efeitos colaterais da radioterapia são sua principal limitação. Esses efeitos são classificados em reações agudas, que ocorrem durante ou de 2 a 6 meses após a irradiação, e em reações tardias, que aparecem meses após o fim do tratamento devido à dose de tolerância dos tecidos saudáveis terem sido ultrapassadas. Os efeitos colaterais variam de acordo com o paciente, a dosagem e a frequência da radiação. Porém, a maioria dos pacientes que passam por esse tratamento apresenta alterações na pele e fadiga. (33)

1.4 Combinação dos tratamentos

Até o momento, não existem muitos estudos reportando os efeitos da associação da TFD com a RT, nem um consenso nos resultados encontrados. Apesar disso, alguns destes trabalhos apresentam resultados relevantes, e serão brevemente apresentados.

Berg *et al.* combinaram TFD com ALA e RT *in vitro* e observaram um efeito ligeiramente antagônico quando a combinação dos tratamentos ocorria com intervalos de tempos entre 0 e 4 horas, e um efeito levemente sinérgico quando esse intervalo era de 12 a 48 horas. (39) Allman *et al.* irradiaram diversas linhagens celulares de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, e obtiveram apenas efeito aditivo dos tratamentos. Os autores utilizaram como combinação das

técnicas tanto o ALA-TFD antes quanto após a RT, em ambos os casos com intervalo de 24 horas entre as técnicas. (40) Sazgarnia *et al.* investigaram a ação da mitoxantrona (MX) tanto como RS quanto como FS em uma combinação de RT com TFD para células de câncer de mama da linhagem MCF-7. Nesse estudo, os tratamentos foram realizados simultaneamente e os autores conseguiram mostrar uma alta sinergia na combinação entre ambos os tratamentos mediados por MX. (41)

Nas investigações em animais, Pogue *et al.* utilizaram a combinação entre TFD e RT em camundongos com fibrosarcoma utilizando verteporfirina. Como esta medicação foi administrada por via injetável em sua forma final, não havia dependência entre o estado prévio do metabolismo da célula e a presença do FS (como ocorre com a PpIX advinda da administração do ALA). Nesse estudo, os autores encontraram um efeito sinérgico na combinação dos tratamentos que foram entregues quase que simultaneamente, com uma das terapias seguida imediatamente pela outra. (42) Benstead *et al.* analisaram o efeito das terapias combinadas em pele de cauda de camundongo, utilizando o TPPS (porfirina meso-tetrasulfonatofenil) como FS. Os pesquisadores usaram diversos intervalos de tempo entre os tratamentos e ainda incluíram os grupos TPPS + RT e Luz + RT. Para a combinação de tratamentos, os autores encontraram efeitos sinérgicos; para o grupo Luz + RT, por outro lado, não houve nenhuma diferença, e o grupo FS + RT apresentou um aumento no dano, embora não tão expressivo quanto no caso da TFD entregue previamente – o que pode sugerir um efeito de radiosensibilizador da TPPS. (43) Luksiene *et al.* injetaram tumores ascíticos de Erlich em camundongos para avaliar as terapias combinadas, utilizando o HPde (éter dimetílico de hematoporfirina) como fotossensibilizador. O tempo de espera entre um tratamento e outro foi de uma hora, e eles não encontraram efeito sinérgico, apenas aditivo. Os autores também reportaram indícios de que o HPde atuou como radiosensibilizador para causar danos às células tumorais. (44)

Por fim, o trabalho clínico desenvolvido por Nakano *et al.* mostrou que RT associada à TFD melhora a efetividade do resultado do tratamento de doenças de Bowen, diminuindo a dose de radiação ionizante ministrada ao paciente e, assim, seus efeitos colaterais. (45)

Os estudos realizados até o presente momento divergem muito em relação ao melhor tempo de espera entre os tratamentos e a existência de uma ordem de aplicação preferencial entre eles e não apresentam uma hipótese clara para os efeitos teciduais encontrados. Por isso, os testes realizados no presente estudo visam o entendimento básico da atuação de ambas as técnicas, e requer que se avaliem primeiramente qual seria a ordem preferencial e o melhor intervalo de tempo entre as terapias, caso haja. Por esse motivo, os primeiros testes foram realizados em tecido saudável de pele de rato, órgão escolhido por ser de fácil análise e apresentar conhecida resposta positiva tanto à TFD quanto à RT. Após essa primeira abordagem, seria possível escolher as melhores combinações para serem avaliadas em tumores.

1.5 Monitoramento da TFD por técnicas ópticas

As técnicas ópticas de detecção utilizam as interações luz-tecido biológico para obter informações, de maneira não invasiva, sobre o tecido investigado. Nesse estudo, as técnicas ópticas utilizadas para o monitoramento das alterações teciduais são as que envolvem a fluorescência e a refletância dos tecidos. Ambos os fenômenos podem ser divididos em duas técnicas de abordagem: produção de imagens e espectroscopia. As técnicas de imagem macroscópicas fornecem uma análise em um campo amplo de visão, enquanto a espectroscopia fornece uma análise pontual do tecido, porém permite avaliação da intensidade em função dos comprimentos de onda e mesmo sua quantificação.

Para a detecção por fluorescência, a absorção é a principal interação entre a luz e o tecido. Como mostrado na Figura 9, após absorver a luz, os elétrons do cromóforo vão para o estado excitado e, para recuperar a estabilidade, as moléculas excitadas reemitem o excesso de energia na forma de luz. Se essa energia é reemitida a partir de um estado excitado de mesma multiplicidade de *spin* com relação ao estado fundamental, o fenômeno é denominado fluorescência, e ocorre em escala de tempo da ordem de nanossegundos. O fóton emitido de fluorescência apresenta menor energia que a do fóton absorvido, devido à dissipação pela relaxação vibracional, o que desloca a emissão de fluorescência para regiões de maiores comprimentos de onda do espectro eletromagnético. O espectro de emissão

resultante da fluorescência representa os níveis de energia característicos à estrutura eletrônica da molécula, sendo por isso passível de ser empregado na sua caracterização e identificação. (45-46)

A pele apresenta fluorescência endógena devido às características das moléculas que a constituem, como colágeno, elastina, queratina, flavina adenina dinucleotídeo (FADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Essas moléculas são denominadas fluoróforos – cromóforos que absorvem luz e emitem fluorescência. A presença de lesão na pele altera a concentração destes fluoróforos, o que modifica a fluorescência endógena do tecido. Assim, as técnicas ópticas de detecção por fluorescência são sensíveis à alterações teciduais decorrentes de uma patologia ou danos induzidos. (48)

Quando a PpIX é irradiada com luz na região UV-azul (Figura 7), o FS apresenta uma fluorescência vermelha característica na região entre 600 e 700 nm que permite acompanhar sua formação e acúmulo nas células, bem como sua degradação e eliminação após a TFD. Esse processo é utilizado para avaliar a ação fotodinâmica, uma vez que a produção de PpIX é um dos componentes fundamentais para o sucesso da terapia, e sua degradação (com redução proporcional da fluorescência emitida) é evidência de que o efeito fotodinâmico está ocorrendo. (20,49)

A detecção óptica por refletância, por sua vez, leva em conta a absorção e a reflexão difusa como os principais tipos de interação da luz com o tecido biológico. Quando o tecido é irradiado, a luz é absorvida pelos cromóforos da pele ou é espalhada pelos componentes celulares. Assim, as técnicas ópticas por refletância medem a intensidade de luz num dado comprimento de onda que tenha entrado, sido espalhado e saído de uma amostra. A intensidade que será refletida depende da concentração de cromóforos (absorvedores) presentes. Os principais cromóforos da pele, na faixa do visível, são hemoglobina (nas formas de oxi-hemoglobina e desoxi-hemoglobina) e a melanina. (49-50)

Por meio da espectroscopia de refletância é possível extrair parâmetros diversos para os cromóforos da pele. A irradiação é feita comumente entre o começo do visível e o infravermelho próximo e, utilizando um ajuste para o espectro coletado, é possível obter informações sobre características morfológicas ou

metabólicas do tecido, como a oxigenação da hemoglobina, volume sanguíneo (através da concentração de hemácias), e a concentração de produtos provenientes da degradação da hemoglobina. Esse ajuste geralmente é feito utilizando simulações de Monte Carlo, com base em um conhecimento prévio de parâmetros como os coeficientes de absorção e espalhamento efetivos do tecido. (51-52) Assim, a técnica de detecção por refletância permite avaliar as alterações vasculares, que tenham ocorrido em decorrência dos tratamentos.

2 OBJETIVO

Considerados a relevância da associação TFD à RT e as possibilidades oferecidas por técnicas ópticas para contribuições em desenvolvimentos terapêuticos, o objetivo deste estudo é analisar os efeitos da TFD associada à RT quando comparados aos efeitos individuais de cada terapia, avaliando se existe um método preferencial de combinação das técnicas.

2.1 *Objetivos específicos*

Como objetivos específicos, pretende-se:

- Avaliar diversas associações de radioterapia e terapia fotodinâmica utilizando ALA tópico em pele normal de rato, a fim de escolher as melhores combinações;
- Monitorar o estabelecimento do dano através de alterações induzidas nas propriedades ópticas do tecido;
- Avaliar a resposta das melhores combinações das terapias em um modelo de tumor cutâneo.

3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo teve duas fases diferentes, sendo a primeira desenvolvida na Universidade de São Paulo (USP – instituição sede da aluna), e a segunda durante um estágio de doutoramento “sanduíche” na Dartmouth College, em Hanover, Estados Unidos.

Sendo as fases diferentes, embora complementares, a descrição da metodologia e dos resultados de ambas foi separada, respectivamente, nos capítulos 3 e 4 da tese, para facilitar a compreensão e discussão do estudo.

3.1 Estudo conduzido na Universidade de São Paulo

3.1.1 Modelo animal

Foram utilizados 27 ratos da linhagem Wistar, sadios, com 6 semanas de vida, machos, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP, Ribeirão Preto, SP).

Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos oito seguintes grupos:

Grupo 1 - TFD seguida imediatamente por Radioterapia (**TFD+RT**)

Grupo 2 - Radioterapia seguida imediatamente por TFD (**RT+TFD**)

Grupo 3 - Radioterapia 24 horas após TFD (**TFD+24h+RT**)

Grupo 4 - TFD 24 horas após Radioterapia (**RT+24h+TFD**)

Grupo 5 - Somente Radioterapia (**RT**)

Grupo 6 - Somente TFD (**TFD**)

Grupo 7 - Radioterapia seguida de irradiação sem ALA (**RT+Luz**)

Grupo 8 - Radioterapia após fotossensibilização, seguida de irradiação (ALA+RT+Luz).

Além destes oito grupos, um grupo adicional foi utilizado como piloto para avaliação da subdose de RT (designado apenas como “piloto”).

Cada grupo foi composto por 3 animais que permaneceram em gaiolas microambientadas, forradas com maravalha, com alimentação e água à vontade.

Para a realização desse estudo, o projeto de pesquisa obteve a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (parecer de aprovação CEUA/Ribeirão Preto 13.1.590.53.8. Apêndice 1) e foi homologado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo - IFSC/USP (parecer de aprovação CEUA/IFSC 07/2014. Apêndice 2).

3.1.2 Terapia Fotodinâmica

A fotossensibilização foi feita aplicando topicamente o ALA 20% (PDT Pharma Indústria e Comércio LTDA, Cravinhos, SP, Brasil) em creme base contendo DMSO e EDTA, com administração sobre a pele da porção posterior da pata traseira do animal, após tricotomização. A região sensibilizada foi protegida da luz utilizando papel alumínio e gaze durante 2 horas, tempo necessário para a formação e acúmulo da PpIX na pele do rato. (54) Após esse tempo, o excesso de creme foi retirado utilizando uma gaze embebida com soro fisiológico e foi realizada a irradiação.

Para a realização da TFD, foi utilizado o equipamento LINCE (MMOptics, São Carlos-SP), que é constituído de uma peça para TFD contendo LEDs com emissão centrada no comprimento de onda de 630 nm, apresentado na Figura 11. (55) Foram escolhidos os parâmetros de iluminação de modo a entregar uma dose de 30 J/cm². Para isso, uma intensidade de 50 mW/cm² e um tempo de irradiação de 10 minutos foram utilizados.

3.1.3. Radioterapia

Para todas as aplicações de radioterapia, foi utilizado um equipamento de ortovoltagem (Stabilipan – Siemens, 120 kVp) do setor de radioterapia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (Figura 11). No grupo piloto, as doses utilizadas foram 10 Gy e 15 Gy, com o objetivo de determinar o melhor valor de subdose para os grupos experimentais. A dose definida foi a de 10 Gy, em uma única aplicação, sendo esta utilizada para os grupos experimentais.

LINCE

Equipamento de Ortovoltagem

Figura 11 – LINCE (MMOptics®, à esquerda) e equipamento de ortovoltagem Stabilipan (Siemens®, à direita), dispositivos utilizados para os tratamentos de TFD e RT.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.4. Anestesia

Os animais foram todos anestesiados para os procedimentos. Foi utilizada anestesia inalatória (Vetcase – Incotec, Serra, ES, Brasil), com o uso de máscara e isoflurano (BioChimico®, Itatiaia, RJ, Brasil) entre 2 e 4% para indução do plano anestésico, e entre 1,5 e 2% para sua manutenção, a qual foi avaliada de acordo com a depressão respiratória e cardíaca e pela ausência de resposta a estímulos.

3.1.5 Procedimento experimental

Os animais foram anestesiados e submetidos aos tratamentos de acordo com os grupos experimentais. Antes dos procedimentos, foram colhidas imagens de luz branca e espectros de fluorescência. Os tratamentos foram realizados na parte externa da porção posterior da pata traseira do rato, que foi previamente tricotomizada. Para o grupo piloto, a parte externa da pata traseira direita de cada animal foi tratada com a dose de 10 Gy, enquanto a esquerda foi tratada com a dose de 15 Gy. Após o fim dos procedimentos (imediatamente e sete dias após), foram feitas imagens de luz branca e espectros de fluorescência das lesões. No sétimo dia, os ratos foram eutanasiados para a avaliação dos tratamentos. A eutanásia foi induzida por meio de inalação de gás CO₂. O acompanhamento do grupo piloto foi realizado durante 10 dias, ao longo dos quais imagens de luz branca foram colhidas a cada dois dias.

3.1.6 Métodos de investigação tecidual

Eficiência de produção de PpIX

Foram investigados a eficiência de formação da PpIX (para atestar a efetividade da TFD) e o dano tecidual causado pela combinação dos tratamentos.

Para a avaliação da eficiência da TFD, foi utilizada a técnica de espectroscopia de fluorescência. Um sistema para espectroscopia de fluorescência foi utilizado. Ele é composto de um laser de diodo (emissão em 408 nm) acoplado a uma fibra tipo "Y", que conduz a luz do laser para o tecido e coleta a luz vinda do tecido, levando-a para um espectrofotômetro (USB2000, Ocean Optics®, EUA). (56)

Os espectros coletados pelo sistema foram usados para obter informação sobre a produção de PpIX nos tecidos após fotossensibilização para as diferentes condições de tratamento. Essa informação foi obtida pela análise espectral e pela obtenção de razões entre os picos de fluorescência característicos da PpIX (630 nm)

e da autofluorescência tecidual (500 nm), além de analisar a autofluorescência ao longo do período de acompanhamento dos tratamentos.

Avaliação de marcadores de apoptose

A morte celular provocada por apoptose foi avaliada por meio da expressão proteica da Caspase 3, proteína pró-apoptótica, por imunohistoquímica. A Caspase 3 é uma proteína com atividade enzimática, que é ativada por clivagem em células que estão em processo de apoptose. Assim, essas células apoptóticas podem ser detectadas mais facilmente usando imunohistoquímica com um anticorpo clivado para Caspase 3, pois é possível observar os núcleos das células sem características morfológicas de apoptose. Quando se tem uma lâmina de imunohistoquímica, as células marcadas positivamente ao anticorpo Caspase 3 são visualizadas em caramelo, enquanto os núcleos corados em roxo (hematoxilina) são as células negativas ao anticorpo Caspase 3. (57) Para a avaliação da apoptose por esta técnica, são contados todos os núcleos corados em caramelo de células visíveis em um determinado campo de uma imagem e calculada a porcentagem de células positivas com relação ao total de células contadas nesse campo.

Avaliação da morte celular por necrose

Para avaliar a necrose total induzida no tecido, foram registradas imagens com luz branca (análise macroscópica) utilizando uma câmera fotográfica digital colorida (Sony DSC-H50), além da elaboração de uma tabela de avaliação macroscópica, que foi feita pela médica Dora Patricia Ramirez, aluna de doutorado em biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos, com base em métodos de classificação de lesões apresentados na literatura. (53,57-58) Essa tabela consiste na avaliação das principais características clínicas apresentadas pelas lesões de cada grupo – eritema, exsudato e crosta. O eritema é uma vermelhidão da pele; o exsudato é um líquido orgânico que sai através das membranas das células, como resultado de dano no tecido ou vaso sanguíneo; e a crosta é uma coleção seca de restos de células na superfície da pele, que se dá devido ao ressecamento de exsudato composto de serosidade, pus ou sangue misturado com restos de

tecido epitelial. Para cada parâmetro avaliado foi usada uma escala de 0 a 4, onde 0 é a ausência da característica e 4 é o grau máximo de apresentação possível.

Finalmente, foram realizadas análises histológicas por microscopia óptica. As amostras foram fixadas com formalina a 40% e posteriormente incluídas em blocos de parafina, os cortes foram confeccionados em micrótomo rotativo com espessura de 3 µm, e colocados em estufa para desparafinizar e posteriormente corados pela coloração de Tricomico de Masson (TM) e Hematoxilina e Eosina (HE). HE foi a análise realizada também para o grupo piloto a fim de determinar a melhor subdose a ser utilizada.

A técnica de HE é o procedimento de coloração mais aplicado na histologia. Esta técnica permite a diferenciação de coloração entre núcleo e citoplasma. Os núcleos das células são corados de azul/roxo (hematoxilina), seguidos pela marcação de citoplasma, colágeno e fibras musculares em tons de vermelho (eosina). Pela técnica de TM, por sua vez, as fibras de colágeno são coradas em azul, os núcleos celulares em preto, e as fibras musculares, vasos sanguíneos e queratina são marcados em vermelho; a técnica do TM é geralmente utilizada para avaliar graus de fibrose e resultados de tratamentos. (60)

A avaliação histológica pela técnica do TM e a análise imunohistoquímica foram realizadas no Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP, no laboratório do Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli.

3.2 Estudo conduzido no Dartmouth College

Uma continuação do estudo desenvolvido na USP foi realizada, durante um período de doutorado "sanduiche", na Thayer School of Engineering at Dartmouth, no Dartmouth College, em Hanover – NH, Estados Unidos, sob supervisão do Prof. Dr. Brian W. Pogue (bolsista CAPES, modalidade Doutorado Sanduiche – Proc. nº 8585/14-8).

Nesta parte do projeto, os experimentos foram realizados em tecido normal, de forma similar à realizada no Brasil, para obtenção de medidas da modificação de parâmetros teciduais ao longo dos tratamentos, e também em tumores, numa

primeira avaliação das possibilidades de combinação das técnicas de TFD e RT em modelos tumorais *in vivo*, mais próximos de simular situações clínicas reais.

3.2.1 Tecido Normal

Modelo animal

Foram utilizados 15 ratos sadios da linhagem Wistar, com 6 semanas de vida, fêmeas, fornecidas pelo Biotério de Charles River em Waltham, MA e mantidos no *Center for Comparative Medical Research at Dartmouth (CCMR)*.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo 1 - Sem tratamento (**Controle**)

Grupo 2 - Somente TFD (**TFD**)

Grupo 3 - Somente Radioterapia (**RT**)

Grupo 4 - TFD 24 horas após Radioterapia (**RT+24h+TFD**)

Grupo 5 - Radioterapia 24 horas após TFD (**TFD+24h+RT**)

Cada grupo era composto por 3 animais que permaneceram em gaiolas microambientadas, forradas com maravalha, com alimentação e água à vontade.

Para a realização desse estudo, o projeto de pesquisa obteve prévia aprovação pelo *Institutional Animal Care and Use Committee at Dartmouth (IACUC - protocolo: pogu.bw.4)*.

Terapia Fotodinâmica

Para a aplicação da TFD, foi utilizado um laser de diodo (Power Technology Inc., Alexander, AR), apresentado na Figura 12, com emissão em 634 nm,

entregando uma dose de 30 J/cm^2 . Para isso, foram utilizados uma intensidade de 50 mW/cm^2 durante um tempo de irradiação de 10 minutos.

O pró-fármaco utilizado foi o ALA creme a 20%, conforme descrito na seção 3.1.2. O ALA foi aplicado topicamente na pele da porção posterior da pata traseira do animal, previamente tricotomizada, que foi protegida da luz utilizando papel alumínio e gaze. O tempo de espera entre a aplicação do creme e a irradiação foi de 2 horas.

Radioterapia

A RT foi realizada utilizando um acelerador linear de fótons (LINAC, Varian 2100CD, feixe de elétrons, 6 MeV), apresentado na Figura 12, que entregou a dose de 1000 unidades monitoras (UM) em uma única aplicação.

Aceleradores lineares são geralmente ajustados de modo que na saída do feixe 1 UM seja igual a 1 cGy para uma profundidade de dose máxima, com uma distância fonte-superfície de 100 cm e um tamanho de campo $10 \times 10 \text{ cm}^2$ (34). Considerando todos os parâmetros necessários, para os experimentos realizados nesse estudo, a dose total entregue foi de 7 Gy.

Laser de diodo

LINAC

Figura 12 – Laser de diodo (à esquerda) e LINAC (à direita), dispositivos utilizados para os tratamentos de TFD e RT, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Anestesia

A anestesia inalatória foi utilizada (DRE Veterinary – VP3, EUA), com o uso de máscara e isoflurano (Piramal Healthcare, EUA)) entre 2 e 4% para indução, e entre 1,5 e 2% para manutenção do plano anestésico, que foi avaliado de acordo com a depressão respiratória e cardíaca e ausência de resposta a estímulos.

Procedimento experimental

Os animais foram anestesiados e tratados de acordo com os grupos experimentais descritos anteriormente. Antes dos procedimentos, imagens de luz branca e espectros de refletância e fluorescência foram colhidos. Os tratamentos foram realizados na parte externa da porção posterior da pata traseira direita do animal, enquanto a esquerda serviu como controle para identificação de efeitos sistêmicos. Ambas as patas traseiras foram previamente tricotomizadas. Imagens de luz branca e espectros de refletância e fluorescência foram novamente colhidos imediatamente após o fim de cada procedimento e nos dias 1, 2, 3 e 6 após o tratamento. No sexto dia, os animais foram eutanasiados para avaliação histológica. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical e confirmada por punção torácica.

Métodos de investigação tecidual

A eficiência da formação e acúmulo da PpIX (cuja degradação fornece informações sobre a eficácia da TFD) e o dano vascular causado pela combinação de tratamentos foram analisados por espectroscopia óptica.

Para esse fim, foi utilizado um dosímetro para medir a refletância de luz branca e o sinal de fluorescência (Figura 13). Esse sistema foi desenvolvido no Dartmouth College e compreende cinco fontes de iluminação: quatro lasers de diodo com temperatura controlada (405, 639, 735 e 785 nm, WorldStarTech, Toronto, Ontario), e uma fonte de luz branca tungstênio-halogênio Ocean Optics HL-2000 (Ocean Optics, Dunedin, Florida). As fontes de luz são acopladas a uma sonda de fibras ópticas (Ocean Optics R200-7-UV/VIS), que consiste em sete fibras de 200 µm de diâmetro. A fibra central entrega a luz de excitação e, ao redor desta, as

outras seis fibras ópticas transmitem a luz reemitida para um espectrômetro Ocean Optics USB4000, com uma gama espectral entre 346 e 1038 nm. (61)

Figura 13 – Dosímetro desenvolvido no Dartmouth College utilizado para medir refletância de luz branca e sinal de fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Das medidas de refletância, foram extraídas informações sobre a saturação de oxigênio (sO_2), concentrações de meta-hemoglobina (MetHb) e bilirrubina (BIL), fração de volume sanguíneo (FVS) e raio do vaso (RV), usando um modelo para ajuste espectral obtido por uma rotina do MATLAB® baseada em um algoritmo de Monte Carlo. (61) Os parâmetros extraídos estão relacionados a informações sobre a vascularização do tecido avaliado e podem ser considerados uma estimativa, uma vez que o modelo utilizado para extrair os valores não leva em consideração as variações ópticas que tenham sido induzidas no tecido pelos tratamentos.

Para a obtenção do ajuste do espectro de refletância, primeiramente era necessária uma calibração. No caso do dosímetro desenvolvido no Dartmouth College era utilizado um *phantom* contendo 2% de Intralipid® em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*). O ajuste de uma função depende basicamente do espalhamento, da absorção e do caminho do fóton pela amostra (que varia com o diâmetro da fibra, o coeficiente de espalhamento e o coeficiente de absorção). O coeficiente de espalhamento muda de acordo com o tecido avaliado e o comprimento de onda. O coeficiente de absorção depende da absorção da hemoglobina e da oxi-hemoglobina (usadas para calcular a saturação de oxigênio), da FVS e do RV, além das concentrações de BIL e MetHb presentes. (62)

Figura 14 – Os gráficos A, B, C, D, E e F são exemplos dos resultados do processamento dos dados obtidos pelo dosímetro. A figura A corresponde ao gráfico da refletância antes da TFD, e B é a refletância 24 horas após a terapia, nos quais a curva pontilhada representa o dado obtido e a curva em vermelho é o ajuste. Já a figura C corresponde ao gráfico da fluorescência excitada com a luz azul antes da TFD, enquanto D é a fluorescência com a mesma excitação após a terapia. E corresponde ao gráfico da fluorescência com excitação no vermelho antes do tratamento, já F é a fluorescência com a mesma excitação após a terapia. Para os gráficos C, D, E e F, a curva pontilhada é o dado obtido, a curva em vermelho é o ajuste, e as curvas em azul, preto e verde fornecem os dados obtidos após os cálculos realizados no programa e correspondem a fluorescência endógena, a fluorescência da PpIX e a fluorescência dos subprodutos, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a espectroscopia de fluorescência foram utilizadas duas fontes de excitação: azul (405 nm) e vermelho (639 nm). O modelo baseado em Monte Carlo desconta a luz de fundo e a fluorescência endógena do tecido, extraindo assim apenas a informação que se refere à emissão da PpIX. Ao realizar uma medida utilizando o dosímetro, os dados passam por uma rotina do MATLAB® e, como saída, obtém-se as figuras dos gráficos com seus respectivos ajustes (Figura 14) e os valores dos parâmetros avaliados em uma tabela. (61)

Para avaliar macroscopicamente o dano induzido no tecido, imagens de campo amplo com luz branca foram colhidas utilizando uma câmera fotográfica digital (Canon Power Shot SX20 IS) e uma tabela de avaliação macroscópica foi construída. Além disso, foram realizadas análises histológicas por microscopia óptica utilizando as técnicas de HE e, por fim, a espessura da epiderme foi medida a fim de avaliar o dano causado pelos diferentes tratamentos. Essa medida foi realizada utilizando o programa ImageJ®, e é dada pela aferição da espessura da epiderme em 20 pontos, escolhidos aleatoriamente, por animal.

As tabelas de avaliação macroscópica também foram feitas pela médica Dora Patricia Ramirez e a avaliação histológica foi realizada pela Dra. Isabelle Ferreira, patologista e pós-doutoranda da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

3.2.2 Tecido Tumoral

Os experimentos em tumores de pele foram realizados nos camundongos seguindo os mesmos protocolos e avaliando os mesmos parâmetros utilizados para os ratos, nos experimentos em tecido normal. A seguir, descrevemos o protocolo para a obtenção do modelo tumoral e para a avaliação de seu recrescimento, bem como a análise estatística aplicada aos dados.

Modelo animal

Para os testes em tumores *in vivo* foram utilizados camundongos Nude, fêmeas, fornecidos pelo Biotério de Charles River em Waltham, MA e mantidos no CCMR do Dartmouth College.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos descritos anteriormente. Cada grupo foi composto por 7 animais que permaneceram todo o tempo em gaiolas microambientadas, com alimentação e água à vontade. Além disso, os camundongos Nude precisam permanecer em ambientes *germfree*, para evitar contaminação, uma vez que essa linhagem apresenta deficiência na produção de linfócitos T, o que faz com que eles sejam mais susceptíveis às infecções. Porém, essa mesma deficiência é o que os torna capazes de receber transplantes de outras linhagens, o que tornou o animal escolhido para esse estudo. (63)

Modelo tumoral

Os tumores foram induzidos por injeção intradérmica de 10^6 células de uma linhagem celular de carcinoma epidermóide, A431 (ATCC® CRL-1555), na parte posterior da coxa direita do animal, como mostrado na Figura 15A. O volume de cada tumor foi estimado com base no volume de uma esfera, e a altura, largura e comprimento foram medidos usando um paquímetro para estimar o raio médio (Figura 15B). O tratamento foi realizado sempre que o volume do tumor atingiu entre 10 e 20 mm³.

Figura 15 – A) Injeção intradérmica de 10^6 células de carcinoma epidermóide, A431, no camundongo. B) Medida do volume do tumor utilizando um paquímetro.
Fonte: Elaborada pela autora.

Recrescimento do tumor

O recrescimento dos tumores foi monitorado diariamente após os tratamentos pela medição do volume tumoral, até que atingissem 10 vezes o seu volume inicial (definida como "ponto de corte", após o qual os camundongos foram eutanasiados, de acordo com o estabelecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da instituição); com isto, a média de tempo para o tumor crescer 10 vezes o seu volume inicial foi calculada para cada grupo.

Análise Estatística

Para comparar o resultado do tratamento com o passar do tempo, foi utilizado o teste *t-student* pareado (diferenças intragrupo), e para a avaliação intergrupos (espessura da epiderme e recrescimento do tumor), foi utilizado o teste *t-student* não pareado. O nível de significância estatística empregado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo conduzido na Universidade de São Paulo

4.1.1 Escolha da subdose de tratamento

Para que o efeito combinado da TFD e da RT fosse observado, era preciso utilizar subdoses de cada um dos tratamentos. Caso contrário, aplicando apenas um dos procedimentos, poderiam ser induzidos danos suficientes para impedir a capacidade de distinguir os efeitos associados da aplicação de ambas as técnicas.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica, parte do IFSC/USP, que apresenta prévia experiência na utilização de subdose de luz para o tratamento de pele de ratos Wistar. (54) Esta experiência torna evidente a relevância do método para observar o estabelecimento de efeitos resultantes da TFD. Subdoses de RT, por outro lado, não são comumente exploradas, tornando necessário estabelecer subdoses que pudessem comprovar a hipótese proposta neste estudo.

Com base em estudos anteriores da literatura (62-63) e com o auxílio dos professores Juliana Fernandes Pavoni e Oswaldo Baffa Filho, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP) e do professor Harley Francisco de Oliveira do serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP), foram calculadas as doses de 10 Gy e 15 Gy como subdoses aceitáveis para o experimento piloto, o qual definiu a melhor subdose para a proposta desse estudo.

A Figura 16 mostra imagens macroscópicas de luz branca das lesões formadas 10 dias após a RT para as doses de 10 Gy e 15 Gy.

Figura 16 – Imagens macroscópicas de luz branca das lesões formadas 10 dias após a RT. A) 10 Gy. B) 15Gy.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 16 é possível observar que o tecido tratado com a dose de 15 Gy ainda apresenta um dano bastante severo 10 dias após o tratamento, enquanto o tratado por 10 Gy, embora apresente um pequeno dano, encontra-se praticamente reparado.

Além da avaliação macroscópica, também foram realizadas análises histológicas dessas lesões por microscopia óptica utilizando a técnica de HE (Figura 17).

Figura 17 - Fotomicrografia das lâminas histológicas: avaliação histológica dos danos teciduais dos tratamentos de acordo com a dose utilizando a técnica de coloração por HE. A) 10 Gy, onde a seta aponta para uma crista epidérmica, estrutura que não está presente quando o tecido foi tratado por 15 Gy. Além disso, esse grupo também apresenta uma maior espessura da epiderme, que indica um tecido em recuperação. B) 15 Gy, que apresentou um grande dano da região da epiderme mesmo 10 dias após o tratamento, ainda sem sinais de recuperação da região e com grande quantidade de células inflamatórias.

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises histológicas da Figura 17 mostram que o tecido tratado com a dose de 15 Gy apresentou um grande dano da região da epiderme que, mesmo 10 dias após o tratamento, ainda não apresentava sinais de recuperação da região, além de apresentar uma grande quantidade de células inflamatórias. Por outro lado, o tecido tratado com uma dose de 10 Gy apresentou uma grande espessura da epiderme, o que indica um tecido em recuperação. Este tecido ainda apresenta as cristas epidérmicas (indicada pela seta), essa característica não se encontra mais presente quando o tecido é tratado com a dose de 15 Gy. Por fim, o dano causado pela dose de 15 Gy foi severo o suficiente para fazer com que o tecido perdesse a sua resistência normal, dificultando o corte das lâminas, algumas das quais apresentaram artefatos de confecção.

Com os resultados obtidos pelas avaliações macroscópica e histológica no teste piloto, a dose de 10 Gy foi selecionada como a subdose a ser utilizada no decorrer do estudo, uma vez que a dose de 15 Gy se mostrou muito agressiva para o propósito.

4.1.2 Eficiência de produção de PpIX

A TFD foi monitorada pela espectroscopia de fluorescência para avaliar a eficiência de formação de PpIX antes e após as diferentes etapas de cada método de tratamento (Figura 18). Os espectros de fluorescência podem fornecer um grande número de informações, a partir do seu perfil e da intensidade de emissão em cada comprimento de onda; esta análise foi concentrada nas intensidades de emissão de fluorescência no máximo emitido pela PpIX (630 nm), visto que a intenção desta medida é monitorar a produção do FS.

Para avaliar a formação e consumo da PpIX, foi realizada a razão entre a intensidade de fluorescência do máximo da PpIX em 630 nm e o máximo da banda associada à fluorescência endógena do tecido, em torno de 500 nm (Figura 19). Esta normalização da fluorescência característica da PpIX pela do tecido minimiza eventuais falhas de acoplamento luz-tecido ou variações de intensidade do laser ocorridas durante a colheita. É importante esclarecer que os estágios de colheita, ao longo dos experimentos, não são os mesmos para todos os grupos, já que cada um apresentou diferentes procedimentos.

Nos gráficos apresentados na Figura 18 e na Figura 19, é possível observar o surgimento de um pico característico de porfirina (em aproximadamente 630 nm) quando o tecido é irradiado por raios-X. A causa mais provável dessa alteração é o dano ao tecido epitelial, o que ocasiona um aumento da vascularização local resultando em uma maior detecção das porfirinas endógenas presentes no sangue.

A Figura 19 mostra que nos grupos em que não houve fotossensibilização, praticamente não ocorreu variação na proporção entre a autofluorescência tecidual e a banda principal que caracteriza a emissão de porfirinas. Por outro lado, houve grande variação na razão para os grupos sensibilizados, representando maior contribuição da banda em 630 nm, como pode ser visto nos respectivos gráficos da Figura 18.

Figura 18 – Espectros de fluorescência em diferentes etapas de tratamento, por grupo experimental. “Eutanásia” representa a coleta uma semana após os tratamentos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 – Razão das intensidades entre os picos (630 nm/500 nm) em diferentes etapas de tratamento, por grupo experimental. “Eutanásia” representa a coleta uma semana após os tratamentos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para todos os grupos, à exceção do G7, houve um aumento do sinal de fluorescência da banda relacionada à autofluorescência tecidual (aproximadamente 500 nm) no dia da eutanásia, em comparação com a medida anterior. Uma explicação para esse aumento seria a diminuição da espessura da epiderme devido ao dano. Essa diferença estrutural permite que a luz alcance mais facilmente o colágeno em camadas mais profundas da pele, devido à diminuição da espessura de tecido. Assim, a fluorescência deste colágeno também é coletada em maior intensidade na superfície do tecido, aumentando a intensidade da banda de fluorescência centrada em 500 nm.

Os resultados obtidos para os espectros de fluorescência dos diferentes grupos, quando comparados à análise morfológica e histológica, deram embasamento para a análise do dano tecidual, apresentada na seção 4.1.5.

4.1.3 Avaliação de marcadores de apoptose

Uma vez que tanto a TFD quanto a RT podem induzir morte celular por mecanismos apoptóticos, foi realizada a avaliação da expressão da principal proteína apoptótica, a Caspase 3, nos grupos experimentais – núcleos corados em caramelo pela expressão da Caspase 3. Nos animais do grupo tratado apenas por TFD foram observados os mais elevados índices de apoptose na derme (Figura 20), o que já era esperado pois a TFD comumente apresenta um alto índice de apoptose, enquanto que a RT, em casos como o desse estudo onde é aplicada uma alta dose de radiação ionizante em uma única aplicação, prevalece a morte celular por necrose. Nos demais grupos, a apoptose também foi observada na derme, mas em menor proporção. O grupo RT+TFD foi o que menos expressou a Caspase 3.

Figura 20 – Fotomicrografia do grupo tratado somente com TFD com expressão proteica de Caspase 3 (setas) em células da derme.
Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 21 mostra o gráfico com o percentual de células positivas para Caspase 3 para cada grupo avaliado.

Figura 21 – Percentual de células positivas para Caspase 3 em função do grupo avaliado.
Fonte: Elaborada pela autora.

A expressão proteica de Caspase 3 foi avaliada principalmente na derme e na hipoderme, pois na epiderme, o índice de necrose foi muito alto e, consequentemente, não foi possível observar a morte celular programada (apoptose). Assim, nas regiões onde o índice de necrose foi alto (morte celular aguda), o índice de apoptose (morte celular mais lenta) foi menor, como na epiderme. Portanto, é possível afirmar que a maior parte do dano causado em todos os grupos se dá por necrose, visto que o índice máximo de apoptose foi de 20%.

4.1.4 Avaliação da morte celular por necrose

Avaliação macroscópica

Uma semana após os tratamentos, foram registradas imagens de luz branca para apreciação do dano macroscópico provocado nos tecidos tratados, como mostra a Figura 22.

TFD+RT **RT+TFD** **TFD+24h+RT** **RT+24h+TFD** **RT** **TFD** **RT+Luz** **ALA+RT+Luz**

Figura 22 – Imagem de luz branca das lesões formadas na pele dos ratos, coletadas uma semana após os tratamentos, de acordo com seus respectivos grupos.
Fonte: Elaborada pela autora.

Das imagens macroscópicas, é possível observar que o maior dano tecidual ocorreu no grupo TFD+24h+RT. Esta observação é apresentada na Tabela 1 de avaliação macroscópica, que representa as principais características clínicas apresentadas pelas lesões de cada grupo.

Tabela 1 – Avaliação clínica das lesões formadas na pele dos ratos uma semana após os tratamentos de acordo com seus respectivos grupos.

Grupo/característica	Eritema	Crosta	Exsudato
0/4+			
TFD + RT	+	+	0
RT + TFD	++	0	++
TFD + 24h + RT	++++	+	++++
RT + 24h + TFD	+	+++	+
RT	++	0	0
TFD	+	++++	0
RT + Luz	+	+	0
ALA + RT + Luz	+	++	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliação morfométrica – HE e TM

As peças de biópsia dos tecidos foram coradas com HE (Figura 23) e TM (Figura 24) para avaliação da integridade da estrutura tecidual.

TFD+RT **RT+TFD** **TFD+24h+RT** **RT+24h+TFD** **RT** **TFD** **RT+Luz** **ALA+RT+Luz**

Figura 23 – Fotomicrografia das lâminas histológicas: avaliação histológica dos danos teciduais dos tratamentos de acordo com o grupo, utilizando a técnica de coloração por HE.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Das análises histológicas da Figura 23, pode-se observar que todos os grupos apresentaram dano tecidual, no entanto, a intensidade dos danos estabelecidos variou de grupo para grupo. O grupo TFD+24h+RT foi o que apresentou dano mais intenso na análise morfométrica, mostrando uma maior desordem das estruturas teciduais e indício de dano vascular. Isto corrobora a observação da maior gravidade da lesão mostrada na avaliação macroscópica para o mesmo grupo (Figura 22). O grupo RT+24h+TFD também apresentou dano importante, com áreas de ruptura na superfície do tecido. Contudo, no momento da eutanásia, algumas áreas já apresentavam grande quantidade de queratina, indicando que o tecido já estava em processo de recuperação.

Os grupos RT+TFD e ALA+RT+Luz, por sua vez, apresentaram dano relevante, mas de menor severidade que os grupos TFD+24h+RT e RT+24h+TFD. Já o grupo TFD+RT apresentou lesões mais brandas que os anteriores, comparáveis com as lesões dos grupos RT e TFD, que resultam da aplicação individual das técnicas. Finalmente, o grupo RT+Luz resultou no menor grau de dano observado dentre os grupos experimentais, apresentando um tecido já praticamente recuperado no momento da eutanásia.

A análise das lâminas coradas pela técnica de TM veio a contribuir com os resultados obtidos pela técnica por HE. A Figura 24 mostra os grupos que apresentaram o maior dano tecidual, destacando algumas alterações histológicas que foram observadas nos diversos grupos estudados, porém em maior quantidade nos grupos TFD+24h+RT e RT+24h+TFD: necrose difusa e focos de necrose, edema intersticial na derme; alguns vasos sanguíneos apresentando neutrófilos sugestivos da fase inicial de infiltrado inflamatório e focos hemorrágicos - esse último somente no grupo TFD+24h+RT.

Figura 24 – Fotomicrografia das alterações histológicas observadas utilizando a técnica de TM. A) Animal do grupo 3, mostrando grande foco hemorrágico (H). B) Animal do grupo 3 mostrando grande foco de necrose (N). C) Animal do grupo 4 mostrando área de edema (E) e vasos sanguíneos contendo alguns neutrófilos no seu interior (setas), além de algumas fibras colágenas normais (FC). D) Animal do grupo 4 mostrando grande foco necrótico contendo células com núcleo picnótico (N) e um vaso sanguíneo contendo alguns neutrófilos no seu interior (setas).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.5. Avaliação do dano tecidual

Os resultados desse estudo mostraram que o grupo TFD+24h+RT apresentou o dano tecidual mais intenso, como comprovado na avaliação macroscópica e na histologia, tanto por coloração por HE quanto por TM. Este resultado pode ser devido ao fato de que as células, 24 horas após serem tratadas por TFD, ainda estão passando por um processo de estabelecimento de dano – algumas ainda tentando se recuperar, outras entrando no processo de morte programada. Quando estas células, já danificadas pela TFD, sofrem dano proveniente da RT, já não apresentam plenas condições de recuperação, o que potencializa o dano causado

ao tecido e resulta numa injúria tecidual mais intensa. Alguns trabalhos encontraram que porfirinas, incluindo a PpIX, podem funcionar como radiosensibilizador, dependendo da concentração presente na célula (39,44,66,67), o que pode ser também uma das causas da resposta mais exacerbada quando se espera 24 horas para a aplicação da RT, uma vez que após esse período houve tempo suficiente para que o ALA remanescente no tecido induzisse novamente a formação de PpIX.

No grupo RT+24h+TFD, também era de se esperar um dano semelhante ao do grupo TFD+24h+RT. Porém, como sugerem os espectros de fluorescência, as células que foram previamente tratadas por radiação ionizante já estavam também em um processo de morte e/ou tentativa de recuperação, e não foram capazes de produzir e acumular PpIX em quantidade suficiente, diminuindo, assim, a efetividade da TFD. Uma alternativa para a baixa disponibilidade de PpIX seria a utilização de um FS que não dependesse do metabolismo celular, evitando que o dano prévio comprometa o tratamento. Mesmo assim, a reação fotodinâmica resultante parece ter favorecido uma morte celular bastante intensa. Isso mostra que o dano causado pela TFD em um tecido que já apresenta seu DNA danificado pela RT é bastante potencializado. Os efeitos do grupo RT+TFD, embora não tão expressivos, foram similares aos do grupo RT+24h+TFD, corroborando mais uma vez para a hipótese de que a TFD em um tecido previamente tratado por radiação ionizante resulta em uma resposta mais intensa.

Não fica claro o motivo pelo qual o dano tecidual apresentado pelo grupo TFD+RT foi tão ameno em comparação aos outros. Uma explicação seria o fato de o dano celular global da TFD demorar certo tempo (algumas horas) para se estabelecer, não ocorrendo imediatamente após sua aplicação. (11) Por isso, ao serem submetidas à RT imediatamente após a TFD, as células não estavam danificadas o bastante para que houvesse efeito sinérgico dos tratamentos, e o dano tecidual causado não foi tão expressivo, sendo comparável aos efeitos individuais das terapias.

Os grupos RT e TFD foram os controles com as técnicas individuais. A partir do espectro do grupo RT, onde não houve aplicação do ALA e, portanto, produção e acúmulo de PpIX, foi possível observar após a RT o surgimento de uma banda de fluorescência característica das porfirinas – provável efeito de porfirinas endógenas

presentes no sangue, mais evidentes devido ao dano provocado pela RT nesta etapa. Com o intuito de observar se estas porfirinas poderiam causar uma reação fotodinâmica caso fossem irradiadas, o grupo RT+Luz foi incluído nesse estudo. O resultado mostrou, porém, que não houve efeito fotodinâmico perceptível após a irradiação; o que ocorreu, pelo contrário, foi uma bioestimulação tecidual causada pela luz vermelha, que aumenta a capacidade de síntese e regeneração do colágeno, levando a uma rápida recuperação do tecido. Tal efeito já é conhecido (na verdade, esperado) do campo de fototerapias (68) e pode contribuir para a reparação de um tecido que tenha sofrido efeitos colaterais da radiação ionizante após um tratamento de RT. Este “efeito reparador” pode explicar porque o dano tecidual observado no momento da eutanásia foi menos severo que o observado para o grupo RT, embora ambos só tenham recebido injúria por radiação ionizante.

O intuito do estabelecimento do grupo ALA+RT+Luz (RT aplicada após o tempo de formação da PpIX, mas antes da irradiação) foi o de observar qual seria a resposta do tecido às duas técnicas se entregues quase que simultaneamente. Os resultados apresentados nos gráficos de fluorescência e nas razões apresentados respectivamente na Figura 18 e Figura 19, mostram um aumento nas bandas referentes à emissão de fluorescência da PpIX após a RT, sugerindo que há um aumento na absorção da porfirina causado pela radiação ionizante. Para verificar esse efeito, foi realizado um teste *in vitro* com um derivado de hematoporfirina semelhante à PpIX (Photogem®). Entretanto, o teste não demonstrou aumento na absorção da porfirina após ser irradiada por diferentes doses de radiação ionizante e, portanto, não deveria ocorrer aumento na emissão de fluorescência da porfirina irradiada (Figura 25). Por isso, o aumento da emissão de fluorescência nas bandas presentes na região entre 620 e 680 nm foi associado ao aumento do aporte sanguíneo local devido ao dano promovido no tecido pela RT.

Figura 25 – Espectro de absorção do Photogem®, em diferentes escalas para as bandas de Soret (< 470 nm) e Q (470-650 nm), após receber diversas doses de RT: 0, 1, 3, 5, 7 e 9 Gy; praticamente não há alteração na absorção.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi possível observar, com os resultados obtidos, que os efeitos induzidos no tecido apresentam uma grande dependência da ordem e do intervalo de aplicação entre as técnicas, devido às alterações metabólicas decorrentes de cada tratamento separadamente. Assim, o efeito causado pela primeira terapia é fundamental para a eficiência da segunda e, para que ocorra o efeito desejado, é importante a espera do tempo necessário entre os tratamentos.

Os resultados do estudo aqui apresentado concordam com os resultados obtidos por Berg et al. (39) e por Allman et al. (40), uma vez que os grupos com um intervalo de tempo de 24 horas entre os tratamentos apresentaram os melhores resultados, embora Allman et al. tenha encontrado apenas uma resposta aditiva. É importante observar, no entanto, que o estudo de ambas as técnicas com cultura de células, embora permita observar o comportamento celular ante a terapia, não leva em consideração aspectos sistêmicos, como resposta inflamatória e reoxigenação tecidual durante a TFD, que dependem da vascularização e das sinalizações intercelulares. Assim, esse estudo vem para complementar os resultados anteriores.

Pogue et al. (42), Benstead et al. (43) e Luksiene et al. (44) utilizaram um FS que não era produzido endogenamente pela célula, e esse mecanismo poderia ser uma solução para aumentar o dano tecidual causado nos grupos em que a RT foi

aplicada antes da TFD (RT+TFD e RT+24h+TFD), evitando o problema da baixa produção de PplX a partir da aplicação do ALA.

Por meio de contato estabelecido com o Prof. Dr. Brian Pogue, surgiu a possibilidade de aprofundar os estudos desta tese. Na USP, foram realizados estudos baseados apenas em fluorescência da PplX e na observação do dano estabelecido após as terapias. A ida para o Dartmouth College permitiu complementar os estudos utilizando outras técnicas ópticas para monitorar parâmetros bioquímicos envolvidos na resposta celular quando da aplicação de TFD e RT.

4.2 Estudo conduzido no Dartmouth College

4.2.1 Tecido Normal

Os experimentos realizados na USP permitiram a seleção das melhores combinações de tratamento para investigações mais detalhadas dos danos que ocorreram no tecido. Assim, os experimentos realizados no Dartmouth College tentaram reproduzir os realizados na USP para os grupos selecionados com o objetivo de avaliar diferentes parâmetros teciduais por fluorescência e refletância. Nesta etapa, os animais foram acompanhados por 6 dias após os tratamentos e informações como o dano macroscópico, o dano vascular e a fluorescência foram avaliados.

Avaliação macroscópica

A Figura 26 mostra as imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo controle. Como explicado anteriormente, todos os animais foram acompanhados durante 6 dias após o tratamento. No entanto, o grupo controle não

foi submetido a tratamento algum e, assim, os dias 1 e 2 correspondem aos dias em que os tratamentos ocorreram para os outros grupos.

Figura 26 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Avaliação clínica da pele dos ratos, durante o período de avaliação, para o grupo controle.

Grupo- tempo/característica 0/4+	Eritema	Crosta	Exsudato
G1 – Dia 1	0	0	0
G1 – Dia 2	+	0	0
G1 – Dia 3	+	0	0
G1 – Dia 4	+	0	0
G1 – Dia 5	0	0	0
G1 – Dia 8	0	0	0

Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo controle, é possível notar que o processo de tricotomização não induziu grandes alterações no tecido, sendo que somente algumas regiões avermelhadas foram observadas nos primeiros dias. Essa observação é apresentada na tabela de avaliação macroscópica (Tabela 2), que representa as principais características clínicas apresentadas pelo tecido com o passar do tempo. Os resultados apresentados na tabela representam a média de dano dos 3 animais que faziam parte de cada grupo.

Figura 27 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado apenas por TFD.
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 – Avaliação clínica da pele dos ratos, durante o período de avaliação, para o grupo tratado por TFD.

Grupo- tempo/característica 0/4+	Eritema	Crosta	Exsudato
G2 – Pré TFD	+	0	0
G2 – Dia 1	+	+	0
G2 – Dia 2	++	++	0
G2 – Dia 3	+	+++	0
G2 – Dia 6	+	++	0

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 27 representa as imagens do tecido monitorado ao longo do tempo para o grupo tratado apenas com TFD. Nesse grupo é possível observar que, um dia após o tratamento, o tecido apresentou uma área de necrose tecidual. Dois dias após a TFD, no entanto, o processo de reparação já estava ocorrendo, e se tornou mais acentuado com o passar do tempo. Esse fenômeno é verificado na tabela de avaliação macroscópica (Tabela 3), onde a formação de crosta aumenta à medida que o processo de reparação se torna mais acentuado.

A Figura 28 mostra as imagens através do tempo para o grupo tratado apenas com a RT. Nesse grupo, é possível notar que a RT induziu um leve dano na pele do rato, porém, não tão intenso quanto o causado pela TFD. Essa lesão tornou-se mais severa com o passar do tempo, uma vez que o dano causado pela RT demora um tempo maior para se estabelecer; no entanto, esse pequeno aumento da severidade no dano apresentado não chega a ser suficiente para elevar a pontuação média da classificação das lesões, apresentada na Tabela 4.

Figura 28 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado apenas por RT.
Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 4 mostra a avaliação macroscópica para os grupos tratados apenas com RT. Os resultados apresentados na tabela corroboram com as imagens de luz

branca, uma vez que mostra que, em média, as lesões formadas na pele do animal após a RT são menos severas que aquelas causadas pela TFD.

Tabela 4 – Avaliação clínica da pele dos ratos, durante o período de avaliação, para o grupo tratado por RT.

Grupo- tempo/característica 0/4+	Eritema	Crosta	Exsudato
G3 – Pré RT	+	0	0
G3 – Dia 1	++	0	0
G3 – Dia 2	++	+	0
G3 – Dia 3	++	+	0
G3 – Dia 6	++	+	0

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 29 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado por RT+24h+TFD.
Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens do tecido monitoradas ao longo do tempo para o grupo RT+24h+TFD são mostradas na Figura 29. A RT, como esperado a partir dos

resultados obtidos na Figura 28, não induziram um dano severo à pele. O dano causado pela TFD foi mais pronunciado e, como mostrado na Figura 27, um dia após a TFD foi possível observar uma região necrótica.

A tabela de avaliação macroscópica (Tabela 5) representa os resultados apresentados nas imagens, mostrando que um dia após a RT não houve variação na pontuação atribuída aos danos na pele do animal, e que 1 dia após a TFD os danos começaram a se tornar mais severos, apresentando um período de maior dano no dia 2 após os tratamentos, após esse período começa o processo de reparação tecidual.

Tabela 5 – Avaliação clínica da pele dos ratos, durante o período de avaliação, para o grupo tratado por RT+24h+TFD.

Grupo- tempo/característica 0/4+	Eritema	Crosta	Exsudato
G4 – Pré RT	+	0	0
G4 – Pré TFD	+	0	0
G4 – Dia 1	+	+	0
G4 – Dia 2	++	++	0
G4 – Dia 3	+	++	0
G4 – Dia 6	+	++	0

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 30 mostra as imagens monitoradas com o tempo para o grupo TFD+24h+RT. Para esse grupo é possível observar que, no momento em que a RT foi realizada, o tecido já estava danificado (devido à TFD), e um dia após a RT, a lesão aparentava ser mais severa em comparação com o mesmo dia do grupo RT+24h+TFD. Essas observações clínicas indicam que, quando a RT é realizada 24 horas após a TFD, o efeito no tecido é mais acentuado, o que está de acordo com os resultados obtidos nos experimentos na USP, e mostra que a sinergia entre a

TFD e a RT em pele normal é mais provável que ocorra quando a TFD é realizada antes da aplicação de RT.

Figura 30 - Imagens do tecido monitorado através do tempo para o grupo tratado por TFD+24h+RT.
Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 6, que apresenta a avaliação macroscópica para o grupo tratado por TFD+24h+RT, também representa o que é mostrado nas imagens para a média de todos os animais do presente grupo: a classificação dos danos teciduais, um dia após a TFD, teve um aumento da pontuação. Quando a RT foi aplicada, o tecido já estava danificado e o dano apresentado 1 dia após os tratamentos foi o mais severo. O processo de cura, porém, ocorreu de forma acelerada, e no dia 6 foi possível observar que, no geral, os animais desse grupo já apresentavam uma boa reparação.

Tabela 6 – Avaliação clínica da pele dos ratos, durante o período de avaliação, para o grupo tratado por TFD+24h+RT.

Grupo-tempo/característica 0/4+	Eritema	Crosta	Exsudato
G5 – Pré TFD	+	0	0
G5 – Pré RT	++	0	0
G5 – Dia 1	+++	++	0
G5 – Dia 2	+	++	0
G5 – Dia 3	+	+	0
G5 – Dia 6	0	+	0

Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliação do dano vascular

Os espectros de refletância foram analisados, fornecendo, assim, os dados apresentados para sO_2 , concentrações de MetHb e BIL, FVS e RV graficados a seguir. A sO_2 representa a quantidade de oxigênio presente no sangue, ou seja, ligado à hemoglobina; esse é um dos principais meios para a reposição de oxigênio no tecido e é usado como uma aproximação para a oxigenação tecidual. Essa medida não leva em consideração, porém, o tempo para que o oxigênio se difunda para o tecido. (69) A FVS é a medida da fração do volume de sangue presente exatamente no ponto da medida (ou seja, do ponto irradiado durante a colheita), e o RV está relacionado às dimensões do volume ao qual o sangue está confinado – tipicamente o diâmetro médio dos vasos sanguíneos. (70) A MetHb é uma forma de hemoglobina gerada devido ao estresse oxidativo, para a qual há uma mudança na valência do elétron do ferro – de ferroso (Fe^{2+}) para férrico (Fe^{3+}) – o que torna a molécula incapaz de fazer a ligação com o oxigênio. A BIL é um produto da degradação da hemoglobina. Assim, o aumento das concentrações de BIL e MetHb indicam dano vascular. (71–73)

As medidas foram colhidas no lado esquerdo (controle) e no lado direito (tratado) do rato, com o objetivo de verificar a existência de eventuais efeitos

sistêmicos. A Figura 31 mostra os gráficos obtidos para o parâmetro sO_2 em cada grupo.

Figura 31 – Valores de sO_2 obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de sO_2 como função do tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos gráficos da Figura 31, é possível acompanhar as mudanças que ocorreram na sO_2 para cada tratamento. No grupo controle, não houve diferença entre esquerdo e direito, o que significa que a óptica do tecido é naturalmente similar nos dois lados do corpo. No grupo de TFD, a sO_2 diminuiu imediatamente após a terapia do lado tratado; e diminuiu ainda mais um dia após o tratamento. Esta diminuição da sO_2 logo após a TFD era esperada devido ao dano vascular induzido, que diminui o aporte de sangue e consequentemente de oxigênio no sítio do tratamento. O fato dessa diminuição ser ainda mais acentuada um dia após o procedimento, pode estar relacionado ao tecido necrótico na superfície da pele. A partir do segundo dia após a TFD, é possível notar que a sO_2 tende a voltar ao normal. Isso indica que o processo de reparo tecidual já está acontecendo, tendendo a reestabelecer o aporte sanguíneo e, consequentemente, a oxigenação do tecido tratado. O grupo tratado apenas com RT não apresentou diferença na sO_2 após a terapia, nos tempos investigados. Nesse caso, a alteração vascular induzida pela RT não pôde ser evidenciada por essa medida óptica.

É importante salientar que a RT não ter mostrado alteração na sO_2 não quer dizer que ela não consuma oxigênio. A sO_2 é o oxigênio presente no sangue, e tanto a TFD quanto a RT utilizam oxigênio tecidual. Porém, o consumo de oxigênio durante a TFD é grande o suficiente para induzir regiões com concentrações extremamente baixas de oxigênio, o que se reflete de forma expressiva na sO_2 . Além disso, a TFD causa dano à microvasculatura local, o que impossibilita a pronta reposição do oxigênio. (74)

Para o grupo RT+24h+TFD, foi observado que a RT não variou a sO_2 , como esperado. A saturação diminuiu seu valor logo após a TFD e diminuiu ainda mais nos dois dias seguintes; a partir do terceiro dia, a sO_2 começou a retornar ao seu valor inicial. No grupo TFD+24h+RT, imediatamente após a TFD houve uma significativa queda no nível da sO_2 . Vinte e quatro horas após a TFD, a sO_2 estava um pouco mais elevada quando, então, a RT foi realizada. A RT não variou significativamente o nível da sO_2 , e seus valores começaram a voltar aos valores iniciais depois disso. Em todos os grupos, o lado controle não apresentou mudanças na sO_2 , mostrando que não houve efeito sistêmico causado de maneira a modificar esse parâmetro.

A Figura 32 mostra os dados para o parâmetro FVS obtidos a partir da refletância para cada grupo de tratamento.

Figura 32 - Valores de BVF obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de BVF com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos gráficos da Figura 32, as variações observadas em FVS foram monitoradas para cada tratamento: no grupo controle não houve diferença entre lado

esquerdo e direito. No grupo TFD, a FVS apresentou uma leve diminuição após a aplicação do ALA e também após a TFD, tendendo a retornar ao nível inicial um dia após o tratamento. No grupo RT o comportamento observado para a FVS foi bastante semelhante para o lado controle e lado tratado, indicando que a RT não promoveu alterações teciduais que causassem variações na FVS. Somente no dia 6 os valores de FVS aumentaram mais que o do lado controle, porém, esse aumento não foi significativo estatisticamente. Para os grupos RT+24h+TFD e TFD+24h+RT, foram observados comportamentos semelhantes, os tratamentos não modificaram a FVS até o dia 2 após a TFD, quando então, as curvas tiveram inversão de comportamento, mostrando uma sutil tendência a aumento de FVS para o lado tratado, e uma leve diminuição para o lado controle.

A Figura 33 mostra os gráficos de RV para cada grupo de tratamento. Para esse parâmetro, o grupo controle não apresentou diferenças significativas para ambos os lados. No grupo TFD, o RV apresentou uma grande redução 24 horas após o tratamento, e a partir de então passou a se aproximar mais e mais do valor original. Esse resultado era esperado devido ao dano vascular induzido pela TFD. É importante notar que a mera aplicação do ALA causa uma pequena, mas perceptível diminuição do RV. O grupo RT não apresentou diferenças após a terapia, exceto no dia 6, no entanto, as barras de erro são tão grandes que não há significância estatística nesse aumento. O grupo RT+24h+TFD não apresentou variação no RV causado pela RT, mas após a aplicação do ALA foi possível observar uma ligeira redução do RV, como visto no caso do grupo apenas TFD, e um dia após a TFD houve uma grande redução dos valores mostrados na curva, com novo aumento do RV a partir do segundo dia após os tratamentos. No grupo TFD+24h+RT, o RV diminuiu ligeiramente após a aplicação do ALA, e mais acentuadamente 24 horas após a TFD. Após esse período, o RV começou a retornar a valores próximos aos de pré-tratamento.

Figura 33 - Valores de RV obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa RV com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.
Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação aos parâmetros FVS e ao RV, um dia após a TFD houve uma diminuição do RV, enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para a FVS. Essa relação indica que houve um aumento do fluxo sanguíneo, o que pode ser devido a uma resposta inflamatória do tecido induzida pela TFD, enquanto a RT não apresentou mudança no fluxo sanguíneo.

A Figura 34 apresenta os dados referentes a concentração de BIL, obtidos a partir da refletância, para cada grupo de tratamento.

Figura 34 - Valores de BIL obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de BIL com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 34 mostra as variações na concentração de BIL para cada tratamento. O grupo controle não apresentou diferenças com o passar do tempo bem como entre os lados esquerdo e direito. No grupo TFD, a concentração de BIL aumentou aproximadamente 3 vezes em um dia após a TFD, e um total de 5 vezes até o segundo dia, depois do que começou a retornar aos valores iniciais. No grupo RT não houve diferenças até o dia 6 após o tratamento, quando a concentração de BIL apresentou um ligeiro aumento, porém, esse valor não foi significativo estatisticamente. Para o grupo RT+24h+TFD, a concentração de BIL seguiu o padrão do grupo apenas TFD, aumentando um dia após a TFD, com aumento continuado no segundo dia, quando então começou a retornar aos níveis normais. No grupo TFD+24h+RT, o aumento pós-TFD também ocorreu como nos outros grupos que envolveram a terapia: a concentração de BIL começou a aumentar um dia após a TFD e sua maior concentração foi 2 dias após a TFD (um dia após a RT), e após esse período a BIL começou a retornar aos valores normais.

Os gráficos representando a concentração de MetHb para cada grupo de tratamento estão representados pela Figura 35. A resposta da MetHb foi similar à da BIL. No grupo controle não houve diferença de concentração com o passar do tempo, bem como entre o lado esquerdo e o direito. Para o grupo TFD, a concentração de MetHb aumentou um dia após o tratamento, e se manteve alto até o final da avaliação. Notou-se uma diminuição do parâmetro de concentração no dia 3, mas esta variação não apresentou relevância estatística. É válido mencionar que, apesar das barras de erro expressivas, a tendência dos valores muito maiores para o lado tratado sugere que este efeito é real. O grupo RT não apresentou diferença até o dia 6 após o tratamento, quando a concentração de MetHb apresentou um leve aumento, embora essa variação não seja relevante estatisticamente. No grupo RT+24h+TFD, a concentração de MetHb começou a aumentar um dia após a TFD e atingiu seu maior valor no segundo dia após a terapia, após esse momento, a concentração de MetHb diminuiu e manteve o seu valor. Para o grupo TFD+24h+RT, a concentração de MetHb aumentou um dia após a TFD e sua maior concentração foi no segundo dia após a terapia (um dia após a RT); após esse período, a concentração de MetHb diminuiu.

Figura 35 – Valores de MetHb obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de MetHb com o tempo. As linhas pretas representam o lado controle, e as linhas vermelhas o lado tratado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados de BIL e MetHb parecem ter uma concordância. Isto acontece porque ambos os parâmetros são produtos da degradação do sangue, ou seja, estão fortemente relacionados à destruição de células do tecido sanguíneo; portanto,

um aumento em suas concentrações significa a destruição da hemoglobina, que por sua vez indica dano tecidual induzido, principalmente dano vascular. A TFD mostrou uma grande produção desses produtos, enquanto a RT não apresentou nenhuma variação significativa. Isso pode ser explicado pelo conhecido dano vascular causado pela TFD pouco tempo após a terapia, ou seja, dentro do intervalo de tempo da investigação desse estudo. (75) A RT, por outro lado, induz efeitos vasculares que podem ser agudos ou crônicos, dependendo da dose de radiação utilizada. (9,34,76) Para a dose utilizada de 7 Gy, dentro do intervalo de tempo investigado (6 dias após o tratamento), não se observou dano relevante às estruturas presentes no sangue. Não é possível garantir, contudo, que esses efeitos não viriam a ser observados tardiamente, ou seja, com maiores intervalos de tempo de monitoramento pós tratamento.

Com base nos resultados, em especial do monitoramento da concentração de BIL e MetHb e da sO_2 , é possível afirmar que a técnica de refletância difusa é uma ferramenta relevante para monitorar o dano vascular causado pela TFD. Os trabalhos já apresentados na literatura tem exibido estudos de acompanhamento do que ocorre na TFD com monitoramento imediatamente após a terapia. (69,72,77) O presente estudo, porém, sugere fortemente que os melhores tempos para avaliar o dano causado pela TFD são os de 24 horas após o tratamento para a sO_2 , e de 48 horas para as concentrações de BIL e MetHb, sendo esses os parâmetros que apresentam as principais variações (Figura 36) nos intervalos e nas condições avaliadas.

A - sO₂ antes do tratamento

A - sO₂ 24h após o tratamento

B - BIL antes do tratamento

B - BIL 48h após o tratamento

C - MetHb antes do tratamento

C - MetHb 48h após o tratamento

Figura 36 – Gráficos dos principais parâmetros para acompanhar os danos vasculares causados pela TFD. A) sO₂ antes e 24h após a terapia; B) concentração de BIL antes e 48 horas após o tratamento e C) Concentração de MetHb antes e 48 horas após a TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dos gráficos da Figura 36 é possível observar que houve uma importante redução da sO₂ 24 horas após o tratamento para todos os grupos, embora o grupo tratado apenas por TFD tenha apresentado uma redução mais expressiva. Já para a concentração de BIL notou-se que a aplicação da RT não interferiu com sua

formação. Por fim, para a concentração da MetHB, é possível observar que a radiação ionizante aplicada ao tecido modifica um pouco a sua formação, desacelerando-a, e tornando maior a concentração de MetHb para o grupo tratado apenas por TFD.

O monitoramento do dano vascular causado no tecido só foi possível para a TFD, uma vez que a RT não apresentou dano vascular detectável. Esses resultados, no entanto, permitem a análise da condição da vasculatura no momento em que o segundo tratamento é realizado e, assim, ajudam a entender os efeitos observados na combinação das terapias.

Avaliação da fluorescência

Os espectros de fluorescência foram coletados a fim de avaliar a produção de PpIX e seu consumo após o tratamento de TFD. Para obter a informação da fluorescência, o FS foi excitado utilizando as fontes de excitação vermelha e azul e os gráficos para cada grupo de tratamento estão representados na Figura 37, onde a linha vermelha representa a fluorescência da PpIX quando esta é excitada utilizando o laser vermelho e a linha azul, quando a excitação foi a luz azul.

Figura 37 – Fluorescência da PpIX com o tempo para cada grupo de tratamento. A linha vermelha é para a excitação utilizando um laser vermelho e a azul é para a excitação na região do azul do espectro eletromagnético.

Fonte: Elaborada pela autora.

A emissão de fluorescência excitada por luz vermelha, como pode ser visto no gráfico da Figura 37, é evidentemente mais intensa que a emissão gerada pela excitação no azul. Essa diferença poderia ser atribuída a um ou mais dos fatores relacionados à produção de fluorescência pelo FS *in vivo*. As principais delas são a

concentração do FS, a intensidade de luz de excitação, o coeficiente de absorção do FS (como função do comprimento de onda) e as características ópticas do tecido. Uma vez que foram usadas fontes de luz diferentes para excitação da fluorescência, é importante avaliar se essa diferença afetou a intensidade da fluorescência emitida em cada comprimento de onda, ou se o fato de uma maior penetração da luz no tecido para maiores comprimentos de onda fez com que mais moléculas de FS fossem excitadas, gerando assim mais fluorescência com a excitação do vermelho. Em outras palavras, é importante avaliar se a maior emissão para a excitação no vermelho se deve à maior quantidade de moléculas excitadas ou a uma diferença nas intensidades de luz de excitação.

Nos experimentos realizados, os espectros de fluorescência foram coletados no mesmo animal e sítio anatômico, portanto sujeitos às mesmas características teciduais. Além disso, a rotina que processa os espectros de fluorescência desconta os efeitos de tecido, removendo a fluorescência endógena e fornecendo apenas a emissão relacionada ao FS. Com isso, a diferença nas emissões depende, essencialmente, das razões entre as intensidades de excitação e entre os coeficientes de absorção. Logo, se a razão entre as fluorescências for equivalente ao produto das razões de excitação e absorção, então o sinal das fluorescências geradas por luz vermelha e azul seria equivalente. Caso contrário, a maior emissão para o vermelho está relacionada à sua maior penetração no tecido.

Assim, para verificar se a diferença entre as emissões é proporcional ao efeito da excitação, tomamos a razão entre a intensidade de excitação no azul (I_a) e no vermelho (I_v), como sendo um parâmetro $\alpha = I_v/I_a$. Da mesma forma, dado que a concentração local de FS é a mesma, a razão entre as absorções de luz azul (σ_a) e vermelha (σ_v) serão dadas por um parâmetro $\beta = \sigma_v/\sigma_a$. Assim, a razão entre a emissão de fluorescência excitada por luz vermelha (E_v) e a excitada por luz azul (E_a) deverá ser igual ao produto de α por β ($E_v/E_a = \alpha.\beta$), caso a quantidade de moléculas alcançadas pela luz vermelha seja aproximadamente igual às alcançadas pela luz azul. Se a razão $E_v/E_a > \alpha.\beta$, então a luz vermelha necessariamente chega mais fundo no tecido e excita mais moléculas de FS; caso $E_v/E_a < \alpha.\beta$, quem chega mais fundo e excita mais moléculas seria a luz azul.

As intensidades dos lasers de excitação vermelho e azul são, aproximadamente, $I_v = 4$ e $I_a = 1$ mW/cm², respectivamente. Os valores do coeficiente de absorção foram tirados da Figura 7 e são $\sigma_v = 0,027$ para o vermelho e $\sigma_a = 0,98$ para o azul. Com isso:

$$\alpha.\beta = \frac{I_v.\sigma_v}{I_a.\sigma_a} \quad (1)$$

$$\alpha.\beta = \frac{4.0,027}{1.0,98} = \frac{0,108}{0,98} = 0,11 \quad (2)$$

A razão E_v/E_a foi calculada a partir dos gráficos da Figura 37. Embora os cálculos pudessem ser realizados para qualquer etapa do processo, foram considerados os pontos identificados como “Pré TFD”, período em que houve a produção de PpIX e onde a informação sobre o sinal de emissão da fluorescência era mais importante. Os valores de E_v/E_a são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Razão entre o sinal de emissão de fluorescência da PpIX quando excitada com a luz vermelha e com a luz azul.

Grupo	E_v/E_a
TFD	1,42
RT+24h+TFD	2,15
TFD+24h+RT	2,70

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, em todos os casos $E_v/E_a > \alpha.\beta$, o que era esperado dado que se sabe que, comumente, a luz vermelha tem maior penetração média em tecidos biológicos com relação à luz azul, dada a maior relevância do espalhamento de luz para menores comprimentos de onda dentro da janela óptica biológica. Com isso, é possível considerar que o sinal de fluorescência coletado quando a PpIX é excitada com a luz azul refere-se a uma informação mais superficial, enquanto a excitação o FS com a luz vermelha fornece uma informação de maior profundidade.

Com base no conhecimento das diferentes informações fornecidas pela fluorescência obtida, é possível observar, a partir da Figura 37, que todos os grupos tratados com TFD apresentaram uma importante redução no sinal de fluorescência da PpIX após a terapia, com uma recuperação desse sinal no dia seguinte. Esse fenômeno ocorreu tanto na superfície (excitação no azul) quanto em profundidade (excitação no vermelho). A redução de sinal é considerada como uma indicação do efeito fotodinâmico, uma vez que parte das espécies reativas de oxigênio causam o dano enquanto a outra parte degrada as moléculas de PpIX. Assim, uma importante redução no sinal de fluorescência é considerada indício de um importante efeito fotodinâmico. (27,78)

Os gráficos da Figura 37 mostram uma maior produção de PpIX para o grupo RT+24h+TFD. Apesar do fato de que a diminuição da fluorescência é geralmente utilizada para inferir a eficiência de iluminação da TFD, não se pode concluir dos resultados que o grupo RT+24h+TFD apresentou o dano mais expressivo. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao fato do tecido estar previamente danificado pela RT, o que levou a um efeito não tão expressivo da TFD. Por outro lado, para o grupo no qual a TFD foi aplicada antes da RT, foi observada a menor produção de PpIX na superfície do tecido. Ainda assim, a emissão de fluorescência reduzida não alterou a tendência geral do sinal de fluorescência ao longo do tempo, quando comparado com o grupo tratado apenas com TFD. Além disso, essa redução foi observada apenas superficialmente; em profundidade, essa produção foi semelhante nos dois grupos.

Avaliação morfométrica

As peças de biópsia dos tecidos foram coradas com HE e as imagens para cada grupo de tratamento são apresentadas na Figura 38.

Figura 38 - Fotomicrografia das lâminas histológicas: avaliação histológica dos danos teciduais dos tratamentos de acordo com o grupo, utilizando a técnica de coloração por HE. As setas (→) indicam figuras de mitose; o asterisco (*) corresponde a uma fissura nuclear; as estrelas (☆), à citoplasma claro e halo perinuclear, e o triângulo (▲) identifica múltiplos nucléolos. As fotomicrografias dos grupos controle, TFD e RT foram feitas com um aumento de 200X, enquanto as dos grupos RT+24h+TFD e TFD+24h+RT, foram realizadas com o aumento de 400X, para facilitar a visualização das alterações do tecido.

Fonte: Elaborada pela autora.

Das imagens histológicas mostradas na Figura 38, nenhum grupo tratado apresentou estruturas características de dano tecidual como, por exemplo, edema,

inflamação e necrose. Assim, não foi possível concluir, a partir da histologia, qual tratamento levou a um maior dano, uma vez que todos os animais avaliados já apresentavam um grau de reparação bastante avançado. As alterações encontradas – figuras de mitose, fissura nuclear, múltiplos nucléolos, citoplasma claro e halo perinuclear – indicam que houve alterações nessas células, mas que o tecido já estava em processo de recuperação no momento da eutanásia, não tornando possível obter maiores informações a respeito.

A espessura da epiderme é uma das características de dano à pele. Assim, a fim de avaliar se esse parâmetro poderia indicar qual dos grupos apresentou um maior dano ao tecido, foi feita uma medida da espessura da epiderme para cada grupo. O resultado está apresentado na Tabela 8 e, embora o desvio padrão seja muito grande, os valores médios mostram diferença significativa na espessura da epiderme para o grupo TFD+24h+RT em relação ao grupo controle.

Tabela 8 – Média da espessura da epiderme para cada grupo de tratamento. As medidas foram realizadas escolhendo-se, aleatoriamente, 20 pontos da epiderme de cada animal. O asterisco significa que houve significância estatística em relação ao grupo controle.

Grupo	Espessura da epiderme (mm)
Controle	60 ± 20
TFD	60 ± 10
RT	50 ± 20
RT+24h+TFD	60 ± 20
TFD+24h+RT	40 ± 20*

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados parecem sugerir que, para o caso dos experimentos realizados no Dartmouth College, o tempo de espera para a realização da biópsia não foi o ideal para a melhor avaliação histológica da combinação dos tratamentos. Porém, ao observar todos os resultados dos experimentos realizados, é razoável afirmar que a combinação TFD+24h+RT tenha apresentado o maior dano, corroborando com o resultado encontrado nos experimentos realizados na USP.

4.2.2 Tecido Tumoral

Uma vez que foi verificado o efeito da combinação das técnicas em tecido normal, passou-se à avaliação de um modelo tumoral para verificação destes mesmos efeitos. Esta transposição para o modelo tumoral se faz importante uma vez que, embora seja relevante conhecer os efeitos das terapias em tecido normal, o tratamento tumoral é a aplicação final almejada para ambas as modalidades de tratamento.

O mesmo protocolo de tratamento realizado para tecido normal de ratos Wistar foi utilizado para tumores em camundongos Nude. Essa decisão foi tomada para permitir a comparação entre os dois experimentos. O modelo animal precisou ser mudado para permitir o desenvolvimento do modelo tumoral utilizado, que não era aplicável a ratos Wistar.

Avaliação macroscópica

A Figura 39 mostra as imagens dos tumores em função do tempo para o grupo controle. Nas imagens é possível observar que, sem tratamento, o tumor cresce rápido o suficiente para ulcerar a pele na superfície do tumor no dia 7. Todos os animais foram acompanhados durante 6 dias após o tratamento, assim como para os experimentos em tecido normal. Portanto, o "dia 1" corresponde ao dia em que o tratamento foi realizado nos outros grupos.

Figura 39 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo controle.
Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo TFD estão representadas na Figura 40. Nela, é possível observar o processo inflamatório estabelecido após a TFD. A presença de inflamação levou à decisão de que os animais seriam monitorados até que o tumor atingisse 10 vezes o seu tamanho inicial, para evitar que o edema tecidual pudesse ser erroneamente interpretado como crescimento do tumor. No dia 3, o tumor começou a apresentar uma crosta decorrente da necrose causada pela TFD, mas mesmo assim o tumor continuou crescendo em torno do dano causado pela TFD.

Figura 40 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo tratado somente por TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 41 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo tratado somente por RT.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 41 mostra as imagens dos tumores monitoradas com o tempo para o grupo tratado somente por RT. Esse tratamento não apresentou nenhuma crosta, inchaço ou vermelhidão; o crescimento do tumor, no entanto, foi atrasado, fato evidenciado pela ausência da ulceração da pele na superfície do tumor, causada por seu crescimento.

As imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo RT+24h+TFD são apresentadas na Figura 42.

Figura 42 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo RT+24h+TFD.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o grupo RT+24h+TFD a inflamação após a TFD parece menos acentuada que a do grupo tratado somente por TFD. A crosta também apareceu no dia 3 após TFD. No dia 6, é possível observar que o tumor continuou crescendo ao redor do dano causado pela TFD, como observado no grupo apenas TFD.

A Figura 43 apresenta imagens dos tumores monitorados através do tempo para o grupo TFD+24h+RT.

Figura 43 – Imagens dos tumores monitorados ao longo do tempo para o grupo TFD+24h+RT.
Fonte: Elaborada pela autora.

Nas imagens acima, é possível observar a inflamação devida à TFD no primeiro dia após os tratamentos; no dia 3 após a RT, o tumor parece ter reduzido seu tamanho e, então, no dia 6, o eritema comumente observado após os tratamentos de TFD pareceu se apresentar num grau menos intenso, e o crescimento do tumor não causou a ulceração da pele na superfície do tecido.

Avaliação do dano vascular

Os mesmos parâmetros obtidos a partir do espectro de refletância para o tecido normal foram também medidos para os tumores. Os gráficos relacionados ao parâmetro sO_2 estão representados na Figura 44.

Figura 44 - Valores de sO₂ obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de sO₂ com o tempo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 44 mostra os gráficos da sO₂ para cada grupo de tratamento. O grupo controle apresentou um ligeiro aumento na sO₂ no dia 8. Essa diferença pode ser devida ao crescimento do tumor, uma vez que os vasos ficam mais próximos à

superfície do tecido quando o tumor cresce e, assim, mais expostos à avaliação óptica. Em tumores, também foi possível observar que as barras de erro são maiores que as do tecido normal. Isso acontece provavelmente devido à heterogeneidade na formação dos tumores, o que leva às diferenças nas propriedades ópticas de ponto a ponto na lesão. Essa heterogeneidade do tecido e, consequentemente, as grandes barras de erro não permitem a apresentação de diferenças estatisticamente significantes nas medidas, mas apenas tendências no comportamento de parâmetros.

Para o grupo TFD, houve uma diminuição no sO_2 após a aplicação do ALA e, então, o parâmetro começou a retornar aos valores observados pré-tratamento. O grupo tratado por RT também apresentou um pequeno aumento na sO_2 , também provavelmente devido ao crescimento do tumor. No grupo RT+24h+TFD, no entanto, houve um aumento significativo na sO_2 um dia após a TFD, e o mesmo comportamento foi observado para o grupo TFD+24h+RT, porém menos acentuado. Esses resultados sugerem que a combinação da TFD e da RT provoca um aumento na sO_2 das lesões, e que tal efeito é mais evidente quando a TFD é aplicada em um tecido previamente tratado por RT. Pode-se considerar que este importante aumento da sO_2 é um efeito sinérgico das duas técnicas, porém outros efeitos sinérgicos para TFD associada a RT só mostraram serem mais relevantes para o grupo TFD+24h+RT.

A Figura 45 mostra os gráficos da FVS para cada grupo de tratamento.

Figura 45 – Valores de FVS obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a porcentagem de FVS com o tempo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos gráficos da Figura 45, o grupo controle apresentou um aumento na FVS no dia 8, o que pode ser devido ao crescimento do tumor. Para o grupo TFD, também houve um aumento na FVS; porém, para esse grupo, o aumento começou a partir do dia 1 pós-tratamento. O grupo RT, por sua vez, não apresentou diferença

na FVS até o dia 6. No grupo RT+24h+TFD, os valores de FVS começaram a aumentar um dia após o tratamento e, para o grupo TFD+24h+RT, esse aumento ocorreu um dia após a TFD e manteve praticamente constante ao longo dos dias seguintes de avaliação.

Figura 46 – Valores de RV obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa o RV com o tempo. Fonte: Elaborada pela autora.

O RV é apresentado na Figura 46 para cada grupo de tratamento. Para esse parâmetro, os grupos controle e RT não apresentaram nenhuma variação significativa durante o período avaliado. No grupo TFD, RV começou a aumentar a partir do segundo dia e continuou crescendo com a passagem do tempo. Os grupos RT+24h+TFD e TFD+24h+RT apresentaram um aumento do RV a partir do terceiro dia após a TFD, o que mostra que o aumento do RV é um indicativo relevante do efeito da TFD. Apesar do grande desvio padrão observado para os dados, a tendência dos valores do parâmetro mostra que há uma evidência de dilatação do vaso como um efeito induzido por TFD com ou sem aplicação de RT.

Considerando a FVS e o RV, como mostrado na Figura 45 e na Figura 46, houve um aumento em ambos os parâmetros para os casos em que a TFD foi aplicada. O aumento tanto da FVS quanto do RV sugere que não houve alteração no fluxo sanguíneo médio tecidual na porção investigada; porém, o aumento local destes parâmetros pode ser um reflexo do processo inflamatório estabelecido no tecido tratado, consequente à TFD.

A Figura 47 mostra os gráficos da concentração de BIL para cada grupo de tratamento.

Figura 47 – Valores de BIL obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de BIL com o tempo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos gráficos da Figura 47, para o grupo controle houve uma tendência a aumentar a concentração de BIL no dia 8. Esse aumento poderia estar relacionado à ulceração da pele causada pelo crescimento do tumor, porém essa diferença não apresentou relevância estatística. Para o grupo TFD, a concentração de BIL

aumentou um dia após a TFD e continuou aumentando com o passar do tempo. A RT não apresentou grandes diferenças na concentração de BIL. Para os grupos RT+24h+TFD e TFD+24h+RT, a concentração de BIL começou a aumentar um dia após a TFD e a partir do segundo dia permaneceu praticamente constante.

Apesar das pequenas diferenças observadas para os outros parâmetros avaliados, o parâmetro com a variação mais relevante foi a BIL: suas concentrações variaram de aproximadamente zero para valores entre 0,6-1,9 μM após a TFD, o que é uma evidência de dano aos vasos sanguíneos induzido por TFD.

A Figura 48 apresenta os gráficos da concentração de MetHb para cada grupo de tratamento. Similar ao que ocorre para a BIL, esse parâmetro apresentou uma diferença pouco expressiva na concentração de MetHb para os grupos controle e RT no dia 6 após o tratamento, porém essa diferença não foi estatisticamente relevante. Nos grupos que envolveram TFD (somente TFD, RT+24h+TFD e TFD+24h+RT) houve um aumento na concentração de MetHb após essa terapia, o que também indica que houve dano nos vasos sanguíneos causado pela TFD.

Figura 48 – Valores de MetHb obtidos a partir da refletância. Cada gráfico representa a concentração de MetHb com o tempo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Crescimento do tumor

O crescimento do tumor é um parâmetro importante, uma vez que permite avaliar a eficiência do tratamento ao monitorar o quanto a técnica é capaz de retardar o crescimento do tumor quando comparado ao grupo controle.

A Figura 49 mostra a curva de Kaplan-Meier para o crescimento do tumor de cada grupo de tratamento. Nessa curva, o eixo y mostra o percentual de animais que ainda não atingiram o ponto de corte em um grupo, e o eixo x representa o número de dias de avaliação, desde o início do monitoramento, para cada animal. Quando o tumor atingia 10 vezes o seu volume inicial, o animal não era mais contado no grupo, e a curva decaía.

Figura 49 – Curva de Kaplan-Meier. Eixo y mostra a percentagem de animais que ainda não atingiram o ponto de corte e o eixo x representa o número de dias para o tumor atingir 10 vezes o seu volume inicial.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir do gráfico da Figura 49, foi calculada a média de tempo para os tumores atingirem 10 vezes o seu volume inicial, mostrada na Tabela 9.

Tabela 9 – Média de tempo para os tumores atingirem o volume do ponto de corte. O asterisco significa que houve significância estatística em relação ao grupo controle.

Grupo	Tempo médio (em dias)	Atraso no crescimento em relação ao controle (em dias)
Controle	6 ± 1	--
TFD	7 ± 1	1 ± 2
RT	12 ± 3	6 ± 3*
RT+24h+TFD	8 ± 2	2 ± 2*
TFD+24h+RT	13 ± 3	8 ± 3*

Fonte: Elaborada pela autora.

Traçar uma curva de Kaplan-Meier ajuda a inferir qual dos procedimentos foi mais eficiente em estender a vida do animal (uma vez que o tumor 10 vezes maior que o inicial foi o ponto de corte escolhido), e essa é uma maneira de definir qual foi o tratamento mais eficaz para combater o tumor. Os asteriscos correspondem aos procedimentos que apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. Após os tratamentos, foi possível observar que o efeito da RT no tumor foi mais intenso que no tecido normal, o que era um resultado esperado porque as células tumorais crescem mais rápido que as células normais, e seu metabolismo as tornam mais susceptíveis ao dano induzido pela RT. Por outro lado, a dose de TFD entregue continuou sendo uma subdose, ou seja, a dose de luz utilizada é capaz de produzir efeito fotodinâmico, porém não promove a cura do tumor (como pode ser notado pelo curto atraso no período de tempo para os animais atingirem o ponto de corte). Com isso, a comparação entre as duas técnicas precisa levar em consideração que há um tratamento com uma subdose de TFD *versus* uma dose normal de RT.

Avaliação da fluorescência

Espectros de fluorescência foram coletados a fim de avaliar a produção e o consumo de PpIX durante o tratamento de TFD. A coleta do sinal de fluorescência foi realizada da mesma forma que para o tecido normal, de modo que o FS foi excitado utilizando fontes de excitação vermelha e azul. Com isso, obteve-se informação de fluorescência proveniente de regiões mais superficiais (excitação com luz azul) e regiões mais profundas (excitação com luz vermelha). A Tabela 10, que contém os valores de E_v/E_a para os tumores, comprova que $E_v/E_a > \alpha.\beta$ também para os tumores.

Tabela 10 – Razão entre o sinal de emissão de fluorescência da PpIX quando excitada com a luz vermelha e com a luz azul.

Grupo	E_v/E_a
TFD	1,74
RT+24h+TFD	1,62
TFD+24h+RT	1,91

Fonte: Elaborada pela autora.

Os gráficos para cada grupo de tratamento estão representados na Figura 50, na qual a linha vermelha representa a fluorescência da PpIX quando esta é excitada utilizando o laser vermelho, e a linha azul quando a excitação foi a luz azul.

Figura 50 – Fluorescência da PpIX com o tempo para cada grupo de tratamento. A linha vermelha é para a excitação utilizando um laser vermelho e a azul é para a excitação na região do azul do espectro eletromagnético.

Fonte: Elaborada pela autora.

A razão pela qual a formação de PpIX para o grupo TFD+24h+RT foi muito menos expressiva que para o grupo somente TFD, tanto na superfície quanto em profundidade, não ficou clara. Esse resultado não era esperado, uma vez que ambos tinham a TFD como primeiro tratamento, o que significa que a fotossensibilização

era o primeiro procedimento para os dois grupos. Baseado na fluorescência, no entanto, deve-se assumir que a produção de PpIX realmente foi reduzida, e esta pode ser uma razão para a baixa eficácia da TFD.

O grupo RT+24h+TFD apresentou, de acordo com a Tabela 9, um reduzido acréscimo no tempo para que o ponto de corte fosse atingido. Isso pode ter sido causado pela baixa produção de PpIX. Com uma baixa concentração de FS disponível, a luz do tratamento pode ter agido principalmente como fotoestimulador do metabolismo tecidual e, em vez de causar dano ao tecido, a luz pode ter estimulado seu crescimento. (68)

Mesmo com os problemas relatados em relação à dose de RT e ao acúmulo de PpIX, ainda foi possível observar que o grupo TFD+24h+RT apresentou pelo menos um efeito aditivo das técnicas quanto à sua combinação. Quando a RT é realizada 24 horas após a TFD, os tumores levaram um tempo maior para atingir 10 vezes seu volume inicial. É possível que, se a dose de TFD fosse uma dose "completa", aplicada de acordo com um protocolo padrão, provavelmente seria possível fazer uma melhor avaliação do sinergismo sugerido por estes resultados.

4.3 Comparação dos resultados obtidos

O principal objetivo para a realização dos experimentos em Dartmouth College foi o de avaliar a resposta combinada da terapia fotodinâmica e radioterapia, de uma maneira complementar aos estudos realizados na USP, empregando a espectroscopia óptica para uma análise mais detalhada da vascularização, principalmente relacionada à hemoglobina. Os resultados não podem ser diretamente correlacionados àqueles obtidos no Brasil, devido às diferenças no protocolo animal, especialmente linhagem e fontes de iluminação para TFD e de radiação. No entanto, o comportamento da resposta tecidual pode ser comparado, pois em cada experimento, os grupos de tratamento isolados e combinado foram realizados.

Uma das diferenças entre os protocolos executados nos experimentos realizados na USP e no Dartmouth College diz respeito à TFD. Em ambas as instituições, a terapia foi realizada utilizando-se ALA 20%, induzindo a formação e acúmulo da PpIX com o tempo de espera de 2 horas. Porém, a iluminação foi realizada com dispositivos diferentes. Na USP, utilizou-se uma fonte de luz à base de LED, enquanto em Dartmouth a fonte utilizada foi um Laser. Embora as fontes sejam diferentes, a emissão era no mesmo intervalo de comprimentos de onda, e até o momento presente a literatura tem apresentado evidências de que tanto laser quanto LED resultam em similares efeitos terapêuticos no que diz respeito a aplicações de TFD tópica, como é o caso dos experimentos realizados nesse estudo (79–81), desde que os mesmos parâmetros de tempo de iluminação, intensidade e comprimentos de onda sejam aplicados.

A RT também utilizou fontes diferentes para tratamentos. Enquanto nos experimentos no Brasil, a irradiação foi realizada utilizando-se equipamento de ortovoltagem, em Hanover a fonte de radiação utilizada foi um dispositivo de feixe de elétrons – ambas fontes utilizadas principalmente para aplicação em pele. Embora houvesse uma diferença de dose nas aplicações, devido à distribuição de energia no caso do feixe de elétrons, e apesar de não haver consenso na literatura sobre qual fonte apresente um melhor resultado estético, esta única diferença não seria suficiente para explicar a total cicatrização do tecido sadio no caso dos experimentos realizados no Dartmouth College, uma vez que os animais tratados apenas por TFD também apresentaram total cicatrização. (82–84)

Outro ponto de relevante discussão sobre a RT realizada nos dois locais, foi o fato de que nos experimentos da USP, após a RT, houve um aumento da fluorescência na banda característica de porfirina (em 630 nm); a causa mais provável para essa alteração é um aumento do fluxo sanguíneo local, capaz de provocar uma maior detecção das porfirinas endógenas presentes no sangue. Porém, ao realizar os experimentos em Hanover, nenhum aumento na fluorescência foi detectado – o que já era esperado, uma vez que o programa que extrai os dados referente à fluorescência da informação coletada o faz separando a emissão característica da PpIX das outras porfirinas presentes, com emissão naquela mesma região. Além disso, também não foi detectado nenhum aumento significativo no fluxo sanguíneo após a terapia. Mesmo assim, os dados obtidos nas diferentes

instituições apresentaram respostas diferenciadas nos animais, sendo os resultados obtidos no Brasil muito mais exacerbados e apresentando maior evidência de processo inflamatório, o que pode ter levado a essa diferença.

Por fim, há a diferença da origem dos animais. No caso da análise em tecido normal, os animais eram da mesma linhagem (Wistar); apesar disso, a origem, acomodação, alimentação e ambiente são elementos a serem considerados quando se avalia o sistema imunológico de um animal e sua capacidade de regeneração tecidual. Outro fator que deve ser considerado é o número de animais por gaiola: na USP, eram acomodados de 3 a 4 animais por gaiola, e no Dartmouth College os ratos permaneciam sozinhos ou, no máximo, em pares nas gaiolas. Esse fator é importante, pois auxilia no combate ao estresse, além de permitir um maior repouso do animal e evitar atritos causados por brigas e/ou brincadeiras, resultando em uma cicatrização mais acelerada.

As diferenças impostas pelas necessidades de adaptação dos protocolos e dos animais entre as duas instituições, além da diferença inerente entre o tipo de tecido normal e tumoral, permitem observar apenas o fato de que os resultados sugerem a existência de um efeito de sinergia na combinação das técnicas quando a TFD é aplicada 24 horas antes da RT.

4.4 Possibilidades oferecidas pela combinação das técnicas

A TFD tem sido considerada segura em relação a outras modalidades de tratamentos, tanto como técnica principal quanto como adjuvante na redução de tumores para aumentar a efetividade da utilização de outras técnicas. A RT também é utilizada em conjunto com outras técnicas a fim de ampliar as possibilidades de tratamento. Contudo, a combinação da RT com a TFD não tem sido explorada diretamente. O estudo apresentado nesta tese é importante, pois é um passo no sentido de fornecer informações complementares sobre a interação entre os fenômenos envolvidos nessas técnicas, e suas consequências quanto ao resultado de tratamentos de tumores.

Essa compreensão auxiliará no entendimento das vantagens, e de potenciais efeitos nocivos de se fazer uso das duas técnicas conjuntamente, ou seja, sobre se uma das técnicas pode influenciar de maneira positiva ou negativa a ação da outra. A combinação das técnicas se mostrou inofensiva no sentido de eventuais riscos da aplicação conjunta da TFD e da RT dentro das condições deste estudo. Ao mesmo tempo, foi possível notar que as técnicas aplicadas com um intervalo de 24 horas entre uma e outra resultaram num efeito sinérgico, expresso num dano maior do que o obtido para as técnicas isoladamente, ou aplicadas imediatamente em sequência.

Embora não seja possível afirmar quais as causas de se observar sinergia entre as técnicas apenas quando houve um intervalo entre as aplicações, é possível dizer que as condições estruturais e metabólicas do tecido horas depois de um dos tratamentos contribuem com o dano provocado pela outra. Esta observação por si só abre um leque de perguntas sobre quais mecanismos são afetados pela terapia que se seguem à primeira, e cria possibilidade para novos estudos, ampliando o entendimento dos fenômenos que envolvem a associação das técnicas.

Estudos complementares podem ser realizados no sentido de melhorar os efeitos obtidos dessas combinações, modificando veículos de administração do FS, ou mesmo fazendo uso de um FS que não seja produzido endogenamente, além de estudos mais amplos sobre as doses de radiação (ionizante ou não) a serem avaliadas para o tratamento de tumores.

Os resultados obtidos nesse estudo encorajam a continuação das investigações, uma vez que a combinação entre essas técnicas pode potencializar o resultado de um tratamento, enquanto diminui os efeitos colaterais da RT, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida do paciente.

5 CONCLUSÃO

Para os experimentos realizados em tecido normal na USP, a avaliação tecidual dos danos causados pela combinação entre as técnicas de TFD e RT mostrou que houve um efeito sinérgico na combinação entre eles, principalmente para os grupos TFD+24h+RT e RT+24h+TFD. A melhor combinação entre as técnicas mostrou-se a do grupo TFD+24h+RT. O grupo RT+24h+TFD também apresentou um efeito sinérgico expressivo, uma vez que apresentou dano importante apesar de baixa produção de PpIX. Uma solução para esse problema seria a utilização de um fotossensibilizador que não dependa do estado prévio do metabolismo da célula, ou seja, que não seja produzido endogenamente.

A análise óptica se mostrou um método efetivo para monitorar o dano causado pela TFD na pele normal, uma vez que essa técnica permite monitorar o importante dano vascular causado pela TFD. Ela permite observar diferenças em FVS, RV, sO₂, e nas concentrações de BIL e MetHb. Este não é, entretanto, um método eficiente para monitorar o dano na combinação dos grupos, uma vez que a RT não apresenta nenhum dano vascular importante, de forma que a técnica apresentou essencialmente efeitos da TFD.

Para os tumores, as análises ópticas não se mostraram um método eficaz para monitorar o dano das terapias em lesões a partir de uma linhagem de carcinoma epidermóide, A431. Isto provavelmente se deu porque a linhagem celular utilizada apresenta um crescimento muito rápido e, assim, não produz uma rede vascular desenvolvida o suficiente no tempo necessário para atingir o ponto de corte, o que dificulta o acompanhamento do dano vascular. Outra razão, comum a tumores em geral, pode ser a heterogeneidade na formação tumoral, o que leva a diferenças nas propriedades ópticas de ponto a ponto na lesão. Com relação a curva de crescimento do tumor, o grupo TFD+24h+RT foi a melhor combinação para TFD e RT.

Os resultados também demonstraram que os efeitos induzidos no tecido apresentam uma grande dependência da ordem de tratamento, assim como do intervalo entre as técnicas, em função das alterações metabólicas.

O estudo da combinação do uso de raios-X com o efeito fotodinâmico é muito importante para o entendimento de fatores associados ao tratamento de tumores malignos - em especial considerando que a TFD tem sido considerada segura em associação a tratamentos por RT. Esta compreensão poderá ser usada para potencializar o resultado de um determinado tratamento, diminuindo o tempo e os efeitos colaterais, visando sempre o bem-estar do paciente. Além disso, os resultados apresentados neste estudo sobre o efeito sinérgico da TFD e da RT mostrou que é possível obter resultados favoráveis, que encorajam a investigação mais aprofundada da possibilidade de uso conjunto da TFD e da RT no tratamento de tumores.

REFERÊNCIAS

- 1 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Cancer. **Estimativa 2014:** incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outrosdestaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2015..
- 2 WASHINGTON, C. M.; LEAVER, D. **Principles and practice of radiation therapy**. Missouri: Elsevier, 2015.
- 3 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016-2017**. sobre as estimativas. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/sobre-as-estimativas.asp>>. Acesso em: 28 jan. 2016.
- 4 TORRE, L. A et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.
- 5 PRATAVIEIRA, S. et al. Optical imaging as auxiliary tool in skin cancer diagnosis. In: LA PORTA, C. (Ed.). **Skin Cancers** - risk factors, prevention and therapy. Rijeka, Croatia: InTech, 2011, p. 159–172.
- 6 NIEMZ, M. H. **Laser-tissue interactions: fundamentals and applications**. Berlin: Springer, 2003.
- 7 GRECCO, C. **Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda**. 2013. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 8 KHAN, F. M. **The physics of radiation therapy**. Minnesota: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- 9 HALL, E. J. **Radiation biology: a handbook for teachers and students**. Vienna: IAEA, 2010.
- 10 YOSHIMURA, E. M. Física das radiações : interação da radiação com a matéria radiation physics : interaction of radiation with matter. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57–67, 2009.
- 11 POTTIER, R. et al. **Photodynamic therapy with ALA: a clinical handbook**. Cambridge: RSC Publishing, 2006.
- 12 BABILAS, P.; SCHREML, S.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 26, n. 3, p. 118–132, 2010.

- 13 MORTON, C. A. et al. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British photodermatology group. **British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 4, p. 552–67, 2002.
- 14 FANTINI, F. et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: clinical and pathological determinants of response. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 8, p. 896–901, 2011.
- 15 RKEIN, A. M.; OZOG, D. M. Photodynamic therapy. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, p. 415–425, 2014.
- 16 CHRISTENSEN, E. et al. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid, dimethylsulfoxide and curettage in basal cell carcinoma: a 6-year clinical and histological follow-up. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 1, p. 58–66, 2009.
- 17 GARCIA-ZUAZAGA, J. et al. Photodynamic therapy in dermatology: current concepts in the treatment of skin cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 5, n. 5, p. 791–800, 2005.
- 18 SOUZA, C. S. et al. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 207–213, 2009.
- 19 IBBOTSON, S. H. An overview of topical photodynamic therapy in dermatology. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 1, p. 16–23, 2010.
- 20 TOREZAN, L. et al. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445–459, 2009.
- 21 FOTINOS, N. et al. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives. **Photochemistry & Photobiology**, v. 82, n. 4, p. 994–1015, 2006.
- 22 CARVALHO, M. et al. Fisiopatologia da porfiria aguda intermitente. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, v. 71, n. 10, p. 391–395, 2012.
- 23 ANDRADE, C. T. et al. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. In: VEREECKEN, P. (Ed.). **Highlights in skin cancer**. Rijeka, Croatia: InTech, 2013.
- 24 ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.
25. REQUENA, M. B. **Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele normal de suínos e diferentes fotossensibilizadores**. 2015. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

26 PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009.

27. VOLLET-FILHO, J. D. **Correlação de fluorescência superficial e profundidade de necrose em terapia fotodinâmica: possibilidade de dosimetria em tempo real**. 2011. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

28 JARVI, M. T. et al. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects. **Photochemistry & Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1198–1210, 2006.

29 GHOLAM, P. et al. Dermatology life quality index and side effects after topical photodynamic therapy of actinic keratosis. **Dermatology**, v. 226, n. 3, p. 253–259, 2013.

30 ERICSON, M. B. et al. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2008.

31 BASKAR, R. et al. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–9, 2012.

32 CAMARGO, A. C. **Radioterapia**. 2015. Disponível em: <<http://www.accamargo.org.br/servicos-especializados/radioterapia/14/>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

33 MUNIZ, R. M. **Os significados da experiência da radioterapia oncológica na visão de pacientes e familiares cuidadores**. 2008. 244 p. Tese (Doutorado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

34 PODGORSK, E. B. **Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students**. Austria: IAEA, 2005.

35 RETIF, P. et al. Nanoparticles for radiation therapy enhancement: the key parameters. **Theranostics**, v. 5, n. 9, p. 1030–1044, 2015.

36 MOORE, A. S. Radiation therapy for the treatment of tumours in small companion animals. **Veterinary Journal**, v. 164, n. 3, p. 176–187, 2002.

37 RERF. **How radiation affects cells**. 2015. Disponível em: <http://www.rerf.jp/radefx/basic_kno_e/radcell.htm>. Acesso em: 15 set. 2015.

38 DIEHN, M. et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 780–783, 2009.

- 39 BERG, K. et al. Combined treatment of ionizing radiation and photosensitization by 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. **Radiation Research**, v. 142, n. 3, p. 340, 1995.
- 40 ALLMAN, R. et al. Effect of photodynamic therapy in combination with ionizing radiation on human squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 5, p. 655–661, 2000.
- 41 SAZGARNIA, A. et al. In vitro survival of MCF-7 breast cancer cells following combined treatment with ionizing radiation and mitoxantrone-mediated photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 1, p. 72–78, 2013.
- 42 POGUE, B. W. et al. Photodynamic therapy with verteporfin in the radiation-induced fibrosarcoma-1 tumor causes enhanced radiation sensitivity. **Cancer Research**, v. 63, n. 5, p. 1025–1033, 2003.
- 43 BENSTEAD, K.; MOORE, J. V. The effect of combined modality treatment with ionising radiation and TPPS-mediated photodynamic therapy on murine tail skin. **British Journal of Cancer**, v. 62, n. 1989, p. 48–53, 1990.
- 44 LUKSIENE, Z. et al. On the combination of photodynamic therapy with ionizing radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 52, n. 1-3, p. 35–42, 1999.
- 45 NAKANO, A. et al. Treatment efficiency of combining photodynamic therapy and ionizing radiation for Bowen's disease. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, p. 475–478, 2011.
- 46 LACOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum, 1999.
- 47 GRECCO, C. **Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando fontes de luz pulsada no regime de femtossegundo**. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 48 VELD, D. C. G. et al. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 5, p. 356–364, 2005.
- 49 VALENTINE, R. M. et al. A quantitative comparison of 5-Aminolaevulinic acid- and methyl aminolevulinic acid-induced fluorescence, photobleaching and pain during photodynamic therapy. **Photochemistry & Photobiology**, v. 87, n. 1, p. 242–249, 2011.
- 50 GLENNIE, D. L. et al. Modeling changes in the hemoglobin concentration of skin with total diffuse reflectance spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 3, p. 035002, 2015.

- 51 ZONIOS, G. et al. Skin melanin, hemoglobin, and light scattering properties can be quantitatively assessed in vivo using diffuse reflectance spectroscopy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1452–1457, 2001.
- 52 JONASSON, H. et al. Oxygen saturation , red blood cell tissue fraction and speed resolved perfusion — a new optical method for microcirculatory assessment. **Microvascular Research**, v. 102, p. 70–77, 2015. doi: 10.1016/j.mvr.2015.08.006.
- 53 EWERLÖF, M. et al. Estimating skin blood saturation by selecting a subset of hyperspectral imaging data. 2015. Disponível em: <<http://liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:798525/FULLTEXT01.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2015.
- 54 RAMIREZ-ANGARITA, D. P. **Avaliação da cicatrização da pele de rato wistar após múltiplas sessões de terapia fotodinâmica**. 2012. 94 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- 55 GRECCO, C. et al. Single LED-based device to perform widefield fluorescence imaging and photodynamic therapy. **SPIE of Proceedings**, v. 9531, p. 953121, 2015.
- 56 CASTRO-E-SILVA, O. et al. Autofluorescence spectroscopy in liver transplantation: preliminary results from a pilot clinical study. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 3, p. 722–725, 2008.
- 57 SABINE, V. S. et al. Validation of activated caspase-3 antibody staining as a marker of apoptosis in breast cancer. **Histopathology**, v. 60, n. 2, p. 369–371, 2012.
- 58 PELOW, P. V. et al. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 3, p. 118–148, 2012.
- 59 PAREKH, S. G. et al. Photodynamic modulation of wound healing with BPD-MA and CASP. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 24, n. 5, p. 375–381, 1999.
- 60 HENWOOD, A. Microscopic quality control of haematoxylin and eosin – know your histology. **Connection**. 2010. Disponível em: <http://www.dako.com/28829_2010_conn14_qc_of_haematoxylin_and_eosin_henwood.pdf>. Acesso em: 12 set. 2015.
- 61 KANICK, S.C. et al. Dual-channel red/blue fluorescence dosimetry with broadband reflectance spectroscopic correction measures protoporphyrin IX production during photodynamic therapy of actinic keratosis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, n. 7, p. 075002, 2014.
- 62 AMELINK, A. et al. Effect of hemoglobin extinction spectra on optical spectroscopic measurements of blood oxygen saturation. **Optics Letters**, v. 34, n. 10, p. 1525–1527, 2009.

63 CHORILLI, M. et al. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.

64 Rifkin, L. H. et al. An athymic rat model of cutaneous radiation injury designed to study human tissue-based wound therapy. **Radiation Oncology**, v. 7, n. 1, p. 68, 2012.

65 KIM, J. H. et al. Plerixafor, a CXCR4 antagonist, mitigates skin radiation-induced injury in mice. **Radiation Research**, v. 178, n. 3, p. 202–206, 2012.

66 YAMAMOTO, J. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 1813-1819, 2014.

67 LUKSIENE, Z. et al. Radiosensitization of tumours by porphyrins. **Cancer Letters**, v. 235, n. 1, p. 40–47, 2006.

68 MANOEL, C. D.; PAOLILLO, F. R.; MENEZES, P. F. C. **Conceitos fundamentais e práticos da fotoestética**. São Carlos: Compacta, 2014.

69 MIDDELBURG, T. A. et al. Monitoring blood volume and saturation using superficial fibre optic reflectance spectroscopy during PDT of actinic keratosis. **Journal of Biophotonics**, v. 4, n. 10, p. 721–730, 2011.

70 RAJARAM, N. et al. Experimental validation of the effects of microvasculature pigment packaging on in vivo diffuse reflectance spectroscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 7, p. 680–688, 2010.

71 LARSEN, E. L. P. et al. In vitro study on methemoglobin formation in erythrocytes following hexyl-aminolevulinate induced photodynamic therapy. **Proceedings of SPIE** v. 6427, 2007. doi:10.1117/12.700993.

72 LARSEN, E. L. P. et al. Monitoring of hexyl 5-aminolevulinate-induced photodynamic therapy in rat bladder cancer by optical spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, n. 4, p. 44031, 2008.

73 LAKOVIC, K. et al. Bilirubin and its oxidation products damage brain white matter. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 34, n. 11, p. 1837–1847, 2014.

74 MORIYAMA, E. H. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica utilizando imagem de bioluminescência**. 2005. 131 p. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Unibersidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2005.

75 BUZZÁ, H. H. et al. Evaluation of vascular effect of Photodynamic Therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 138, p. 1–7, 2014. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.04.023.

76 AZIMZADEH, O. et al. Integrative proteomics and targeted transcriptomics analyses in cardiac endothelial cells unravel mechanisms of long-term radiation-induced vascular dysfunction. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 2, p. 1203–1219, 2015.

77 ISABELLE, M. et al. Assessment of biophysical tumor response to PDT in pancreatic cancer using localized reflectance spectroscopy. **Proceedings of SPIE**, v. 7886, p. 78860S–1-78860S–7, 2011. doi: 10.1117/12.876147.

78 FARRELL, T. J. et al. Modeling of photosensitizer fluorescence emission and photobleaching for photodynamic therapy dosimetry. **Applied Optics**, v. 37, n. 31, p. 7168–7183, 1998.

79 JODE, M. L. et al. New LED source for photodynamic therapy: preclinical study. **Proceedings of SPIE**, v. 2629, p. 299-305, 1996. doi:10.1117/12.229531.

80 YU, C.-H. et al. Comparison of clinical outcomes of oral erythroleukoplakia treated with photodynamic therapy using either light-emitting diode or laser light. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 9, p. 628–633, 2009.

81 ZHAO, B.; HE, Y.-Y. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 10, n. 11, p. 1797–1809, 2010.

82 GRIEP, C. et al. Electron beam therapy is not inferior to superficial x-ray therapy in the treatment of skin carcinoma. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 32, n. 5, p. 1347–1350, 1995.

83 KWAN, W. et al. Radiotherapy for locally advanced basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 60, n. 2, p. 406–411, 2004.

84 ROSEN, L. R. et al. Comparison of HDR brachytherapy, orthovoltage X-ray, and electron beam radiation in the treatment of nonmelanoma skin cancers: a single institution experience of individualized radiation therapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology*Physics**, v. 87, n. 2, p. S165, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

2ª via

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 13.1.590.53.8), intitulado "Terapia Fotodinâmica combinada à radioterapia", de autoria de **Cintia Teles de Andrade e Cristina Kurachi** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus de Ribeirão Preto – USP* foi aprovado em reunião da CEUA de 02.09.2013.

Colaboradores: Vanderlei Salvador Bagnato
Juliana Pavoni Fernandes
Oswaldo Baffa Filho
Hermes Murtha Oliveira

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.590.53.8), entitled: "Terapia Fotodinâmica combinada à radioterapia", by **Cintia Teles de Andrade e Cristina Kurachi**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, September, 02 2013.

Ribeirão Preto, 15 de outubro de 2013.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Vanessa Bombonato Garcia

APÊNDICE 2

IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador são-carlense, 400 / 13565-590
Caixa Postal 369 / 13560-970
São Carlos - SP, Brasil
Fone: +55 16 3373-9758
www.ifsc.usp.br

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS – CEUA/IFSC

Protocolo nº 07/2014

A Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos – CEUA/IFSC, em reunião realizada no dia 24.06.2014, homologou o projeto de pesquisa intitulado “Terapia Fotodinâmica combinada à radioterapia”, submetido pela pesquisadora Cintia Teles de Andrade.

São Carlos, 03 de julho de 2014.

Prof. Dra. Cristina Kurachi
Presidente da CEUA/IFSC