UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

GABRIELA ARTHUZO

Estudo da angiogênese e reperfusão sanguínea pós-terapia fotodinâmica em
modelo de membrana corioalantoica

São Carlos
2018

GABRIELA ARTHUZO

Estudo da angiogênese e reperfusão sanguínea pós-terapia fotodinâmica em
modelo de membrana corioalantoica

Dissertação 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 Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2018

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.

Arthuzo, Gabriela

Estudo da angiogênese e reperfusão sanguínea pós-terapia fotodinâmica em modelo de membrana corioalantoica / Gabriela Arthuzo; orientador Vanderlei Salvador Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

66 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Angiogênese. 3. Membrana corioalantoica. I. Bagnato, Vanderlei Salvador, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato pela orientação, à Dr^a. Hilde Harb Buzzá pela ajuda ao longo do mestrado, à Dr^a. Cynthia Aparecida de Castro e à Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi pelas contribuições. Agradeço também a todos os colegas do Laboratório de Biofotônica.

Agradeço aos funcionários do IFSC, especialmente aos funcionários da biblioteca, da gráfica e da Pós-Graduação.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

ARTHUZO, G. *Estudo da angiogênese e reperfusão sanguínea pós-terapia fotodinâmica em modelo de membrana corioalantoica*. 2018. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A terapia fotodinâmica é uma técnica que utiliza uma substância fotossensibilizadora, luz de comprimento de onda adequado e oxigênio para produzir um efeito citotóxico, sendo uma alternativa aos tratamentos convencionais para o câncer. Este tratamento, quando realizado nos vasos sanguíneos, leva à destruição deles. No entanto, a recuperação dos vasos é observada algum tempo depois, o que pode ser um processo angiogênico (formação de novos vasos sanguíneos) induzido pela própria terapia. Os vasos sanguíneos fornecem oxigênio e nutrientes às células, levando ao crescimento de tecidos, inclusive tumorais. Para a investigação da angiogênese após a terapia fotodinâmica, foi utilizado o modelo de membrana corioalantoica de ovos de galinha, pois possui alta vascularização e fácil acesso aos vasos sanguíneos. A terapia fotodinâmica foi feita nos vasos da membrana com o fotossensibilizador Photogem[®], em uma concentração de 10 µg/mL, e subdoses de luz para não levar o embrião à morte. As doses de luz de 6 e 15 J/cm² foram estabelecidas para os experimentos e foi observada diminuição na densidade de vasos 3 horas após a terapia fotodinâmica, com um aumento 24 horas depois. Para a quantificação desses efeitos, uma rotina no MATLAB[®] foi elaborada para determinar a porcentagem de área ocupada pelos vasos sanguíneos nas imagens da membrana, que foram realizadas antes, a cada 30 minutos durante as primeiras 3 horas após o tratamento e 24 horas depois. Além disso, para uma análise da distribuição de grandes e pequenos vasos, o comprimento e o diâmetro de cada vaso nas imagens foram medidos com o software ImageJ[®], que permitiu verificar que os menores vasos são os mais afetados 3 horas depois da terapia, com aumento no número desses vasos após 24 horas. Como isso poderia ser um indício de um processo angiogênico após a terapia fotodinâmica, marcadores de angiogênese foram utilizados em Western Blot. Apesar de esse método molecular não ter mostrado diferença entre o grupo com terapia fotodinâmica e os grupos controle, as análises por imagem indicam a formação de novos vasos 24 horas após a terapia, com uma rede vascular diferente da que havia antes.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Angiogênese. Membrana corioalantoica.

ABSTRACT

ARTHUZO, G. *Study of angiogenesis and blood reperfusion after photodynamic therapy in chorioallantoic membrane model*. 2018. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Photodynamic therapy is a technique that uses a photosensitizing substance, light of adequate wavelength and oxygen to produce a cytotoxic effect, being an alternative to conventional treatments for cancer. This treatment, when carried out in the blood vessels, leads to their destruction. However, vessel recovery is observed some time later, which may be an angiogenic process (formation of new blood vessels) induced by the therapy itself. The blood vessels supply oxygen and nutrients to the cells, leading to tissue growth, including tumoral. For the investigation of angiogenesis after photodynamic therapy, the chorioallantoic membrane model of chicken eggs was used, because it has high vascularization and easy access to the blood vessels. Photodynamic therapy was performed on membrane vessels with the Photogem[®] photosensitizer, at a concentration of 10 µg/mL, and light subdoses to avoid leading the embryo to death. Light doses of 6 and 15 J/cm² were established for the experiments and a decrease in vessel density 3 hours after photodynamic therapy was observed, with an increase 24 hours later. For quantification of these effects, a routine in MATLAB[®] was designed to determine the percentage of area occupied by blood vessels in the membrane images, which were performed before, every 30 minutes for the first 3 hours after treatment and 24 hours later. Furthermore, for an analysis of the distribution of large and small vessels, the length and diameter of each vessel in the images were measured with the ImageJ[®] software, which allowed to verify that the smaller vessels are most affected 3 hours after the therapy, with an increase in the number of these vessels after 24 hours. Since this could be an indication of an angiogenic process after photodynamic therapy, angiogenesis markers were used in Western Blot. Although this molecular method showed no difference between the group with photodynamic therapy and the control groups, the image analysis indicates the formation of new vessels 24 hours after the therapy, with a vascular network different from before.

Keywords: Photodynamic therapy. Angiogenesis. Chorioallantoic membrane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Diagrama de Jablonski.	17
Figura 2 –	Diagrama com os dias de desenvolvimento do embrião e os respectivos procedimentos. (a) Abertura na casca do ovo e vedação com fita adesiva, procedimento realizado no EDD3. (b) A TFD foi feita entre o EDD11 e o EDD14, quando a CAM apresenta tamanho ideal de vasos sanguíneos e o embrião ainda não desenvolveu a percepção da dor.	26
Figura 3 –	Espectros de excitação e emissão do Alexa Fluor 405.	30
Figura 4 –	Imagens da CAM com o anel de Teflon [®] em sua superfície nos EDD7, 8 e 9.	35
Figura 5 –	Imagens da CAM sem o anel de Teflon [®] nos EDD7, 8 e 9. A seta escura indica o vaso que foi usado como referência nas fotografias. A seta clara indica um vaso que apareceu na imagem devido ao movimento da rede vascular.	36
Figura 6 –	Processamento da imagem da CAM com a rotina no MATLAB [®] . (a) O ajuste manual do parâmetro não identifica todos os pixels referentes aos vasos sanguíneos. (b) A melhor transformação foi obtida com outro ajuste.	37
Figura 7 –	Vaso de comprimento L e diâmetro ϕ , quadrado de lado L e paralelepípedo de lados L , L e ϕ	38
Figura 8 –	Imagens da CAM obtidas nos EDD7, 8, 9, 10 e 11 com aplicação diária de Avastin [®]	39
Figura 9 –	Imagens da CAM obtidas nos EDD7, 8, 9, 10 e 11 com aplicação diária de soro.	40
Figura 10 –	Imagens da CAM obtidas no EDD11. (a) CAM com aplicação diária de Avastin [®] , onde as setas indicam as regiões sem a presença de vasos visíveis. (b) CAM com aplicação diária de soro, apresentando uma densidade maior de pequenos vasos.	40
Figura 11 –	Gráfico do crescimento da área relativa de vasos sanguíneos ao longo dos dias de desenvolvimento embrionário do grupo que recebeu a solução de Avastin [®] e do grupo controle.	41
Figura 12 –	Vasos de diferentes calibres na imagem da CAM indicados por setas e, a direita da imagem, é mostrada a medida do diâmetro desses vasos.	42
Figura 13 –	Gráfico da quantidade de vasos para cada intervalo de comprimento e diâmetro. (a) Grupo que recebeu aplicação diária de Avastin [®] . (b) Grupo controle.	42

Figura 14 –	Imagens da CAM obtidas antes da TFD, 3 e 24 horas depois, com aplicação de 200 μL da solução de Photogem [®] e irradiância de 20 mW/cm^2	44
Figura 15 –	Imagens da CAM obtidas antes da TFD, 3 e 24 horas depois, com aplicação de 400 μL da solução de Photogem [®] e irradiância de 20 mW/cm^2	44
Figura 16 –	Imagens da CAM obtidas antes da TFD, 3 e 24 horas depois, com aplicação de 400 μL da solução de Photogem [®] e irradiância de 50 mW/cm^2	44
Figura 17 –	Gráfico do dano vascular pós-TFD com a utilização de diferentes parâmetros.	45
Figura 18 –	Gráfico da quantidade de vasos para cada intervalo de comprimento e diâmetro nas imagens do grupo C. (a) Antes da TFD. (b) 3 horas depois da TFD. (c) 24 horas depois da TFD.	49
Figura 19 –	Gráfico da área relativa de vasos dos grupos controle: só fotossensibilizador, só luz e só soro.	51
Figura 20 –	Gráfico da quantidade de vasos para cada intervalo de comprimento e diâmetro nas imagens do grupo só soro. (a) Antes da aplicação do soro. (b) 3 horas depois da aplicação. (c) 24 horas depois da aplicação.	52
Figura 21 –	Comparação entre o grupo C com os grupos controle. (a) Grupo que recebeu somente o fotossensibilizador, (b) somente luz e (c) somente soro.	54
Figura 22 –	Imagem da CAM do grupo controle. (a) e (b) representam ovos diferentes.	55
Figura 23 –	Imagem da CAM do grupo com os marcadores. (a) e (b) representam ovos diferentes.	56
Figura 24 –	Gráficos da razão VEGF/ β -actina dos grupos só soro, só luz, só fotossensibilizador e TFD, com um exemplo de Western Blot abaixo de cada gráfico. (a) 3 horas. (b) 24 horas.	57
Figura 25 –	Gráfico da razão VEGF/ β -actina dos grupos só soro e Avastin [®] , com um exemplo de Western Blot.	58

Sumário

1 Introdução	13
1.1 Doenças vasculares	13
1.2 Câncer	13
1.3 Angiogênese	14
1.4 Tratamentos convencionais para o câncer	15
1.5 Terapia Fotodinâmica	16
1.6 Modelo de membrana corioalantoica	18
1.7 Terapia Fotodinâmica e sua relação com a angiogênese e reperfusão sanguínea	19
2 Objetivos	23
3 Materiais e métodos	25
3.1 Modelo de membrana corioalantoica	25
3.2 Avastin® (bevacizumabe)	26
3.3 Terapia Fotodinâmica	27
3.4 Obtenção e análise das imagens	29
3.5 Microscopia confocal	30
3.6 Western Blot	32
3.6.1 Preparo das amostras	32
3.6.2 Quantificação proteica	33
3.6.3 Eletroforese, transferência e marcadores	33
4 Resultados e Discussão	35
4.1 Obtenção de imagens da CAM	35
4.2 Processamento das imagens	36
4.3 Resposta anti-angiogênica do Avastin® (bevacizumabe)	38
4.4 Terapia Fotodinâmica	43
4.4.1 Avaliação do dano vascular	43
4.4.2 Grupos controle	50
4.5 Análise de imagens com o uso de microscopia confocal	54
4.6 Avaliação do VEGF por Western Blot	56
5 Conclusão	61
REFERÊNCIAS	63

1 Introdução

1.1 Doenças vasculares

Existem diversas doenças que afetam os vasos sanguíneos, como insuficiência venosa crônica (varizes), trombose venosa, pé diabético, doença arterial obstrutiva periférica e aneurisma da aorta abdominal. Aproximadamente 20 a 33% das mulheres e 10 a 20% dos homens irão apresentar algum grau de insuficiência venosa crônica durante a vida. A hiperglicemia crônica leva a alterações vasculares que causam problemas nos pés do diabético, como rachaduras, micoses, feridas de difícil cicatrização e infecções, podendo levar a amputações. Entre os tratamentos para as doenças vasculares, pode-se citar a cirurgia e a ablação química para as varizes e os anticoagulantes para a trombose venosa. (1)

Há ainda as malformações vasculares e as lesões vasculares proliferativas (tumores). (2) As malformações vasculares são capilares, vasos linfáticos, venosos e arteriais malformados congenitamente. (3) Entre os tumores vasculares, pode-se citar o hemangioma, que surge da proliferação de células endoteliais. (2) O hemangioma infantil é um tumor vascular benigno que se prolifera nas primeiras semanas de vida e, em seguida, regride espontaneamente, podendo deixar cicatrizes e deformidades faciais. (4–5)

Os vasos sanguíneos estão relacionados, também, a outras doenças, como o câncer. A formação de novos vasos (angiogênese) é essencial para o crescimento de tumores sólidos e para a metástase. (6) Dessa maneira, o estudo de novas terapias que têm como objetivo a eliminação dos vasos é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

1.2 Câncer

Câncer é um conjunto de mais de cem doenças que têm, em comum, o crescimento desordenado de células. Estas células, que se dividem de forma mais acelerada que as normais, levam à formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). Elas invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Em tecidos epiteliais, o câncer é chamado carcinoma. Para o câncer em tecidos conjuntivos, o nome dado é sarcoma. Já um tumor benigno é um conjunto de células que não se espalham para outras partes do corpo, raramente sendo um risco de vida. (7)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo e é responsável por uma estimativa de 9,6 milhões de mortes em 2018. (8) No Brasil, para os anos de 2018 e 2019, 600 mil novos casos de câncer são estimados em cada ano. (9)

Aproximadamente um terço das mortes provocadas pelo câncer é devido aos seguintes riscos comportamentais e alimentares: índice de massa corporal alto, baixo consumo de frutas e vegetais, falta de atividade física, uso de tabaco e álcool. O tabaco, por exemplo, é responsável por cerca de 22% das mortes por câncer, sendo o fator de risco mais importante. (8)

O crescimento de um tumor requer a presença de vasos sanguíneos, que fornecem nutrientes e oxigênio. O tumor secreta substâncias que estimulam a angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos. Esses vasos apresentam anormalidades estruturais e funcionais. Eles são irregulares em tamanho, formato e padrão de ramificação, além de não estarem organizados em arteríolas, capilares e vênulas. A vascularização do tumor varia, sendo maior nas regiões de crescimento e ausente nas regiões de necrose. As células endoteliais do tumor proliferam 50–200 vezes mais rápido do que células endoteliais normais. (10–11)

1.3 Angiogênese

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos pré-existentes. Este processo está relacionado a fenômenos fisiológicos como desenvolvimento de órgãos embrionários, reparo de tecidos e cicatrização de feridas. Porém a angiogênese está envolvida com doenças como artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica e aterosclerose. (12) O crescimento e invasão de tumores também dependem deste processo. Assim, a sua quantificação é importante para monitorar a progressão de tumores e estimar o potencial maligno deles, além de ser útil para o estudo de outros processos patológicos relacionados à angiogênese. (6)

As etapas envolvidas na angiogênese são a migração das células endoteliais, proliferação das células endoteliais em túbulos vasculares e separação dos novos vasos sanguíneos formados que se tornam interconectados ao sistema circulatório. Os fatores de crescimento VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*) e bFGF (do inglês, *basic fibroblast growth factor*) estão associados com a proliferação, migração, formação do tubo vascular e prevenção da apoptose da célula endotelial. (12)

As células tumorais estimulam a formação de novos vasos sanguíneos para o fornecimento de oxigênio e nutrientes, o que leva ao crescimento tumoral e à metástase. (13) A angiogênese é resultante da liberação pelas células tumorais de proteínas como o VEGF, bFGF e ciclo-oxigenase 2 (COX-2). (14) A hipóxia, uma redução no nível normal de oxigenação dos tecidos, ocorre nos tumores, pois seus vasos sanguíneos são anômalos, apresentando um fluxo sanguíneo insatisfatório, (15) e a proliferação das células tumorais pode ultrapassar o desenvolvimento de novos vasos. (16) A hipóxia aumenta a expressão de vários genes angiogênicos, incluindo o VEGF, o que provoca uma expansão da rede vascular. (17)

O VEGF é um importante regulador da angiogênese, que estimula a formação e ramificação de novos vasos sanguíneos, promove rápido crescimento tumoral e facilita a metástase. (18) Entretanto, há outras moléculas na família do VEGF. O VEGF é também chamado de VEGF-A e está relacionado à angiogênese fisiológica e tumoral. O VEGF-B está associado à vasculogênese e ativação de enzimas nas células endoteliais. O VEGF-C participa dos processos de linfangiogênese e angiogênese tumoral. O VEGF-D estimula a angiogênese. O VEGF-E está relacionado à mitose da célula endotelial e também à angiogênese. Há também os receptores de VEGF (VEGFR): VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Esses receptores são expressos em células endoteliais e em algumas células neoplásicas. (16)

As substâncias anti-angiogênicas atuam sobre as moléculas mediadoras da angiogênese. O anticorpo monoclonal anti-VEGF bevacizumabe (Avastin[®]) impede que o VEGF-A se ligue aos receptores. Há outros inibidores como ramucirumab, sunitinib, sorafenib e axitinib. (19)

1.4 Tratamentos convencionais para o câncer

Entre as terapias convencionais para o câncer estão a quimioterapia, a radioterapia e a remoção cirúrgica do tumor. Estes tratamentos, apesar de serem eficientes, possuem efeitos colaterais e desvantagens.

A radioterapia emprega radiação ionizante para eliminar células tumorais. A radiação interage com o DNA nuclear, causando a morte celular ou a incapacidade de reprodução. Um dos efeitos da radiação é a clivagem da molécula de DNA, o que interfere na sua duplicação. Outro efeito é a dissociação da molécula de água em H^+ e OH^- , que também interfere na duplicação do DNA, pois o OH^- reage com as bases do DNA. Como durante a mitose há a duplicação do DNA, as células mais afetadas são as que apresentam elevada atividade

mitótica. A radioterapia, portanto, pode também atingir células normais com altas taxas de proliferação, levando a várias reações adversas. No tratamento de câncer de cabeça e pescoço, por exemplo, os pacientes recebem altas doses de radiação em locais como a cavidade bucal, maxila, mandíbula e glândulas salivares. Neste caso, podem aparecer complicações como a mucosite, candidose, disgeusia, cárie por radiação, osteorradionecrose, necrose do tecido mole e xerostomia. (20)

A quimioterapia consiste no uso de medicamentos que inibem a síntese de DNA, afetando células que apresentam altas taxas de proliferação. Dessa maneira, o tratamento atinge as células tumorais e, também, as células normais que se multiplicam rapidamente, como as da medula óssea, da mucosa intestinal e dos folículos pilosos. (21) Entre os problemas que os quimioterápicos podem causar no sistema digestivo estão náuseas, vômitos, mucosite e estomatite. (22)

A remoção cirúrgica do tumor pode levar a prejuízos estéticos e, conseqüentemente, problemas emocionais no paciente. No Brasil, o tipo de câncer mais comum é o de pele, representando 30% dos tumores malignos registrados, e a cirurgia é o tratamento mais indicado. (23) As cicatrizes deixadas pela cirurgia no tratamento de câncer de pele podem afetar a autoestima do paciente, principalmente se estiverem localizadas na região facial. (24)

1.5 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa aos tratamentos convencionais para o câncer, pois possui um efeito mais localizado e menos reações adversas. (25) A TFD é uma técnica que envolve o uso de uma substância fotossensibilizadora, luz de comprimento de onda adequado e oxigênio para produzir um efeito citotóxico. (26) Existem diferentes mecanismos para a destruição do tumor com o uso da TFD. As células tumorais podem ser atingidas diretamente, sofrendo necrose ou apoptose. Outra maneira é atingindo os vasos sanguíneos ao redor do tumor, que são responsáveis por sua nutrição. (27)

O fotossensibilizador, ao absorver a energia da luz, vai do estado eletrônico fundamental (estado singlete S_0) para um estado singlete excitado. A molécula pode voltar para o estado S_0 pela emissão de energia na forma de fluorescência ou conversão interna (dissipação de calor). Outra possibilidade é o cruzamento intersistema, no qual o fotossensibilizador, que está no estado singlete excitado, passa para o primeiro estado tripleto excitado (T_1). O fotossensibilizador nesse estado pode retornar para o estado S_0 pela emissão

de fosforescência. (28) O diagrama de Jablonski na Figura 1 ilustra os níveis de energia eletrônica e os processos que podem ocorrer.

Figura 1 – Diagrama de Jablonski.
Fonte: Elaborada pela autora.

Com o fotossensibilizador no estado tripleto, dois mecanismos de reação podem acontecer. Na reação do tipo I, há transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado T₁ e outras moléculas, produzindo substâncias nocivas para as células, e o fotossensibilizador retorna para o estado S₀. Na reação do tipo II ocorre transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto T₁ para a molécula de oxigênio no estado tripleto. Essa reação produz o primeiro estado singleto excitado do oxigênio, que é altamente citotóxico, e o fotossensibilizador volta para o estado S₀. O oxigênio singleto é considerado o principal mediador do dano celular provocado pela TFD. Os dois tipos de reação causam oxidação de biomoléculas nas células e podem ocorrer simultaneamente. (28–29)

As quatro classes principais de fotossensibilizadores são: derivados de porfirina, clorinas, ftalocianinas e porfírenos. Um fotossensibilizador ideal deve apresentar pureza química, estabilidade química e física, seletividade para células tumorais, intervalo de tempo curto entre a administração e a acumulação máxima nos tecidos tumorais, ativação com luz de comprimento de onda adequado para a penetração no tecido e rápida remoção do organismo. (30)

O fotossensibilizador requer um comprimento de onda adequado de luz para ser ativado, que corresponde aos picos de absorção da molécula. A escolha do fotossensibilizador precisa levar em consideração o tipo de lesão a ser tratada, já que a luz interage com o tecido biológico de acordo com seu comprimento de onda. A luz vermelha, por exemplo, penetra o tecido em 5 mm ou mais, permitindo o tratamento de tumores volumosos. Já as lesões superficiais podem ser tratadas com luz azul, com a penetração do tecido sendo mínima. A luz verde penetra menos que a luz vermelha, o que é adequado para lesões que não requerem muita profundidade de iluminação. (31)

A dose de droga, dose de luz e intervalo de tempo entre a aplicação da droga e a iluminação são parâmetros importantes dos fotossensibilizadores. O mesmo fotossensibilizador age de forma completamente diferente quando essas variáveis são alteradas. Os intervalos de tempo entre a aplicação da droga e a iluminação, por exemplo, serão mais curtos ou mais longos dependendo do caso clínico. Essa diferença é devida à localização do fotossensibilizador, que varia com o tempo. Logo após a sua aplicação, o fotossensibilizador estará presente principalmente no sistema vascular. Com o passar do tempo, ele se acumula em tecidos e, portanto, sua concentração no sangue diminui. Assim um curto intervalo de tempo favorece a destruição vascular, podendo ser um tratamento para doenças relacionadas à neovascularização. Já um intervalo de tempo prolongado favorece a destruição do tumor. (31)

O fotossensibilizador **TOOKAD®**, por exemplo, é utilizado para danificar a rede vascular do tumor em tratamento de câncer de próstata. A aplicação é intravenosa e o fotossensibilizador circula sistemicamente enquanto apenas a área alvo é iluminada. A vascularização do tumor é atingida com este tratamento, o que leva ao bloqueio do suprimento de sangue e nutrientes e, conseqüentemente, leva à necrose tumoral. (32)

1.6 Modelo de membrana corioalantoica

A membrana corioalantoica (CAM, do inglês, *chorioallantoic membrane*) é formada pela fusão do cório com o alantoide em ovos de galinha. Nesta membrana, uma rede vascular se desenvolve e atua como o órgão respiratório do embrião até o momento de sair do ovo. (33) O crescimento da CAM ocorre do dia de desenvolvimento embrionário 3 e é completado no dia 10. (34) Devido à sua alta vascularização e fácil acesso aos vasos sanguíneos, a CAM é um modelo adequado para estudar os efeitos vasculares da TFD e de outras terapias. Este modelo permite a observação direta dos efeitos vasculares, com a visualização dos vasos sanguíneos antes, durante e depois da terapia. A CAM pode ser também usada para estudar processos biológicos relacionados com alta atividade angiogênica. (35) Experimentos com **Avastin®**, por exemplo, revelaram que esta droga inibe fortemente a angiogênese na CAM quando aplicada topicamente no 7º e 8º dia de desenvolvimento do embrião. (36) O modelo permite a entrega da substância estudada de forma tópica ou intravenosa. (37)

As principais vantagens do uso da CAM em pesquisas científicas são o seu baixo custo, a reprodutibilidade e a confiabilidade. O sistema imune do embrião de galinha só começa a se desenvolver em 2 semanas e no dia 18 os embriões se tornam imunocompetentes.

Portanto ele pode receber vários tecidos de diferentes espécies sem sofrer uma resposta imune durante o período em que é imunodeficiente. Outra vantagem é a rápida vascularização da CAM, desenvolvimento de células tumorais ou amostras biológicas colocadas na sua superfície. (38) O uso de anestésicos não é necessário, pois os experimentos são realizados antes do embrião desenvolver a percepção da dor e, por isso, este modelo é considerado em muitos países um método alternativo ao uso de animais. (39)

Entretanto, como a CAM possui um sistema vascular bem desenvolvido, a vasodilatação devida à sua manipulação é difícil de ser distinguida dos efeitos da substância testada. Outra desvantagem é o aparecimento de reações inflamatórias não específicas, que pode ser evitado se os experimentos forem feitos no início do desenvolvimento do embrião, quando seu sistema imune é mais imaturo. (40)

Pesquisas mostram que a TFD, quando realizada nos vasos sanguíneos, induz danos reversíveis ou permanentes. Porém, após algum tempo, é observada a recuperação dos vasos, que talvez seja causada por um processo angiogênico induzido pela própria TFD. A formação de novos vasos sanguíneos é um efeito indesejado no tratamento de tumores, pois o fornecimento de nutrientes e oxigênio para o tumor aumenta, levando ao seu crescimento. O entendimento dos mecanismos da angiogênese induzida pela TFD ajudará a melhorá-la pela combinação com inibidores de angiogênese. (36–37,41–42)

1.7 Terapia Fotodinâmica e sua relação com a angiogênese e perfusão sanguínea

Há diversos trabalhos que utilizam o modelo de CAM para estudar a TFD e seus efeitos vasculares. Vários estudos relatam o dano vascular causado nos vasos sanguíneos da CAM após a TFD e o tempo para esses vasos recuperarem. A recuperação pode ser por perfusão ou formação de novos vasos. A perfusão é a restauração do fluxo sanguíneo após um período de interrupção no fornecimento de sangue (isquemia). (43)

Um estudo mostrou que, na área tratada pela TFD, a obstrução vascular na CAM foi observada 24 horas após o tratamento. No entanto, 48 horas após a TFD, os vasos que tinham sido reduzidos recuperaram o tamanho original e os vasos que estavam obstruídos sofreram perfusão. Além disso, a formação de novos vasos foi observada. Para a TFD, foram utilizados os fotossensibilizadores m-THPP e BPD-MA. As doses de luz usadas na CAM foram 15, 25 ou 30 J/cm² 1 minuto após a aplicação intravenosa do fotossensibilizador. As

análises foram feitas por angiografias de fluorescência e foi utilizada uma escala de dano (de 0 a 5) para a avaliação do efeito da TFD. (44)

Já outros estudos mostram que, imediatamente após a TFD, o tratamento resultou em impedimento do fluxo sanguíneo e, 24 horas após, observa-se o recrescimento vascular, que é completado 48 horas depois da terapia. (37,41) A TFD foi realizada na CAM com o fotossensibilizador Visudyne[®], com aplicação intravenosa, e dose de luz de 20 J/cm² 1 minuto após a aplicação. A evidência para a formação de novos vasos sanguíneos na CAM após a TFD foi obtida pelo uso do inibidor de angiogênese Avastin[®]. A combinação do tratamento com Avastin[®] 24 horas depois da TFD resulta em uma inibição considerável do recrescimento da rede vascular 48 horas após a terapia quando comparado às observações sem Avastin[®]. Portanto, a resposta do tratamento farmacológico com Avastin[®] sugere que a angiogênese ocorre depois da TFD. (37) Em outro estudo, a TFD foi realizada com os mesmos parâmetros e foi combinada também com a administração tópica dos seguintes inibidores de angiogênese: Avastin[®] (bevacizumabe), Nexavar[®] (sorafenib), Tarceva[®] (erlotinib) e Sutent[®] (sunitinib). Os inibidores aplicados topicamente imediatamente depois da TFD resultaram em um prolongamento da obstrução vascular induzida pela terapia. (41)

A combinação da TFD com Lucentis[®] (ranibizumab), uma substância anti-VEGF, também foi estudada. Os vasos menores da CAM foram obstruídos 24 horas após a TFD, porém ocorreu reperfusão e formação de novos vasos 48 horas depois do tratamento. Ambos os processos podem ser atrasados pela aplicação de Lucentis[®]. Na terapia combinada, a obstrução dos vasos sanguíneos pode ser estendida para 72 horas neste modelo comparado com 24 horas no caso da TFD sem Lucentis[®]. Assim, foi demonstrado que o melhor tempo para administrar Lucentis[®] é 24 horas após a TFD. Portanto o VEGF induzido pela TFD atinge um alto nível e seu efeito pode ser inibido pela adição de Lucentis[®], diminuindo eficientemente a angiogênese e a ocorrência de novos vasos. (42)

A angiogênese em CAM após a TFD também foi demonstrada com o uso de marcadores. A coloração imunohistoquímica do marcador de proliferação Ki-67 foi feita, assim como a detecção do $\alpha V\beta 3$ -integrin como um marcador de vasos sanguíneos imaturos e angiogênicos. O Ki-67 foi expresso na rede vascular 48 horas após a TFD na CAM. Este resultado implica que a nova vascularização é formada pela angiogênese, requerendo a proliferação de células endoteliais. Além disso, foi encontrada a expressão do marcador de angiogênese $\alpha V\beta 3$ -integrin nos vasos onde foi feita a TFD após 48 horas, mas não nas áreas controles não tratadas. A visualização imunohistoquímica da angiogênese 48 horas depois da TFD foi feita também com a coloração dos marcadores de angiogênese galectin-1 e vimentin,

onde o tecido tratado pela TFD teve uma coloração maior quando comparado ao tecido normal. Estes resultados demonstraram que a nova estrutura vascular é formada por angiogênese e reperfusão de vasos existentes. Após a aplicação da TFD, novos vasos são formados para substituir a rede de capilares original, um processo que é completado em 48 horas. (37)

Outro trabalho realizou a análise por PCR e mostrou que, 24 horas depois, a TFD induziu a expressão dos marcadores de angiogênese endotelial galectin-1 e integrin β -3, e também do neuropillin e dos receptores de VEGF. (41)

Por outro lado, há também trabalhos que indicam que não ocorre angiogênese após a TFD. Neste caso, o experimento também foi feito em CAM e na TFD foi utilizado o fotossensibilizador Photogem[®]. Os vasos periféricos se tornaram mais visíveis 5 horas após a TFD, pois ocorreu uma dilatação dos vasos nessa região. O curto tempo para a observação do fato indica que não ocorreu angiogênese. A TFD induziu uma constrição nos vasos mais espessos e, portanto, o fluxo sanguíneo foi redirecionado para outros vasos, que anteriormente não estavam ativos. (45)

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de referências bibliográficas, o modelo, o fotossensibilizador e a dose de luz usada, com a conclusão do trabalho em relação ao efeito após a TFD nos vasos sanguíneos.

Tabela 1 – Efeito após a TFD relatado por diferentes autores.

referência	modelo	fotossensibilizador	dose de luz (J/cm ²)	conclusão
44	CAM	m-THPP e BPD-MA	15, 25 ou 30	angiogênese + reperfusão
37	CAM	Visudyne [®]	20	angiogênese + reperfusão
42	CAM	Visudyne [®]	20	angiogênese + reperfusão
41	CAM	Visudyne [®]	20	angiogênese
45	CAM	Photogem [®]	30	reperfusão
46	rato	Photofrin [®]	150	reperfusão
47	rato	Photofrin [®]	75–180	reperfusão
48	rato	Visudyne [®]	25	reperfusão

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto o estudo dos efeitos vasculares da TFD é importante para a investigação do processo angiogênico que a própria terapia pode causar. No tratamento de câncer e de doenças vasculares, esses efeitos devem ser levados em consideração, pois a formação de novos vasos ou a reperfusão sanguínea pode tornar a terapia ineficiente.

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a angiogênese e a reperfusão sanguínea após a Terapia Fotodinâmica usando o modelo de membrana corioalantoica.

Objetivos específicos

- Avaliação do efeito vascular da TFD, com a utilização de diferentes quantidades de Photogem[®] e diferentes doses de luz, analisando a imagem da rede vascular;
- Análise do potencial angiogênico da TFD, com o uso de marcadores de VEGF.

3 Materiais e métodos

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos sob o protocolo número 5847010817.

3.1 Modelo de membrana corioalantoica

Os ovos fertilizados foram doados pela empresa Ad'oro SA (São Carlos, SP), chegando ao laboratório no primeiro dia de desenvolvimento do embrião (EDD1, do inglês, *embryo development day*). Eles foram limpos com álcool 70% e permaneceram em uma estufa a 37°C. Do EDD1 ao EDD3, os ovos foram colocados em um suporte com rotação automática, cujo movimento de rotação lenta (meio ciclo a cada 30 minutos) evita que o embrião e a própria membrana corioalantoica se fixem à casca.

No ovo, a CAM se une à membrana interna da casca entre os EDD4 e EDD5 e, portanto, após esse período, a ruptura da casca leva também à ruptura da CAM. (34) Por isso, a abertura dos ovos fertilizados para a realização de experimentos deve ser feita no EDD3, quando a casca do ovo foi limpa com álcool 70% novamente e um orifício foi feito na extremidade mais fina do ovo com a ponta de uma tesoura. A partir desse orifício, a casca do ovo foi retirada com pinças limpas com álcool 70% para a formação de uma abertura de cerca de 2 cm². Aproximadamente 3 mL de clara foi retirada com uma agulha e seringa para a obtenção de uma câmara de ar formada entre a casca e o conteúdo do ovo. Então a abertura foi coberta com fita adesiva para evitar desidratação e infecções. Após este período, quando a abertura já foi feita, os ovos permaneceram imóveis dentro da estufa até serem usados. A partir do EDD6, pode-se verificar a viabilidade dos embriões, observando a cor através da fita adesiva. Os ovos que apresentavam uma cor amarelada eram abertos dentro do fluxo para a confirmação da inviabilidade. Se o embrião estivesse morto, o ovo era congelado para descarte.

Para minimizar os riscos de contaminação, todas as manipulações feitas com a região interna do ovo exposta ao ambiente externo foram realizadas dentro de um fluxo laminar, com a utilização de instrumentos desinfetados. Os ovos permaneceram fora da estufa apenas o tempo mínimo necessário para a realização dos procedimentos, para evitar a mudança de temperatura do embrião. Os experimentos com formulações anti-angiogênicas ou TFD foram realizados até o EDD14, período no qual ainda não há desenvolvimento de receptores de dor

pelo embrião. Portanto não era preciso o uso de anestésicos ou analgésicos para realização de qualquer procedimento. (39) Para o descarte após o experimento, os ovos eram colocados no freezer até a coleta semanal para serem encaminhados à incineração.

A Figura 2 apresenta um diagrama dos dias de desenvolvimento do embrião e os respectivos procedimentos. A Figura 2-a mostra o ovo com a abertura coberta com a fita adesiva. Na Figura 2-b é mostrado um exemplo de membrana com os vasos sanguíneos em tamanho adequado para os experimentos com TFD, que é atingido a partir do EDD11. O desenvolvimento completo do embrião ocorre no EDD21.

dias de desenvolvimento do embrião

Figura 2 – Diagrama com os dias de desenvolvimento do embrião e os respectivos procedimentos. (a) Abertura na casca do ovo e vedação com fita adesiva, procedimento realizado no EDD3. (b) A TFD foi feita entre o EDD11 e o EDD14, quando a CAM apresenta tamanho ideal de vasos sanguíneos e o embrião ainda não desenvolveu a percepção da dor.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Avastin[®] (bevacizumabe)

Os experimentos com Avastin[®] (Genentech, South San Francisco, EUA) tiveram início a partir do EDD7, para que fosse usado como controle positivo de inibição de angiogênese. A aplicação tópica de soluções em CAM pode ser feita dentro da área delimitada por um anel de Teflon[®] colocado na superfície da membrana e, por isso, os experimentos foram realizados com e sem anel. Para que o efeito anti-angiogênico da substância fosse avaliado, o Avastin[®] foi diluído em soro fisiológico e as concentrações testadas foram 1 mg/mL e 10 mg/mL. A quantidade de aplicações foi variada entre os EDD7 e EDD11 e o volume da solução de Avastin[®] em cada aplicação foi variado entre 20 e 100 µL. A Tabela 2

resume todas as variações feitas em relação à concentração usada, volume aplicado topicamente, dias de aplicação e presença ou ausência de anel.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados nos testes com Avastin®.

concentração da solução de Avastin®	volume da solução de Avastin® (em cada aplicação)	EDD em que foram feitas as aplicações	anel
10 mg/mL	30 µL	7	sim
	20 µL	7	
	20 µL	7, 8 e 9	
	20 µL	8	
	20 µL	8, 9 e 10	
1 mg/mL	30 µL	7	
	20 µL	7	
	20 µL	7 e 8	
	20 µL	7, 8 e 9	
	40 µL	8	
	20 µL	8	
	20 µL	8 e 9	
10 mg/mL	20 µL	8, 9 e 10	não
	20 µL	8, 9 e 10	
1 mg/mL	100 µL	7, 8, 9 e 10	
	30 µL	7, 8, 9, 10 e 11	
	30 µL	8, 9 e 10	
	30 µL	8, 9, 10 e 11	
	20 µL	8, 9 e 10	
	30 µL	9, 10 e 11	
	30 µL	10 e 11	
	30 µL	11	

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Terapia Fotodinâmica

O fotossensibilizador escolhido foi o Photogem® (Photogem LLC Company, Moscow, Russia). A concentração da solução de Photogem® foi de 10 µg/mL diluído em soro fisiológico, com aplicação tópica e tempo de incubação de 40 minutos. Após a incubação, a membrana foi lavada com soro fisiológico para retirada do fotossensibilizador excedente, que não entrou no vaso sanguíneo e permaneceu sobre a membrana. Na lavagem, um volume de 500 µL de soro foi colocado sobre a CAM e retirado em seguida, repetindo-se o procedimento por 4 vezes. Logo após a lavagem, a membrana foi iluminada com o equipamento Lince (MMOptics, São Carlos, Brasil), que possui um conjunto de LEDs com emissão em 635 nm.

Alguns testes foram feitos com o anel sobre a membrana e um volume de 100 μL da solução de Photogem[®] foi colocado na região interna ao anel. Neste caso, as irradiâncias testadas foram de 50 e 75 mW/cm^2 , com tempos de iluminação de 2, 3, 4 ou 5 minutos. As doses totais de luz foram variadas entre 6 e 22,5 J/cm^2 na TFD. Os grupos controle foram: só fotossensibilizador (100 μL da solução de Photogem[®]), só luz (22,5 J/cm^2) e só soro (100 μL), sempre testados com as maiores doses para a verificação do efeito.

Nos experimentos sem anel sobre a membrana, os parâmetros da TFD foram variados em relação ao volume da solução de Photogem[®] aplicado (200 e 400 μL) para verificar o efeito da variação da disponibilidade de moléculas. A irradiância foi variada em 20 e 50 mW/cm^2 , e o tempo de iluminação foi fixado em 5 minutos, totalizando doses de 6 e 15 J/cm^2 , respectivamente. Os grupos controle testados foram: somente fotossensibilizador (200 e 400 μL), somente luz (6 e 15 J/cm^2) e somente soro fisiológico (400 μL). A Tabela 3 apresenta a variação dos parâmetros nestes testes em cada grupo (TFD ou controle) em relação ao volume aplicado, irradiância, tempo de iluminação, dose total de luz e presença ou ausência de anel.

Tabela 3 – Parâmetros utilizados nos testes com TFD.

grupo	volume de Photogem [®] (μL)	irradiância (mW/cm^2)	tempo de iluminação (minutos)	dose total de luz (J/cm^2)	anel
TFD	100	75	5	22,5	sim
TFD	100	50	5	15	
TFD	100	50	4	12	
TFD	100	50	3	9	
TFD	100	50	2	6	
só fotossensibilizador	100	-	-	-	
só luz	-	75	5	22,5	
só soro (100 μL)	-	-	-	-	não
TFD	400	50	5	15	
TFD	400	20	5	6	
TFD	200	20	5	6	
só fotossensibilizador	400	-	-	-	
só fotossensibilizador	200	-	-	-	
só luz	-	50	5	15	
só luz	-	20	5	6	
só soro (400 μL)	-	-	-	-	

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Obtenção e análise das imagens

As imagens da CAM foram obtidas com uma câmera de aumento de até 400 vezes (Digital Microscope, China) posicionada acima do ovo e, portanto, elas puderam ser feitas sem a retirada da membrana e com o embrião vivo, seguindo o desenvolvimento dos vasos tanto quanto necessário. Nos experimentos com TFD, as imagens da membrana foram feitas antes do procedimento, imediatamente após, a cada 30 minutos durante as primeiras 3 horas e no dia seguinte (24 horas após a TFD). Nos experimentos com Avastin[®], a CAM foi fotografada diariamente após a primeira aplicação do fármaco. Na aquisição de cada imagem, sempre foi feita uma comparação com a primeira imagem do mesmo ovo, de maneira que a mesma região da CAM fosse fotografada.

A análise quantitativa foi feita com uma rotina no MATLAB[®] (MATrix LABoratory, MathWorks, EUA) que calcula a porcentagem de área ocupada pelos vasos a partir da quantidade de vermelho, verde e azul presente em cada imagem. Como o sangue absorve na região espectral de 500-600 nm, o canal verde das imagens foi utilizado para permitir a detecção automática dos vasos. Para isso, foi realizada uma convolução da matriz de canal verde de 8 bits com uma máscara de disco com 30 pixels de raio. Este processo basicamente gerava uma imagem onde o valor de cada pixel era a média de todos os pixels dentro de um disco em um determinado raio dado.

Como os vasos sanguíneos têm valores verdes menores nas imagens, a imagem gerada tenderia a ter valores mais altos no canal verde do que o original na região dos vasos e menor que o original na região fora dos vasos. O raio podia ser ajustado manualmente de acordo com cada imagem para garantir a melhor leitura e melhor ajuste dos vasos. Uma matriz binária foi determinada e, para ser produzida com alta correlação com os vasos, esta matriz foi calculada como sendo a imagem original multiplicada por uma constante α , determinada empiricamente como sendo 1,05. Finalmente, uma região de interesse (ROI) pode ser selecionada manualmente para cada imagem (no caso do anel, dentro do anel) e a razão entre a área dos vasos e a área total (calculada a partir da imagem binária) dentro desta ROI foi calculada. Portanto a razão forneceu a porcentagem de área que os vasos sanguíneos ocupavam. Como cada ovo possui uma rede vascular distinta, todos os dados de um mesmo ovo foram normalizados em relação ao valor correspondente à primeira imagem de cada CAM, feita antes do experimento.

Em outro tipo de análise, o software ImageJ[®] (National Institutes of Health) foi usado para medir o comprimento e diâmetro dos vasos nas imagens. Os vasos foram, então,

agrupados em determinados intervalos de comprimento e diâmetro para que fossem contados, o que permitiu a análise da distribuição de grandes e pequenos vasos. Esta análise foi realizada para um grupo que recebeu Avastin[®] e um grupo controle com soro, além de um grupo com TFD nas imagens antes, 3 e 24 horas depois.

3.5 Microscopia confocal

As imagens de fluorescência confocal foram obtidas com o microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido). O marcador específico de angiogênese (marcador primário) utilizado foi o anticorpo policlonal VEGF (PA5-16754, Thermo Fisher Scientific) e o marcador secundário foi o Alexa Fluor 405 (A-31556, Thermo Fisher Scientific). Nos experimentos com microscopia confocal, a membrana precisava ser retirada para análise no microscópio, o que impossibilitava um acompanhamento diário do mesmo ovo.

As informações sobre os espectros de excitação e emissão do Alexa Fluor 405 foram fornecidas pelo fabricante na especificação do produto. Segundo esses dados, o comprimento de onda para o qual a excitação do marcador secundário é máxima é 401 nm. No entanto, o comprimento de onda mais próximo obtido no microscópio confocal é 405 nm. O espectro de excitação do marcador mostra que ele pode ser excitado nesse comprimento de onda. A sua fluorescência tem um máximo de emissão em 421 nm (azul). A Figura 3 mostra os espectros de excitação e emissão do Alexa Fluor 405.

Figura 3 – Espectros de excitação e emissão do Alexa Fluor 405.

Fonte: Adaptada de THERMO FISHER SCIENTIFIC. (49)

A solução estoque do anticorpo policlonal VEGF possuía uma concentração de 0,2 mg/mL e o Alexa Fluor 405 de 2 mg/mL. A diluição dos dois marcadores foi feita em PBS (tampão fosfato-salino) com BSA (albumina sérica bovina) 2%. O marcador primário teve as concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$ testadas, com aplicação tópica sobre a membrana. A quantidade de aplicações foi variada, podendo ser aplicado apenas uma vez, duas vezes separadas de 24 horas ou três vezes separadas de 24 horas. O tempo de incubação da última aplicação foi fixado em 2 horas. Após a incubação, a membrana foi lavada com soro fisiológico para retirar o excesso de marcador, que não se ligou ao VEGF, da mesma maneira descrita na subseção 3.3.

Em seguida, o marcador secundário foi aplicado topicamente, com concentrações de 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$. O marcador secundário sempre teve uma única aplicação, com variação do tempo de incubação em 1 hora ou 3 horas. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente com soro fisiológico e, logo depois, foi removida para análise.

Para a sua remoção, a membrana foi puxada com uma pinça e cortada com uma tesoura. O pedaço cortado foi colocado em soro fisiológico para mais uma lavagem e retirada do sangue, onde a membrana foi também esticada com o auxílio da pinça para não haver dobras que atrapalhassem a análise da imagem. Ela foi colocada sobre uma lâmina e levada imediatamente ao microscópio confocal.

Os marcadores foram aplicados de maneira que todas as análises no microscópio fossem feitas no EDD12. No grupo controle, os marcadores não foram aplicados. A Tabela 4 apresenta a variação dos parâmetros utilizados com os marcadores primário e secundário, relacionados à concentração, ao volume aplicado e ao tempo de incubação de ambos e à quantidade de aplicações do marcador primário.

Tabela 4 – Parâmetros utilizados nos experimentos de microscopia confocal.

marcador primário				marcador secundário		
concentração (µg/mL)	volume (em cada aplicação) (µL)	quantidade de aplicações	tempo de incubação da última aplicação (horas)	concentração (µg/mL)	volume (µL)	tempo de incubação (horas)
2	100	1	2	2	100	1
4	200	1	2	10	300	3
2	100	2 (separadas de 24 h)	2	2	100	1
2	100	3 (separadas de 24 h)	2	10	200	3

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Western Blot

A quantificação do VEGF em CAM foi realizada por meio de Western Blot, no qual a análise foi feita em um grupo que recebeu a TFD e também nos grupos controle que receberam somente soro fisiológico, somente fotossensibilizador e somente luz. Esses grupos tiveram suas membranas retiradas 3 ou 24 horas após o procedimento. Para isso foram utilizados 12 ovos por grupo em cada tempo de análise e as membranas foram sempre retiradas no EDD12.

Um grupo que recebeu Avastin® e um grupo controle que recebeu somente soro foram analisados em um único tempo (EDD11), correspondente a 24 horas após a última aplicação da solução. Neste caso também foram utilizados 12 ovos por grupo.

Em cada ovo, foi removida a máxima quantidade de membrana possível na região submetida aos procedimentos. As membranas retiradas foram guardadas a -80°C até serem preparadas.

3.6.1 Preparo das amostras

Para a extração das proteínas, as membranas de 2 ovos de um mesmo grupo (6 amostras para cada tempo) foram processadas para obter o extrato proteico total, utilizando 425,5 µL de tampão de extração de proteína (Triton 0,5%, Tris 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,1 mM e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 0,2 mM), adicionado de 72 µL de inibidores de protease (Complete-Mini Roche® 1x) e 2,5 µL de

PMSF. As amostras foram então homogeneizadas em aparelho FastPrep (FastPrep[®]-24 Classic Instrument) durante 3 ciclos de 10 segundos de agitação por 1 minuto de repouso em gelo. Este homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 8000 g e 4°C para a retirada do material precipitado. O sobrenadante de cada amostra foi congelado e estocado a -80°C e a integridade da proteína foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.

3.6.2 Quantificação proteica

A concentração de proteína de cada amostra foi calculada para que em cada poço do gel fosse colocada a mesma quantidade de proteínas totais. O método de Lowry (50) foi utilizado para a quantificação e, para isso, foi feita uma curva padrão com a medida da absorbância de soluções de BSA com diferentes concentrações.

No preparo da solução final, em cada tubo foi colocado um volume total de 200 µL da solução de BSA, 1 mL de solução de tartarato e, após uma incubação de 15 minutos, foi colocado 100 µL de Folin (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma-Aldrich). Os tubos foram agitados no vórtex e, após 30 minutos, a absorbância foi medida em 650 nm para ser relacionada com a concentração de proteínas da solução (valor conhecido). Dessa maneira, foi obtida a equação que fornece a concentração de proteínas em função do valor da absorbância.

Para a determinação da concentração de proteína de cada amostra, as soluções foram preparadas da mesma maneira descrita anteriormente, com exceção da solução de BSA, que foi substituída por 10 µL da amostra e 190 µL de água Milli-Q. A absorbância das soluções também foi medida em 650 nm, o que possibilitou calcular a concentração com a equação encontrada.

3.6.3 Eletroforese, transferência e marcadores

Os extratos brutos proteicos referentes a cada experimento foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 12% e tampão Tris-glicina, utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Bio-Rad).

Como a concentração de proteínas totais de cada amostra foi determinada pelo método descrito na subseção 3.6.2, as amostras puderam ser diluídas para que todas tivessem a mesma concentração de proteínas. No preparo de 100 µL da solução que foi colocada no poço do gel, utilizou-se 20 µL de solução de β-Mercaptoetanol (5%) e o restante do volume equivalia à

amostra diluída em água Milli-Q. A mistura foi aquecida a 96°C por 5 minutos. Em cada poço do gel, foi colocado 40 µL da solução aquecida, totalizando 117 µg de proteína por poço. O marcador de peso molecular utilizado foi PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (26619, Thermo Fisher Scientific), em um volume de 3 µL.

As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Bio-Rad). O tampão de transferência foi preparado com 3,03 g de Tris, 14,4 g de glicina, 10 mL de SDS 10%, 200 mL de metanol e água destilada até completar 1 L. Antes da transferência, o gel permaneceu por 20 minutos e a membrana por 5 minutos no tampão.

O bloqueio da membrana foi feito com leite em pó desnatado 9% em TBS-T (tampão tris-salino com adição de Tween-20) por 2 horas, para evitar as ligações não específicas entre o anticorpo e a membrana. A membrana foi, então, lavada com TBS-T (4 vezes de 5 minutos). O anticorpo policlonal VEGF (PA5-16754, Thermo Fisher Scientific) foi diluído com leite em pó desnatado 5% em TBS-T em uma diluição de 1/1000 e o anticorpo monoclonal β-actina (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) foi diluído com BSA 5% em TBS-T em uma diluição de 1/1000.

Para cada amostra foram preparadas duas membranas e cada uma foi incubada com um anticorpo primário por 15 horas. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e os anticorpos secundários foram colocados. A membrana que foi incubada com VEGF recebeu o anticorpo secundário anti-rabbit (7074, Cell Signaling Technology) e a que foi incubada com β-actina recebeu o anticorpo secundário anti-mouse (7076, Cell Signaling Technology). Os dois anticorpos foram diluídos com leite em pó desnatado 5% em TBS-T em uma diluição de 1/3000 e o tempo de incubação foi de 1 hora e 30 minutos. As membranas foram lavadas e preparadas com reagente de detecção ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences). A imunodeteção foi realizada com o equipamento ChemiDoc (Bio-Rad) e a análise quantitativa das imagens foi feita com o software Image Lab (Bio-Rad). Com o valor da razão VEGF/β-actina de cada amostra, pode-se fazer a média entre as 6 amostras de cada grupo em cada tempo.

4 Resultados e Discussão

4.1 Obtenção de imagens da CAM

Na aquisição das imagens, houve a tentativa de sempre fotografar a mesma região de vasos sanguíneos. Porém, como o embrião estava vivo e se movimentava constantemente, havia também um movimento da rede vascular. Isso pode prejudicar a análise com o passar do tempo, pois alguns vasos podem aparecer ou desaparecer da região fotografada. Essa diferença na quantidade de vasos foi minimizada com o número de ovos por grupo, sempre igual a 5, para a obtenção do comportamento médio.

Nas Figuras 4 e 5 são mostrados exemplos de imagens que foram obtidas com a câmera posicionada acima do ovo nos EDD7, 8 e 9. A Figura 4 mostra o anel de Teflon[®] colocado na superfície da CAM. O anel, além de delimitar a área onde as soluções são aplicadas, auxilia no acompanhamento da mesma região de vasos sanguíneos, pois sempre é fotografada toda a região interna ao anel.

Figura 4 – Imagens da CAM com o anel de Teflon[®] em sua superfície nos EDD7, 8 e 9.
Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 5 mostra as imagens da CAM nos EDD7, 8 e 9 sem o anel de Teflon[®]. Neste caso, para acompanhar a mesma região da CAM, um vaso é escolhido como referência na imagem inicial e, nas seguintes, ele é usado para posicionar a câmera na mesma região da primeira imagem. Contudo, o embrião se movimenta e, conseqüentemente, a rede vascular pode ser alterada na região fotografada. Na Figura 5, a seta escura mostra o vaso de referência e a seta clara mostra um vaso que apareceu na imagem devido a esse movimento.

Figura 5 – Imagens da CAM sem o anel de Teflon[®] nos EDD7, 8 e 9. A seta escura indica o vaso que foi usado como referência nas fotografias. A seta clara indica um vaso que apareceu na imagem devido ao movimento da rede vascular.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Processamento das imagens

A análise quantitativa das imagens dos vasos sanguíneos da CAM foi feita com uma rotina no MATLAB[®] desenvolvida em parceria com o Dr. Ramon Gabriel Teixeira Rosa, na época, aluno de doutorado do Grupo de Óptica.

A rotina identifica os pixels referentes aos vasos sanguíneos com o ajuste manual de alguns parâmetros e, a partir disso, a porcentagem de área ocupada pelos vasos é calculada por uma transformação desses pixels. A Figura 6 apresenta dois exemplos de ajuste do raio da máscara de disco em uma mesma imagem processada. Um exemplo de ajuste que resulta em uma transformação insatisfatória é mostrado na imagem da Figura 6-a. Na imagem da Figura 6-b, o parâmetro foi ajustado de maneira a obter a melhor transformação.

RADIUS 4.38129

(a)

(continua)

(continuação)

Figura 6 – Processamento da imagem da CAM com a rotina no MATLAB®. (a) O ajuste manual do parâmetro não identifica todos os pixels referentes aos vasos sanguíneos. (b) A melhor transformação foi obtida com outro ajuste.

Fonte: Elaborada pela autora.

A porcentagem de área ocupada pelos vasos sanguíneos é dada pela razão entre o número de pixels referente aos vasos e o número de pixels totais. Para evitar a comparação entre redes vasculares distintas, a quantificação de cada ovo foi obtida pela razão entre a porcentagem de área dos vasos de cada imagem ao longo do tempo e a porcentagem de área dos vasos da imagem inicial do mesmo ovo.

Em cada grupo estudado, foi calculada a média das razões de 5 ovos do grupo e o desvio padrão em cada período de tempo após o procedimento que seria analisado, seja ele a TFD, os grupos controle ou a medicação anti-angiogênica. A média e o desvio padrão foram, então, colocados em um gráfico, o que permitia observar o comportamento dos vasos ao longo do tempo. Esse tipo de análise foi feito para todos os grupos descritos nas próximas duas subseções.

A quantificação dos vasos foi feita com base na razão entre a área ocupada pelos vasos em uma imagem bidimensional e a área total da imagem. Entretanto, a partir de um modelo geométrico, pode-se demonstrar que a razão entre a área do vaso na imagem e a área total é praticamente equivalente à razão entre o volume do vaso e o volume total. Para a demonstração, considerou-se um vaso de comprimento L e diâmetro ϕ , um quadrado de lado L e um paralelepípedo formado pelo mesmo quadrado de lado L e profundidade ϕ . A Figura 7 ilustra o vaso, o quadrado e o paralelepípedo mencionados.

Figura 7 – Vaso de comprimento L e diâmetro ϕ , quadrado de lado L e paralelepípedo de lados L , L e ϕ .
Fonte: Elaborada pela autora.

Se a figura for considerada pela visão frontal e, portanto, bidimensional, a razão entre a área do vaso (A_V) e a área do quadrado (A) é

$$\frac{A_V}{A} = \frac{\phi L}{L^2} = \frac{\phi}{L}$$

No caso de considerarmos a imagem tridimensional, a razão entre o volume desse vaso (V_V) e o volume do paralelepípedo (V) é

$$\frac{V_V}{V} = \frac{\pi \left(\frac{\phi}{2}\right)^2 L}{\phi L^2} = \frac{\pi \phi}{4 L}$$

Portanto essas razões diferem por um fator de $\pi/4$, que é igual a 0,78. Em razão de essa diferença ser constante (além de aproximadamente 1), as relações obtidas a partir da área das imagens podem ser consideradas correspondentes ao volume total de vasos sanguíneos.

Apesar de ter uma quantificação suficiente para observação de grandes efeitos nos vasos sanguíneos, a rotina do MATLAB[®] não reconhece corretamente os vasos quando o embrião aparece ao fundo da imagem. Além disso, a ocorrência de hemorragias leva ao reconhecimento de uma área maior de vasos do que aquela que realmente existe. Portanto, os ovos com imagens que apresentaram esses problemas não foram considerados para essa análise.

4.3 Resposta anti-angiogênica do Avastin[®] (bevacizumabe)

O Avastin[®] é uma substância que possui um efeito anti-angiogênico já conhecido, (19) inclusive no modelo de CAM. (36) Assim, esse fármaco foi usado como controle positivo de

inibição e estabelecido o protocolo com a maior inibição de crescimento dos vasos sanguíneos, as técnicas utilizadas na identificação do VEGF com marcadores puderam ser avaliadas. Alguns testes foram realizados para que uma análise qualitativa e quantitativa das imagens da CAM mostrasse o efeito do Avastin®.

Nesses testes, as substâncias foram aplicadas topicamente, já que existe a vantagem de não causar qualquer dano vascular com essa via de entrega. Neste tipo de aplicação, uma área pode ser delimitada por um anel de Teflon® colocado na superfície da CAM. Apesar de diversos estudos com o modelo de CAM relatarem a utilização do anel, (36–37,42) a maioria dos ovos não sobreviveu nos experimentos em que o anel foi colocado sobre a membrana. Provavelmente, o anel estava mais pesado do que o embrião podia suportar e, portanto, os experimentos passaram a ser feitos sem o seu uso, na tentativa de evitar a morte dos embriões. Em todos os grupos em que o anel não foi colocado, podia-se observar a sobrevivência dos embriões dias após o início dos experimentos.

Diferentes parâmetros foram testados para estabelecer um protocolo que mostrasse inibição de crescimento dos vasos com a aplicação do Avastin® (Tabela 2). Após os testes, a concentração escolhida foi de 1 mg/mL, com a solução aplicada nos EDD7, 8, 9 e 10 em um volume de 100 µL por dia. Os outros parâmetros testados (sem o uso do anel) não mostraram efeito nos vasos sanguíneos. Para comparação, o grupo controle recebeu 100 µL de soro nesses mesmos dias. A aplicação foi tópica, diretamente na região de vasos sanguíneos, e as imagens da CAM foram feitas diariamente do EDD7 ao EDD11.

As Figuras 8 e 9 apresentam imagens da CAM obtidas diariamente com a câmera posicionada acima do ovo. A Figura 8 mostra um exemplo do grupo que recebeu Avastin® e a Figura 9 mostra um exemplo do grupo controle.

Figura 8 – Imagens da CAM obtidas nos EDD7, 8, 9, 10 e 11 com aplicação diária de Avastin®.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 – Imagens da CAM obtidas nos EDD7, 8, 9, 10 e 11 com aplicação diária de soro.
Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens feitas no EDD7 mostram a CAM sem a aplicação das substâncias. Nota-se que cada ovo possui uma vascularização inicial diferente. Com o passar dos dias, mais vasos surgem e ocorre o deslocamento de alguns vasos devido à movimentação do embrião.

As imagens da CAM no EDD11 das Figuras 8 e 9 são destacadas nas Figuras 10-a e 10-b, respectivamente. É possível observar uma densidade maior de vasos na Figura 10-b em comparação com a da Figura 10-a. Além disso, na Figura 10-a, há regiões com ausência de vasos visíveis, como indicado pelas setas, demonstrando o efeito anti-angiogênico do Avastin®.

Figura 10 – Imagens da CAM obtidas no EDD11. (a) CAM com aplicação diária de Avastin®, onde as setas indicam as regiões sem a presença de vasos visíveis. (b) CAM com aplicação diária de soro, apresentando uma densidade maior de pequenos vasos.
Fonte: Elaborada pela autora.

Na análise quantitativa realizada com a rotina no MATLAB®, foram utilizados 5 ovos por grupo. A Figura 11 apresenta um gráfico com a razão entre a porcentagem de área referente aos vasos em cada dia e a porcentagem de área no dia inicial (EDD7), mostrando o crescimento da rede vascular ao longo dos dias de desenvolvimento embrionário para cada um dos grupos. Os valores mostrados no gráfico são a média e o desvio padrão dos 5 ovos.

Figura 11 – Gráfico do crescimento da área relativa de vasos sanguíneos ao longo dos dias de desenvolvimento embrionário do grupo que recebeu a solução de Avastin® e do grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

No EDD8 já existe uma diferença entre os grupos, com o grupo controle apresentando um crescimento de 26% e o grupo Avastin® um crescimento de 13% em relação ao dia anterior. Além da diferença entre eles aumentar ao longo dos dias, o gráfico mostra uma taxa de crescimento bem menor para o grupo Avastin® comparado ao controle. No EDD11, o controle cresceu 92% em comparação com o EDD7, enquanto o grupo Avastin® cresceu 54%. Apesar das barras de erro, existe uma tendência de comportamento que mostra que o Avastin® inibiu o crescimento dos vasos sanguíneos.

Outros métodos podem ser usados para avaliar o crescimento vascular, como a contagem dos pontos de ramificação dos vasos sanguíneos. (36,41) Neste trabalho, além da quantificação com o MATLAB®, o comprimento e o diâmetro dos vasos foram considerados na contagem, para análise da distribuição de grandes e pequenos vasos. Com o auxílio do software ImageJ®, o comprimento e diâmetro de cada vaso foi medido manualmente nas imagens do EDD11. Na Figura 12, alguns exemplos de vasos de diferentes calibres são indicados por setas e seus respectivos diâmetros são fornecidos.

Figura 12 – Vasos de diferentes calibres na imagem da CAM indicados por setas e, a direita da imagem, é mostrada a medida do diâmetro desses vasos.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 13 mostra os gráficos da quantidade de vasos com determinados intervalos de comprimento e diâmetro do grupo que recebeu Avastin[®] (Figura 13-a) e do grupo controle (Figura 13-b). A média da quantidade de vasos e o desvio padrão foram obtidos com a utilização de 2 ovos de cada grupo.

Figura 13 – Gráfico da quantidade de vasos para cada intervalo de comprimento e diâmetro. (a) Grupo que recebeu aplicação diária de Avastin[®]. (b) Grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os vasos que apresentam pequenos diâmetros (maior ou igual a 1 pixel e menor que 3 pixels na imagem) e pequeno comprimento (de 1 a 100 pixels) são os mais numerosos nos dois grupos. Porém há uma redução de 37% na quantidade desse tipo de vaso no grupo Avastin[®]. Vasos com esse diâmetro não são encontrados com comprimento maior que 300 pixels. Há também redução de 41% no grupo Avastin[®] dos vasos com diâmetro maior ou

igual a 3 pixels e menor que 6 pixels e comprimento de até 200 pixels. A quantidade de vasos com os maiores diâmetros (maior ou igual a 6 pixels) não difere muito entre os dois grupos. Portanto, a maior diferença é encontrada nos vasos de diâmetro pequeno (menor que 6 pixels), como foi observado nas imagens da CAM na Figura 10. Como vasos com diâmetro e comprimento pequenos são aqueles recém formados, isso pode ser um indicador direto da inibição da angiogênese.

4.4 Terapia Fotodinâmica

Os parâmetros utilizados para a TFD foram baseados em trabalhos anteriores (25) e, por isso, o fotossensibilizador utilizado foi o Photogem[®], com uma concentração de 10 µg/mL. A aplicação foi tópica e o tempo de incubação foi de 40 minutos. Como o objetivo do trabalho era avaliar o efeito angiogênico após a TFD, os parâmetros foram escolhidos de maneira a garantir a sobrevivência do embrião 24 horas após o experimento, com o uso de subdoses de luz. As doses de luz que mostravam efeito vascular, mas permitiam a sobrevivência do embrião, foram: 6 e 15 J/cm². Devido à morte do embrião com o uso do anel, só foram considerados os dados referentes aos experimentos sem anel.

4.4.1 Avaliação do dano vascular

Alguns testes foram feitos para verificar o dano vascular após a TFD. Em um grupo, foi utilizado 200 µL de Photogem[®] com uma iluminação de 20 mW/cm² durante 5 minutos (grupo A), totalizando uma dose de 6 J/cm². Em outro grupo (grupo B) foi aumentado o volume de Photogem[®] para 400 µL, mantendo os mesmos parâmetros de iluminação, para verificarmos se haveria um dano maior nos vasos sem levar o embrião à morte. Em outro teste, foi mantido o volume de 400 µL de Photogem[®], com o aumento da irradiância para 50 mW/cm² durante 5 minutos (grupo C), totalizando uma dose de 15 J/cm², a fim de se verificar se o dano seria maior ainda. Um resumo das diferenças entre os grupos A, B e C está mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Volume da solução de Photogem[®] e dose total de luz nos grupos A, B e C.

grupo	volume de Photogem [®] (µL)	dose total de luz (J/cm ²)
A	200	6
B	400	6
C	400	15

Fonte: Elaborada pela autora.

A primeira imagem da CAM foi obtida antes da aplicação do fotossensibilizador e as seguintes foram obtidas imediatamente depois da TFD, a cada 30 minutos durante as primeiras 3 horas e 24 horas após a TFD. A Figura 14 apresenta as imagens de um mesmo ovo do grupo A, que foram obtidas antes da TFD, 3 e 24 horas depois.

Figura 14 – Imagens da CAM obtidas antes da TFD, 3 e 24 horas depois, com aplicação de 200 μL da solução de Photogem[®] e irradiância de 20 mW/cm^2 .

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 15 mostra as imagens da CAM de um ovo do grupo B.

Figura 15 – Imagens da CAM obtidas antes da TFD, 3 e 24 horas depois, com aplicação de 400 μL da solução de Photogem[®] e irradiância de 20 mW/cm^2 .

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 16 temos um exemplo de ovo do grupo C.

Figura 16 – Imagens da CAM obtidas antes da TFD, 3 e 24 horas depois, com aplicação de 400 μL da solução de Photogem[®] e irradiância de 50 mW/cm^2 .

Fonte: Elaborada pela autora.

As Figuras 14, 15 e 16 mostram exemplos de CAM com diminuição da densidade de vasos durante as 3 horas após a TFD, especialmente nas regiões de vasos com menor calibre, e sua recuperação no dia seguinte. Uma análise quantitativa com a rotina no MATLAB[®] foi feita como na subseção anterior, mas a literatura mostra diversas possibilidades para a análise vascular, como o uso de uma escala com 6 pontuações, de 0 (nenhum dano vascular) a 5 (destruição vascular total). (35,42,51) Entretanto essa análise não permite quantificar a área total de vasos e verificar se há uma compensação do fluxo sanguíneo com o aumento de vasos sanguíneos ao mesmo tempo em que há destruição. Como a nossa análise principal é mostrar a presença ou ausência da angiogênese, era preciso um método que considerasse esses fatores e, por isso, foi usada a análise da área vascular (correspondente ao volume total, como já demonstrado). A Figura 17 mostra o comportamento dos vasos sanguíneos com o passar do tempo nos grupos em que foi realizada a TFD, com a média e o desvio padrão de 5 ovos por grupo.

Figura 17 – Gráfico do dano vascular pós-TFD com a utilização de diferentes parâmetros.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o grupo A, o dano vascular começa 1 hora depois da TFD. Ao aumentar a quantidade de Photogem[®] aplicada (grupos B e C), pode-se observar no gráfico que o dano começa imediatamente após a TFD. Além disso, no grupo C, no qual a dose total de luz é a maior, há uma queda mais acentuada da área de vasos na imagem.

O grupo B apresentou uma redução maior nos vasos sanguíneos comparado ao grupo A, ou seja, a aplicação do dobro de volume da solução de Photogem[®] não mostra o dobro do efeito vascular, mas foi possível aumentar o dano nos vasos sem levar o embrião à morte. Ao final das primeiras 3 horas de acompanhamento, o grupo A teve uma redução de vasos de

10% em relação à quantidade antes da TFD. Já o grupo B teve uma redução de 12% nesse mesmo período. O grupo que apresentou a maior redução nos vasos sanguíneos nas primeiras 3 horas após a TFD foi o grupo C, com uma redução de 15%.

No dia seguinte, podemos observar que houve recuperação dos vasos em todos os grupos. No grupo A, a quantidade de vasos ainda é menor do que a quantidade antes da TFD, apresentando uma redução de 5%. Nos grupos B e C, a quantidade de vasos é praticamente a mesma que tinha antes da TFD.

Apesar dessas porcentagens mostradas a partir da média, o desvio padrão mostra que o comportamento do gráfico para os três grupos é bem similar e, portanto, mesmo com a variação dos parâmetros de dose de luz e fotossensibilizador, a redução dos vasos aconteceu entre 10 e 15% nas 3 horas pós-TFD e, 24 horas depois, houve recuperação total dos vasos.

A partir dos valores obtidos com o gráfico, outra análise quantitativa pode ser feita para distinguir melhor a redução apresentada pelos três grupos. Se considerarmos que a área ocupada pelos vasos varia no tempo com um fator de crescimento e um fator de dano dado pela própria TFD, uma equação para o dano vascular pode ser escrita como:

$$\frac{dA_V}{dt} = L - \alpha A_V$$

Onde A_V é a área de vasos, L representa o crescimento e α é a taxa de dano nos vasos.

A equação pode ser integrada:

$$\int_{A_0}^{A_V} \frac{dA_V'}{L - \alpha A_V'} = \int_0^t dt'$$

Para resolver a integral à esquerda, fazemos a substituição $L - \alpha A_V' = x$ e $dA_V' = -dx/\alpha$:

$$\begin{aligned} \int \frac{dA_V'}{L - \alpha A_V'} &= -\frac{1}{\alpha} \int \frac{dx}{x} = -\frac{1}{\alpha} \ln x = -\frac{1}{\alpha} \ln(L - \alpha A_V') \\ \int_{A_0}^{A_V} \frac{dA_V'}{L - \alpha A_V'} &= -\frac{1}{\alpha} [\ln(L - \alpha A_V) - \ln(L - \alpha A_0)] \end{aligned}$$

A equação do dano vascular fica:

$$-\frac{1}{\alpha} [\ln(L - \alpha A_V) - \ln(L - \alpha A_0)] = t$$

$$\ln\left(\frac{L - \alpha A_V}{L - \alpha A_0}\right) = -\alpha t$$

$$e^{-\alpha t} = \frac{L - \alpha A_V}{L - \alpha A_0}$$

$$\Rightarrow A_V = \frac{L}{\alpha} - \frac{(L - \alpha A_0)}{\alpha} e^{-\alpha t}$$

A equação mostra que, logo após a TFD, a área de vasos diminui. Após um certo tempo, a área de vasos chega a um valor constante de L/α . Para αt pequeno (longe da saturação), pode-se fazer a aproximação:

$$A_V = A_0 + (L - A_0\alpha)t$$

A análise de um intervalo de tempo de 3 horas não mostra um crescimento significativo dos vasos sanguíneos, portanto pode ser considerado $L = 0$. Assim, ao considerarmos o intervalo de tempo de 3 horas após a TFD, é possível aproximar o comportamento do gráfico por uma reta de equação:

$$A_V = A_0 - A_0\alpha t$$

A partir do gráfico da Figura 17, a reta de melhor ajuste para cada grupo apresenta coeficiente linear A_0 e coeficiente angular $-A_0\alpha$. Portanto, quanto maior o valor de α , maior o dano nos vasos, que corresponde ao maior efeito da TFD. A razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear é igual ao valor de $-\alpha$, o que permite o cálculo da taxa de dano nos vasos dos grupos em que foi realizada a TFD. O valor de α dos grupos A, B e C é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Valor de α dos grupos em que foi feita a TFD.

Grupo	α
A	0,037
B	0,036
C	0,049

Fonte: Elaborada pela autora.

Nesta análise, com os valores de α , novamente o grupo C apresentou uma eficiência maior na redução da área ocupada pelos vasos sanguíneos, seguido do grupo A e do grupo B. Apesar do grupo B ter recebido uma quantidade maior de fotossensibilizador em relação ao grupo A, os valores de α desses grupos não diferem consideravelmente. Já o valor de α do grupo C mostra que, com uma dose maior de luz na TFD, há uma maior taxa de dano nos vasos. Portanto, a taxa de dano não aumentou com o aumento na quantidade de fotossensibilizador, mas sim com o aumento na dose de luz.

A análise com a medida do diâmetro e do comprimento dos vasos sanguíneos também foi feita. Como o grupo C apresentou uma redução mais intensa na densidade de vasos nas primeiras 3 horas após a TFD, este grupo foi escolhido para a medida do comprimento e diâmetro de cada vaso nas imagens com o uso do software ImageJ[®]. A Figura 18 apresenta os

gráficos da quantidade de vasos com determinados intervalos de comprimento e diâmetro nas imagens feitas antes da TFD (Figura 18-a), 3 horas depois (Figura 18-b) e 24 horas depois (Figura 18-c). A média da quantidade de vasos e o desvio padrão foram obtidos com a utilização de 2 ovos.

Antes da TFD

(a)

3 horas depois

(b)

(continua)

(continuação)

24 horas depois

(c)

Figura 18 – Gráfico da quantidade de vasos para cada intervalo de comprimento e diâmetro nas imagens do grupo C. (a) Antes da TFD. (b) 3 horas depois da TFD. (c) 24 horas depois da TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os vasos com pequeno diâmetro (maior ou igual a 1 pixel e menor que 3 pixels na imagem) e pequeno comprimento (de 1 a 100 pixels) são os mais numerosos antes da TFD e, 3 horas depois, há uma redução de 74% no número desse tipo de vaso. A Figura 18-c mostra que o número desses vasos aumenta novamente 24 horas depois da TFD, porém a quantidade ainda está abaixo do que havia antes do tratamento, apresentando uma redução de 14% em relação ao valor anterior à TFD. O reaparecimento desses pequenos vasos pode ser um indício de que existe um processo angiogênico após a TFD, mesmo com um grande efeito vascular imediatamente após a terapia. Contudo, existe também a possibilidade de que a TFD tenha apenas causado um dano nesses vasos, sem a eliminação completa deles, com recuperação dos mesmos vasos 24 horas após a terapia.

Os vasos com diâmetro entre 3 e 6 pixels mostram diferenças nos comprimentos de até 300 pixels, com uma redução de 31% no número desses vasos 3 horas depois da TFD. Assim como ocorre com os pequenos vasos, esses também mostram um aumento 24 horas após a TFD, com uma diminuição de 12% em relação ao número que havia antes da terapia. Pode-se observar que, após 3 horas, a porcentagem de redução desse tipo de vaso é menor que a dos pequenos vasos e, após 24 horas, os dois tipos têm uma porcentagem de redução semelhante.

Portanto os vasos menores, além de serem os mais afetados pela TFD, são também os que se recuperam mais intensamente.

Em relação aos vasos com comprimento maior que 300 pixels, é possível notar um aumento na quantidade de vasos com diâmetro maior que 9 pixels 3 horas depois da TFD. Isso pode acontecer pela destruição dos vasos menores e compensação desse fluxo nos vasos de maior calibre, já que um vaso dessas dimensões não se forma nesse período de tempo. Entretanto, a movimentação do embrião durante o experimento também pode influenciar na contagem desses vasos.

4.4.2 Grupos controle

Um grupo recebeu somente a iluminação com uma irradiância de 50 mW/cm^2 durante 5 minutos para verificar se a luz causava algum efeito nos vasos da membrana. O gráfico da Figura 19 mostra que este grupo apresentou uma oscilação na quantidade de vasos com um aumento máximo de 4% durante as primeiras 3 horas e no dia seguinte houve um aumento de 2% em comparação com o valor anterior ao experimento.

Com a intenção de analisar se somente o fotossensibilizador provocava efeito nos vasos, um grupo recebeu apenas a solução de Photogem[®], com um volume de 400 μL e tempo de incubação de 40 minutos. O gráfico da Figura 19 mostra que o valor da área de vasos se manteve, na maior parte do tempo, inferior ao valor anterior ao experimento, apresentando um máximo de diminuição de 5%; no dia seguinte vemos um aumento de 3%.

Um grupo controle com aplicação apenas de soro fisiológico também foi analisado, com aplicação tópica de um volume total de 400 μL , especialmente para garantia de que o peso da própria solução não causava qualquer dano à rede vascular. Esse grupo apresenta uma oscilação na área de vasos que está entre um aumento de 3% e uma diminuição de 6% durante as primeiras 3 horas e no dia seguinte houve um aumento de 7% em comparação com o valor anterior ao experimento.

Figura 19 – Gráfico da área relativa de vasos dos grupos controle: só fotossensibilizador, só luz e só soro.
Fonte: Elaborada pela autora.

Essas oscilações dos grupos controle, analisadas juntamente com as barras de erro, mostram que o comportamento da rede vascular foi praticamente constante para os três grupos controle.

O diâmetro e o comprimento dos vasos sanguíneos foram medidos nas imagens do grupo que recebeu apenas soro. Essa análise foi feita nas imagens de 2 ovos antes da aplicação do soro (Figura 20-a), 3 horas depois da aplicação (Figura 20-b) e 24 horas depois da aplicação (Figura 20-c).

Antes

(a)

(continua)

(continuação)

3 horas depois

(b)

24 horas depois

(c)

Figura 20 – Gráfico da quantidade de vasos para cada intervalo de comprimento e diâmetro nas imagens do grupo só soro. (a) Antes da aplicação do soro. (b) 3 horas depois da aplicação. (c) 24 horas depois da aplicação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nesse caso, os vasos com pequeno diâmetro (maior ou igual a 1 pixel e menor que 3 pixels na imagem) e pequeno comprimento (de 1 a 100 pixels) são os mais numerosos antes da aplicação do soro e não há uma redução no número desse tipo de vaso 3 horas depois,

diferentemente do que aconteceu com o grupo que recebeu a TFD. Já 24 horas depois, o número desses pequenos vasos apresenta um aumento, o que mostra o crescimento natural da rede vascular nesse período de tempo, sem grandes mudanças.

Para comparação dos grupos controle com um grupo de TFD, foi escolhido o grupo C, que apresentou uma redução mais intensa na quantidade de vasos sanguíneos nas 3 horas seguintes ao tratamento. Os gráficos da Figura 21 mostram este grupo com cada um dos grupos controle: só fotossensibilizador (Figura 21-a), só luz (Figura 21-b) e só soro (Figura 21-c). Podemos ver que em qualquer um dos grupos controle não há redução significativa na quantidade de vasos, confirmando o efeito vascular da TFD no grupo C.

(a)

(b)

(continua)

(continuação)

(c)

Figura 21 – Comparação entre o grupo C com os grupos controle. (a) Grupo que recebeu somente o fotossensibilizador, (b) somente luz e (c) somente soro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, o efeito observado nos grupos com aplicação de luz e fotossensibilizador mostra o efeito da TFD e não corresponde aos seus elementos separadamente. Além disso, vemos que, no dia seguinte, o grupo C praticamente retorna ao valor que tinha antes da TFD, mas mostra uma redução comparada aos controles, já que há um pequeno aumento na quantidade de vasos desses grupos nesse período.

4.5 Análise de imagens com o uso de microscopia confocal

A CAM foi analisada no microscópio confocal de fluorescência com o uso de dois marcadores. Como o marcador primário se liga às proteínas responsáveis pela angiogênese e o marcador secundário se liga ao marcador primário, era esperado ver os novos vasos sanguíneos com a fluorescência azul do marcador secundário.

Nos experimentos iniciais, os marcadores foram colocados topicamente sobre a CAM, que não recebeu nenhum tratamento prévio, para que os melhores parâmetros de aplicação dos marcadores fossem estabelecidos, uma vez que a CAM está em constante processo de angiogênese para a sobrevivência do embrião. Para isso, os grupos que receberam os marcadores foram comparados com um grupo controle, sem os marcadores. Após serem estabelecidos os melhores parâmetros, os marcadores seriam aplicados para a avaliação do efeito angiogênico pós-TFD. No entanto, em todos os testes realizados (Tabela 4), os ovos de um mesmo grupo

não mostraram um comportamento semelhante, ou seja, alguns ovos apresentaram mais fluorescência e outros menos.

Como exemplo, nas figuras seguintes são mostradas as imagens do microscópio confocal do grupo controle (Figura 22) e de um grupo com os marcadores (Figura 23). Em cada grupo, cada uma das duas imagens representa um ovo diferente. Neste caso, a concentração do marcador primário foi de 2 $\mu\text{g/mL}$. Esse marcador foi aplicado três vezes (separadas de 24 horas), com um volume de 100 μL em cada aplicação. A concentração do marcador secundário foi de 10 $\mu\text{g/mL}$ e o volume aplicado foi de 200 μL . O secundário foi aplicado 2 horas após a última aplicação do primário e seu tempo de incubação foi de 3 horas.

Figura 22 – Imagem da CAM do grupo controle. (a) e (b) representam ovos diferentes.
Fonte: Elaborada pela autora.

A inexistência de fluorescência azul nas membranas de ovos que não receberam os marcadores seria ideal para uma comparação com as membranas que receberam os marcadores. Nesta situação, a fluorescência azul observada em uma membrana com marcadores seria devida somente aos marcadores e não à própria membrana. O ovo da Figura 22-b não apresentou a fluorescência azul característica do marcador secundário, porém o da Figura 22-a apresentou essa fluorescência.

Figura 23 – Imagem da CAM do grupo com os marcadores. (a) e (b) representam ovos diferentes.
Fonte: Elaborada pela autora.

Uma comparação entre as Figuras 23-a e 23-b também mostra que os ovos do mesmo grupo apresentaram um comportamento diferente. A membrana da Figura 23-a apresenta uma quantidade maior de fluorescência que a da Figura 23-b. Apesar da Figura 23-a mostrar pontos específicos de acúmulo de fluorescência e a Figura 23-b mostrar mais fluorescência azul que a Figura 22-b, essa ausência de padrão deixava dúvidas sobre o resultado.

Em outros experimentos, os parâmetros de aplicação dos marcadores foram variados, porém foi observada também uma diferença na fluorescência entre os ovos de um mesmo grupo. Como não foi possível obter um padrão entre os ovos do mesmo grupo e não haveria possibilidade de quantificar a angiogênese, um método molecular foi utilizado para identificar a angiogênese com os marcadores.

4.6 Avaliação do VEGF por Western Blot

O grupo C, no qual a TFD foi feita com 400 μL da solução de Photogem[®] e irradiância de 50 mW/cm^2 por 5 minutos, foi escolhido para ser analisado por Western Blot, pois apresentou maior efeito vascular. Foram analisados também os grupos controle: somente soro fisiológico (400 μL), somente fotossensibilizador (400 μL) e somente luz (50 mW/cm^2).

O grupo que recebeu Avastin[®] nos EDD7, 8, 9 e 10 em um volume de 100 μL por dia (concentração de 1 mg/mL) e o grupo controle que recebeu 100 μL de soro por dia nesses mesmos dias também foram submetidos ao Western Blot.

Foram usados 12 ovos por grupo em cada tempo analisado. Cada amostra foi preparada com as membranas de 2 ovos de um mesmo grupo, pois apenas 1 ovo não seria suficiente para extrair o volume necessário de proteína para os experimentos, principalmente se os experimentos precisassem ser repetidos. Dessa maneira, havia 6 amostras para cada grupo em cada tempo e o VEGF e a β -actina de cada amostra foram quantificados. A β -actina é o controle endógeno, ou seja, uma proteína que não tem seus níveis de expressão alterados pelos tratamentos.

A Figura 24 apresenta os gráficos com a razão VEGF/ β -actina de cada grupo (só soro, só luz, só fotossensibilizador e TFD), com a CAM removida 3 horas (Figura 24-a) e 24 horas (Figura 24-b) após o procedimento. Um exemplo de Western Blot com VEGF e β -actina é mostrado abaixo dos gráficos. Os grupos foram comparados entre si em cada tempo com o teste estatístico *One Way Analysis of Variance*, que não mostrou diferença estatística tanto nos grupos de 3 horas quanto nos grupos de 24 horas.

Figura 24 – Gráficos da razão VEGF/ β -actina dos grupos só soro, só luz, só fotossensibilizador e TFD, com um exemplo de Western Blot abaixo de cada gráfico. (a) 3 horas. (b) 24 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 25 mostra o gráfico da razão VEGF/ β -actina do grupo que recebeu soro e do grupo que recebeu Avastin[®]. Abaixo do gráfico, é mostrado um exemplo de Western Blot com VEGF e β -actina. Para as comparações entre os grupos, foi utilizado o t-test, que também não mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Figura 25 – Gráfico da razão VEGF/β-actina dos grupos só soro e Avastin®, com um exemplo de Western Blot.
Fonte: Elaborada pela autora.

Na análise por imagem, foi possível observar tanto qualitativamente quanto quantitativamente que há redução na quantidade de pequenos vasos 3 horas após a TFD e, 24 horas depois, o número desses vasos aumenta novamente, podendo ser um indício de revascularização, com a formação de novos vasos. Entretanto, essa mudança na quantidade de pequenos vasos pode ser apenas um colapso da parede do vaso. Neste caso, o dano causado nos pequenos vasos pode ter levado ao redirecionamento do fluxo sanguíneo para os vasos de maior calibre e, como não houve a destruição total, mas apenas um dano provocado pela TFD, eles se recuperaram 24 horas depois do tratamento, ocorrendo o retorno da circulação sanguínea.

Na tentativa de quantificar o VEGF em um tempo mais curto após a TFD (3 horas) e em um tempo mais longo (24 horas), não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo que recebeu a TFD e os grupos controle, o que indicaria que não ocorre um processo angiogênico após a TFD. No entanto, outras técnicas para a avaliação da angiogênese em CAM encontradas na literatura, como imunohistoquímica (37) e PCR (41), mostram que, após a TFD, ocorre um processo angiogênico, que pode ser quantificado com essas técnicas mais precisas. Portanto, a técnica de Western Blot, possivelmente, não é muito sensível a pequenas variações na quantidade de proteína analisada, uma vez que a própria membrana corioalantoica está em constante processo de angiogênese e apresenta grande

quantidade dessa proteína. Como não foi verificada diferença mesmo entre o grupo com Avastin[®], que era o controle positivo de inibição de angiogênese e comprovadamente com inibição dessa proteína, e o grupo com soro, essa técnica não se mostrou sensível suficiente para detectar tais diferenças.

A análise por imagens mostra que, 24 horas após a TFD, acontece a formação de uma rede vascular diferente quando comparada à imagem antes da terapia, o que seria mais um indício de que há o processo de formação de novos vasos e não apenas a recuperação dos mesmos vasos existentes anteriormente. Apesar de a técnica de Western Blot não mostrar diferença estatística na quantificação das proteínas relacionadas à angiogênese, pode-se considerar que a TFD estimula sim esse processo, mas que é preciso técnicas mais específicas para observar essa diferença.

O entendimento do processo de angiogênese após a TFD é fundamental para a aplicação clínica do tratamento em diferentes doenças, especialmente as relacionadas ao processo vascular. É preciso garantir que os parâmetros de dose de fotossensibilizador e luz sejam suficientes para que não haja apenas a destruição aguda dos vasos, pois é possível o retorno dessa vascularização. Assim, o estudo da TFD em vasos sanguíneos é um importante fator na garantia de um tratamento eficiente de diferentes doenças, incluindo o câncer.

5 Conclusão

O modelo de CAM foi usado para estudar os efeitos vasculares da TFD com o uso de Photogem[®], em uma concentração de 10 µg/mL, e de subdoses de luz. Nos experimentos realizados sem o uso do anel de Teflon[®] e com doses de luz de 6 e 15 J/cm², houve diminuição na densidade de vasos 3 horas após a TFD, porém foi observado um aumento nessa densidade 24 horas depois. Para a quantificação dos efeitos observados, uma rotina foi desenvolvida no MATLAB[®] para calcular a porcentagem de área ocupada pelos vasos sanguíneos nas imagens e foi demonstrado que a área dos vasos nessas imagens é praticamente equivalente ao volume. A rotina permitiu construir um gráfico que mostra a área de vasos relacionada com o tempo após a terapia e, a partir da reta de melhor ajuste ao considerar as primeiras 3 horas após a TFD, foi calculada a taxa de dano nos vasos desses grupos. Como o grupo C (TFD com 400 µL da solução de Photogem[®] e dose de luz de 15 J/cm²) apresentou uma maior redução na área de vasos com essas análises, ele foi escolhido para uma análise da distribuição de grandes e pequenos vasos com o software ImageJ[®], que mostrou que os menores vasos são os mais afetados 3 horas após a TFD e apresentam uma grande recuperação 24 horas depois. O aumento na quantidade desses pequenos vasos podia ser um indicativo de angiogênese após a TFD, mas podia ser também uma recuperação dos vasos que haviam sido danificados pela terapia e que não foram totalmente destruídos.

A tentativa de visualizar a angiogênese com o uso de marcadores no microscópio confocal não levou a um resultado conclusivo. Por isso, a quantificação proteica foi realizada por Western Blot, no qual não houve diferença estatística entre o grupo que recebeu a TFD e os grupos controle. Como também não houve diferença entre o grupo com Avastin[®], que era o controle positivo de inibição de angiogênese, e o grupo com soro, provavelmente a técnica utilizada não detectou pequenas variações na quantidade de VEGF dos grupos. Apesar de a técnica de Western Blot não mostrar diferença estatística na quantificação do VEGF, pode-se considerar que a TFD estimula a angiogênese, uma vez que, nas análises por imagem, há a formação de novos vasos 24 horas após o tratamento, com uma rede vascular diferente da anterior, além de que outras técnicas de análise molecular encontradas na literatura apontam que este processo ocorre em CAM após a TFD.

REFERÊNCIAS

- 1 SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E DE CIRURGIA VASCULAR REGIONAL SÃO PAULO. *Doenças vasculares*. Disponível em: <<https://sbacvsp.com.br/doencas-vasculares/>>. Acesso em: 29 out. 2018.
- 2 WASSEF, M. et al. Vascular anomalies classification: recommendations from the International Society for the Study of Vascular Anomalies. *Pediatrics*, v. 136, n. 1, p. 1–12, 2015.
- 3 KOLLIPARA, R. et al. Vascular anomalies in pediatric patients: updated classification, imaging, and therapy. *Radiologic Clinics of North America*, v. 51, n. 4, p. 659–672, 2013.
- 4 HAGGSTROM, A. N. et al. Prospective study of infantile hemangiomas: clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics*, v. 118, n. 3, p. 882–887, 2006.
- 5 LEE, K. C.; BERCOVITCH, L. Update on infantile hemangiomas. *Seminars in Perinatology*, v. 37, n. 1, p. 49–58, 2013.
- 6 SHIH, S.-C. et al. Molecular profiling of angiogenesis markers. *American Journal of Pathology*, v. 161, n. 1, p. 35–41, 2002.
- 7 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Câncer*. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 30 out. 2018.
- 8 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer*. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 30 out. 2018.
- 9 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
- 10 BALUK, P.; HASHIZUME, H.; MCDONALD, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 15, n. 1, p. 102–111, 2005.
- 11 RIBATTI, D. et al. The structure of the vascular network of tumors. *Cancer Letters*, v. 248, n. 1, p. 18–23, 2007.
- 12 ELSHABRAWY, H. A. et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*, v. 18, n. 4, p. 433–448, 2015.
- 13 SWEENEY, P. et al. Anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody reduces tumorigenicity and metastasis in orthotopic prostate cancer xenografts via induction of endothelial cell apoptosis and reduction of endothelial cell matrix metalloproteinase type 9 production. *Clinical Cancer Research*, v. 8, n. 8, p. 2714–2724, 2002.

- 14 PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 25, n. 4, p. 396–402, 2005.
- 15 HARRIS, A. L. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 1, p. 38–47, 2002.
- 16 SHAHI, P. K.; PINEDA, I. F. Tumoral angiogenesis: review of the literature. *Cancer Investigation*, v. 26, n. 1, p. 104–108, 2008.
- 17 CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, v. 9, n. 6, p. 653–660, 2003.
- 18 ZHAO, Y.; ADJEI, A. A. Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor. *Oncologist*, v. 20, n. 6, p. 660–673, 2015.
- 19 LIN, Z.; ZHANG, Q.; LUO, W. Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: challenges and future directions. *European Journal of Pharmacology*, v. 793, n. 24, p. 76–81, 2016.
- 20 JHAM, B. C.; FREIRE, A. R. S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 72, n. 5, p. 704–708, 2006.
- 21 FRIGATO, S.; HOGA, L. A. K. Assistência à mulher com câncer de colo uterino: o papel da enfermagem. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 49, n. 4, p. 209–214, 2003.
- 22 TARTARI, R. F.; BUSNELLO, F. M.; NUNES, C. H. A. Perfil nutricional de pacientes em tratamento quimioterápico em um ambulatório especializado em quimioterapia. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 56, n. 1, p. 43–50, 2010.
- 23 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Pele melanoma*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em: 31 out. 2018.
- 24 SOBANKO, J. F. et al. Importance of physical appearance in patients with skin cancer. *Dermatologic Surgery*, v. 41, n. 2, p. 183–188, 2015.
- 25 BUZZÁ, H. H. *Avaliação do efeito vascular da terapia fotodinâmica empregando derivados de porfirina e clorina na membrana corioalantóica*. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 26 KHURANA, M. et al. Quantitative in vitro demonstration of two-photon photodynamic therapy using Photofrin® and Visudyne®. *Photochemistry and Photobiology*, v. 83, n. 6, p. 1441–1448, 2007.
- 27 BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology*, v. 5, n. 8, p. 497–508, 2004.

- 28 NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 73, n. 1–2, p. 1–28, 2004.
- 29 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 5, p. 380–387, 2003.
- 30 ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.
- 31 ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 10, n. 4, p. 331–341, 2013.
- 32 AZZOUZI, A.-R. et al. Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD[®] Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World Journal of Urology*, v. 33, n. 7, p. 937–944, 2015.
- 33 BLACHER, S. et al. Quantification of angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). *Image Analysis & Stereology*, v. 24, n. 3, p. 169–180, 2005.
- 34 NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, v. 17, n. 4, p. 779–804, 2014.
- 35 DEBEFVE, E. et al. Video monitoring of neovessel occlusion induced by photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne[®]), in the CAM model. *Angiogenesis*, v. 11, n. 3, p. 235–243, 2008.
- 36 NOWAK-SLIWINSKA, P. et al. Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model. *Microvascular Research*, v. 79, n. 1, p. 21–28, 2010.
- 37 NOWAK-SLIWINSKA, P. et al. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis*, v. 13, n. 4, p. 281–292, 2010.
- 38 RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Experimental Cell Research*, v. 328, n. 2, p. 314–324, 2014.
- 39 RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of Development*, v. 141, n. 3, p. 70–77, 2016.
- 40 RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* assay to study antiangiogenesis. *Pharmaceuticals*, v. 3, n. 3, p. 482–513, 2010.
- 41 NOWAK-SLIWINSKA, P. et al. Angiostatic kinase inhibitors to sustain photodynamic angio-occlusion. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 16, n. 7, p. 1553–1562, 2012.

- 42 DEBEFVE, E. et al. Combination therapy using verteporfin and ranibizumab; optimizing the timing in the CAM model. *Photochemistry and Photobiology*, v. 85, n. 6, p. 1400–1408, 2009.
- 43 CHOUGHANI, E. T. et al. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. *Cell Metabolism*, v. 23, n. 2, p. 254–263, 2016.
- 44 ZULUAGA, M.-F. et al. Synergies of VEGF inhibition and photodynamic therapy in the treatment of age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 48, n. 4, p. 1767–1772, 2007.
- 45 BUZZÁ, H. H. et al. Evaluation of vascular effect of photodynamic therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 138, n. 9, p. 1–7, 2014.
- 46 KORBELIK, M.; SUN, J.; ZENG, H. Ischaemia-reperfusion injury in photodynamic therapy-treated mouse tumours. *British Journal of Cancer*, v. 88, n. 5, p. 760–766, 2003.
- 47 KORBELIK, M. et al. Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, v. 82, n. 11, p. 1835–1843, 2000.
- 48 MARIAMPILLAI, A. et al. Speckle variance detection of microvasculature using swept-source optical coherence tomography. *Optics Letters*, v. 33, n. 13, p. 1530–1532, 2008.
- 49 THERMO FISHER SCIENTIFIC. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/spectra-viewer?SID=srch-svtool&UID=31553p72>>. Acesso em: 01 out. 2018.
- 50 LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- 51 LANGE, N. et al. A new drug-screening procedure for photosensitizing agents used in photodynamic therapy for CNV. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 42, n. 1, p. 38–46, 2001.