

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

HILDE HARB BUZZÁ

Avaliação da terapia fotodinâmica em um modelo tumoral em
membrana corioalantóica

São Carlos

2016

HILDE HARB BUZZÁ

Avaliação da terapia fotodinâmica em um modelo tumoral em membrana corioalantóica

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof^ª Dr^ª Cristina Kurachi

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2016

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

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

Buzzá, Hilde Harb

Avaliação da terapia fotodinâmica em um modelo tumoral em membrana corioalantóica / Hilde Harb Buzzá; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2016.
102 p.

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

1. Terapia fotodinâmica. 2. Efeito vascular. 3. Membrana corioalantóica. 4. Modelo tumoral. 5. PDT.
I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

Aos meus pais e irmão.
Por eles serem a minha melhor parte.
À minha avó Léa (*in memoriam*).
Que sempre quis uma “doutora” na família.

AGRADECIMENTOS

É preciso agradecer muitas pessoas e eu vou tentar, humildemente, nessa minha pequena lista agradecer àqueles que eu posso chamar de meus:

Primeiramente, à professora Cristina Kurachi. Durante o meu processo de aprendizado, nesse doutorado, sem dúvidas, ela me ensinou além das técnicas de laboratório e análises de dados. Ela me ensinou a enfrentar meus sonhos e fazê-los reais. Eu tenho certeza que, durante esses 4 anos, a nossa relação foi muito mais do que orientada-orientadora. Uma amizade sólida foi construída e eu agradeço por ter a possibilidade de trabalhar com a orientação de uma grande amiga. Aqui eu deixo todo o meu carinho.

Ao professor Vanderlei Bagnato. Ele não é meu orientador no papel, mas um papel não diz nada! Obrigada por toda a orientação e inspiração. E, claro, pelos conselhos e injeções de ânimo. Ele sabe fazer isso como ninguém. Mas quero deixar aqui registrado, especificamente, ao apoio quando as coisas pareciam um pouco fora do lugar. Obrigada por me inspirar, me animar e enxugar algumas lágrimas. Que eu leve sua paixão pela ciência por toda a minha vida, sabendo que, independentemente do cargo que ocuparmos, somos cientistas e temos um dever moral com a sociedade. Obrigada! É meu maior orgulho quando dizem que eu pareço ser sua filha.

Aos meus pais. Claro! Eu não seria nada sem eles. Esse doutorado todo é dedicado a eles, mesmo eles não entendendo muito o que isso significa. Não existiriam palavras para agradecê-los de forma justa, então, dedico cada palavra escrita nessas páginas a vocês! Amo vocês, com tudo de sublime que essa expressão pode trazer.

Ao meu irmão Joseph. Um dia me falaram que eu e meu irmão nos dávamos tão bem que era como se tivéssemos nascidos um para o outro. Existe sorte maior do que essa? Ter um irmão como ele, que divide comigo tantos sonhos e gostos? A defesa do doutorado dá início a um sonho nosso e é mais prazeroso tê-lo compartilhando passo a passo disso tudo. As páginas aqui são dedicadas a você também, por tantos empurrões e incentivos. Eu amo você.

À minha família, composta por meus tios, primos e agregados. Eu tenho a sorte imensa de ter uma família que lota um salão. Eu não sei falar uma situação da minha vida em que eu não me lembre de tê-los comigo. Por isso, a mulher que eu me tornei é formada por pedaços de vocês! Obrigada aos meus primos irmãos que eu pude acompanhar a vida e concretização de cada sonho tão de perto!! Obrigada por serem tão falantes e festivos e por me alicerçarem em todas as minhas alçadas. Eu não sei o que é uma vida sem uma família gigante e espero não saber, por toda a vida! Amo vocês e agradeço todos os dias pela sorte de ter nascido nessa grande família.

Aos meus amigos. Ah! O que falar de vocês? Eu não tenho como agradecê-los, na verdade. Que me acompanham diariamente nessa minha vida louca. Que cuidam de mim com todas as garras da proteção de irmãos. Ao “Nosso Grupo!”, que sabem me mostrar amor com palavras não tão doces. Que se deslocam alguns km para o meu aniversário ou para me darem uma bronca por uma coisa errada que eu fiz durante esses 4 anos! A vocês, por tantos momentos de alegria e por me mostrarem a força de uma amizade, em cada comemoração quando as coisas deram certo! Ou inconformidade quando deram erradas! Meus irmãos-amigos, muito obrigada!

Aos meus amigos do Lab. Como explicar a minha gratidão em acordar todos os dias para trabalhar feliz por saber que vou encontrá-los? Acordar e saber que independentemente do problema que vai ter pra resolver no laboratório, eu tenho ao meu lado as pessoas mais competentes do mundo e que,

depois, vamos tomar uma pinga na minha mesa pra comemorar o longo dia de trabalho? Acordar todos os dias sabendo que a hora do almoço vai ser o momento de colocar as fofocas em dia e receber a torcida diariamente da sua vida loucamente emocionante? Eu queria agradecê-los e dizer que trabalhar com grandes amigos me faz uma pessoa muito mais feliz, todos os dias!

Aos meus amigos do teatro e aos que vieram com isso. À “Amar, você ama”, mas especialmente à “Segunda Pedra”. Ao processo e tudo o que essa peça trouxe para a minha formação pessoal. Agradecer por eu encontrar pessoas tão dispostas a embarcar em umas oficinas malucas, em dividir os corações, em fazer encontros de madrugada para falarmos sobre os nossos próprios medos e prisões. Crescer, amadurecer e fortalecer-se com pessoas de coração tão grande! Obrigada por tantas madrugadas de aprendizado, por compartilharem a vida comigo e por fazerem alguns planos se tornarem reais.

À minha querida turma do Yoga, que tanto dividiu comigo durante o doutorado! Que dividiu as emoções de tantos amores e de tantas risadas! Eu e o que há de melhor dentro do meu coração saúda e agradece o que há de melhor dentro do coração de vocês! Namastê!

Às minhas amigas do coração de Araraquara, que me viram crescer e torceram por cada conquista ao longo não do doutorado, mas da vida! E que eu torci junto e crescemos! Eu amo vocês! E deixo aqui registrado minha gratidão por vocês mêm darem sobrinhos tão tão amados!

Aos amigos da biomol (e agregados), que independentemente do lugar do mundo que se esconderam, sempre tinham um tempo para uma visita em São Carlos e pra um abraço! Pra me mostrarem o porque eu sinto tanta saudade de vocês!

Aos amigos que me cruzaram a vida, por sorte. Que não foram agrupados por serem únicos!! Aos amigos que conheci nas minhas viagens nesses últimos 4 anos!! Aos meus amores, que me fizeram entender que existe um coração pulsante aqui dentro. Obrigada por tornarem minha vida assim, tão Hilde!

Ao apoio do Grupo de Óptica. Às secretárias, ao LAT, ao LIEPO, ao Evaldo, Leandro e Wanda! Obrigada por todos esses anos de trabalho conjunto!!

Aos amigos que toparam fundar o SPIE Student Chapter e tornar real o projeto “Luz ao Alcance das Mãos – Ensino de Física acessível para Pessoas com Deficiência Visual”.

Ao IFSC, não só por me fornecer infra-estrutura desde a graduação e inspiração. Mas que, ao longo desses anos todos, confiaram em mim em tantos projetos e realizações.

Às meninas da biblioteca do IFSC e ao pessoal do serviço de pós-graduação. Eu não sei o que seria do meu doutorado sem vocês.

Aos órgãos do fomento: CAPES, CNPq e FAPESP por permitirem a realização dessa pesquisa.

À empresa A´doro, por acreditarem em nossa pesquisa, fornecendo todos os ovos gratuitamente.

“- Sei lá. Por que você pensa que ela tem medo de alguma coisa? Ela é adulta, não é? Os adultos e os monstros não têm medo de nada.

- Ah! Os monstros têm medo – disse Lettie – É por isso que são monstros. E os adultos... – Ela parou de falar, coçou o nariz sardento com um dedo. – Vou dizer uma coisa importante para você. Os adultos também não se parecem com adultos por dentro. Por fora, são grandes e desatenciosos e sempre sabem o que estão fazendo. Por dentro, eles se parecem com o que sempre foram. Com o que eram quando tinham a sua idade. A verdade é que não existem adultos. Nenhum, no mundo inteirinho. – Ela pensou por um instante. Então, sorriu. – Tirando a vovó, claro.”

(Neil Gaiman – trecho do livro “O Oceano no fim do caminho”)

RESUMO

BUZZÁ, H. H. *Avaliação da terapia fotodinâmica em um modelo tumoral em membrana corioalantóica*. 2016. 102 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento alternativo de câncer que vem tendo grandes avanços ao longo dos anos e consiste na interação entre luz e uma substância fotossensibilizadora, levando à transformação do oxigênio molecular em oxigênio singlete, altamente reativo e tóxico para a célula. Nesse contexto, o uso do modelo de Membrana Corioalantóica (CAM, do inglês Chorioallantoic Membrane) fornece acesso direto aos vasos sanguíneos, possibilitando o estudo dos efeitos vasculares envolvidos nessa terapia. O desenvolvimento de um tumor nesse ambiente previamente vascularizado permite o estudo e o entendimento dos mecanismos que envolvem o crescimento e destruição do tumor, levando ao aperfeiçoamento de diferentes modalidades terapêuticas. As células tumorais empregadas para o desenvolvimento do tumor podem ser de diversas linhagens e formas de aplicação, desde culturas celulares a biópsias tumorais. O objetivo principal foi investigar a terapia fotodinâmica nos vasos e nas células neoplásicas em um modelo de tumor em CAM. Com esse modelo estudado para células tumorais de melanoma e Ehrlich, foi escolhido trabalhar com tumor de Erlich pela facilidade de manuseio laboratorial. Por meio da microscopia confocal de fluorescência, foi observada a interação entre os vasos sanguíneos e as células tumorais. Com imagens por fluorescência, foi possível entender e quantificar o efeito individualizado dos fotossensibilizadores, incluindo a farmacodinâmica do Photogem[®] e da formação da protoporfirina IX a partir do ALA, tanto com aplicação tópica como intravenosa. A partir disso, o tumor foi irradiado e os efeitos da terapia fotodinâmica foram analisados tanto no tumor quanto nos vasos sanguíneos que o alimentam. Usando ainda a curcumina, um fotossensibilizador derivado do açafrão, que sozinho possui um efeito vascular, foi aplicada a Terapia Fotodinâmica para análise na membrana corioalantóica e efeito nos vasos sanguíneos. O entendimento desse efeito da curcumina permite a ampliação de seu uso como fotossensibilizador no tratamento de câncer e doenças vasculares. Portanto, com o modelo estabelecido foi possível acompanhar os fotossensibilizadores estudados tanto nos vasos sanguíneos e sua ação, como a diferente atuação no ambiente tumoral, causando dano às células do tumor e aos vasos sanguíneos do mesmo ambiente.

Palavras-Chave: Terapia fotodinâmica. Efeito vascular. Membrana corioalantóica. Modelo tumoral. PDT.

ABSTRACT

BUZZÁ, H. H. *Evaluation of Photodynamic Therapy in a tumor model on the chorioallantoic membrane*. 2016. 102 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Photodynamic Therapy (PDT) is a cancer treatment that has had great advances over the years and consists in the interaction between light and a photosensitizer compound, transforming the molecular oxygen in singlet oxygen, highly reactive and toxic to the cell. In this context, the use of Chorioallantoic Membrane (CAM) enables direct access to blood vessels, making possible to study the vascular effects involved in this therapy. The development of a tumor in this environment previously vascularized allows the study and the understanding of mechanisms that involves the growing and the destruction of tumor, improving different therapeutic modalities. The tumor cells used to develop the tumor in this model can be from several lines and ways of application, since cell culture to biopsy of some tumor. The main objective was investigating PDT in blood vessels and neoplastic cells in the tumor model in CAM. With this model studied for melanoma cells and Ehrlich, it was chosen to work with Ehrlich tumor because its facility of laboratory manipulation. After the observation the interaction between blood vessels and tumor cells, with confocal microscopy analysis, it was possible to understand and quantify the individualized effect of photosensitizers, including the pharmacodynamic of Photogem® and the Protoporphyrin IX from Aminolevulinic acid, both topic and intravenous application. From this, the tumor was illuminated and the Photodynamic Therapy effects was analyzed both tumor and blood vessels that feeds it. Still using the curcumin, photosensitizer derivated of saffron which has alone a vascular effect, was applied PDT to analysis on the Chorioallantoic Membrane and the blood vessels effect. The understanding of this effect of curcumin enables the extension of its useful as photosensitizer in the cancer treatment and vascular diseases. Therefore, with the model established, it was possible to follow all PS studying both their action in blood vessels and in the tumor region, causing damage.

Keywords: Photodynamic therapy. Vascular effect. Chorioallantoic membrane. Tumor model. PDT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A penetração da luz no tecido biológico. Diferentes comprimentos de onda com diferentes penetrações da luz, com destaque para a janela biológica.	26
Figura 2 - Interação do fotossensibilizador com a luz e possíveis caminhos – diagrama de Jablonski modificado.....	27
Figura 3 - Estruturas dos fotossensibilizadores utilizados. a) Curcumina. b) Photogem. c) ALA - molécula precursora do FS. d) PpIX.	32
Figura 4 - Espectro de absorvância dos diferentes fotossensibilizadores com especificação dos comprimentos de onda nos picos. a) Photogem. b) PpIX. c) Curcumina.....	33
Figura 5 - Esquema mostrando a rotação do ovo nos ED1 e ED2 de meio ciclo a cada 30 minutos.	41
Figura 6 - Arranjo experimental da aquisição de imagens e iluminação da CAM.....	45
Figura 7 - Metodologia do corte da membrana para colocá-la sobre a lâmina para análise.....	47
Figura 8 - Membrana posicionada no microscópio, mostrando sua posição na lâmina.	48
Figura 9 - Esquema delineando todos os procedimentos experimentais. As análises estão nos quadros coloridos..	50
Figura 10 - Tumor de Ehrlich na membrana corioalantóica. a) Fragmento do tumor sólido colocado sobre a membrana. b) Desenvolvimento a partir da injeção da forma fluida do tumor entre as camadas da CAM.....	52
Figura 11 - Microfotografias do microscópio confocal feitas a partir do tumor desenvolvido na CAM com a forma fluida do tumor de Ehrlich. a) Surgimento de novos vasos a partir do vaso principal. b) A seta aponta para uma região onde novos vasos formados são observados.....	52
Figura 12 - Tumor desenvolvido a partir da introdução de células de melanoma em meio de cultura, após corte da membrana.....	53
Figura 13 - Tumor desenvolvido a partir de fragmento de biópsia de melanoma em camundongo. a) Tumor na CAM. A seta indica a região do tumor. b) Base do tumor, após corte da membrana. A seta indica a invasão dos vasos no tumor.	53
Figura 14 - Microfotografias feitas a partir de células de melanoma murino B16F10 colocadas sobre o modelo de CAM, mostrando a interação das células com os vasos sanguíneos e células do epitélio. a) A membrana, no contorno do vaso sanguíneo. A seta indica a parede do vaso sanguíneo. b) O tumor e o interior do vaso sanguíneo.....	54
Figura 15 – Microfotografia no microscópio confocal mostrando os vasos sanguíneos indicados pela seta interagindo com a massa tumoral.....	55

Figura 16 - Microfotografias do microscópio confocal variando o plano z a cada passo de 20,7 μm em profundidade. As setas indicam o vaso sanguíneo em todos os planos e a interação com o tumor.....	55
Figura 17 - Microfotografia por microscopia óptica não linear com adição de acriflavina, a partir de tumor de Ehrlich. a) Intersecção entre vaso sanguíneo (região preta central) e as células do tumor. b) Células tumorais nos vasos sanguíneos, mostrando íntima interação e possível evidência de metástase.	56
Figura 18 – Outras interações entre células tumorais e a membrana corioalantóica. Neste caso, com células de melanoma. a) Células agrupadas em torno de um vaso principal sem a formação da massa tumoral. b) Tumor não interagindo com os vasos apesar da semelhança com um tumor viável. c) Separação do tumor e vasos sanguíneos, mostrando a cápsula formada ao redor do tumor e nenhuma relação com os vasos sanguíneos. d) Aspecto plastificado da membrana com a introdução do tumor.....	57
Figura 19 – Diferença de coloração entre os tumores de Ehrlich e melanoma, na maioria dos casos. a) Ehrlich. b) Melanoma.....	58
Figura 20 - Histologia da CAM sem tumor. Na figura, M corresponde à Membrana. a) Controle. b) Adição de fotossensibilizador - não mostra alteração nas estruturas.....	59
Figura 21 - Modelo tumoral em CAM, na figura, M corresponde à Membrana e C às Células do modelo tumoral. a) Espessamento da Membrana. b) Células de melanoma com mostra dos melanócitos (pontos escuros). c) Regiões de interação e não interação do tumor e da CAM (seta indicando a região com ausência de interação). d) Aglomerado celular interagindo com a CAM.	60
Figura 22 - Espectro de emissão de fluorescência excitado em 408 nm de: a) PpIX; b) Photogem.	61
Figura 23 - Evidenciação do tumor por fluorescência no modelo de membrana corioalantóica. a) Imagem branca de um tumor na CAM. b) Imagem por fluorescência do mesmo tumor, evidenciando a massa tumoral. c) Imagem branca de outro tumor na CAM, mostrando um tumor mais espalhado ao longo da CAM. d) Imagem por fluorescência mostrando exatamente a localização da massa tumoral.	62
Figura 24 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA tópico.	63
Figura 25 - Gráfico correspondente à fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA tópico ($\tau = 11.53$ horas).....	65
Figura 26 - Derivada da função para ALA tópico sem tumor.	65
Figura 27 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA intravenoso.	66
Figura 28 - Gráfico correspondente à fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA intravenoso.	67

Figura 29 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência nos vasos e no tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA tópico.....	68
Figura 30 - Gráfico correspondente à fluorescência nos vasos e tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA tópico.....	69
Figura 31 - Derivada da função de produção da PpIX com aplicação de ALA tópico. a) em toda a região ($\tau = 6,7$ horas). b) Apenas no tumor ($\tau = 8,1$ horas).....	70
Figura 32 - Imagens no microscópio confocal da região de vasos sanguíneos e tumor 24 horas após aplicação tópica de ALA. a) região do vaso sanguíneo com células ao redor mostrando presença de fluorescência vermelha. b) vaso sanguíneo ao lado de um aglomerado de células também fluorescendo em vermelho.	70
Figura 33 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência nos vasos e no tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA intravenoso.	71
Figura 34 - Gráfico correspondente à fluorescência nos vasos e tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA® intravenoso.	72
Figura 35 - Acompanhamento da fluorescência da PpIX ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico.....	73
Figura 36 - Gráfico correspondente à fluorescência ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico.....	74
Figura 37 – Acompanhamento da PpIX por fluorescência nos vasos e no tumor ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico. A seta indica a região do tumor.....	75
Figura 38 - Gráfico correspondente à fluorescência nos vasos e tumor ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico.....	75
Figura 39 – Photogem® retido na região do tumor 1 hora depois da aplicação tópica.....	76
Figura 40 - Acompanhamento da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com aplicação de ALA tópico.....	78
Figura 41 - Gráfico da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com aplicação de ALA tópico. A linha vertical vermelha corresponde ao instante da iluminação.....	78
Figura 42 – Regiões separadas do gráfico 24. a) I - Entre 0h e 4h; b) II- Entre 4h e 7h; c) III- Entre 7h e 48h.....	79
Figura 43 - Imagem branca ao longo do tempo dos vasos e do tumor após aplicação da TFD com ALA tópico.....	80
Figura 44 - Comparação entre os tipos de imagem. a) Imagem Branca. b) Imagem por fluorescência. c) Microfotografia por microscopia confocal priorizando canal entre 600-700 nm. d) Microfotografia por microscopia confocal priorizando canal entre 400-500	

nm. e) Microfotografia por microscopia confocal com ambos os canais e adição de acriflavina.....	81
Figura 45 - Microfotografua por microscopia confocal no canal de emissão entre 600 - 700 nm para PpIX. a) controle, sem FS. b) 4 horas após aplicação do ALA. c) 2 horas após iluminação. d) 24 horas após iluminação.	82
Figura 46 - Acompanhamento da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor após aplicação da terapia fotodinâmica, com uso de Photogem® tópico.....	83
Figura 47 - Gráfico da fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de Photogem® tópico. A linha vertical vermelha corresponde ao instante da iluminação.	84
Figura 48 - Microfotografia por microscopia confocal no canal de emissão entre 600 - 700 nm para Photogem®. a) controle, sem FS. b) 4 horas após aplicação do Photogem®. c) 2 horas após iluminação. d) 24 horas após iluminação.	84
Figura 49 - Destruição dos vasos sanguíneos pós TFD. a) Quebra do vaso sanguíneo. b) Redução do diâmetro vascular. As setas indicam a região de dano vascular.	85
Figura 50 - Histologia da CAM e tumor após TFD com uso de Photogem. Na figura, M corresponde à Membrana e C às Células. a) Perda das estruturas da CAM. b) Ausência dos núcleos celulares definidos. c) Destruição da CAM. d) Redução dos núcleos celulares.....	86
Figura 51 - Acompanhamento com imagem de luz branca nos vasos e no tumor contaminado com fungo ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de ALA tópico.....	87
Figura 52 - Acompanhamento da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor contaminado com fungo ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de ALA tópico.	87
Figura 53 - Gráfico da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor contaminado com fungo ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de ALA tópico. A linha vertical verde corresponde ao instante da iluminação.	88
Figura 54 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo só curcumina com concentração 0,1 mM/cm ² . As setas indicam um exemplo de vaso que sofreu ação vascular e teve redução de seu calibre ao longo do tempo.	89
Figura 55 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo só curcumina com concentração 10 mM/cm ² . As setas indicam dois vasos que sofreram ação vascular e tiveram redução de seu calibre ao longo do tempo.	90
Figura 56 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo curcumina com concentração 0,1 mM/cm ² + luz.	91

Figura 57 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo curcumina com concentração 10 mM/cm ² + luz.....	92
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Câncer	21
1.2	Vascularização Sanguínea do Tumor	22
1.3	Terapia Fotodinâmica	23
1.4	Fundamentos da TFD	24
1.5	Interação Luz-Matéria e Mecanismos de Ação da TFD	26
1.6	Efeito Vascular da Terapia Fotodinâmica	28
1.7	Fotossensibilizadores	30
1.8	Modelo de Membrana Corioalantóica	34
1.9	Modelo Tumoral em CAM	35
1.10	Diagnóstico por Fluorescência	36
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Modelo de Membrana Corioalantóica	41
3.2	Cultura de células – melanoma	42
3.3	Tumor de Ehrlich	42
3.4	Introdução do tumor no modelo de CAM	43
3.5	Fotossensibilizadores – Acompanhamento por fluorescência	44
3.6	Aquisição das Imagens	44
3.7	Quantificação da Fluorescência	45
3.8	Terapia Fotodinâmica no Modelo Tumoral	46
3.9	Preparação da Amostra para Análise no Microscópio	47
3.10	Efeito Vascular da Terapia Fotodinâmica com o uso de Curcumina	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	O Modelo Tumoral	51
4.2	Acompanhando o Fotossensibilizador – Análise por Fluorescência	60
4.2.1	Produção da PpIX – Vasos Sanguíneos	62
4.2.2	Produção da PpIX - Modelo Tumoral	67
4.2.3	Photogem® - Vasos Sanguíneos	72
4.2.4	Photogem® - Modelo Tumoral	74
4.3	Terapia Fotodinâmica no Modelo Tumoral	77
4.4	Efeito Vascular da Curcumina com Terapia Fotodinâmica	88
5	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado para mais de cem tipos de doenças que possuem em comum a perda da capacidade de diferenciação celular e o crescimento desordenado de células e que podem formar neoplasias, como é o caso dos tumores. (1) O câncer pode atingir várias regiões do corpo, uma vez que ele é formado por diferentes células, em diferentes tecidos. Além disso, as células cancerígenas possuem a capacidade de atravessar barreiras teciduais, vasos sanguíneos e sistema linfático para se instalarem em outros tecidos do corpo, sendo esse processo chamado de metástase, quando o ciclo de proliferação celular recomeça em outra região, com graves consequências para o estado clínico do paciente. (2-3)

O câncer é um dos grandes problemas da saúde pública mundial visto que, por ano, são diagnosticadas mais de 12,5 milhões de pessoas no mundo com essa doença, sendo que 7,6 milhões morrem vítimas dela. Só no Brasil, são esperados quase 600 mil novos casos para o ano de 2016 e estima-se que, no ano de 2030, serão 26 milhões de novos casos no mundo, com 17 milhões de morte por ano. Além desses números preocupantes, a economia global tem um ônus com mortes prematuras e invalidez com a doença de cerca de um trilhão de dólares, já descontados os gastos médicos. No Brasil, o câncer é responsável por 190 mil óbitos por ano, caracterizando a segunda maior causa de mortes no país. Em 2007, os investimentos brasileiros para o diagnóstico e tratamento do câncer foram de R\$ 1,4 bilhão, além daqueles direcionados às ações e programas de controle da doença. (4)

Vários fatores influenciam na incidência do câncer. Um destes fatores é o envelhecimento; por isso, quanto maior a expectativa de vida da população, maior a sua incidência, fazendo dela uma doença importante dos tempos modernos, em que a expectativa média de vida da população mundial tem aumentado. A predisposição genética é um dos principais fatores que podem influenciar a origem destas lesões, embora os hábitos da população influenciem e agravem a situação, como o tabagismo, o consumo de álcool, o sedentarismo e a conseqüente obesidade, além do item incluído mais recentemente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre os fatores de alto risco: o consumo de carnes processadas (lingüiça, salsicha, embutidos em geral). Há ainda fatores ambientais que influenciam na incidência do câncer, como, por exemplo, a exposição excessiva ao sol e a fontes de radiação ionizante. (4-5)

Portanto, a realização de campanhas de prevenção, o diagnóstico precoce e o controle dessas neoplasias estão entre as grandes preocupações políticas e científicas do mundo, e o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas além do aperfeiçoamento das técnicas já existentes são grandes desafios da atualidade.

1.2 Vascularização Sanguínea do Tumor

Para que células normais se transformem em células neoplásicas e, portanto, com ausência de controle no processo de divisão celular, é preciso acontecer alterações oncogênicas, caracterizadas por mutações nos genes relacionados ao ciclo celular. Entretanto, apenas essas alterações não são suficientes para que se forme um tumor com volume considerável, uma vez que para isso é necessário que essas células recebam nutrientes do organismo.

A nutrição do tumor acontece através do fornecimento de um suprimento sanguíneo abundante devido à presença de uma vascularização intrínseca, essencial para que o tumor cresça mais do que poucos milímetros. Essa rede vascular é formada por microvasos desenvolvidos a partir de células endoteliais proeminentes de capilares situados na região adjacente às células neoplásicas. (6)

Este processo de formação de novos vasos é chamado angiogênese, e é fundamental em processos normais do organismo, como o desenvolvimento dos embriões ou a cicatrização de feridas. Além disso, esse processo está envolvido em processos patológicos, como inflamações, respostas do sistema imune, e o próprio desenvolvimento de neoplasias. Nestes casos, o surgimento de vasos sanguíneos nas imediações do tumor é indicativo de que a presença de células neoplásicas provoca um estímulo local para o crescimento das células endoteliais que formarão os vasos, posto que isso é observado apenas na região do tecido tumoral. (7)

A relação entre vascularização e o câncer foi descrito por Folkman que, em 1971, sugeriu uma possível linha de pesquisa em tratamento de câncer através da supressão da angiogênese para impedir diretamente o crescimento do tumor. (8-9)

A neovascularização do tecido é dependente de diversos fatores que irão estimular a angiogênese, tais como a condição de hipóxia ou a elevação dos níveis locais de CO₂. (10) Esses fatores desencadeiam a produção de proteínas específicas relacionadas à formação dos vasos sanguíneos. Uma das principais proteínas associadas à angiogênese é chamada de fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*), que

estimula não só a formação dos fibroblastos normais, mas contribui com sua transformação em fibroblastos neoplásicos. Outra proteína importante relacionada a esse processo é aquela denominada fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), que se tornou o alvo terapêutico do primeiro quimiofármaco com ação exclusivamente antiangiogênica aprovada para aplicação clínica. (7,11)

Outras proteínas, tais como a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), relacionada com resposta inflamatória do tecido e a angiopoietin-2, também são envolvidas com o crescimento vascular. Existem ainda os inibidores da angiogênese relacionados às neoplasias, como a angiostatina, endostatina e heparinas. O entendimento sobre estas proteínas ajuda na elucidação do processo de crescimento tumoral, e pode contribuir com a identificação de inibidores com ação específica de uso terapêutico. (7,12)

Além da nutrição do tumor, a angiogênese tem uma importante participação no processo de metástase, processo pelo qual células neoplásicas são capazes de migrar para sítios diferentes no organismo, alocando-se em outras porções do mesmo tecido ou em outros tecidos e permitindo recidivas tumorais. A angiogênese pode facilitar essa migração de células para outras regiões do corpo por meio da circulação sanguínea, e um indicativo evidente disso é a observação da forte relação entre a densidade de vasos sanguíneos e o risco metastático. (6)

Uma técnica de tratamento mais efetiva, portanto, envolve não só a destruição das células tumorais diretamente, mas também o bloqueio da neovascularização, ou mesmo a destruição da vascularização já existente. (13) Para isso, o entendimento das características da interação entre o tumor e os vasos sanguíneos e de seu comportamento diante das terapias propostas pode contribuir para a eficácia dos tratamentos oferecidos à população, e mesmo para o surgimento de novas propostas terapêuticas. (14)

1.3 Terapia Fotodinâmica

A busca por modalidades terapêuticas alternativas àquelas usadas tradicionalmente no combate ao câncer, como a quimioterapia, a radioterapia ou a ressecção cirúrgica, é uma necessidade para a descoberta de novas soluções, quando as opções existentes são consideradas ineficientes ou descartadas frente à relação custo-benefício entre eficácia e efeitos colaterais indesejados.

Uma técnica que vem sendo cada vez mais aceita no tratamento de diversas doenças como artrite reumatóide, psoríase e infecções causadas por diversos micro-organismos, mas

que atualmente tem se consagrado no tratamento de tumores é a chamada Terapia Fotodinâmica (TFD) ou PDT (do inglês, *Photodynamic Therapy*). Seu mecanismo de ação envolve a interação de três elementos: luz em um comprimento de onda adequado, um composto fotossensível (ou fotossensibilizador) e a presença do oxigênio molecular. Essa interação resulta em reações foto-físico-químicas que geram espécies reativas com alto poder de oxidação dos componentes celulares, levando à inviabilização da célula. Com isso, a TFD tem a grande vantagem de ser uma terapia localizada, seletiva (principalmente pela foto-oxidação do sensibilizador) e de gerar mínimos efeitos colaterais.(15–20)

Sendo uma técnica com um princípio simples, a TFD apresenta características atrativas para o uso em condições de baixo investimento, pois não demanda internação ou infraestrutura de grande porte, apresentando possibilidade de tratamento ambulatorial e de curta duração, sendo uma possibilidade para a redução de filas para cirurgias e menores deslocamentos do paciente. Este tipo de vantagem torna a TFD uma grande opção, que tem inclusive gerado interesse no que diz respeito às políticas públicas na área da saúde. Este interesse tem se manifestado no Brasil na forma de financiamentos tanto de projetos de pesquisa básica para o desenvolvimento da dosimetria e dos protocolos clínicos de TFD, quanto em projetos multicêntricos (no Brasil e no exterior) para a difusão e estabelecimento da TFD como possibilidade terapêutica. (21-22)

1.4 Fundamentos da TFD

As primeiras observações sobre o uso de corantes e luz foram feitas entre 1897 e 1898 por Raab, quando foi observada a morte de protozoários na presença de luz e acridina. Porém, apesar de diversos testes em humanos e animais, o advento da penicilina como antibiótico acabou deixando o interesse nas observações de Raab em segundo plano até por volta de 1975, quando Dougherty e colaboradores passaram a pensar na TFD como possibilidade de tratamento tumoral; como consequência desse interesse, neste ano a TFD teve o primeiro caso relatado de cura completa de tumor em modelo animal com o uso de um fotossensibilizador derivado de hematoporfirina e luz vermelha. Em 1976, teve-se o primeiro caso de estudos em humanos para câncer de bexiga e, desde então, os avanços para a técnica tem sido cada vez maiores tanto no entendimento dos fenômenos envolvidos quanto no estabelecimento e aperfeiçoamento de protocolos clínicos.(19,23–26)

Desde pesquisas *in vitro* até as aplicações em hospitais, o entendimento da interação desses três elementos (luz, FS e O₂) entre si e com o tecido biológico é de fundamental

importância para a melhoria da técnica. É preciso, por exemplo, levar em consideração a penetração da luz no tecido que será tratado e qual a aplicação proposta. Para TFD, a luz utilizada tem sido aquela na região do espectro eletromagnético cuja energia dos fótons seja capaz de promover transições eletrônicas dentro de um intervalo no qual não se chegue à ionização (que ocorre para comprimentos de onda no ultravioleta e abaixo), mas acima da região exclusivamente vibracional (infravermelho médio e acima). Assim, as aplicações da TFD usam luz essencialmente no intervalo visível (400-750 nm) até o infravermelho próximo (acima de 750 nm até 3000 nm).

Mesmo no visível, luz em menores comprimentos de onda tem pouca penetração no tecido, o que limita seu uso muitas vezes a tratamentos superficiais, enquanto luz em maiores comprimentos de onda apresentam maior penetração, e é preferida para tratamentos que visem regiões mais profundas. Essa região do espectro que apresenta maior penetração no tecido biológico corresponde à região em que há menor absorção para as moléculas biológicas (tais como a hemoglobina - Hb, a oxi-hemoglobina - HbO₂, a melanina e a água), e é chamada de “janela biológica” e está entre a região do vermelho (600 nm) e do infra-vermelho próximo—representada na Figura 1. (23,25)

Por um lado, as moléculas biológicas absorvem muito na região violeta-azul do espectro (começo do visível); por outro, o tecido biológico apresenta grandes quantidades de água, e por isso absorção crescente em direção dos maiores comprimentos de onda na região do infravermelho próximo. Por isso, essa janela acontece no intervalo em que as moléculas apresentam absorção reduzida no visível, limitadas pela absorção da água (aproximadamente entre 600-1200 nm), permitindo que a luz penetre no tecido, possibilitando o tratamento de tumores mais volumosos.

Assim, os fotossensibilizadores devem ter espectros de absorção que coincidam com a região espectral da luz com menor atenuação, seja ela para aplicações superficiais ou tumores volumosos, uma vez que a luz precisa chegar com intensidade suficiente para desencadear a ação fotodinâmica. (23,27)

Os estudos em dosimetria são fundamentais para efetividade da terapia, uma vez que são necessárias doses mínimas dos três elementos da PDT e envolvem a distribuição da luz pelo tecido, o aporte e o consumo de oxigênio no tecido durante a TFD - elemento diretamente ligado à vascularização - e a variação da concentração do FS. Esse último leva em conta a dinâmica cinética do FS e o tempo necessário para que haja concentração suficiente no tecido alvo.(28–30)

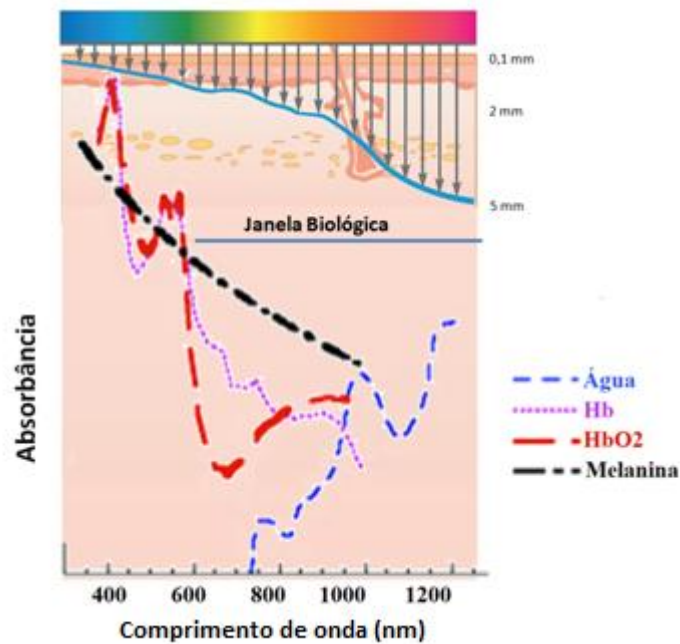


Figura 1 - A penetração da luz no tecido biológico. Diferentes comprimentos de onda com diferentes penetrações da luz, com destaque para a janela biológica.

Fonte: Adaptada de DEMEO (31) e COLTER (32).

1.5 Interação Luz-Matéria e Mecanismos de Ação da TFD

Quando o fotossensibilizador absorve a luz, essa molécula vai para um estado eletronicamente excitado e o elétron decai rapidamente para o menor nível eletrônico do estado excitado (S_1) (fenômeno denominado *conversão interna*). O diagrama de Jablonski simplificado da Figura 2 ilustra o que pode acontecer com essa molécula a partir desse estado. Quando ela retorna diretamente para o estado fundamental, ela pode sofrer relaxação vibracional, transferir energia para outras moléculas, ou emitir uma fluorescência característica, esta última cuja detecção é um dos princípios usados no diagnóstico óptico. A TFD, porém, acontece quando a relaxação, em vez de assumir uma destas vias, leva a um estado tripleto metaestável; esta é uma transição “proibida” (ou seja, de baixa probabilidade) pelas regras de seleção da Mecânica Quântica, que ocorre nestes casos por meio de um processo denominado *cruzamento inter-sistema*, que consiste numa conversão de orientação do *spin* eletrônico durante a relaxação; a partir daí, o processo dá origem a dois mecanismos principais de reação. (15–19)

1.6 Efeito Vascular da Terapia Fotodinâmica

O dano da TFD pode iniciar uma ou mais vias de resposta dependendo do alvo celular que ela atingir. Quando aplicada no tratamento de câncer, a TFD pode levar diretamente a efeitos citotóxicos no tumor, mas também pode agir causando dano à microvasculatura dos tecidos ou ainda à modificação do sistema imunológico, mediado pelos mesmos mecanismos de dano provocado às células tumorais. O dano vascular leva rapidamente à estagnação do fluxo de sangue pouco depois do início da aplicação da luz. Entretanto, o fluxo sanguíneo é o principal meio de entrega de oxigênio e nutrientes para todos os tecidos do corpo e, portanto, modificações na rede vascular podem levar à hipóxia tecidual, falta de nutrientes e, eventualmente, à morte das células tumorais. (35)

Como o oxigênio é um dos elementos fundamentais para que a TFD aconteça, quando o dano vascular ocorre de forma aguda durante a iluminação, pode haver uma limitação na eficácia do tratamento, já que haverá supressão desse elemento. O efeito vascular controlado da TFD, portanto, é de fundamental importância para a eficiência da técnica. (36) Esta característica é tão relevante que, pelo mesmo motivo, evita-se inclusive o uso de substâncias vasoconstritoras para controle da dor em aplicações de TFD, pois a vasoconstrição induzida pode modificar os resultados do tratamento.

Tratamento com doses (densidade superficial de energia entregue) muito baixas de luz em TFD não reduz a extensão do dano vascular, sugerindo que os danos à microvasculatura são cumulativos durante o tratamento. O potencial do dano vascular da TFD já é estabelecido na literatura (37–40), com, por exemplo, a observação de formação de trombose de plaquetas, oclusão microvascular, e isquemia tecidual após a iluminação do tecido fotossensibilizado, mostrando que estas alterações vasculares são as responsáveis pela necrose do tecido tratado. (41-42)

Há, entretanto, diferença entre a resposta vascular de um tecido normal e da microvasculatura tumoral, uma vez que esta última se mostra sempre mais sensível aos efeitos da luz, com redução das taxas de fluxo sanguíneo durante e após a TFD. (43) Pelo rápido crescimento da rede vascular tumoral, o endotélio apresenta maiores imperfeições, tornando-se mais sensível à reação fotodinâmica.

A estagnação do fluxo sanguíneo induzindo efeitos citotóxicos no tumor foi demonstrada como uma consequência de mecanismos secundários, incluindo o dano vascular, e não da morte celular direta durante o tratamento. A morte do tumor, portanto, depende

também do dano tanto nos vasos sanguíneos que alimentam o tumor diretamente quanto em uma margem do tecido normal circundante.

Assim, vários componentes vasculares podem ser alvos primários da TFD, e as células endoteliais estão entre as principais moléculas de interesse. Isso acontece, pois, apesar dos mecanismos da TFD aplicados às células endoteliais ainda não serem completamente compreendidos, há evidências de uma maior sensibilidade ao dano fotodinâmico por parte destas células quando comparadas às linhagens como células musculares ou fibroblastos. Isso se deve ao fato de que tais células formam as paredes do vaso e estão diretamente relacionadas à quantidade de fotossensibilizador absorvida por esses tecidos. Esta característica explica a maior ação da TFD em vasos relacionados aos tumores para determinados fotossensibilizadores (como os derivados de hematoporfirina), uma vez que estes são encontrados em maior quantidade nos vasos tumorais quando comparados aos vasos de tecido normais. (43)

Logo, há uma consequência significativa do efeito da TFD sobre as células endoteliais, suficiente para ativar as plaquetas e leucócitos polimorfonucleares, que resulta em uma resposta trombogênica que corresponde à obstrução ou colapso dos vasos sanguíneos. A observação de dano às plaquetas implica na existência de dano aos vasos sanguíneos, podendo resultar na redução do fluxo sanguíneo, já que plaquetas tratadas com TFD perdem a capacidade de induzir a formação de coágulos ou agregação, formando trombos nas paredes dos vasos.(44)

Leucócitos polimorfonucleares estão em contato através do colágeno com o endotélio vascular de tecidos normais durante e após a TFD, o que pode ser uma evidência de eventos associados à terapia naquele tecido, tais como derrame vascular ou efeitos imunológicos. Quando observada a microvascularização do tumor exposto à TFD, essa reação é aparentemente ausente, sugerindo que as alterações vasculares agudas em vasos tumorais não estão relacionadas com a aderência de leucócitos.(39)

Danos ao longo do endotélio vascular ou às plaquetas levam a uma série de respostas fisiológicas, como a liberação de vasoconstritores, reposita da cascata de coagulação, e diminuição do fluxo sanguíneo. A liberação de compostos com atividade vascular é diretamente associada com a TFD, o que incluem eicosanóides, citocinas, fatores de coagulação e histamina. Alguns estudos que analisam a liberação de citocinas após TFD mostram que estes agentes desempenham, provavelmente, um papel significativo na resposta do tumor e na inflamação dos tecidos após o tratamento.(39,43,45)

A utilização de microscopia *in vivo* em vários modelos animais permite a visualização do fluxo de sangue em arteríolas, capilares, e vênulas durante e após a TFD, e é possível medir com exatidão alterações no diâmetro dos vasos, a velocidade do fluxo sanguíneo e a quantidade de macromoléculas liberadas. Com o avanço da microscopia confocal, essas medidas de constrição vascular podem vir a ser mais bem avaliadas com a aplicação da TFD.

Mesmo quando há a ausência de dano vascular durante a TFD, são observadas reduções nas taxas de fluxo sanguíneo, isquemia tecidual e hipóxia depois de algumas horas após a iluminação. Os mecanismos após a terapia que levam aos danos vasculares não são completamente compreendidos, mas podem ser relacionados à degradação de células endoteliais ou à pressão mecânica sobre os vasos, causada por um edema do tecido, ambos resultados da TFD.(46)

Um dos eventos que pode levar à estagnação do fluxo sanguíneo durante a TFD é o dano endotelial, causado pela produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas resultantes da excitação dos fotossensibilizadores. Esse dano às células endoteliais provoca um rearranjo da estrutura do citoesqueleto celular, resultando na perda de junções entre as células e no seu resultante arredondamento. Estes efeitos podem ocorrer mesmo com doses de fotossensibilizador e de luz bem menores que as suficientes para matar ou inativar células.

O dano causado diretamente às plaquetas durante a TFD pode ser o responsável por uma via alternativa para ativação plaquetária, com a liberação de substâncias de agregação de células sanguíneas. (43)

A combinação de constrição dos vasos, a agregação de plaquetas (e consequente formação de trombose) e o aumento da pressão intersticial sanguínea resultam na estagnação do fluxo de sangue e, conseqüentemente, na hipóxia tecidual. Esta última, por sua vez, é uma condição necessária para a regressão do tumor em modelos animais diversos, já que limita o metabolismo tumoral, e deve ser completamente entendida para a aplicação da TFD com o uso de muitos fotossensibilizadores. O entendimento dos processos que ocorrem junto aos vasos que alimentam o tumor e de como eles afetam o tecido tumoral, quando utilizados diferentes fotossensibilizadores e parâmetros de iluminação, constituem o grande desafio deste estudo, que visa um maior entendimento dos mecanismos da TFD.

1.7 Fotossensibilizadores

Nas últimas décadas, vários grupos de pesquisa dedicados à TFD vêm buscando FS mais eficientes. Por “eficiente”, entende-se FS com menor toxicidade no escuro, maior

eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio, maior capacidade de penetração na membrana celular e maior velocidade de eliminação pelo organismo após o tratamento. Além disso, para a seletividade da técnica, o FS ideal também deve se concentrar preferencialmente em células alteradas em detrimento de células saudáveis, sejam elas tumorais, displasias ou micro-organismos. (47–51)

Modificações químicas e estruturais em substâncias fotossensíveis buscando maximizar sua atividade geraram inúmeros compostos, tais como derivados de porfirina, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas, dentre outros, que vêm sendo aplicados com eficácia no uso da terapia fotodinâmica. Há, hoje, um conjunto de moléculas eficientes, mas que ainda necessitam encontrar veículos para uma aplicação mais específica justamente por necessidade da elucidação desses mecanismos de atuação, ou que precisam melhorar em termos de toxicidade e capacidade de ativação em comprimentos de onda de maior interesse. (49,51-52)

Um exemplo desses compostos é a curcumina, um dos curcuminóides naturalmente extraídos do açafrão (*Curcuma longa*), um tubérculo indiano usado como condimento alimentar. Testes clínicos e pré-clínicos têm mostrado o potencial desta substância como FS para, por exemplo, controle microbiológico e, particularmente, no tratamento de oncomicoses. (53–55) Além da sua ação fotodinâmica, diversos estudos *in vivo* e *in vitro* vem demonstrando seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos, ação em infecções de micro-organismos e com atividade quimio-preventiva, além de resultados positivos no tratamento de obesidade e diabetes. (56–62) Esses estudos colocam a curcumina como uma molécula promissora com grande potencial para aplicação no tratamento de várias doenças.

Os derivados de hematoporfirina aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e a agência norte-americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), como é o caso do Photofrin[®] e do Photogem[®], já são utilizados na clínica. O Photogem[®], particularmente, foi o primeiro fotossensibilizador aprovado para ser testado no Brasil, em testes de Terapia Fotodinâmica clínica, pelo Grupo de Óptica, em 1998, em parceria com cirurgiões de cabeça e pescoço do Hospital Amaral Carvalho em Jahu/SP. O Photogem[®] é formado por uma mistura de oligômeros com tamanhos diversos, e tem maior efetividade quando aplicados por via intravenosa, uma vez que, por ser composto por moléculas grandes, apresenta maior dificuldade em atravessar as barreiras celulares. Por conta dessa via de aplicação, pode causar diversos efeitos colaterais, mas a fotossensibilidade temporária (entre 4 a 6 semanas, conforme as doses) de todo o organismo é considerado o principal (e basicamente o único) efeito adverso.

Outra porfirina importante, com estrutura semelhante à das moléculas do Photogem[®], é a Protoporfirina IX (PpIX), um fotossensibilizador endógeno. Isso significa que as células, naturalmente, produzem esse composto em uma de suas rotas sintéticas. Por isso, a indústria farmacêutica tem investido nos chamados pró-fármacos, como é o caso do ácido aminolevulínico (ALA), base da síntese de PpIX nas mitocôndrias, ao longo da rota sintética do grupo heme. Esses pró-fármacos não possuem atividade fotodinâmica, sendo, em geral, moléculas pequenas com alta eficiência de penetração, o que permite o uso de aplicação tópica. Dentro das células, eles desencadeiam a produção do fotossensibilizador. Por ser um processo celular, essa conversão do pró-fármaco para o FS acontece, inclusive, em células viáveis, e quase não possui efeitos colaterais, uma vez que é endógena ao organismo e, portanto, permite múltiplas sessões de tratamento. Atualmente, o ALA é aprovado em diversos países do mundo para aplicação clínica em tratamentos usando terapia fotodinâmica, desde estética até tratamento de lesões neoplásicas superficiais, e de fato tem sido o FS mais utilizado nos últimos anos. (22,63–67)

As estruturas químicas da curcumina, do Photogem[®], do ALA e da PpIX estão apresentadas na Figura 3.

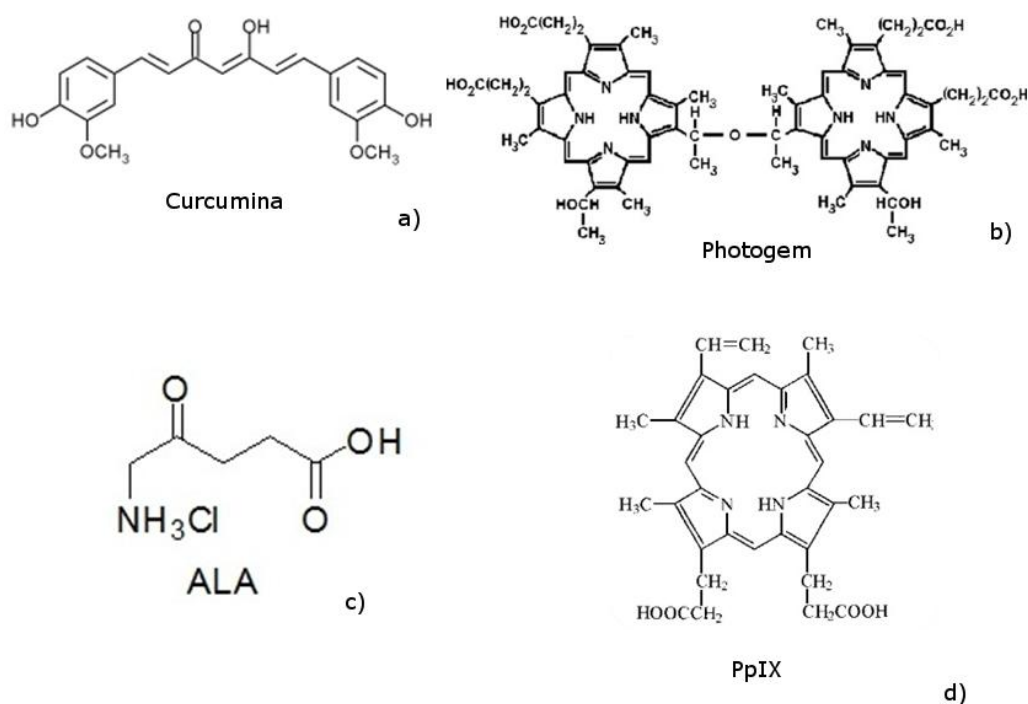


Figura 3 - Estruturas dos fotossensibilizadores utilizados. a) Curcumina. b) Photogem. c) ALA - molécula precursora do FS. d) PpIX.

Fonte: a) Adaptada de SILVA (53); b) Adaptada de BUZZÁ (20); c) e d) Adaptada de INADA (49);

Os espectros de absorção do Photogem[®], da PpIX e da curcumina são apresentados na Figura 4, respectivamente. Apesar de a maior absorção ocorrer na região do azul para todos

eles, há picos de absorção perto dos 630 nm para os dois primeiros compostos, o que possibilita sua aplicação em tumores mais volumosos, abrindo a possibilidade de aplicação em ambos os comprimentos de onda de acordo com a aplicação clínica. Isso já não é observado para a curcumina, o que limita sua aplicação para tratamento de lesões ou contaminações superficiais, devido à pequena penetração média da luz azul no tecido biológico. A exploração adequada do espectro de absorção de um FS é fundamental para aplicação da TFD, uma vez que é preciso usar um comprimento de onda que seja absorvido pelo fotossensibilizador, com a garantia de ter um volume tecidual mínimo irradiado. (68-69)

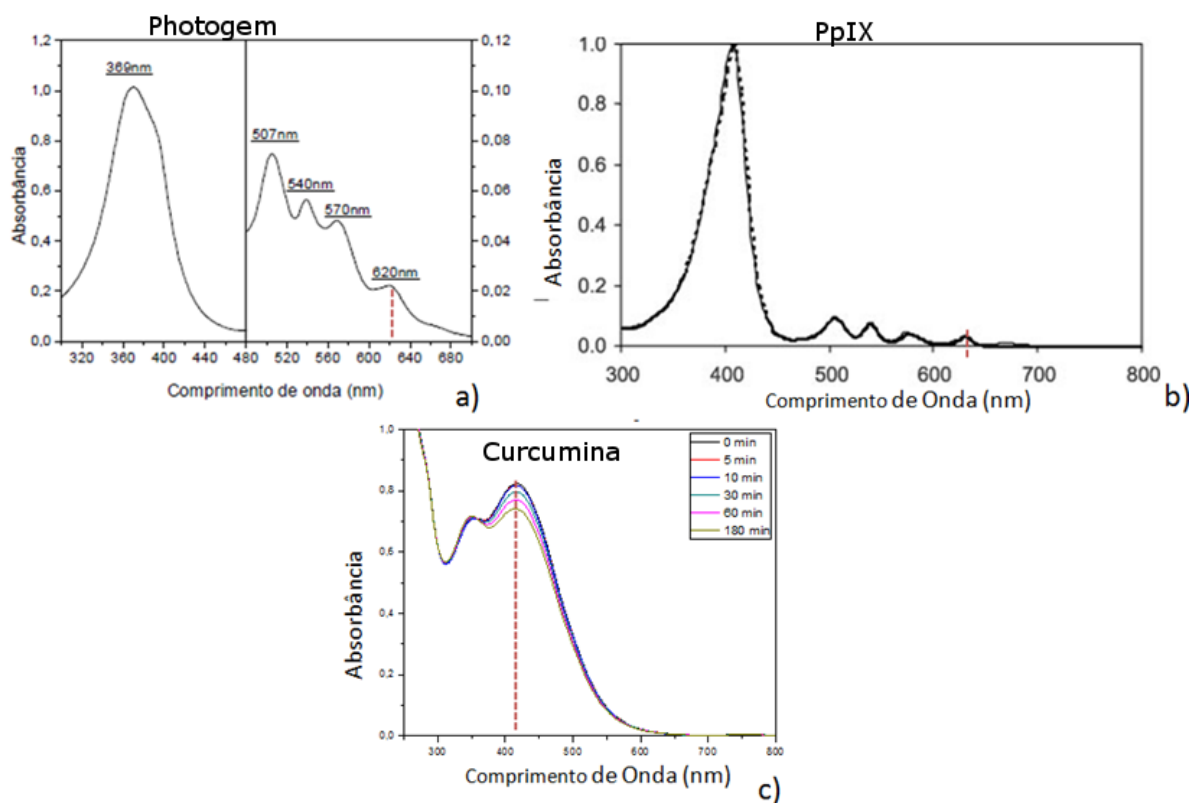


Figura 4 - Espectro de absorbância dos diferentes fotossensibilizadores com especificação dos comprimentos de onda nos picos. a) Photogem. b) PpIX. c) Curcumina.

Fonte: a) Adaptada de BONINI (70); b) Elaborada pela autora; c) Adaptada de SILVA (53).

Dosando corretamente os parâmetros da reação fotodinâmica, pode-se causar a morte do tumor e das células dos vasos que o alimentam. Entretanto, a destruição das células endoteliais dos vasos compromete, direta e consequentemente, o suprimento de oxigênio no tumor. Na ausência de oxigênio, o efeito da TFD é praticamente inexistente, uma vez que ele é um dos elementos fundamentais na ação da técnica, já que media praticamente todo o dano induzido pelas reações tipo I e II. Além disso, determinados comprimentos de onda tem efeitos de fotoestimulação tecidual e, portanto, quando a luz é aplicada ao tecido, mas não

provoca a ação fotodinâmica, pode estimular o crescimento tumoral. Somado ao fato de a isquemia induzida por dano vascular não garantir a hipóxia para todas as células do tumor, devido a vários fatores como a perfusão de oxigênio ou a presença de vasos periféricos de suporte, a dosagem dos três elementos da TFD é fundamental para garantir a morte tumoral. É necessário, portanto, entender claramente como se dá a destruição dos vasos sanguíneos pela TFD e qual a relação com a destruição do tumor, avaliando o resultado para que esse efeito seja somado positivamente no combate ao câncer e não se torne prejudicial para a eficácia da terapia (32).

1.8 Modelo de Membrana Corioalantóica

Dadas as condições que os efeitos vasculares imprimem às lesões tumorais e ao seu tratamento, um modelo que permita o estudo individualizado do efeito vascular de terapias e compostos se torna uma importante ferramenta no entendimento e aperfeiçoamento de tratamentos aplicados ao câncer. A membrana corioalantóica de ovos de galinha, conhecido como CAM (do inglês, *ChorioAllantoic Membrane*) é formada no quarto dia de desenvolvimento do embrião e é obtida pela fusão do cório e do alantóide, (71) se tornando responsável pelas trocas gasosas do ovo. Por ser altamente vascularizada, é, provavelmente, o modelo mais utilizado para o estudo do fenômeno da angiogênese e da atividade de compostos e medicamentos no endotélio vascular. A CAM é um modelo bem estabelecido, que permite um acesso facilitado aos vasos sanguíneos e ao embrião, além de ser um método simples, barato e de fácil instalação em ambiente laboratorial. (72–75)

Esse modelo *in ovo* é considerado intermediário entre os modelos *in vitro* e *in vivo*, (76) com a vantagem de possibilitar um estudo mais complexo da angiogênese e do efeito vascular quando comparado aos estudos *in vitro* dado o desenvolvimento de tecidos, mas que possibilita um estudo mais controlado quando comparado aos estudos *in vivo*, uma vez que se dá num ambiente praticamente isolado, reduzindo a influência de órgãos do corpo, de microambientes específicos e de moléculas resultantes de processos metabólicos do organismo.(73)

O modelo animal, apesar de apresentar a resposta global de um organismo ao tratamento de doenças como o câncer, não permite o estudo de mecanismos das terapias, incluindo a terapia fotodinâmica, de forma isolada de outros fatores, uma vez que diversos efeitos colaterais induzidos pela terapia ou pelas condições criadas para mimetizá-la ou ainda mecanismos de defesa podem atrapalhar a análise da resposta em estruturas individualizadas.

A CAM tem, ainda, a vantagem de não envolver dor animal, uma vez que os receptores de dor do embrião só são produzidos a partir do seu 14º dia de desenvolvimento. Portanto, fazendo o planejamento experimental de modo a não ultrapassar esse dia, têm-se um modelo considerado alternativo ao uso de animais, por não causar qualquer sofrimento ao embrião. (77)

Por essas vantagens, o modelo de membrana corioalantóica vem sendo usado para estudos pré-clínicos em TFD, envolvendo testes de diversos fotossensibilizadores e vias de administração, (78–81) além dos efeitos da TFD em vasos sanguíneos e vasoconstrição. (82–84)

Sendo a CAM um modelo experimental altamente vascularizado e bem estabelecido, é possível utilizá-lo para o desenvolvimento de um tumor nesse ambiente, o que permite acesso direto ao sistema formado por tumor e vasos sanguíneos.

1.9 Modelo Tumoral em CAM

O modelo de CAM possui um sistema imunológico propício para a introdução de diversas linhagens celulares e fornece, por si só, uma fonte de nutrição para essas células. O tumor obtido, com a inserção de células ou de material de biópsia, apresenta o desenvolvimento de uma microvascularização regional, e permite o estudo da angiogênese e dos processos envolvidos quando o tumor se torna viável. É, portanto, um excelente modelo para o estudo de atividades anti-angiogênicas e anti-tumorais, permitindo a avaliação da resposta terapêutica em tempo real e de forma direta (72) Esse modelo já vem sendo usado para a caracterização da morfologia do tumor (13) do recrescimento vascular (85) associados com o efeito da TFD para, entre outras coisas, avaliar a destruição tumoral promovida pela aplicação dessa técnica. (83)

A possibilidade de culturas de células usadas para o desenvolvimento desse modelo sobre a membrana corioalantóica apresenta uma grande diversidade de linhagens. As pesquisas com cultura de células *in vitro* contribuem para o entendimento de diversos mecanismos celulares, incluindo suas formas de defesa, de ação de terapias e ainda permite estabelecer muitos parâmetros para o início dos estudos *in vivo*. É possível estudar diversas linhagens celulares dependendo do intuito da pesquisa, incluindo células tumorais, como as células de melanoma e as células do tumor de Ehrlich.

Não existe um modelo ideal para explicar o comportamento de melanomas em humanos, mas o modelo em camundongos é considerado o mais similar quanto ao

comportamento clínico. O modelo *in vitro* é menos complexo e, normalmente, as células crescem em monocamadas ou suspensão de cultura. Porém, dessas células mantidas em cultura, pode-se obter uma biblioteca em estoque e, a partir dela, aplicar em camundongos para obter tumores, que são, assim como os de humanos, agressivos e invasivos, o que abre possibilidade para entender o comportamento e as possibilidades de tratamento de melanoma em humanos.(86)

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia de camundongos originada a partir de câncer de mama, com rápido crescimento e comportamento agressivo, que se desenvolve em cavidades como abdominal e pleural. (88-89) Quando essas células são inoculadas na cavidade abdominal do camundongo, uma reação inflamatória é desencadeada gerando um grande acúmulo de fluido nessa região e aumento no número de células. (90-91) O tumor de Ehrlich sólido pode ser feito subcutaneamente a partir desse fluido gerado, e o desenvolvimento de tumores é observado entre seis e dez dias. Devido à baixa imunidade dos animais aos quais se induz esses tumores, esta neoplasia apresenta um crescimento com proliferação celular acelerada e invasão de tecidos adjacentes. As facilidades para seu manuseio experimental fazem do tumor de Ehrlich um modelo muito utilizado para o entendimento dos tumores em geral e do seu desenvolvimento. (91)

A escolha da linhagem utilizada é um passo importante para estabelecer o modelo tumoral na CAM. A partir disso, é possível visualizar diversos fenômenos no conjunto tumor-vasos sanguíneos, incluindo efeitos terapêuticos e a localização do FS absorvido pelas células tumorais por técnicas ópticas.

Portanto, com o estabelecimento desse modelo, é possível elucidar alguns dos mecanismos ainda não compreendidos da resposta fotodinâmica nos vasos sanguíneos que alimentam diretamente o tumor, em vasos sanguíneos adjacentes e na resposta direta das células tumorais.

1.10 Diagnóstico por Fluorescência

Quando a luz interage com o tecido biológico, diferentes processos, como reflexão, refração, absorção e espalhamento, podem acontecer. As propriedades ópticas intrínsecas às moléculas formadoras desses tecidos determinam a ocorrência desses fenômenos. A absorção depende das moléculas absorvedoras do tecido e é a mais importante dos fenômenos responsáveis pelas terapias fotônicas e pelo diagnóstico óptico por fluorescência.

Algumas moléculas, quando absorvem luz, podem produzir fluorescência como um dos processos de relaxação eletrônica (como mencionado na seção 1.5). Nesse processo, a energia advinda do fóton é absorvida pelo elétron no estado fundamental, que passa para um estado excitado – condição permitida, mas de menor estabilidade que o estado fundamental. Entre as possibilidades para recuperar a estabilidade, as moléculas tendem a voltar para o estado fundamental liberando a energia absorvida sob forma de luz. Esse processo é chamado de forma genérica de luminescência, e pode ser classificada como fluorescência ou fosforescência, dependendo das configurações de *spin* entre o nível de energia em que o elétron excitado está e aquele para o qual decairá. No caso da fluorescência, a transição ocorre entre estados com mesma configuração de *spin* (transições permitidas pelas regras de seleção, ou seja, de alta probabilidade), resultando em rápida relaxação e reduzidos tempos de vida dos estados excitados; por outro lado, quando as configurações de *spin* são diferentes, a transição é dita proibida ou pouco provável, e portanto implica em longos tempos de vida dos estados excitados. (93-94)

A fluorescência ocorre, normalmente, a partir do menor nível vibracional do estado excitado, e depende das condições do tecido – temperatura, pH, moléculas presentes. Em um tecido com alguma patologia, as condições biológicas são modificadas, como mudanças bioquímicas e estruturais, que alteram a maneira da luz interagir com os substratos celulares. Devido ao processo de conversão interna entre o estado para o qual a absorção levou o elétron e o estado vibracional de menor energia do estado excitado, a energia liberada é menor do que a absorvida, o que resulta em um espectro de emissão diferente do absorvido deslocado para os maiores comprimentos de onda (deslocamento de Stokes). Tecidos diferentes em composição ou estrutura, portanto, emitem fluorescências diferentes dada a combinação molecular presente, vistas as muitas possibilidades de absorção e emissão, o que torna a fluorescência de cada tecido (ou mesmo de tecidos semelhantes em condições metabólicas diferentes) característica, permitindo sua identificação ou diferenciação através do espectro de fluorescência emitida. (95-96)

Por isso, a fluorescência pode ser usada como tecnologia óptica para auxiliar o diagnóstico de lesões. As imagens de campo amplo por fluorescência são opções não invasivas e podem ser promissoras na detecção de doenças e substâncias, já que áreas extensas podem ser analisadas e podem ajudar na identificação das bordas das lesões.

Além da fluorescência natural presente no tecido, é possível usar marcadores que fluorescem em comprimentos de onda específicos. (96) Assim, pode-se marcar o tecido lesionado para aumentar o contraste com o tecido sadio com moléculas que se acumulam

preferencialmente nestas células alteradas e possuem fluorescência diferente da observada para o tecido biológico sadio local. Muitos FS apresentam essas características, entre eles, a PpIX e o Photogem[®] a serem utilizadas nesse estudo.

O ALA não possui uma fluorescência característica; entretanto, ele entra na célula e estimula a produção da PpIX em células viáveis, permitindo o auxílio direto no diagnóstico. Não é completamente elucidado o motivo pelo qual as moléculas acumulam-se e são retidas preferencialmente nas células alteradas, mas entende-se que essa seletividade é causada, em partes, pela associação do fotossensibilizador às lipoproteínas do plasma, pela alteração das membranas celulares tumorais e pela imaturidade das fibras de colágeno das lesões (64,97–99)

Tanto o Photogem[®] quanto a PpIX sob excitação na luz na região do violeta-azul apresentam fluorescência intensa em toda a região do vermelho, aumentando o contraste com o tecido que, por sua vez, fluoresce normalmente na região do verde sob a mesma excitação. (100) Esse contraste não só auxilia no diagnóstico médico, como possibilita o acompanhamento da eficiência da TFD, mostrando onde o fotossensibilizador está e se, após a iluminação, foi consumido (através do decréscimo de sua fluorescência característica), um indicativo indireto da resposta fotodinâmica.

Apresentado o contexto em que se dá a TFD para o tratamento de tumores, fica evidente que a busca do melhor entendimento dos processos físicos, químicos e biológicos que envolvem o tratamento de câncer é fundamental para o aperfeiçoamento da técnica em uma de suas aplicações mais relevantes e de resultados mais expressivos, particularmente no contexto de problema de saúde mundial. Portanto, explorar o uso de técnicas ópticas de diagnóstico que sejam minimamente invasivas, passíveis de monitoramento instantâneo, em um modelo que possibilita acesso direto ao conjunto tumor e vasos sanguíneos torna-se um recurso fundamental para a maior compreensão de como se estabelece o dano em TFD, e de quais são os efeitos terapêuticos em células e vasos. Conseqüentemente, essa possibilidade permite avaliar como é possível beneficiar ou prejudicar o tratamento de lesões, além de oferecer possibilidade de fazer essa avaliação utilizando FS que já vêm sendo usados clinicamente, obtendo conclusões que sejam imediatamente relevantes para os protocolos clínicos usados correntemente. Além disso, o monitoramento dos processos que ocorrem nos vasos peritumorais durante a terapia pode permitir uma forma de avaliação direta da eficiência da terapia fotodinâmica.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo foi a investigação da terapia fotodinâmica nos vasos e nas células neoplásicas em um modelo de tumor em CAM.

Objetivos específicos

1. Estabelecer o modelo tumoral em CAM.
2. Estudar a cinética de produção da protoporfirina IX e de distribuição do Photogem intravenoso e curcumina tópica em vasos e células tumorais.
3. Avaliação da resposta fotodinâmica nos vasos e nas células tumorais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo de Membrana Corioalantóica

Os ovos embrionados foram fornecidos pela granja da empresa A'doro SA (São Carlos, SP) e chegaram ainda no primeiro dia de desenvolvimento do embrião (ED, do inglês, *embryo development*). Antes de serem colocados na estufa umidificada a 37,7 °C, os ovos foram limpos com álcool 70% a fim de retirar a sujeira que fica na casca e evitar a contaminação da estufa. Durante os ED1 e ED2, os ovos ficaram em um suporte que realiza meia rotação a cada 30 minutos, como mostrado no esquema da Figura 5, para evitar a formação da membrana na casca do ovo.

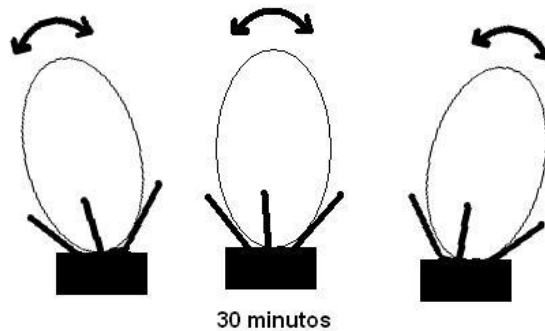


Figura 5 - Esquema mostrando a rotação do ovo nos ED1 e ED2 de meio ciclo a cada 30 minutos.

Fonte: Elaborada pela autora

No terceiro dia (ED3), a rotação foi interrompida e foi feito um orifício na casca do ovo na parte com a curvatura mais fina para retirada de 3 a 4 mL de albumina com uma agulha de 26G e seringa de 5 mL, criando uma câmara de ar entre a casca do ovo e a membrana. A região foi limpa com álcool 70% novamente, para garantir a assepsia do local e, com uma pinça, foi retirada a casca do ovo para a formação de uma janela de cerca de 2 cm². No ED3 ainda não há vasos sanguíneos de grande calibre e o ovo precisa voltar à estufa para continuar seu desenvolvimento. Para que isso aconteça sem contaminação, foi utilizada uma fita adesiva com o intuito de vedar a janela feita e os ovos voltaram para a estufa até o dia de trabalho, que se realiza entre os ED11 e ED14.

A viabilidade dos ovos foi verificada todos os dias através da visualização da membrana; quando o embrião está inviável, ele apresenta uma cor amarelada devido à ausência de vasos sanguíneos e foram retirados da estufa e congelados para serem levados à

incineração. O descarte dos ovos após os experimentos realizados também aconteceu dessa maneira.

Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar para minimizar os riscos de contaminação.

3.2 Cultura de células – melanoma

Duas linhagens distintas de células de melanoma foram utilizadas: humano - G361 e murino - B16F10; ambas obtidas da ATCC e cultivadas utilizando meio de cultura com soro fetal bovino, água, aminoácidos, glicose, vitaminas e sais.

Quando a cultura celular atingiu uma população da ordem de 10^6 células/mL, 35 μ L de meio celular com 3×10^5 células por ovo, foram colocados na CAM usando duas vias: a primeira topicamente sobre a membrana e a segunda, injetado entre as camadas da CAM, com uma seringa de insulina e agulha 25G. (101)

A biópsia de melanoma foi obtida com injeção intramuscular da cultura celular em camundongos *hairless* NOD (do inglês, *non obese diabetic*). Depois de cerca de 20 dias de desenvolvimento, o tumor de melanoma foi retirado e cortado em pequenos pedaços para introdução no modelo de CAM (fornecidos pela aluna de doutorado Layla Pires, sob supervisão da mesma orientadora, Prof^a Dr^a Cristina Kurachi).

3.3 Tumor de Ehrlich

Para induzir o tumor de Ehrlich em camundongos *Swiss* ou *Hairless* é necessário fazer um transplante de células tumorais na forma fluida, chamada de ascítica, para um animal saudável, injetando no peritônio, para o desenvolvimento da forma ascítica, ou com injeção subcutânea para o desenvolvimento do tumor sólido. (102) A partir de uma solução estoque, 0,3 mL de cultura celular na forma fluida foram injetados no peritônio do camundongo, resultando em cerca de 5 mL de cultura celular nova. A partir disso, a solução estoque foi repostada, com adição de glicerol 40% para conservação das células e colocado no freezer - 20°C por 3 horas para depois ser transferido ao nitrogênio líquido. A partir desse estoque, as formas fluidas e sólidas puderam ser obtidas.

Foi necessária a injeção subcutânea de 0,5 mL e a espera de 10 dias para o desenvolvimento da forma sólida do tumor. O tumor foi, então, retirado e cortado em

pequenos pedaços (aproximadamente 100 mg de biópsia do tumor) para ser colocado sobre a CAM.

Do fluido, foram retirados 100 μL para introdução na membrana corioalantóica. Também foram testadas duas vias de introdução da forma fluida: sobre a membrana e injetado entre as camadas da CAM.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos sob o protocolo número 068/2012 e homologado pelo Instituto de Física de São Carlos sob o protocolo 09/2014.

3.4 Introdução do tumor no modelo de CAM

A introdução do tumor na membrana corioalantóica ocorreu no ED4 com células tumorais em meio de cultura (ou em forma fluida) e em tumor sólido.

Na forma fluida, foram introduzidos 35 μL do meio de cultura com células de melanoma ressuspensas após contagem, totalizando 3×10^5 células por ovo. Do tumor de Ehrlich fluido foram introduzidos 100 μL da forma ascítica em cada ovo.

Ambas as linhagens celulares foram colocados de duas formas: sobre a membrana com a aplicação tópica do líquido e com a injeção entre as camadas da CAM com o auxílio de uma seringa de insulina e agulha de 30G. A CAM é uma camada muito fina com menos de 1 mm de largura e foi preciso cautela para as células não ultrapassarem a membrana e irem para a gema do ovo.

A forma sólida de ambos os tumores foi retirada e cortada em pequenos pedaços (de no máximo 5 mm de largura) com o auxílio de bisturi, tomando o cuidado para não selecionar partes não-viáveis do tumor (sem vascularização). Normalmente, o aspecto do tumor indica se ele está ou não viável, uma vez que, quando há necrose do tecido, o tumor se desintegra facilmente e não há indicações de vascularização. Essas partes foram devidamente descartadas para incineração e foram usados apenas pedaços com consistência firme e com formações de vasos sanguíneos. Os tumores foram retirados dos camundongos e imersos imediatamente em uma solução de soro fisiológico e antibiótico.

Os ovos receberam 100 μL da mistura de antibióticos penicilina e estreptomicina à concentração de 10% diluída em soro fisiológico, a cada 2 dias, para evitar contaminação por bactérias advindas do tumor em sua forma ascítica ou do ambiente durante a manipulação da CAM.

3.5 Fotossensibilizadores – Acompanhamento por fluorescência

Foram testados 2 tipos diferentes de fotossensibilizadores: o Photogem® (PHOTOGEN, Rússia), um composto derivado de hematoporfirina e o ALA (PDT PHARMA, Cravinhos/SP), um pró-fármaco que dá origem ao fotossensibilizador endógeno protoporfirina IX (PpIX).

Ambos os fotossensibilizadores possuem uma fluorescência na região do vermelho (entre 600-700 nm) quando excitados na região do azul (400-460 nm).

Para comparação dos resultados, foram testadas duas vias de aplicação: tópica e intravenosa. Na aplicação tópica, foi usado um anel de Teflon® de 1,76 cm², inerte ao tecido, para contenção do líquido em uma região de interesse e para delimitação da área de iluminação, quando necessário. A solução de ALA tinha a proporção de 10% em relação ao volume e a de Photogem® apresentava a concentração de 17,6 µg/mL que, na área do anel, totaliza a concentração de 1 µg/cm².

3.6 Aquisição das Imagens

A aquisição das imagens foi feita usando duas câmeras distintas.

As imagens de luz branca foram feitas com uma câmera USB Digital Microscope® (AVANTGARDE, China) e a cada 30 minutos foi feita uma aquisição de imagem, partindo do tempo zero até 5 horas, 8 horas, 24 horas ou até 48 horas de experimento, dependendo da necessidade de análise. Para que a mudança de temperatura não influenciasse na sobrevivência do embrião, durante os 30 minutos entre a aquisição de cada imagem, cada ovo foi vedado e mantido na estufa a 37,7 °C.

As imagens de fluorescência foram feitas utilizando uma câmera CCD Pixelfly (PIXELFLY QE – PCO, Alemanha) e com o Velscope® (VELSCOPE, EUA), um equipamento que emite luz azul no comprimento de onda entre 400-460 nm.

O tecido biológico tem uma fluorescência característica; a essa fluorescência endógena, sem sinalizadores, comumente é dado o nome de “autofluorescência”. É possível, com a inserção de uma substância com uma fluorescência diferente, utilizar a relação entre os sinais de fluorescência para um monitoramento ao longo de tempo de modificações teciduais. Foram selecionados os fotossensibilizadores PpIX e Photogem® os quais, quando excitados com luz azul (400-460 nm), fluorescem na região do vermelho para o acompanhamento

dessas substâncias nos vasos sanguíneos e no tumor, ao longo do tempo. O Velscope® possui filtros que aumentam o contraste da fluorescência do vermelho, tornando-o ideal para a aquisição das imagens.

A câmera e o Velscope® foram posicionados em frente à CAM com ajuste de aumento para melhor foco das imagens dos vasos sanguíneos e tumor, conectadas ao computador de aquisição de imagens, que ficou fora do fluxo. O software usado para a aquisição das imagens foi o CamWare® (CamWare, PCO, Alemanha). Ambas as câmeras foram fixadas dentro do fluxo laminar para minimizar os riscos de contaminação, como mostra a Figura 6.

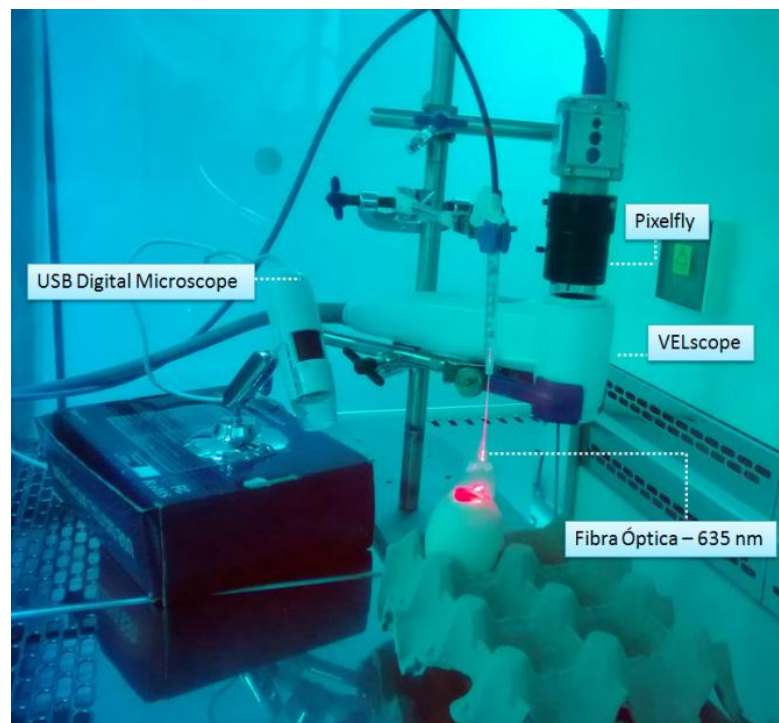


Figura 6 - Arranjo experimental da aquisição de imagens e iluminação da CAM
Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Quantificação da Fluorescência

Primeiramente, as áreas de interesse de cada imagem foram selecionadas, usando o software Photoshop® (ADOBE PHOTOSHOP CS4, versão 11, EUA) e/ou GIMP (GNU Image Manipulation Program, software livre, projeto GNU). Essa sequência de imagens foi, então, carregada para o MATLAB (MATrix LABoratory, MathWorks, EUA) e aplicado um filtro para extrair o *red channel* (canal de *pixels* vermelhos) de cada arquivo. Como as imagens possuem tamanhos diferentes e o número de *pixels* poderia não representar a

evolução da fluorescência ao longo do tempo, foi feita a razão entre a soma dos valores de todos os *pixels* vermelhos na área de interesse e dividida pelo número total de *pixels*.

É preciso destacar a relação entre intensidade da fluorescência e tempo de integração, durante a aquisição das imagens. A saturação do sinal pode fornecer um valor impreciso do aumento da fluorescência, já que, quando se atinge a saturação, não há aumento no valor registrado da intensidade e o gráfico pode apresentar um comportamento constante, mesmo não sendo, além de distorções da coleta de comprimentos de onda adjacentes à região saturada. Portanto, foi necessário adaptar o tempo de exposição de cada imagem a fim de evitar saturação do sinal.

Esses valores foram colocados no gráfico de acordo com cada imagem, mostrando a relação entre os *pixels* como função do tempo. A partir dos valores obtidos e com o software OriginPro® 8.1 SR3 (OriginLab Corporation, EUA), foram feitos os gráficos e suas respectivas análises.

O valor do coeficiente de determinação (*R-Square*), um dos valores obtidos com o gráfico, determina o quão bom foi o ajuste da curva em relação aos dados experimentais e foi usado para comparação entre os dados e validação das equações determinadas.

3.8 Terapia Fotodinâmica no Modelo Tumoral

Os testes para aplicação da TFD envolveram a variação de diversos parâmetros, tais como concentração da droga e intensidade e dose de luz. Os melhores parâmetros foram determinados pela relação entre dose e intensidade de luz, procurando utilizar o menor tempo de iluminação, totalizando uma dose que não destruísse ou provocasse qualquer alteração nos anexos embrionários (clara, gema e embrião), com a garantia de não haver qualquer dano além do efeito fotodinâmico, esperado. Um dos exemplos de danos indesejados é aquele promovido por efeitos térmicos, que geram modificações nas estruturas teciduais, em função da denaturação de proteínas por aquecimento, como é o caso do branqueamento da clara do ovo.

Foram usadas duas fontes de luz: um laser de diodo (Quantum Tech, São Carlos, Brasil) emitindo em 635 nm acoplado a uma fibra óptica de emissão homogênea e o conjunto de LEDs em 630 nm do LINCE (MMOptics, São Carlos, Brasil), equipamento para aplicação clínica em tratamentos de pequenas lesões de câncer de pele. (22) Essas fontes de luz foram escolhidas porque tanto o Photogem® quanto a PpIX possuem espectros de absorção semelhantes e com picos em 630 nm.

Estudos feitos previamente, usando o modelo de membrana corioalantóica sem tumor, aplicavam irradiâncias de 100 mW/cm² e dose final de 30 J/cm². (82) Considerando que, para que haja morte do tumor, é necessária uma dose maior de energia, foram aplicados 50 J/cm², com diminuição da irradiância para 80 mW/cm², totalizando o tempo de iluminação de 10 minutos.

O tempo de incubação do fármaco até a aplicação da luz também foi variado, para que se determinasse o melhor tempo para produção ou absorção do fotossensibilizador, sendo escolhidas 4 horas como a espera ideal, nesse modelo.

3.9 Preparação da Amostra para Análise no Microscópio

Para a morte do embrião, antes da retirada da membrana, é necessário adicionar cerca de 2 mL de uma solução de formaldeído 37% sobre a CAM e espera de 30 minutos. A partir disso, a retirada da membrana foi feita com o uso de uma pinça de relojoeiro e uma tesoura cirúrgica.

A membrana foi levantada com a pinça e, com a tesoura, a porção de interesse contendo o tumor e os vasos sanguíneos, foi cortada. Essa região foi colocada em uma placa de *Petri* com soro fisiológico, para lavagem e retirada de conteúdos indesejados para análise, como o sangue remanescente e a gema de ovo.

Como possíveis dobras da membrana removida atrapalhariam a análise, foi preciso deixá-la tão esticada quanto possível. Com o auxílio da pinça, a membrana foi esticada e, com a tesoura, foram cortadas as porções que não faziam parte da região de interesse. Um esquema ilustrando esse procedimento é mostrado na Figura 7.

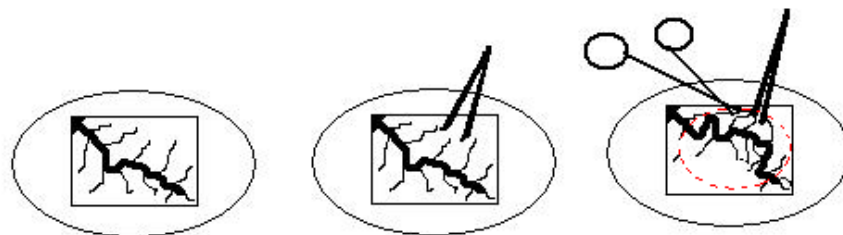


Figura 7 - Metodologia do corte da membrana para colocá-la sobre a lâmina para análise.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para a análise da membrana no microscópio confocal ou no microscópio óptico não linear feito em nosso laboratório, ela foi colocada sobre a lâmina ou lamínula e foi direto para análise, como mostrado na Figura 8. A análise no microscópio confocal (LSM 780, Zeiss, Alemanha) aconteceu priorizando os canais de emissão entre 400-500 nm, coloridos em verde

e entre 600-700 nm, coloridos em vermelho, com cores falsas pelo próprio *software*. A adição de acriflavina aconteceu nos casos em que era preciso evidenciar as células, uma vez que esse composto marca núcleos celulares.

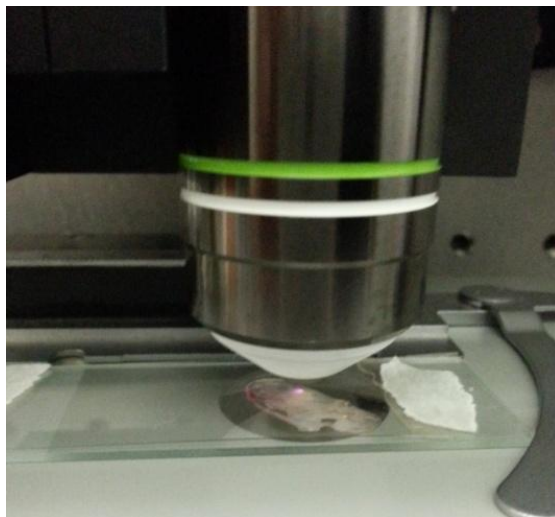


Figura 8 - Membrana posicionada no microscópio, mostrando sua posição na lâmina.
Fonte: Elaborada pela autora

Para análise no microscópio óptico, a membrana foi colocada sobre o papel vegetal e, para evitar dobras durante o processo de desidratação, foi colocada uma esponja sobre a membrana, que fica dentro do cassete de histologia. A desidratação acontece seguindo as soluções de álcool 70%, 80%, 90%, 95%, 100% e solução de álcool e xilol.

Para colocar a peça na parafina, foi preciso retirar a esponja do cassete e, cuidadosamente, devolvê-la ao suporte. São necessários três banhos de parafina antes do emblocamento. Os testes de histologia foram feitos usando os corantes Hematoxilina – Eosina (HE).

3.10 Efeito Vascular da Terapia Fotodinâmica com o uso de Curcumina

Para análise do efeito vascular especificamente desse fotossensibilizador, a solução foi preparada a partir de um pó de curcumina (Curcumina, PDTPharma, Brasil) diluída primeiramente em DMSO para criar uma solução de 500 mM. A partir dessa solução, foi adicionada água destilada para alcançar diferentes concentrações: 0,1, 0,3, 0,5, 1, 5 e 10 mM distribuídos em uma área de 1,76 cm² (Tabela 1).

Foram aplicados 200 µL da solução de forma tópica em uma área determinada por um anel de Teflon® de 1,76 cm² e 1 mm de espessura, com a função de reter o líquido sobre a

CAM no local determinado. O tempo de incubação foi de 40 minutos para a interação da curcumina com as células que compõe os vasos sanguíneos, tempo esse usado para testes de outros fotossensibilizadores. (101)

Um aparelho desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT – IFSC/USP) com um LED emitindo em 450 nm foi posicionado sobre a CAM de modo que a área de iluminação fosse limitada ao anel de Teflon®.

Para testar apenas o efeito da luz azul na CAM, um grupo controle foi feito sem aplicação da solução de curcumina. Os grupos com aplicação apenas da curcumina foram conduzidos para avaliação do seu efeito sem aplicação da luz.

Depois de vários testes para a escolha dos melhores parâmetros de iluminação, variando a irradiância em 10, 12 e 60 mW/cm² durante 5 e 10 minutos, o grupo para avaliação do efeito da TFD foi definido em 50 mW/cm² durante 10 minutos, totalizando uma dose de 30 J/cm².

Todos os grupos testados apenas com a luz, apenas com a curcumina e TFD estão resumidos na Tabela 1.

A aquisição das imagens foi feita com uma câmera USB Digital Microscope® (AVANTGARDE, China) a cada 30 minutos a partir da aplicação da curcumina ou da iluminação, dependendo do grupo, até 5 horas depois.

Tabela 1 – Grupos experimentais para diferentes concentrações de curcumina com e sem iluminação

Grupo	[Curcumina] (mM)	Intensidade (mW/cm²)	Dose (J/cm²)
Só Luz	-	50	30
Curcum [1]	0,1		
Curcum [2]	0,33		
Curcum [3]	0,5		
Curcum [4]	1		
Curcum [5]	5		
Curcum [6]	10		
TFD [1]	0,1		
TFD [2]	0,33		
TFD [3]	0,5		
TFD [4]	1	50	30
TFD [5]	5		
TFD [6]	10		

Fonte: Elaborada pela autora

Um fluxograma com o resumo dos procedimentos experimentais está ilustrado na Figura 9 a fim de mostrar um panorama geral dos testes feitos.

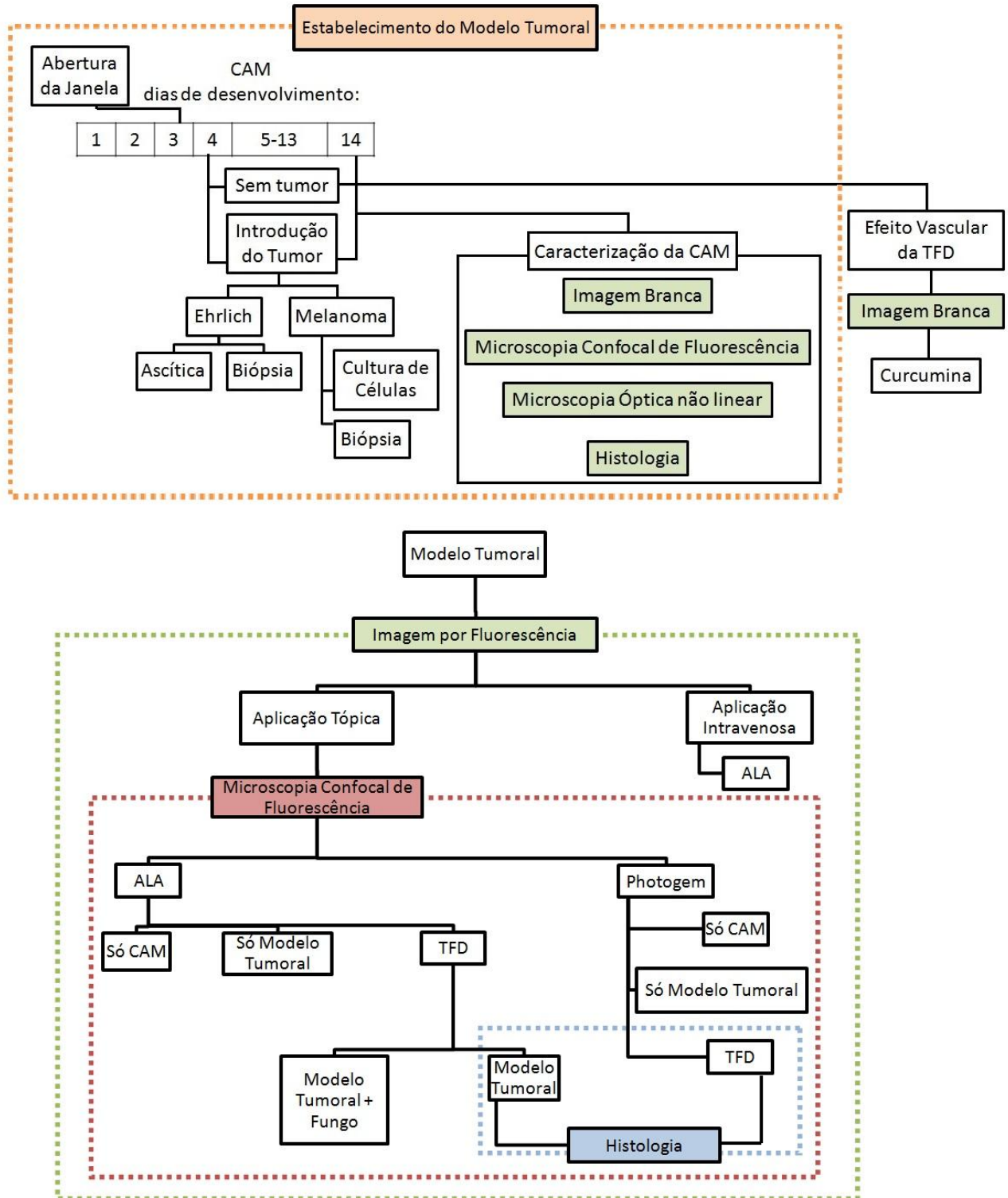


Figura 9 – Esquema delineando todos os procedimentos experimentais. As análises estão nos quadros coloridos.
 Fonte: Elaborada pela autora

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 O Modelo Tumoral

Para o desenvolvimento de um tumor no modelo de membrana corioalantóica, pode-se utilizar células de diferentes origens. As linhagens celulares testadas foram: tumor de Ehrlich em sua forma ascítica, cultura celular de melanoma murino da linhagem B16F10, cultura celular de melanoma humano da linhagem G361, fragmentos de tumor de Ehrlich sólido desenvolvido subcutaneamente e fragmentos de biópsia de melanoma humano em camundongos *hairless* (sendo os dois últimos cortados em pequenos pedaços e colocados sobre a membrana). Esses modelos tumorais foram escolhidos pelo rápido crescimento celular que apresentam.

A variação das linhagens permitiu avaliar qual era a mais apropriada para o estabelecimento do modelo tumoral em CAM, com a comparação do crescimento da massa tumoral e interação entre vasos sanguíneos e tumor por essas diversas formas de introdução das células.

A taxa de sobrevivência do modelo de CAM sem a introdução de células tumorais, normalmente, é de 80%. (82) Com a introdução de qualquer uma das linhagens celulares testadas, a taxa de sobrevivência caiu para cerca de 20%, mostrando que o procedimento para inclusão do tumor é bastante fatal para o desenvolvimento do embrião.

Dos ovos viáveis e, portanto, que apresentaram sucesso no estabelecimento do modelo tumoral, foi possível avaliar o desenvolvimento do tumor e sua interação com os vasos sanguíneos. Na Figura 10-a, observa-se a região da CAM cortada com o tumor desenvolvido a partir de um pedaço de biópsia de tumor de Ehrlich e, apesar da formação de dois tumores, apenas um pedaço de biópsia foi colocado, permitindo observar a boa interação com a CAM e desenvolvimento desse tumor. A Figura 10-b mostra um tumor desenvolvido a partir da aplicação de tumor de Ehrlich ascítico. A introdução da forma fluida desse tumor aconteceu no ED4 e iniciou a formação de uma massa sólida de 1 a 2 milímetros de diâmetro entre os ED7 e ED8, com o crescimento até o ED14, resultando em tumores de diâmetros variados, chegando alguns a até 7 mm. Como o tumor se desenvolveu nesse ambiente, houve uma grande interação entre os vasos sanguíneos e a massa tumoral formada.

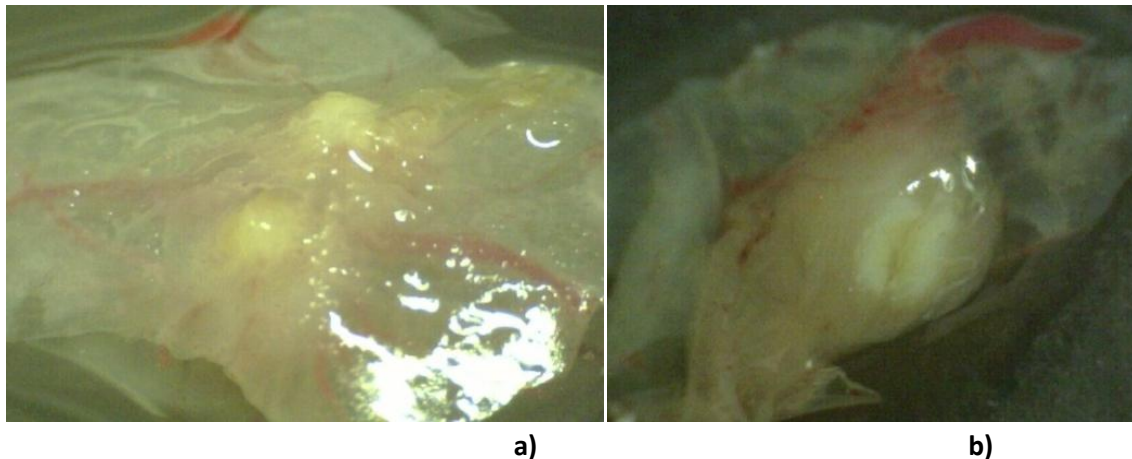


Figura 10 - Tumor de Ehrlich na membrana corioalantóica. a) Fragmento do tumor sólido colocado sobre a membrana. b) Desenvolvimento a partir da injeção da forma fluida do tumor entre as camadas da CAM.

Fonte: Elaborada pela autora.

Essas membranas cortadas foram levadas para análise no microscópio confocal e as microfotografias obtidas permitiram a confirmação da interação entre os vasos e o tumor, mostrando a formação de novos vasos em direção à massa tumoral, para a sua nutrição e desenvolvimento. A porção da membrana com o tumor foi colocada em uma lamínula e a avaliação aconteceu na interface entre o tumor e os vasos sanguíneos. Como exemplificado na região indicada pela seta na Figura 11, há a formação de novos vasos exatamente nessa interface, confirmando o fenômeno da angiogênese, que visa garantir a viabilidade do tumor.

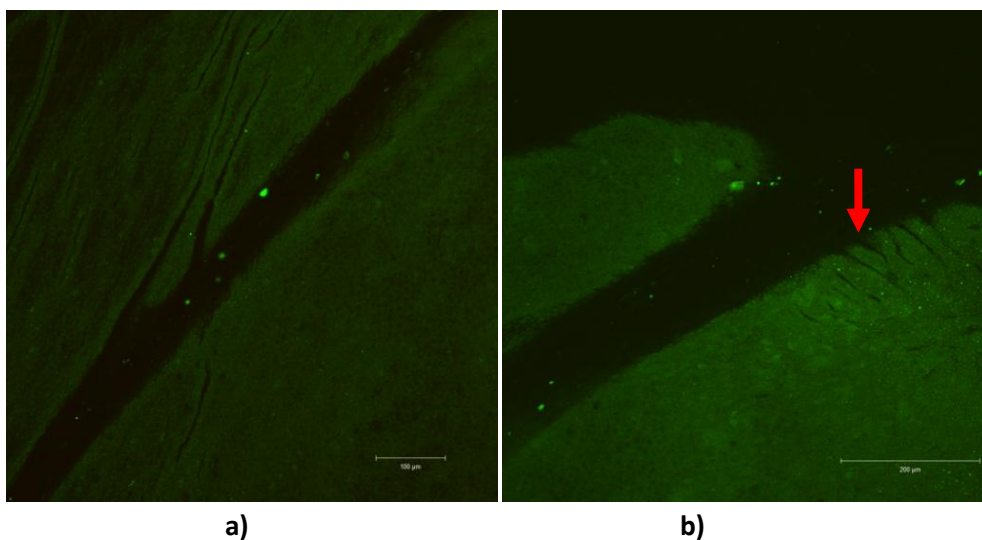


Figura 11 - Microfotografias do microscópio confocal feitas a partir do tumor desenvolvido na CAM com a forma fluida do tumor de Ehrlich. a) Surgimento de novos vasos a partir do vaso principal. b) A seta aponta para uma região onde novos vasos formados são observados.

Fonte: Elaborada pela autora.

O uso de células de melanoma mostrou resultados semelhantes aos encontrados com o uso de tumor de Ehrlich, tanto para a forma líquida da cultura celular quanto para a aplicação de pedaços de biópsia. A aplicação de 100 μ L de cultura celular, em uma forma fluida, também gerou um tumor sólido, como mostrado na Figura 12, indicando que as células não só se desenvolveram como interagiram e formaram uma massa tumoral.



Figura 12 - Tumor desenvolvido a partir da introdução de células de melanoma em meio de cultura, após corte da membrana.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 13-a mostra o tumor desenvolvido a partir de um fragmento de biópsia de melanoma humano G361 colocado sobre a CAM. Não é possível comprovar sua viabilidade a olho nu e, por isso, a porção da membrana com o tumor foi cortada para análise de sua base. A Figura 13-b mostra claramente a invasão dos vasos sanguíneos para o interior do tumor, fator indispensável para seu crescimento e sobrevivência. Essa análise é uma evidência de que a interação, muitas vezes, acontece apenas na região abaixo do tumor, que dificulta um pouco a confirmação se o modelo está bem estabelecido ou não naquele ovo.

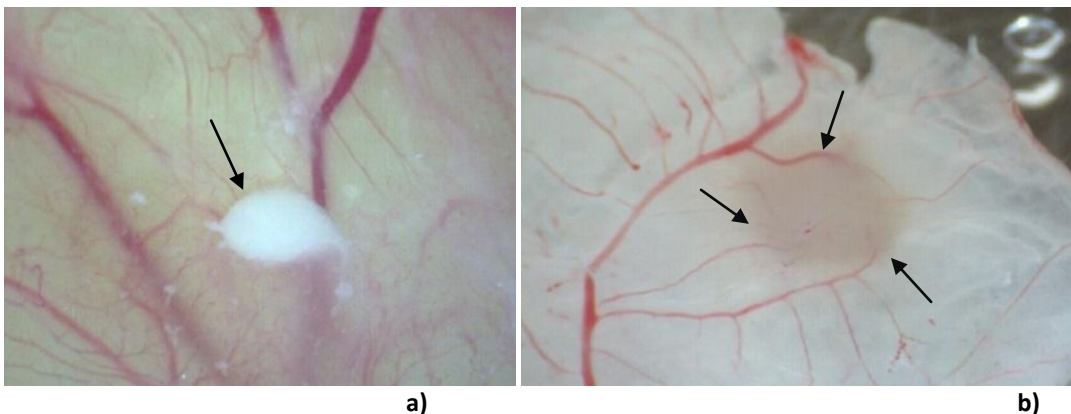


Figura 13 - Tumor desenvolvido a partir de fragmento de biópsia de melanoma em camundongo. a) Tumor na CAM. A seta indica a região do tumor. b) Base do tumor, após corte da membrana. A seta indica a invasão dos vasos no tumor.

Fonte: Elaborada pela autora

Levando essa membrana para análise em microscópio confocal, foi possível observar as células tumorais na interface do vaso sanguíneo, como está na Figura 14-a. Quando analisado o interior dos vasos, foi possível identificar células tumorais nessa região, sendo mais uma evidência de uma forte interação entre as células e o vaso (Figura 14-b).

Essas microfotografias foram feitas com adição de acriflavina, uma substância com afinidade por núcleo celular, que permite a identificação e realce da morfologia da célula e tamanho do núcleo. Com isso foi possível identificá-las realmente como células de melanoma.

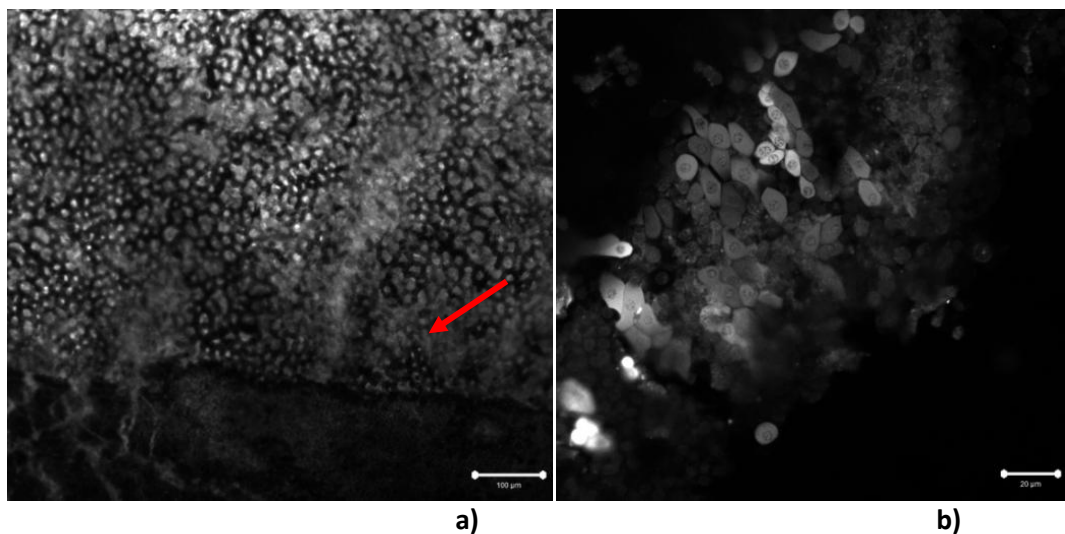


Figura 14 - Microfotografias feitas a partir de células de melanoma murino B16F10 colocadas sobre o modelo de CAM, mostrando a interação das células com os vasos sanguíneos e células do epitélio. a) A membrana, no contorno do vaso sanguíneo. A seta indica a parede do vaso sanguíneo. b) O tumor e o interior do vaso sanguíneo.

Fonte: Elaborada pela autora.

No lugar da acriflavina, pode ser utilizada alguma substância com fluorescência diferente das células teciduais. Um exemplo desse tipo de substância são os fotossensibilizadores, que, além disso, ainda possuem afinidade às células tumorais. Assim, a Figura 15 mostra a microfotografia do microscópio confocal do modelo tumoral com pedaço de biópsia de Ehrlich e adição de Photogem[®]. Nela, é possível observar os vasos sanguíneos saindo da massa tumoral desenvolvida na CAM e as setas estão indicando as regiões dos vasos sanguíneos. Fica evidente que os vasos estão entrando na massa tumoral, um indicativo de que eles foram formados para permitir o aporte sanguíneo junto ao tumor, com a função de nutrição. A cor vermelha falsa foi colocada com a ajuda do *software* para as regiões de emissão correspondentes à fluorescência vermelha do fotossensibilizador.

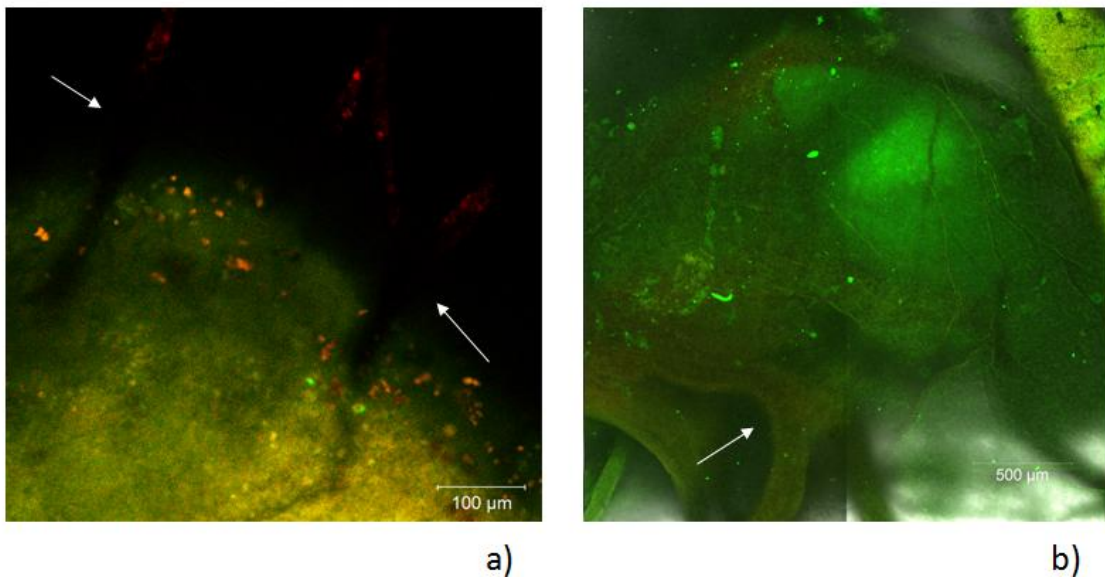


Figura 15 – Microfotografia no microscópio confocal mostrando os vasos sanguíneos indicados pela seta interagindo com a massa tumoral.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para certificar que esses vasos não eram apenas superficiais, foram feitas microfotografias no plano “z” do tumor da Figura 15-a, ou seja, com variação da profundidade de análise. A Figura 16 mostra os vários planos, com o vaso indicado pela seta.

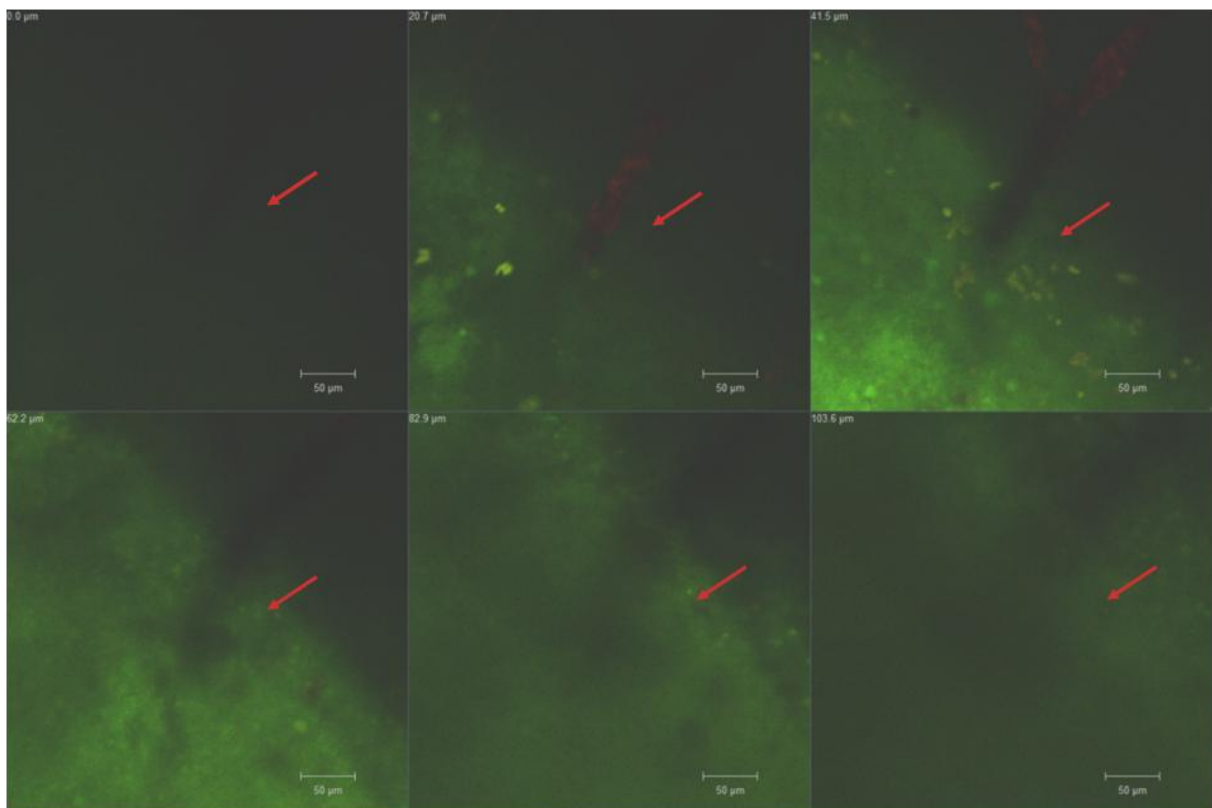


Figura 16 - Microfotografias do microscópio confocal variando o plano z a cada passo de 20,7 µm em profundidade. As setas indicam o vaso sanguíneo em todos os planos e a interação com o tumor.

Fonte: Elaborada pela autora.

A presença do mesmo vaso sanguíneo em todos os planos das microfotografias indica que o vaso não está apenas sobre o tumor, mas também no seu interior, servindo para nutrição de zonas centrais.

Foi possível também analisar o modelo tumoral com o microscópio óptico não linear desenvolvido no Grupo de Óptica para imagens em tempo real e com visualização direta (por refletância), pois não se trata de um microscópio invertido. O microscópio óptico de fluorescência com absorção de dois fótons é formado por um laser de titânio-safira ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$) de pulso ultracurto com excitação entre 680 e 1080 nm, um sistema de varredura, uma lente objetiva e um sistema de detecção e controle. (103)

As microfotografias foram feitas com excitação de 800 nm e uma gota de água foi colocada entre o tumor e a membrana, além da adição de acriflavina, que facilitou a análise por fluorescência. A Figura 17 mostra uma microfotografia obtida nesse microscópio, que permitia a análise direta no ovo, sem a necessidade do corte da membrana e que deixa clara a interação entre as células e os vasos sanguíneos, semelhante à microscopia confocal.

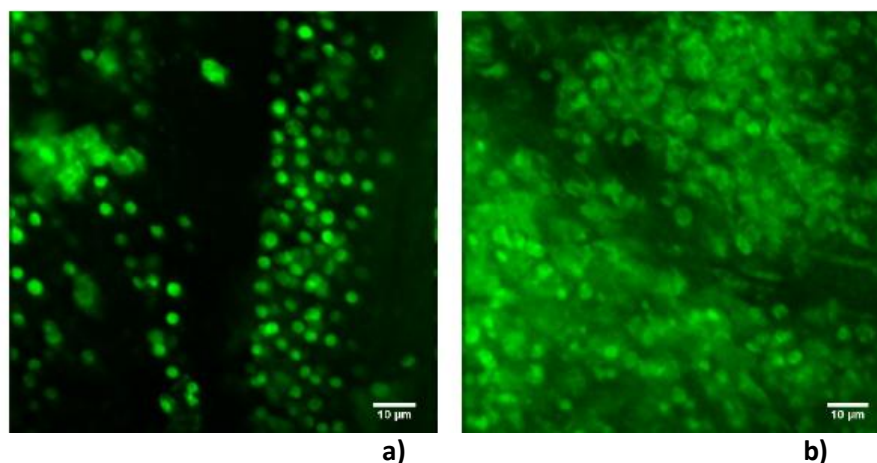


Figura 17 - Microfotografia por microscopia óptica não linear com adição de acriflavina, a partir de tumor de Ehrlich. a) Intersecção entre vaso sanguíneo (região preta central) e as células do tumor. b) Células tumorais nos vasos sanguíneos, mostrando íntima interação e possível evidência de metástase.

Fonte: Elaborada pela autora e publicada em PRATAVIEIRA (104).

Apesar de o modelo tumoral estar estabelecido e de a viabilidade celular do tumor ser comprovada, sua interação com os vasos sanguíneos pode acontecer de diversas formas. A introdução das células ou biópsias no ambiente da CAM, além de permitir a interação observada do tumor com a membrana, desencadeou diferentes reações, como, por exemplo, o material introduzido ser reconhecido como corpo estranho pelo tecido. A Figura 18 mostra algumas dessas possibilidades e, apesar de todos os exemplos mostrados serem a partir de células de melanoma, esse comportamento foi observado para ambas as linhagens. A Figura 18-a mostra que não houve a formação da massa tumoral, mas as células se mantiveram

agrupadas ao redor de um vaso principal. Esse tipo de interação, apesar da não formação de uma massa tumoral, ainda pode ser usado como ferramenta de estudo na interação de compostos com células tumorais e vasos sanguíneos. A Figura 18-b mostra a encapsulação do tumor, quando considerado um corpo estranho. Apesar de ser muito parecido visualmente com um tumor viável, quando a membrana foi cortada para análise, foi possível observar que não existia interação alguma entre ele e os vasos sanguíneos (Figura 18-c). Outra reação muito comum foi a observação da alteração de toda a membrana, que passou a apresentar um aspecto plastificado, na tentativa de eliminar o tumor. Essa membrana, mostrada na Figura 18-d foi analisada no microscópio óptico e não apresentou qualquer célula, comprovando que não é um exemplo de interação das células com a membrana nem qualquer tipo de contaminação por micro-organismo, mas, na verdade, uma queratinização como tentativa de isolar a biópsia ou as células introduzidas.

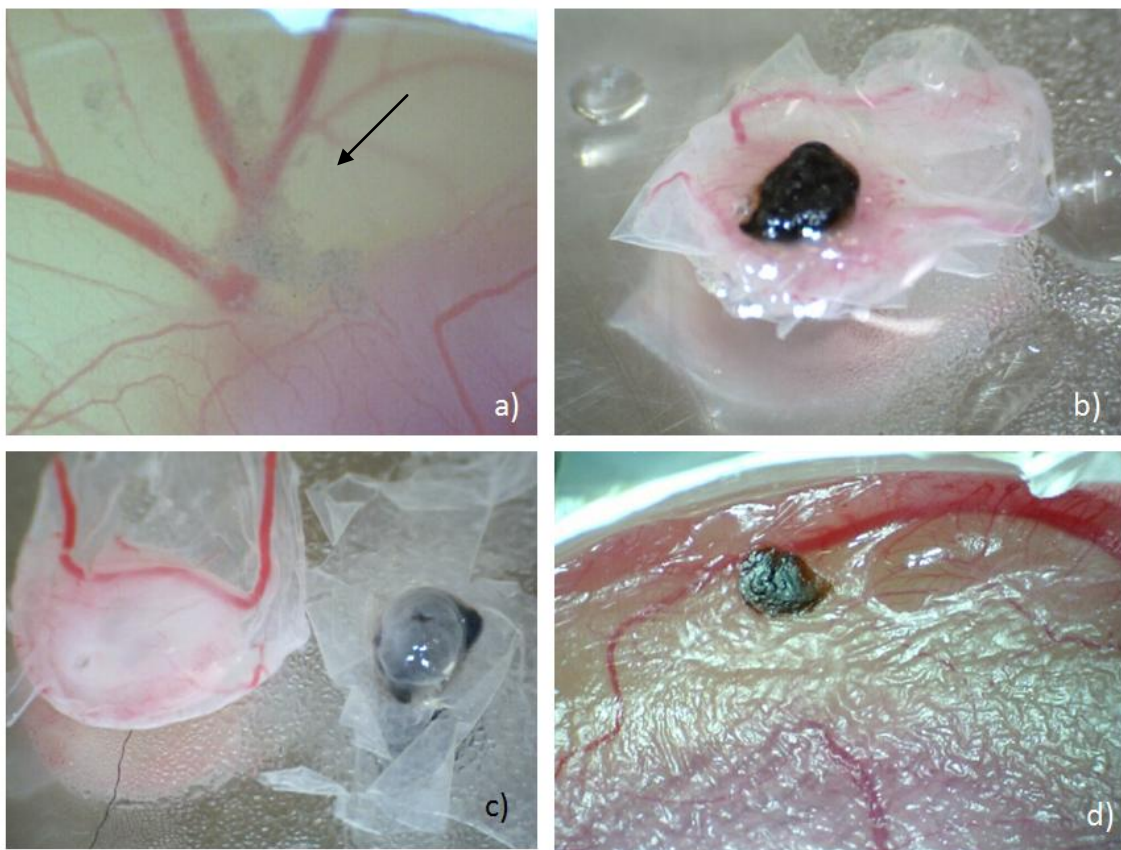


Figura 18 – Outras interações entre células tumorais e a membrana corioalantóica. Neste caso, com células de melanoma. a) Células agrupadas em torno de um vaso principal sem a formação da massa tumoral. b) Tumor não interagindo com os vasos apesar da semelhança com um tumor viável. c) Separação do tumor e vasos sanguíneos, mostrando a cápsula formada ao redor do tumor e nenhuma relação com os vasos sanguíneos. d) Aspecto plastificado da membrana com a introdução do tumor.

Fonte: Elaborada pela autora.

As interações apresentadas pelas linhagens de Ehrlich e de melanoma se mostraram muito semelhantes em relação aos vasos sanguíneos. Como o tumor de Ehrlich é de mais fácil manuseio em laboratório, uma vez que esse tumor se desenvolve em todas as linhagens de camundongo, enquanto o melanoma é desenvolvido apenas em espécies imunossuprimidas, os testes posteriores com FS foram realizados com o modelo de Ehrlich. Além disso, o melanoma é escuro e, a princípio, dificultaria a análise e acompanhamento do fotossensibilizador dentro do tumor na análise de imagens por fluorescência. A diferença de cor entre as linhagens está mostrada na Figura 19.

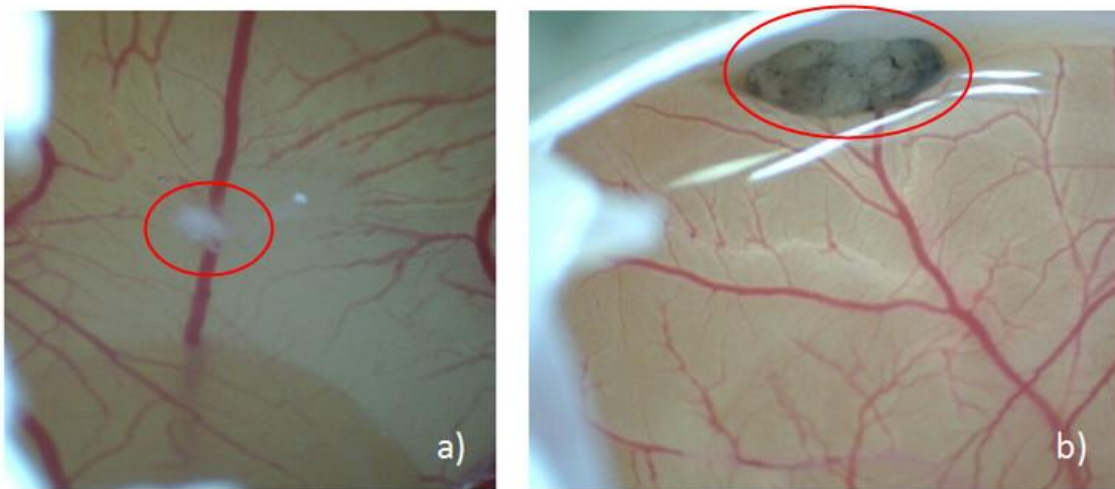


Figura 19 – Diferença de coloração entre os tumores de Ehrlich e melanoma, na maioria dos casos. a) Ehrlich. b) Melanoma.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda para verificar a interação entre o tumor e a CAM, também foram feitas lâminas histológicas e coradas com HE. A hematoxilina cora em violeta e tem afinidade com estruturas de caráter básico, como os núcleos celulares. A eosina, por sua vez, cora em vermelho e tem afinidade com estruturas ácidas que são, em sua maioria, proteínas presentes no citosol, nas fibras de colágeno e nas mitocôndrias. (105)

A CAM é formada por células regularmente espalhadas, como mostrado na Figura 20-a. Quando adicionado fotossensibilizador (nesse caso, o Photogem[®]), não há alteração significativa na membrana e na distribuição das fibras de colágeno, como mostrado na Figura 20-b.

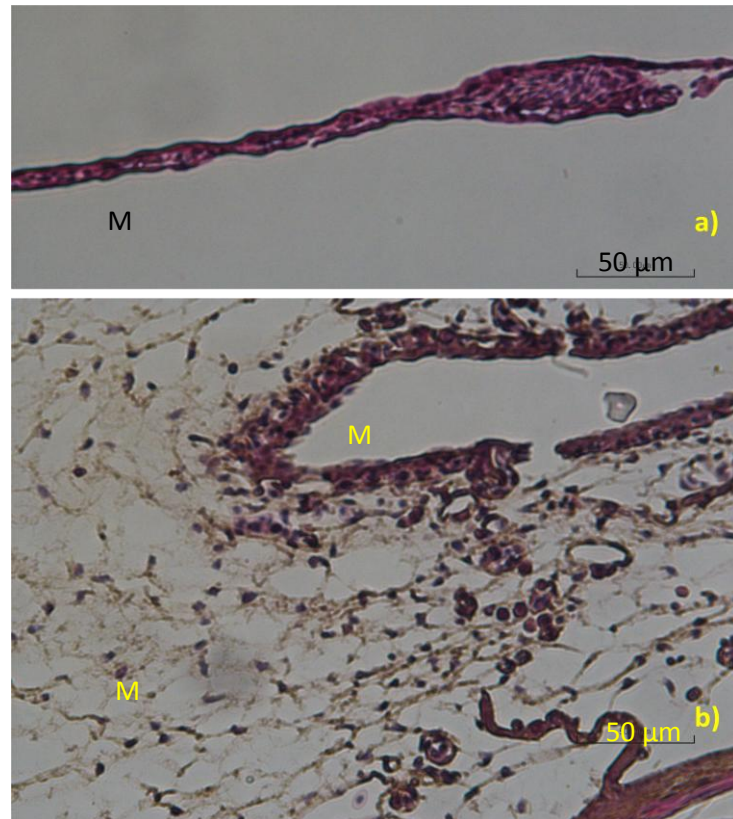


Figura 20 - Histologia da CAM sem tumor. Na figura, M corresponde à Membrana. a) Controle. b) Adição de fotossensibilizador - não mostra alteração nas estruturas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando adicionada células (tanto de melanoma quanto de Ehrlich), esperava-se observar a interação entre as estruturas da CAM e as células tumorais. Como mostrado na Figura 21, isso pode acontecer pelo alargamento da CAM (21-a), pelo aparecimento de uma camada celular sobre a membrana (21-b e 21-c) ou pelo surgimento de aglomerados celulares em regiões específicas (21-d). A região tumoral apresenta uma grande quantidade de células, indicadas pelos núcleos corados em azul e aglomerados em uma mesma região. As células de melanoma, mostradas na Figura 21-b, tem a característica esperada de apresentar regiões mais escuras. A Figura 21-c mostra regiões onde não há interação entre o aglomerado celular e a CAM – indicados pela seta – pelo plano de corte da lâmina.

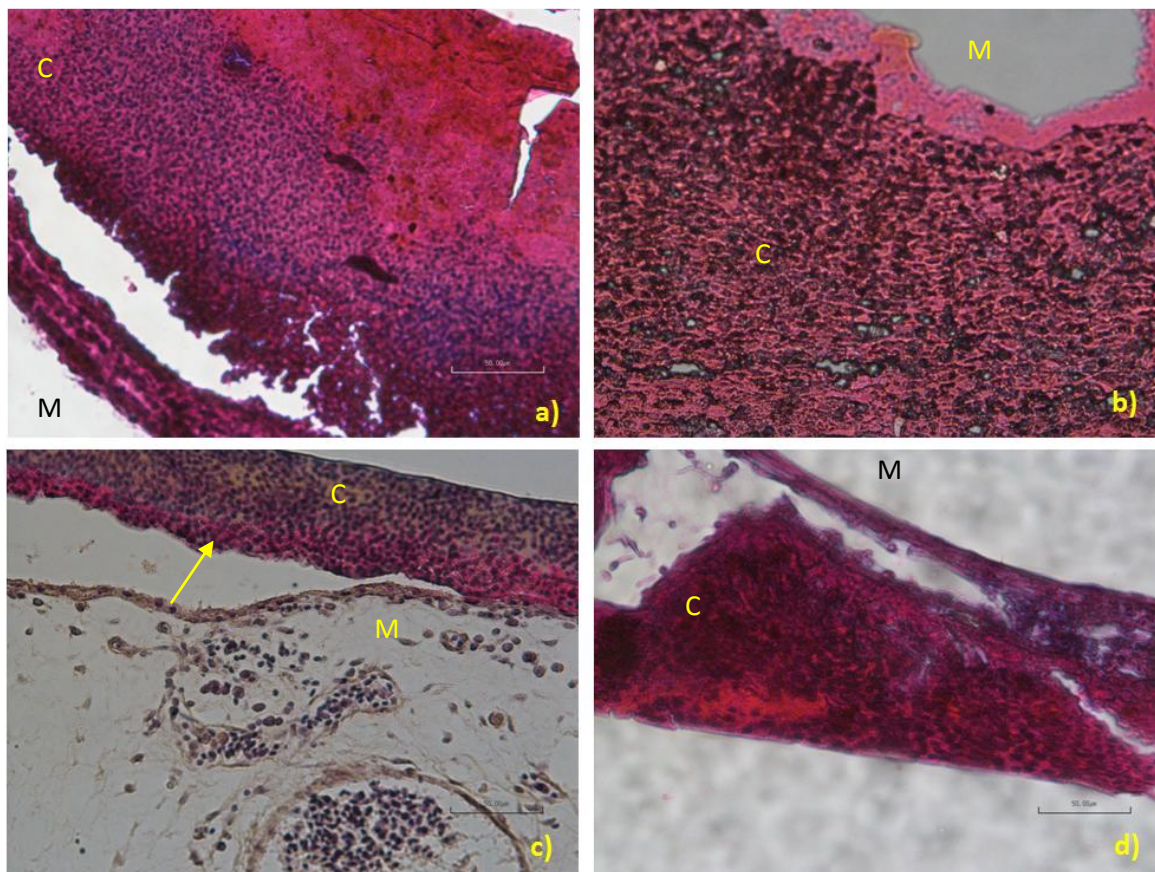


Figura 21 - Modelo tumoral em CAM, na figura, M corresponde à Membrana e C às Células do modelo tumoral. a) Espessamento da Membrana. b) Células de melanoma com mostra dos melanócitos (pontos escuros). c) Regiões de interação e não interação do tumor e da CAM (seta indicando a região com ausência de interação). d) Aglomerado celular interagindo com a CAM.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise histológica obedece ao padrão encontrado nos modelos tumorais em CAM relatados na literatura. (77,107-108)

Comparando as formas de introdução do tumor na forma líquida e sólida, a adição dos fragmentos de biópsia mostrou uma taxa de interação maior entre tumor e vasos sanguíneos quando comparado à forma ascítica e, portanto, os experimentos a seguir foram realizados com o modelo tumoral em CAM estabelecido com a introdução de pedaços de biópsia de tumor subcutâneo de Ehrlich em camundongo.

4.2 Acompanhando o Fotossensibilizador – Análise por Fluorescência

Os espectros de emissão do Photogem® e da PpIX, quando excitados em 408 nm, estão mostrados na Figura 22. Os picos de emissão entre 600 e 700 nm indicam que a fluorescência de ambos os fotosensibilizadores se dá na região do vermelho para a

iluminação com a luz azul. Isso permite o acompanhamento do fotossensibilizador, uma vez que o vermelho se destaca na emissão da CAM, cuja autofluorescência se dá na região do verde, o que coincide com a maioria dos tecidos biológicos, dada a emissão de fluorescência de estruturas de colágeno com alto grau de organização e de NADH e FADH, abundantes nestes tecidos.

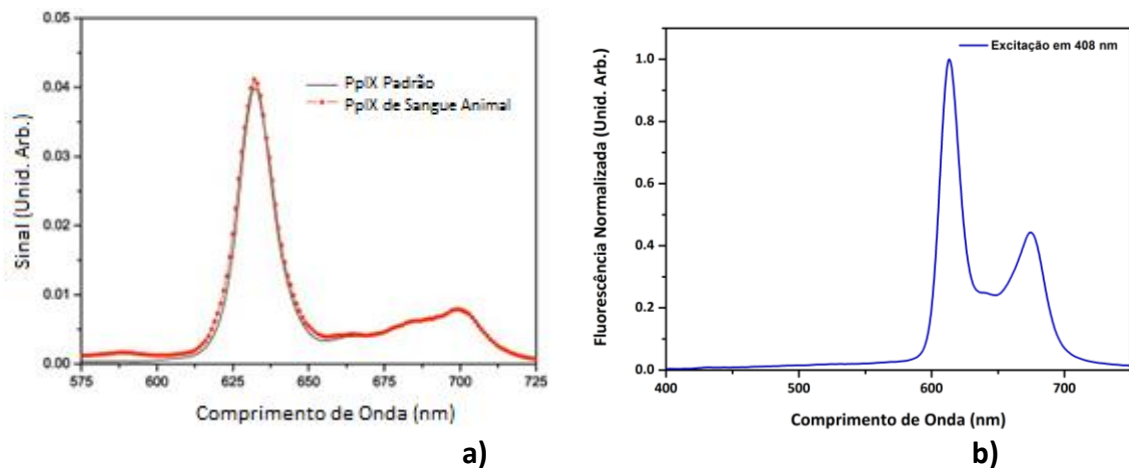


Figura 22 - Espectro de emissão de fluorescência excitado em 408 nm de: a) PpIX; b) Photogem.

Fonte: a) Adaptada de SILVA (34); b) Elaborada pela autora.

A fluorescência é uma técnica já utilizada para evidenciação de lesões e permite a melhor diferenciação dos tecidos, uma vez que um tecido tumoral tem fluorescência diferente de um tecido saudável. (100) A Figura 23 mostra dois exemplos da evidenciação do tumor no modelo de CAM e identificação exata com as imagens por fluorescência.

As imagens por fluorescência contribuíram, então, não só para o acompanhamento do fotossensibilizador, como para a identificação da localização tumoral e sua viabilidade. A observação de uma fluorescência verde muito intensa no tumor era um indicativo de que ele não estava viável. Além disso, como a produção da PpIX exige que haja viabilidade celular, a verificação da ausência de fluorescência nessa região após aplicação do ALA assinalava a inviabilidade do tumor e, portanto, essa ausência de fluorescência na região do vermelho pôde ser usada para identificar tumores a serem descartados.

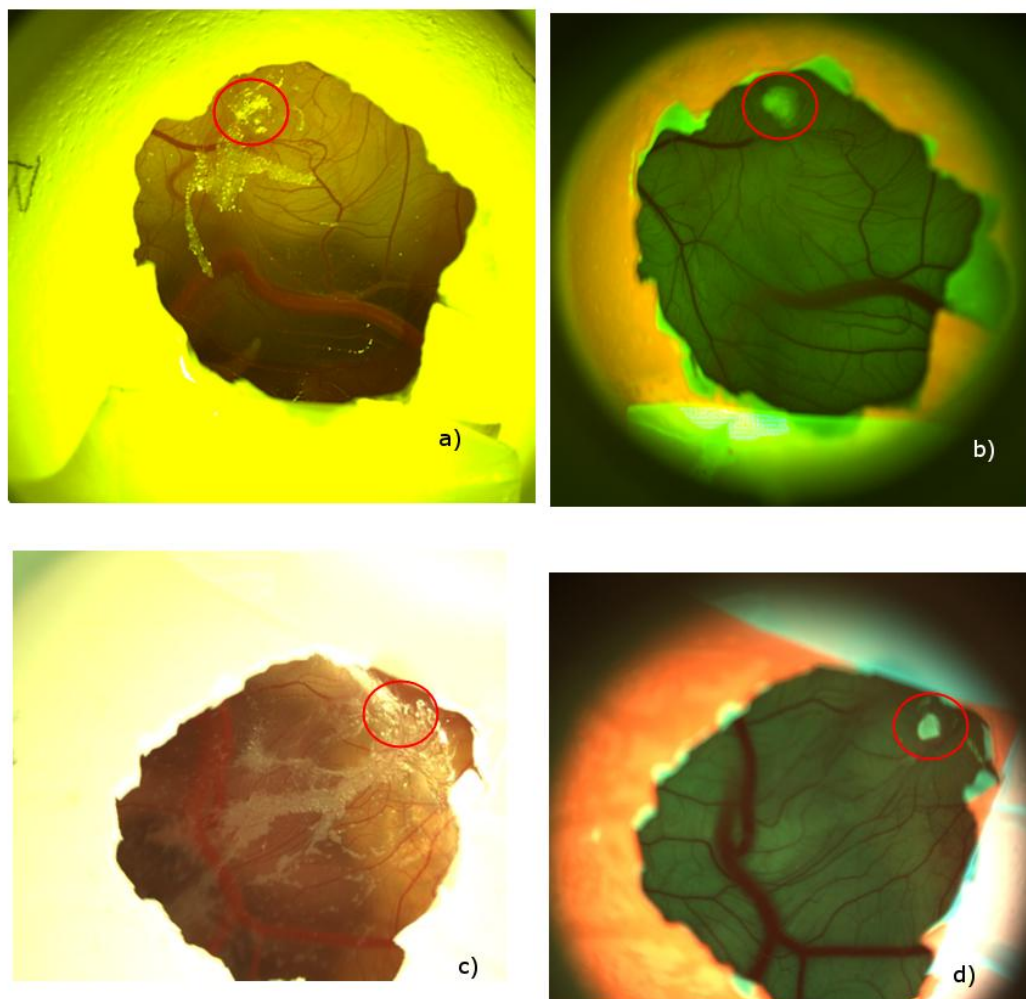


Figura 23 - Evidenciação do tumor por fluorescência no modelo de membrana corioalantóica. a) Imagem branca de um tumor na CAM. b) Imagem por fluorescência do mesmo tumor, evidenciando a massa tumoral. c) Imagem branca de outro tumor na CAM, mostrando um tumor mais espalhado ao longo da CAM. d) Imagem por fluorescência mostrando exatamente a localização da massa tumoral.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1 Produção da PpIX – Vasos Sanguíneos

Os testes no modelo de membrana corioalantóica, sem a presença do tumor, foram feitos, inicialmente, para entender a farmacodinâmica dos fotossensibilizadores com os vasos sanguíneos, analisando a sua interação com a rede vascular.

O primeiro composto usado foi o ALA, o precursor do fotossensibilizador endógeno PpIX e, a princípio, duas vias de entrega foram usadas: tópica e intravenosa, a fim de verificar a influência das diferentes formas de aplicação na produção da PpIX. A Figura 24 mostra uma sequência de imagens com aplicação tópica do ALA de 0 a 75 horas. A primeira imagem (0 h) mostra a autofluorescência da CAM, mostrando que os componentes do ovo apresentam

autofluorescência característica na região do verde, e que os vasos sanguíneos, sem adição de qualquer marcador, se apresentam como regiões mais escuras e levemente avermelhadas. Com o tempo, os vasos de maior calibre começam a mostrar um aumento da fluorescência vermelha, característico da PpIX, principalmente das células endoteliais que compõe os vasos sanguíneos, indicando o início da produção do fotossensibilizador. A fluorescência vermelha aumenta com o passar do tempo, não apenas nos vasos de calibre grande, como em toda a região, como visualizado depois de 75 horas de acompanhamento, evidenciando a produção da PpIX em todo o tecido.

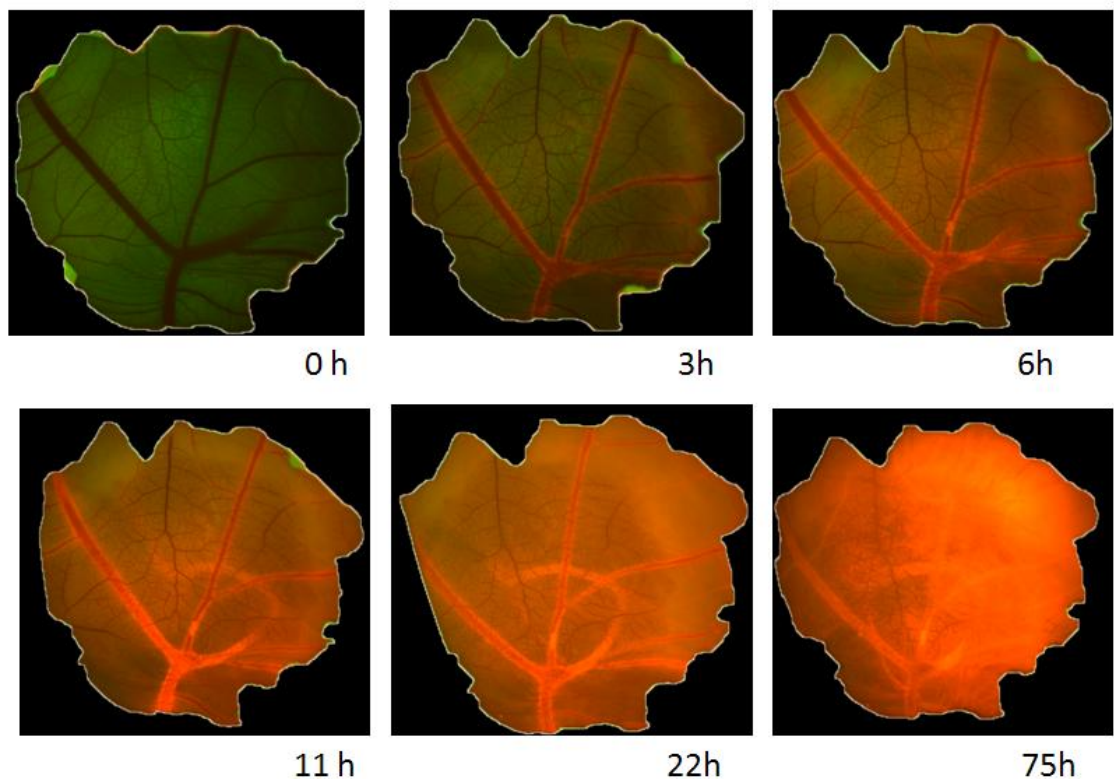


Figura 24 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA tópico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na aplicação tópica ocorre, primeiramente, a difusão do ALA pela membrana e as células presentes nas camadas mais superficiais da CAM são as primeiras a receber a molécula para dar início à produção da PpIX. O ALA por si só não apresenta fluorescência característica quando excitado com luz azul e as células epiteliais, que compõe os vasos sanguíneos, realizam naturalmente a biossíntese do grupo heme nas mitocôndrias. Como a protoporfirina IX é uma das moléculas dessa rota sintética, as células iniciam esse processo, passando a acumular a PpIX, sendo o aumento da fluorescência vermelha um indicativo deste acúmulo.

A quantificação dessa fluorescência foi feita com uma rotina do MATLAB[®]. O gráfico correspondente a esses valores em relação ao tempo mostra um comportamento exponencial e a curva de melhor ajuste para a produção da PpIX segue uma equação exponencial de crescimento, que pode ser dada por uma função descrita pela equação (1):

$$I(t) = I_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) + k \quad (1)$$

Nessa equação, I corresponde à intensidade da fluorescência vermelha em unidades arbitrárias, t ao tempo (em horas), I_0 corresponde ao valor da intensidade de fluorescência inicial (em $t=0$ h), que seria zero se não houvesse componentes de vermelho na imagem inicial, já ainda não ocorreu neste ponto a produção de PpIX. (32) Entretanto, como há vermelho na imagem de autofluorescência dos próprios vasos sanguíneos, foi adicionado o parâmetro k na equação, que corresponde ao melhor ajuste da curva, deslocando a curva para perto do primeiro valor de I . O valor de τ corresponde ao tempo característico de formação da PpIX e é um dos parâmetros que permite a comparação entre os resultados. Quanto maior o valor de τ , mais tempo o parâmetro de intensidade leva para atingir uma constante de saturação. O software Origin[®] foi usado para encontrar a melhor curva de ajuste com os dados experimentais, possibilitando a descrição do comportamento gráfico de produção da PpIX.

O gráfico da Figura 25 mostra os dados experimentais normalizados e a curva seguindo a equação 1 para a aplicação tópica do ALA. É possível observar que a produção da PpIX acontece de forma quase linear nas primeiras 7 horas e a saturação da produção começa depois de 10 horas de incubação. A análise em 75 horas de experimento apresenta um τ igual a 11,54 horas. Quando essa análise é repetida para três ovos, o valor médio de τ foi de $(8,3 \pm 3,6)$ horas, sempre apresentando um comportamento semelhante.

O aumento da produção acontece nas primeiras 6 horas, seguindo um aumento linear. Após 75 horas, a fluorescência é encontrada em toda a região e não há diminuição em sua intensidade. Esse é um dado importante quando aplicado à clínica, pois é preciso estimar o tempo de espera mais adequado para formação e acúmulo da PpIX no tecido com base na informação provida pela fluorescência, além de analisar a localização do fotossensibilizador.

O valor médio do *R-Square* foi de (96 ± 2) % para todos os ovos analisados, mostrando que a curva tem uma boa correlação com os dados experimentais.

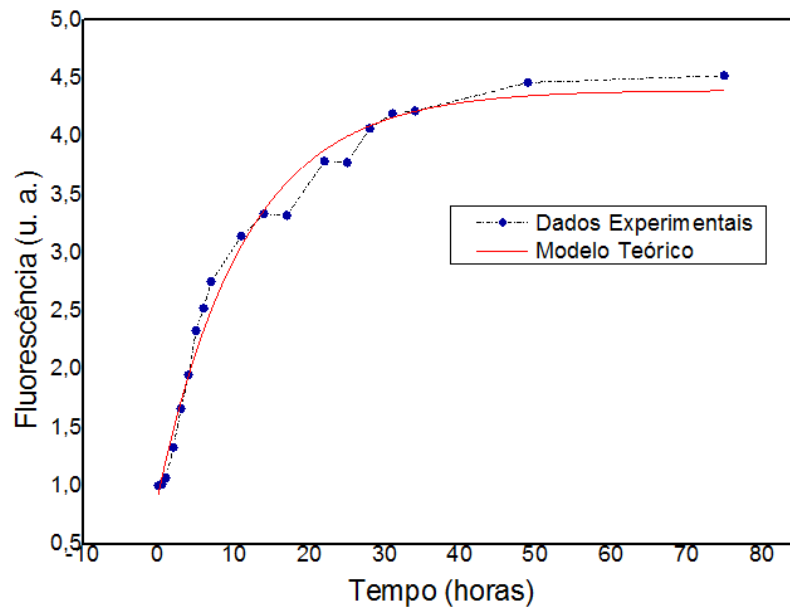


Figura 25 - Gráfico correspondente à fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA tópico ($\tau = 11.53$ horas).

Fonte: Elaborada pela autora.

A derivada de uma função com relação a um determinado parâmetro determina a sua taxa de variação com relação ao mesmo. Portanto, quanto maior o valor da sua derivada (no caso, com relação ao tempo), maior a sua taxa de variação temporal em um determinado intervalo. Com isso, a curva obtida a partir dos dados experimentais permite calcular sua derivada e, com isso, a taxa de variação correspondente a ela.

A Figura 26 mostra a derivada dessa função e fica evidente que a taxa de variação correspondente à taxa de produção de PpIX é mais alta nas primeiras horas, começando a estabilizar após, aproximadamente, 10 horas, o que corrobora com a análise do gráfico da Figura 25.

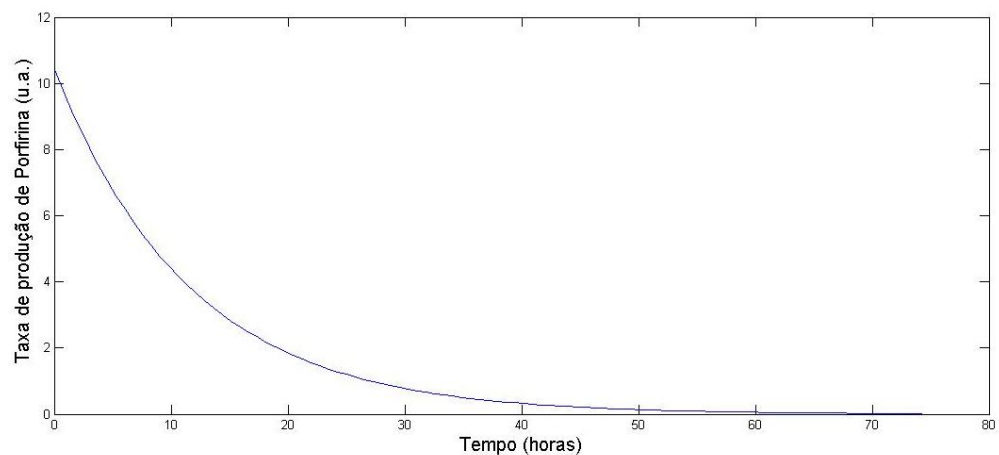


Figura 26 - Derivada da função para ALA tópico sem tumor.

Fonte: Elaborada pela autora.

A produção da PpIX para aplicação intravenosa de ALA também foi avaliada. A Figura 27 mostra essa produção, evidenciando já em 4 horas uma intensa fluorescência na região do vermelho presente nos vasos principais da CAM.

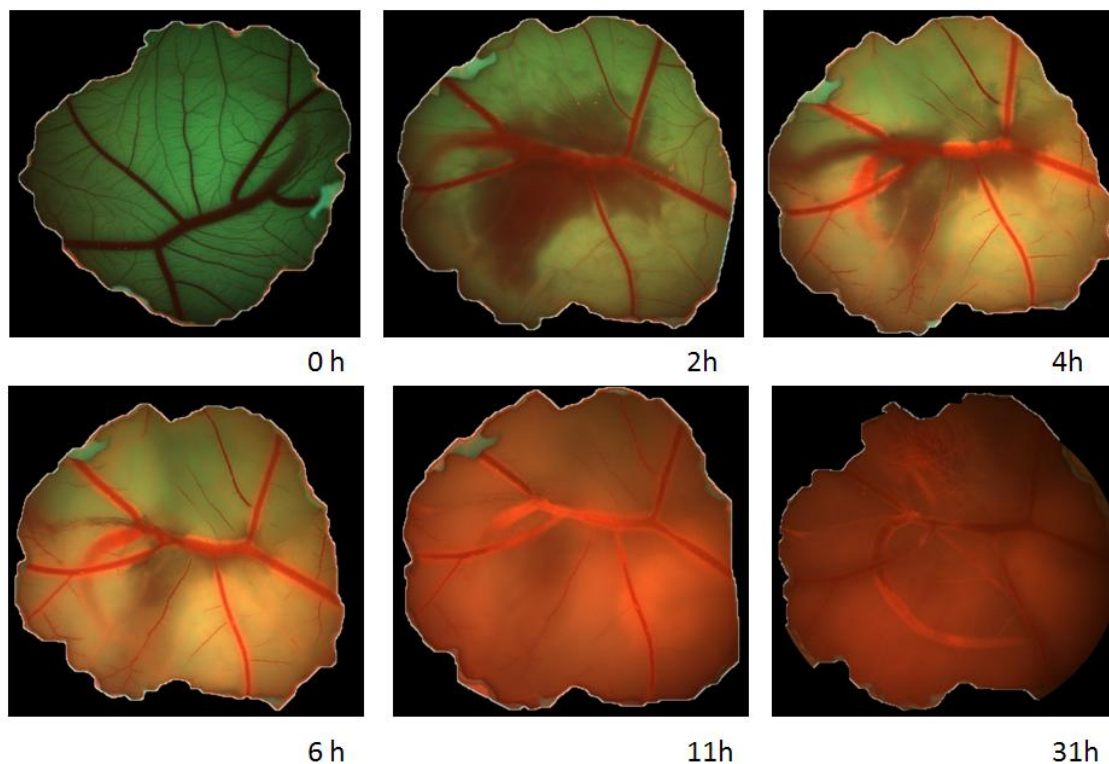


Figura 27 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA intravenoso.

Fonte: Elaborada pela autora.

Seguindo o mesmo processamento no MATLAB[®], foi obtido o gráfico da Figura 28 que mostra um comportamento bem semelhante ao da aplicação tópica, de acordo com a mesma equação (1), com τ de 15,71 horas. O τ médio foi dado por $(17,7 \pm 2,8)$ horas, maior que o da aplicação tópica, mostrando que a aplicação intravenosa demora mais tempo para estabilizar a produção da PpIX. O *R-Square* médio foi dado por $(97,7 \pm 0,3)$ %, também mostrando um ótimo ajuste da curva com os dados experimentais.

Mesmo com um tempo maior de estabilização para a aplicação intravenosa, a aplicação tópica foi escolhida como mais vantajosa, uma vez que apresenta um comportamento semelhante ao intravenoso e não causa qualquer dano à rede de vasos sanguíneos, ao contrário da aplicação intravenosa, que provoca um pequeno extravasamento de sangue no local da injeção. Na aplicação clínica, a aplicação tópica é amplamente utilizada, principalmente por ter um efeito mais localizado e não causar fotossensibilidade de outras regiões do corpo.

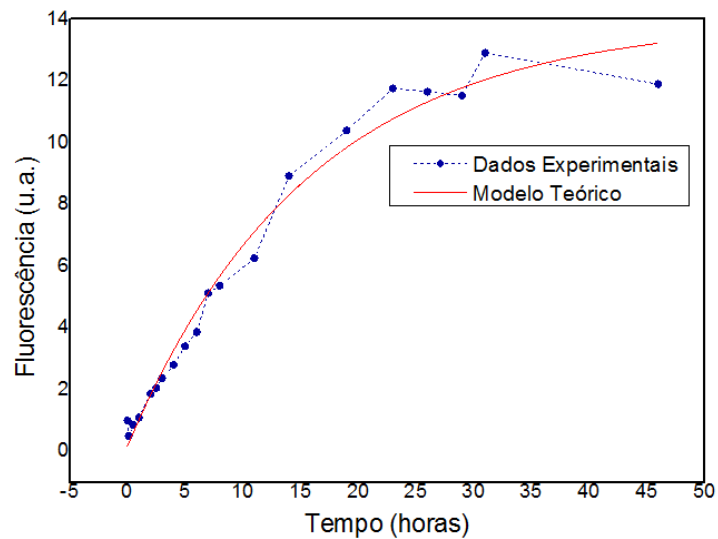


Figura 28 - Gráfico correspondente à fluorescência ao longo do tempo com aplicação de ALA intravenoso. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Produção da PpIX - Modelo Tumoral

Com o modelo tumoral estabelecido e, entendida a dinâmica do fotossensibilizador, foi possível conduzir os experimentos para o acompanhamento por fluorescência da produção da PpIX no modelo tumoral. Como o tumor de Ehrlich é uma linhagem celular de mais fácil manuseio em laboratório, foi escolhido o modelo de CAM com a aplicação de um fragmento de biópsia de Ehrlich subcutâneo para esses experimentos.

A presença de fotossensibilizador na célula e, portanto, da fluorescência vermelha, é diretamente relacionada à viabilidade da célula. Essa característica permitiu a verificação direta de viabilidade do modelo tumoral sem necessidade de análise no microscópio, uma vez que se as células tumorais apresentassem fluorescência vermelha após administração do ALA, havia uma indicação de que as células estavam viáveis e, portanto, o modelo estava bem estabelecido.

A Figura 29 mostra a análise qualitativa da produção da PpIX com a aplicação tópica do ALA no modelo de vasos e tumor. É possível notar a fluorescência vermelha na região tumoral já 1,5 horas após a aplicação e essa fluorescência se intensifica nessa região, com o tempo. Depois de 24 horas, há a formação de PpIX em toda a CAM, com uma concentração maior observada na região tumoral.

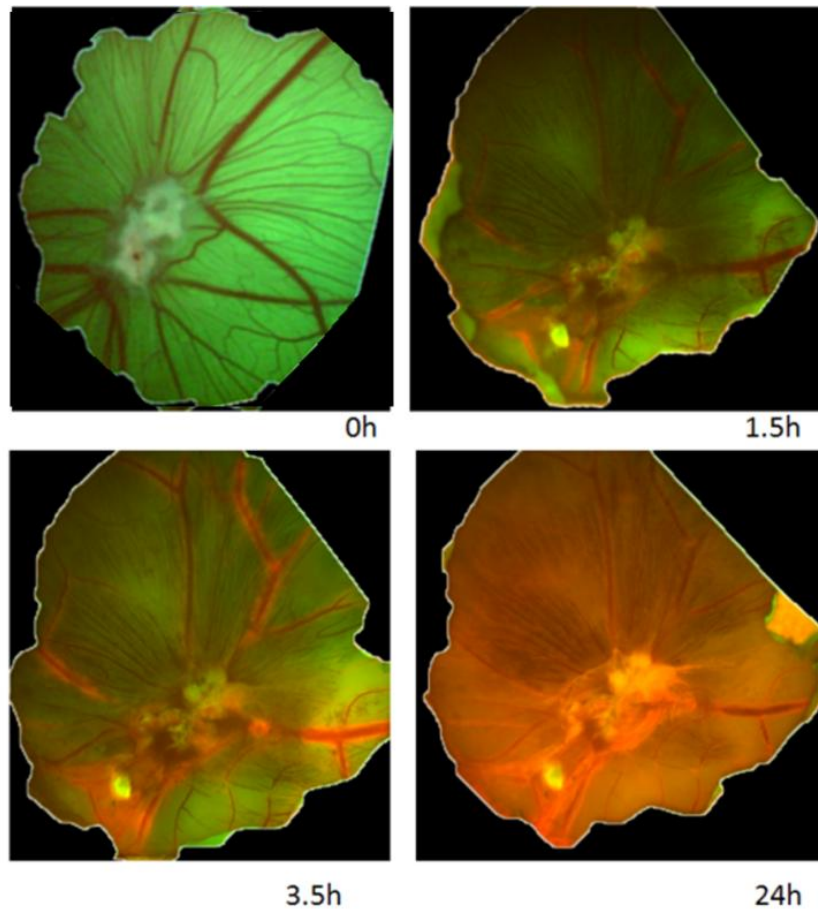


Figura 29 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência nos vasos e no tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA tópic.

Fonte: Elaborada pela autora.

Antes de o tumor apresentar a produção da PpIX, a fluorescência vermelha característica é observada nos vasos sanguíneos, já que as primeiras células que recebem a solução de ALA são as endoteliais, que formam uma camada monocelular e, portanto, de espessura muito menor que a massa tumoral. Assim, antes de 1.5 horas, a produção já se inicia nessas células enquanto o ALA se difunde por toda a massa tumoral para que a produção da PpIX possa acontecer. O acúmulo do fotossensibilizador no tumor pode ser resultado tanto da produção de PpIX das células tumorais quanto da sua distribuição sistêmica através dos vasos sanguíneos, bem como de uma combinação de ambos os fenômenos. Entretanto, a taxa de produção no tumor é muito maior quando comparada a dos tecidos saudáveis, como mucosas, que também são regiões bastante vascularizadas. (44,108)

A avaliação da fluorescência é mostrada no gráfico da Figura 30, com uma curva de ajuste seguindo a equação (1) e, portanto, com o mesmo comportamento da aplicação sem tumor. Apesar do mesmo comportamento, o tempo de formação característico τ pode indicar o quanto o tumor na região pode influenciar na dinâmica de produção da PpIX.

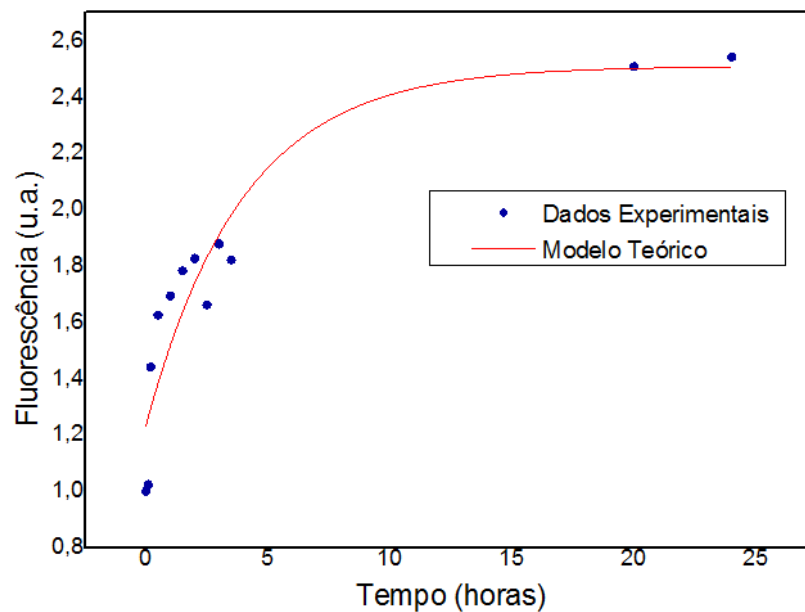


Figura 30 - Gráfico correspondente à fluorescência nos vasos e tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA tópico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para toda a CAM, o τ médio obtido para três ovos foi de $(6,7 \pm 2,5)$ horas, enquanto a análise apenas para a região tumoral apresentou $\tau = (8,1 \pm 3,4)$ horas, mostrando que a produção na região tumoral demora mais para estabilizar quando comparada a toda a região da membrana, como era esperado com base na análise qualitativa. Esses valores corroboram com a informação de que o ALA se concentra nas células tumorais, uma vez que os vasos produzem nas primeiras horas com taxa elevada, mas o tumor retém o ALA ao longo do tempo, produzindo assim PpIX em maior quantidade e por mais tempo.

Esse valor médio do valor de τ para o modelo tumoral é menor do que o valor encontrado apenas para os vasos sanguíneos, como era esperado, uma vez que a produção é concentrada apenas em uma região – o tumor. O valor médio o *R-Square* foi de $(88 \pm 7)\%$, mostrando também um valor aceitável de correlação entre os dados experimentais e a curva de ajuste. A menor correlação obtida com o tumor deve-se ao fato de que existem células e tecidos diferentes ao da CAM, constituindo heterogeneidades estruturais e bioquímicas que resultam em uma produção de PpIX menos homogênea. O ajuste teórico proposto não leva em consideração essas heterogeneidades e seu efeito na produção de PpIX.

Estudos clínicos (108) e testes em animais (109) encontrados na literatura mostram gráficos da produção da PpIX com comportamento semelhante aos gráficos encontrados no nosso modelo de CAM, com o pico da fluorescência de produção acontecendo entre 4 e 6 horas após aplicação do ALA.

O cálculo das derivadas da curva de fluorescência foi realizado para obtenção da taxa de produção da PpIX, tendo sido tomada a derivada para toda a CAM e para a região apenas do tumor, ambas mostradas na Figura 31. Essa análise evidencia que, na região tumoral, há uma demora maior em estabilizar a produção de PpIX quando comparada a toda CAM.

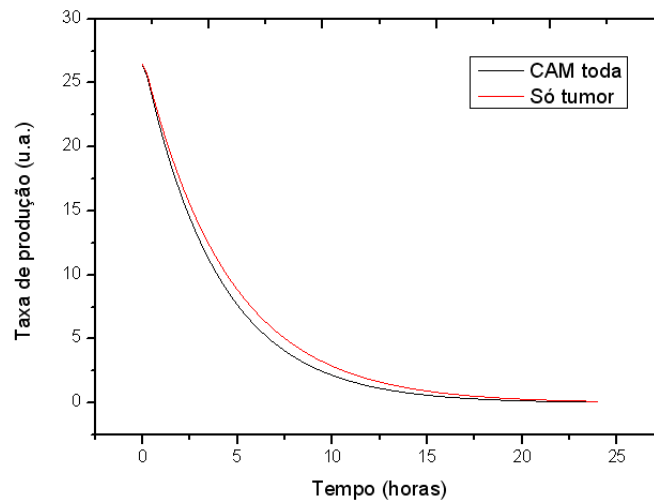


Figura 31 - Derivada da função de produção da PpIX com aplicação de ALA tópico. a) em toda a região ($\tau = 6,7$ horas). b) Apenas no tumor ($\tau = 8,1$ horas).

Fonte: Elaborada pela autora.

Depois de 24 horas de análise e coletados os dados necessários para análise quantitativa, esse tumor foi retirado para análise em microscópio confocal, para verificação da fluorescência. A Figura 32-a mostra a fluorescência de um vaso sanguíneo principal e das células ao redor. Um aglomerado celular com uma fluorescência intensa junto com o vaso sanguíneo pode ser visto na Figura 32-b.

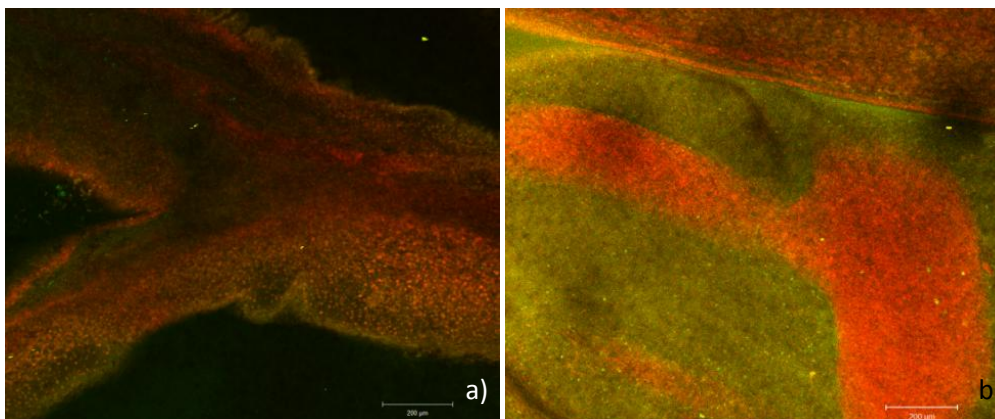


Figura 32 - Imagens no microscópio confocal da região de vasos sanguíneos e tumor 24 horas após aplicação tópica de ALA. a) região do vaso sanguíneo com células ao redor mostrando presença de fluorescência vermelha. b) vaso sanguíneo ao lado de um aglomerado de células também fluorescendo em vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dessas imagens, foi possível reiterar que o corte da membrana já não era necessário para análise da viabilidade ou interação, uma vez que a produção da PpIX já poderia indicar a sobrevivência das células tumorais.

A aplicação intravenosa ainda foi repetida para o ALA e também foi verificado o acúmulo de fluorescência na região tumoral (Figura 33). Esse acúmulo em ambas as aplicações é uma comprovação de que o modelo tumoral desenvolvido na membrana corioalantóica pode representar o arranjo entre células e vasos sanguíneos, mostrando ainda que o fotossensibilizador acumula-se preferencialmente no tumor, assim como acontece em modelos animais e no uso clínico.

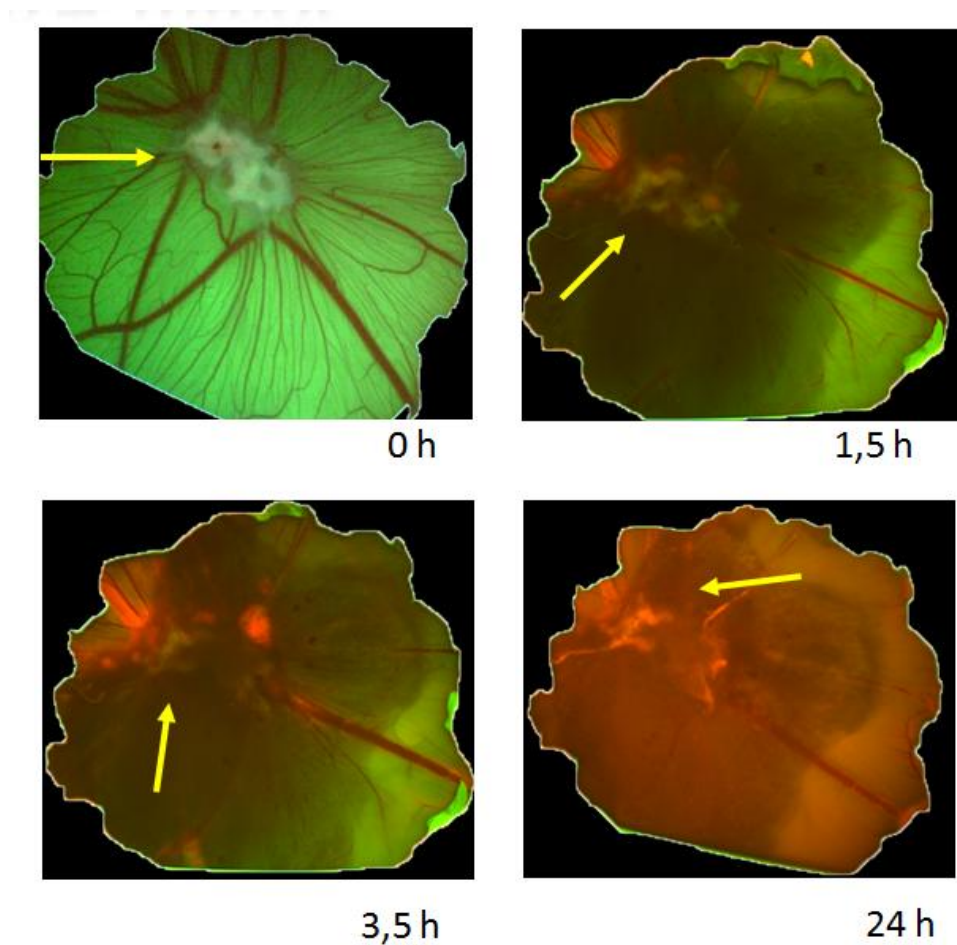


Figura 33 - Acompanhamento da formação da PpIX por fluorescência nos vasos e no tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA intravenoso.

Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento mostrado no gráfico da Figura 34 segue o comportamento da produção da PpIX em todas as outras aplicações, com a mesma equação de ajuste. O τ encontrado para toda a CAM é de por $(6,9 \pm 2,0)$ horas, enquanto o τ apenas para a região tumoral é 8,18 horas, seguindo exatamente o comportamento da aplicação tópica. Este

resultado reforça a escolha da aplicação tópica para os testes seguintes, diante das vantagens que esta última apresenta.

O *R-Square* foi de $(82\pm 7)\%$, indicando um ajuste aceitável dos dados experimentais.

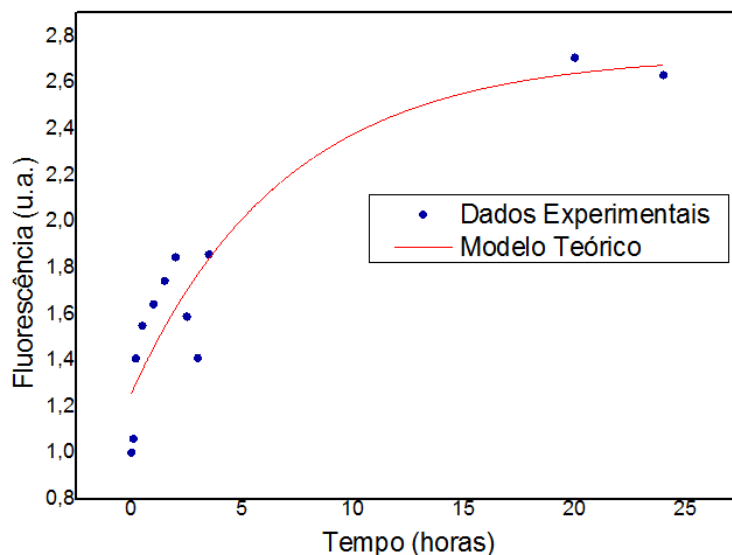


Figura 34 - Gráfico correspondente à fluorescência nos vasos e tumor ao longo do tempo com aplicação de ALA® intravenoso.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3 Photogem® - Vasos Sanguíneos

Como as aplicações tópica e intravenosa do ALA apresentaram comportamentos semelhantes, para o Photogem® foi escolhida apenas a aplicação tópica. A Figura 35 mostra esse comportamento no modelo de CAM sem tumor. Imediatamente após a aplicação da solução (0 h), é possível ver uma intensa fluorescência vermelha característica, embora o fotossensibilizador não esteja nas células da CAM ou dos vasos. Após 30 minutos, com a difusão pela membrana, todo o sistema apresentou fluorescência vermelha e, com o passar do tempo, essa fluorescência se concentrou nos vasos sanguíneos e no embrião.

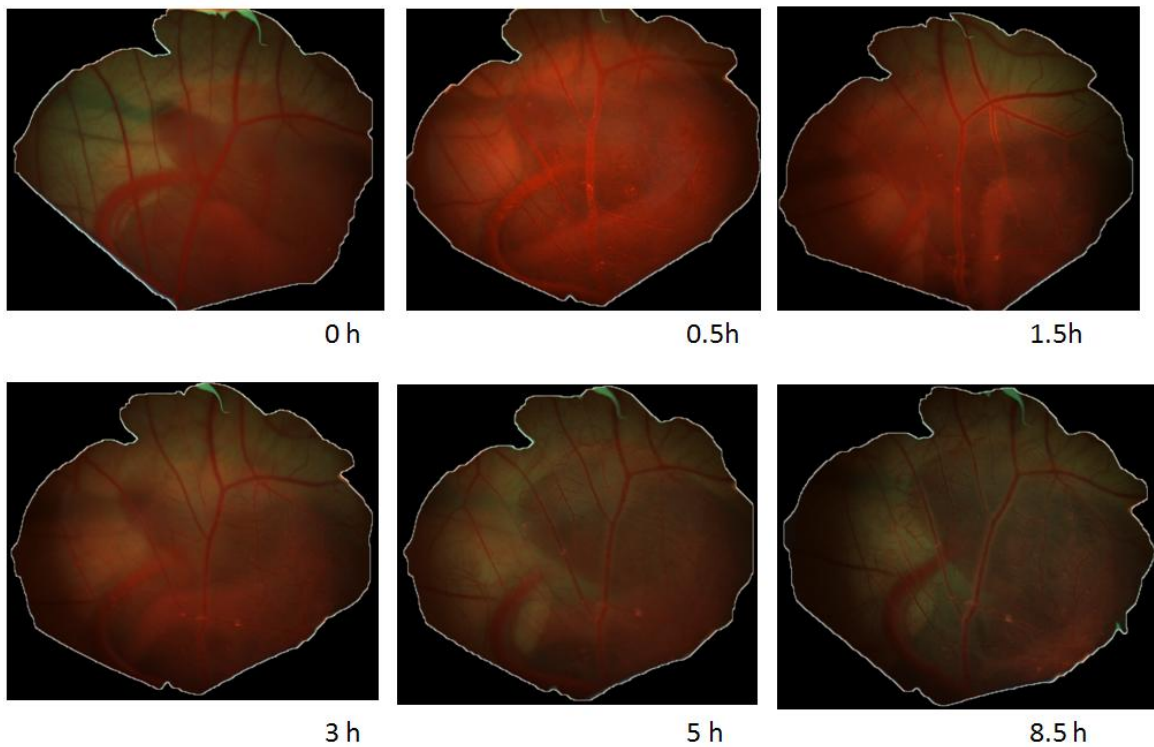


Figura 35 - Acompanhamento da fluorescência da PpIX ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico.
Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento do Photogem® é completamente oposto quando comparado ao ALA, uma vez que o Photogem® já é o próprio fotossensibilizador em sua forma final e não um pró-fármaco, e por isso não precisa de um tempo para que seja sintetizado. É preciso apenas que ocorra a difusão das moléculas pela CAM e que estas interajam com as células epiteliais dos vasos sanguíneos. Como as moléculas de ambos os compostos (Photogem® e ALA) são de tamanhos diferentes, a própria interação entre as moléculas e as membranas celulares são diferentes. Parte da porfirina do Photogem® é degradada, mas parte também é transportada pela corrente sanguínea, aumentando a difusão por todo o modelo, que diminui sua concentração nos vasos superficiais gradativamente.

O gráfico da Figura 36 mostra claramente essa inversão de comportamento, sendo que a curva que melhor se ajusta aos dados experimentais é uma exponencial decrescente, cuja expressão é dada pela equação (2):

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} + k \quad (2)$$

Nessa equação, I também corresponde ao valor da fluorescência vermelha, t o tempo em horas, I_0 o valor da intensidade de fluorescência inicial, e k a constante para melhor ajuste.

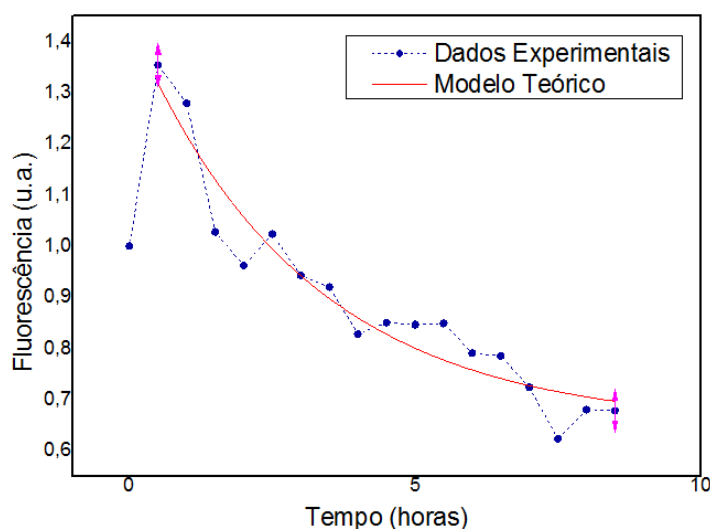


Figura 36 - Gráfico correspondente à fluorescência ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico.
Fonte: Elaborada pela autora.

O τ , nesse caso, é de 3,02 horas e a média dos três ovos é de 2,85 horas. Importante observar que, apesar de a maior intensidade de fluorescência ser observada na primeira hora, o fotossensibilizador não está nos vasos e a aplicação da luz nesse intervalo de tempo não resultaria em destruição dos vasos sanguíneos, diferentemente do ALA, para o qual a produção já acontece dentro das células.

O valor médio do *R-Square* foi de $(87\pm 4)\%$, mostrando que a equação é bem ajustada também para o Photogem®

4.2.4 Photogem® - Modelo Tumoral

Aplicado o fotossensibilizador no modelo tumoral, também com a via de entrega tópica, o Photogem® seguiu o mesmo comportamento apresentado no modelo sem tumor. Após a aplicação da solução (0 h) foi possível verificar uma intensa fluorescência vermelha em toda a CAM, mostrado na Figura 37 e, após 1,5 horas, já é possível notar que o FS se concentra na região tumoral. Esse comportamento continua sendo observado ao longo do tempo e, cada vez mais, o tumor apresenta maior fluorescência enquanto esta vai diminuindo no restante da CAM.

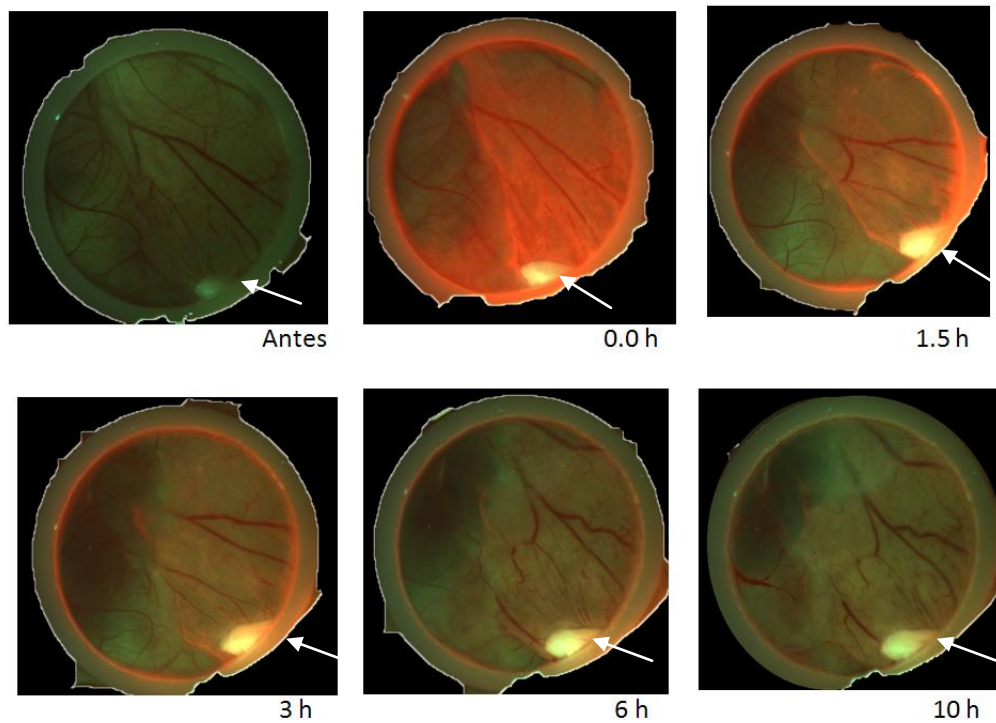


Figura 37 – Acompanhamento da PpIX por fluorescência nos vasos e no tumor ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico. A seta indica a região do tumor.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico da Figura 38 também se comportou segundo a equação exponencial de decaimento apresentada na Equação (2), mostrando o mesmo comportamento esperado para esse fotossensibilizador. O τ médio determinado para a toda região foi de $(4,5 \pm 0,9)$ horas, enquanto o τ apenas para a região tumoral foi de $(9,2 \pm 1,4)$ horas, mostrando que o decaimento do Photogem® é mais lento para a região tumoral, como era esperado.

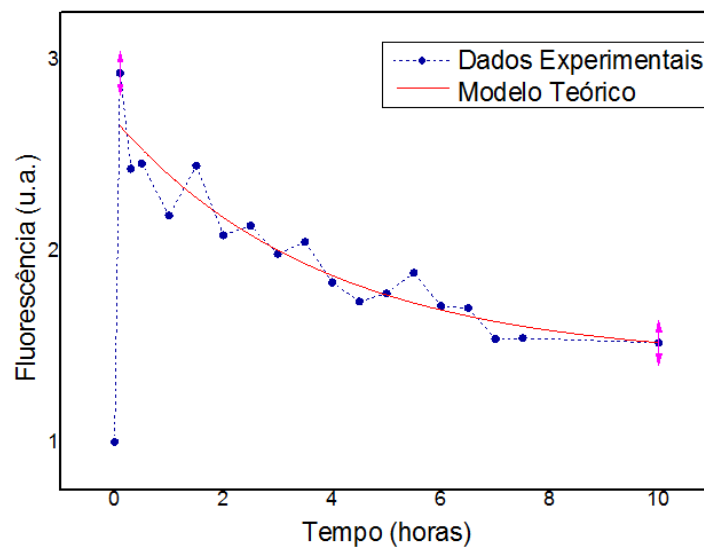


Figura 38 - Gráfico correspondente à fluorescência nos vasos e tumor ao longo do tempo com aplicação de Photogem® tópico.

Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens de fluorescência sugerem claramente que o FS se acumula no tumor ao longo do tempo e, por isso, demora mais tempo para estabilizar o decaimento da fluorescência. O *R-Square* médio observado foi de $(79\pm 9)\%$.

É importante ressaltar que a heterogeneidade da distribuição do FS no tecido interfere na cinética de acúmulo do FS, que é diferente em tecido tumoral e saudável. O Photogem[®] é uma molécula maior que o ALA e é uma solução composta por uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de hematoporfirinas. O ALA, portanto, apresenta uma difusão melhor quando comparada à da mistura de porfirinas e, em geral, resultou em uma produção mais homogênea da PpIX. Entretanto, para ambos os fotossensibilizadores, houve acúmulo na região com o tumor, apesar da distribuição mais heterogênea do Photogem[®].

A Figura 39 mostra o Photogem[®] depois de 1 hora de aplicação, que já está todo retido na região do tumor. Esse pouco tempo de incubação mostra que esse parâmetro também pode variar de acordo com o metabolismo e viabilidade tumoral. Nesse caso, fica claro o quanto o tumor retém mais a solução de Photogem[®] quando comparada ao restante do sistema, mostrando uma característica importante e desejada nesses compostos – seletividade a células tumorais.

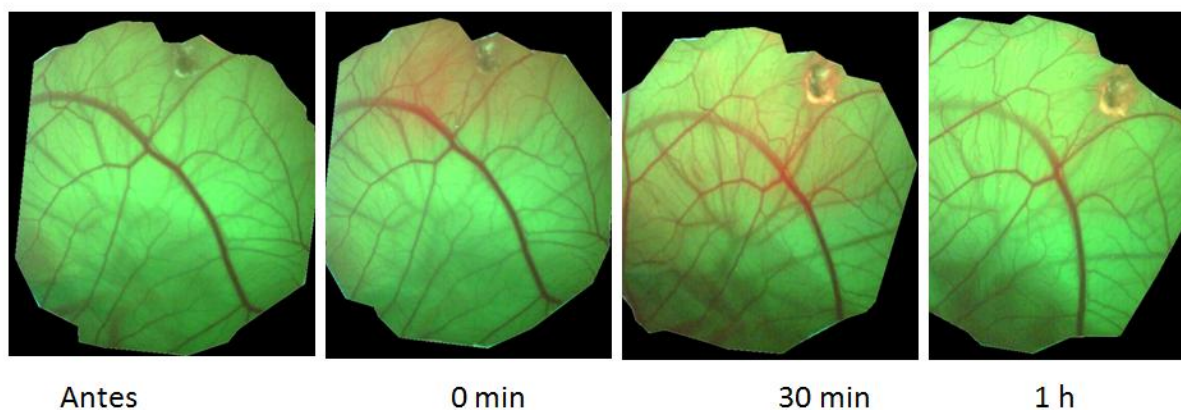


Figura 39 – Photogem[®] retido na região do tumor 1 hora depois da aplicação tópica

Fonte: elaborada pela autora

Os valores médios de τ e *R-Square* para as aplicações tópica e intravenosa do ALA e para o Photogem[®] foram sumarizadas na tabela 2, a fim de facilitar a comparação entre os valores obtidos.

Com a análise desses dados e entendimento do acúmulo do fotossensibilizador na região tumoral, foram realizados, então, os testes de aplicação da terapia fotodinâmica.

Tabela 2 – Valores de τ e *R-Square* encontrados para ambos FS – PpIX e Photogem®.

FS	Vasos Sanguíneos		Modelo Tumoral		
	τ médio (horas)	<i>R-Square</i> (%)	τ médio (horas)		<i>R-Square</i> (%)
			CAM+ Tumor	Só Tumor	
ALA Tópico	8,3 ± 3,6	96 ± 2	6,7 ± 2,5	8,1 ± 3,4	88 ± 7
ALA IV	17,7 ± 2,8	97,7 ± 0,3	6,9 ± 2,0	8,2 ± 3,3	82 ± 7
Photogem®	2,8 ± 1,4	87 ± 4	4,5 ± 0,9	9,2 ± 1,4	79 ± 9

Fonte: elaborada pela autora

4.3 Terapia Fotodinâmica no Modelo Tumoral

Ficou definida a aplicação tópica como a melhor forma de entrega do fotossensibilizador para esse modelo tumoral, por não causar qualquer dano vascular na região durante a aplicação. A partir das análises anteriores, o tempo de incubação escolhido para a aplicação da luz foi o de 4 horas, baseado no menor tempo de espera necessário de interação do fotossensibilizador, com a garantia de localização na região tumoral.

Duas fontes de luz diferentes foram utilizadas: LED e Laser com dose total de 50 J/cm² e irradiância de 80 mW/cm². Ambos os grupos irradiados apresentaram o mesmo comportamento qualitativo e quantitativo, entretanto, todos os grupos apresentados a seguir foram irradiados com o laser para melhor comparação visual dos resultados entre os fotossensibilizadores.

Com a aplicação de ALA, a sequência de imagens da Figura 40 mostra a evolução da fluorescência ao longo do tempo. Com 4 horas de incubação, como esperado, é possível verificar um aumento da fluorescência vermelha na região tumoral, mostrando a produção da PpIX. Imediatamente após a iluminação, há uma redução considerável dessa fluorescência, indicando que houve interação entre a luz e o fotossensibilizador, com a degradação do último. Como a solução de ALA continuava no ovo e a luz não interage com o pró-fármaco, após a iluminação, a produção de PpIX continua acontecendo e, após 7,5 h da TFD (que corresponde a 11,5 horas de experimento), o fotossensibilizador pode ser visto em toda a CAM, incluindo no embrião.

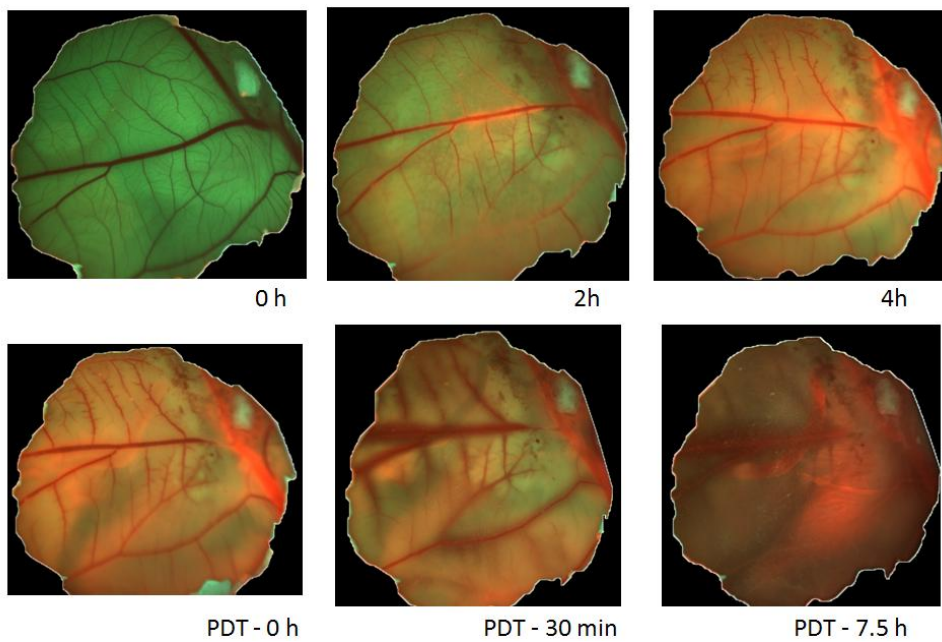


Figura 40 - Acompanhamento da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com aplicação de ALA tóxico.

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante observar que após a aplicação da luz, apesar da fluorescência vir de todas as regiões da CAM, a região tumoral que, antes, emitia quase toda a fluorescência vermelha, quase não apresenta mais intensidade. Isso pode ser explicado pelo fato de as células dessa região terem sofrido um dano fotodinâmico e não apresentarem mais viabilidade para recomeçar a produção da PpIX.

A quantificação da fluorescência é apresentada no gráfico da Figura 41, coincidindo com o comportamento qualitativo observado nas imagens.

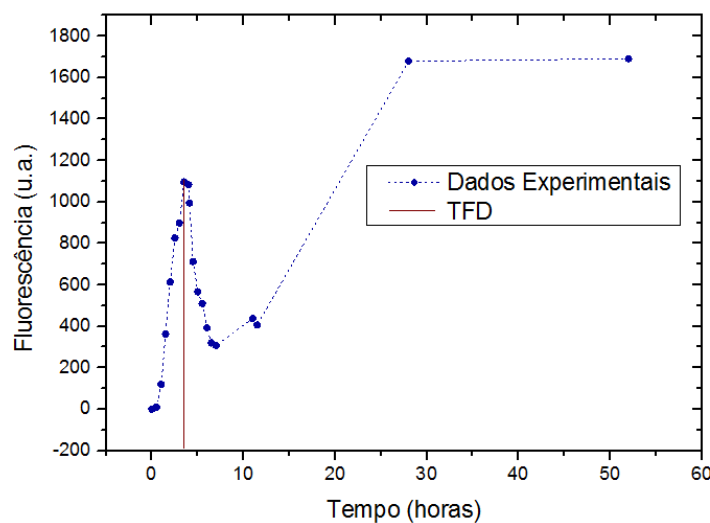


Figura 41 - Gráfico da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com aplicação de ALA tóxico. A linha vertical vermelha corresponde ao instante da iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível dividir esse gráfico em três regiões distintas de comportamento: I - de 0 h a 4 h (antes da aplicação TFD); II - de 4 h a 7 h correspondente ao consumo do fotossensibilizador e III - de 4 h a 48 h, quando recomeça a produção de PpIX, devido a presença de ALA remanescente no ambiente. Os gráficos foram analisados, então, separadamente (Figura 42).

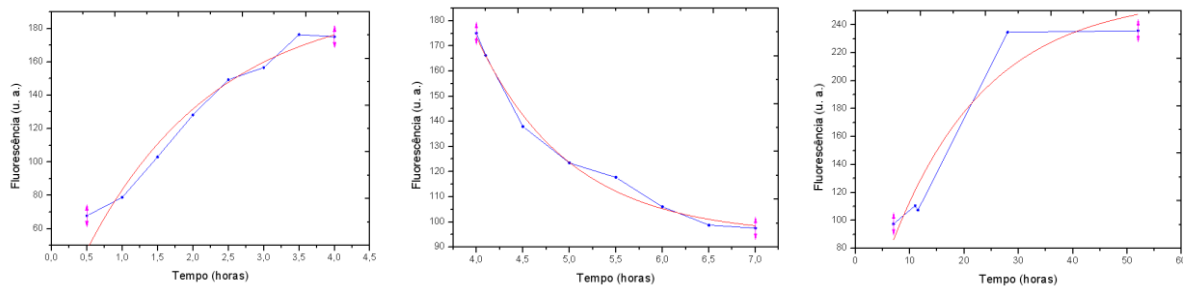


Figura 42 – Regiões separadas do gráfico 24. a) I - Entre 0h e 4h; b) II- Entre 4h e 7h; c) III- Entre 7h e 48h.

Fonte: Elaborada pela autora.

As curvas de melhor ajuste foram feitas para as três regiões. A região I, como o esperado, já que corresponde à produção do fotossensibilizador, teve a curva de ajuste seguindo a mesma equação apresentada para a produção da PpIX (equação (1)). É interessante notar que, após a degradação observada para a região II, quando a produção recomeça, a região III também apresenta uma curva de ajuste correspondente à equação (1). O reaparecimento da fluorescência entre 1 e 3 horas após a aplicação da luz é observada em diversos estudos e também é justificada na literatura pela presença da solução de ALA que ainda não tenha sido metabolizada e que continua presente no tecido mesmo depois da aplicação da TFD. (111-112)

O tumor, após a aplicação da luz, adquiriu um aspecto muito diferente do inicial, mostrado na Figura 43. A região tumoral excisionada para análise no microscópio, quando não submetida à TFD, permanece quase sempre fixa à membrana. Entretanto, em quase todos os tumores analisados após a aplicação da luz, o tumor estava bastante alterado, com perda da integridade tecidual, o que fazia a massa tumoral se soltar da membrana e, por vezes, se fragmentar em pequenos pedaços. Isso é uma indicação direta que a terapia fotodinâmica agiu efetivamente e destruiu uma fração importante das células da massa tumoral.

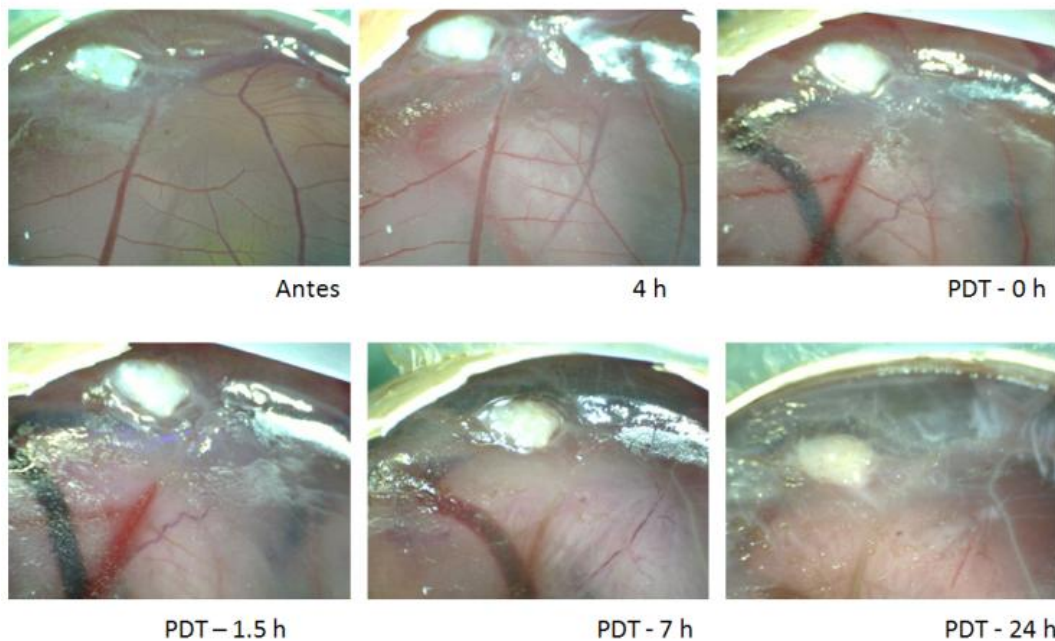


Figura 43 - Imagem branca ao longo do tempo dos vasos e do tumor após aplicação da TFD com ALA tópic. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 44 foi elaborada para mostrar e comparar os diferentes tipos de imagens de um mesmo tumor obtidas neste estudo. O verso da membrana mostrava um tumor sólido com uma clara interação entre os vasos sanguíneos e a massa tumoral. A imagem branca (Figura 44-a) foi feita da membrana sobre a lâmina de análise. A imagem por fluorescência (Figura 44-b) mostrou a produção na PpIX exatamente na região tumoral, evidenciando a localização preferencial do fotossensibilizador. A análise no microscópio confocal aconteceu priorizando os canais de emissão entre 400-500 nm (Figura 44-c), que foram coloridos em verde no próprio software e entre 600-700 nm (Figura 44-d), que foram coloridos em vermelho. A adição de acriflavina aconteceu para evidenciar as células (Figura 44-e), uma vez que este corante marca núcleos celulares e deixa mais evidente a localização das células tumorais.

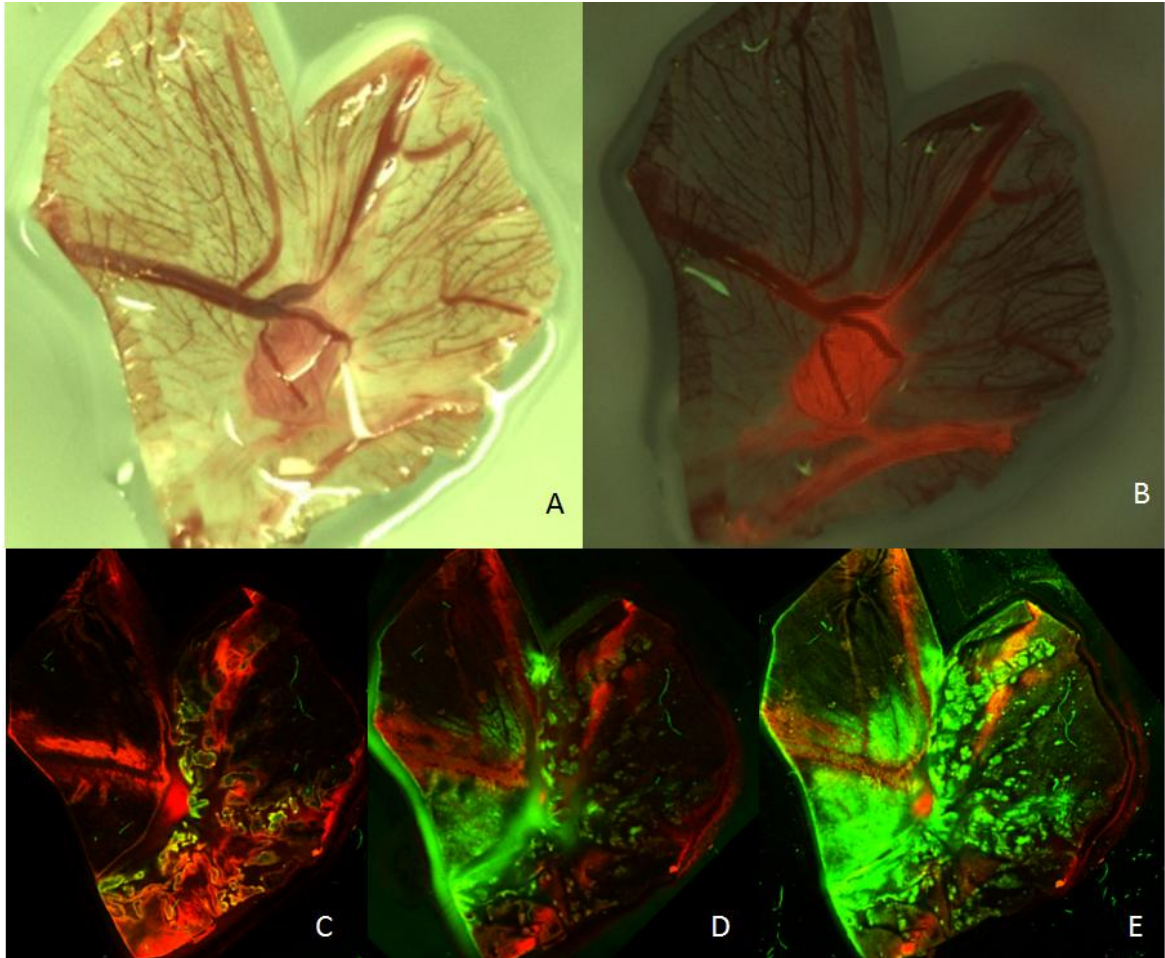


Figura 44 - Comparação entre os tipos de imagem. a) Imagem Branca. b) Imagem por fluorescência. c) Microfotografia por microscopia confocal priorizando canal entre 600-700 nm. d) Microfotografia por microscopia confocal priorizando canal entre 400-500 nm. e) Microfotografia por microscopia confocal com ambos os canais e adição de acriflavina.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise por microscopia confocal foi um instrumento para complementar o entendimento da interação entre o fotossensibilizador e o tumor antes e depois da aplicação da terapia fotodinâmica. A Figura 45 mostra o tumor sem aplicação de fotossensibilizador (Figura 45-a), após 4 horas de incubação do ALA (Figura 45-b), 2 horas depois da iluminação (Figura 45-c) e 24 h pós TFD (Figura 45-d). Foram selecionadas as imagens que mostram o canal de emissão entre 600 e 700 nm, correspondente à faixa do vermelho e, portanto, à PpIX, que foram coloridas no próprio software.

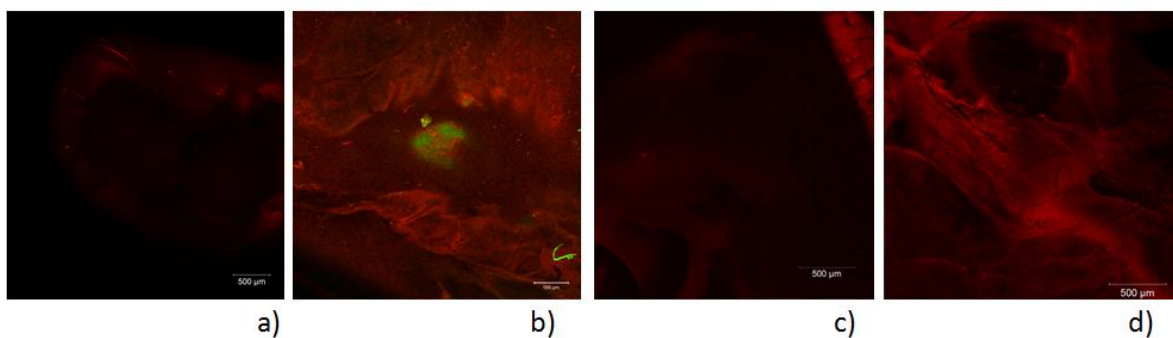


Figura 45 - Microfotografua por microscopia confocal no canal de emissão entre 600 - 700 nm para PpIX. a) controle, sem FS. b) 4 horas após aplicação do ALA. c) 2 horas após iluminação. d) 24 horas após iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento observado com a microscopia confocal foi exatamente o mesmo da análise realizada para o gráfico e para a imagem obtida por fluorescência. Na membrana do controle, sem o fotossensibilizador, quase não há fluorescência vermelha. Com a aplicação do ALA, após 4 horas, há a produção da PpIX, evidenciada pela fluorescência vermelha, que fica visivelmente maior. Logo após a iluminação, há uma redução significativa da quantidade de fluorescência vermelha detectada. Contudo, 24 horas após a iluminação, ocorre o recomeço da produção do fotossensibilizador, com algumas regiões que não apresentam produção, provavelmente por não haver viabilidade celular, já que algumas regiões do tumor foram destruídas pela terapia fotodinâmica.

Seguindo o mesmo protocolo de tempo de incubação, forma de aplicação e dose de luz, foi usado o Photogem[®] para a análise da terapia fotodinâmica. A Figura 46 mostra a fluorescência no tumor e arredores e, após a aplicação da luz, o decréscimo de fluorescência vermelha indica o consumo de quase todo o fotossensibilizador presente no tecido.

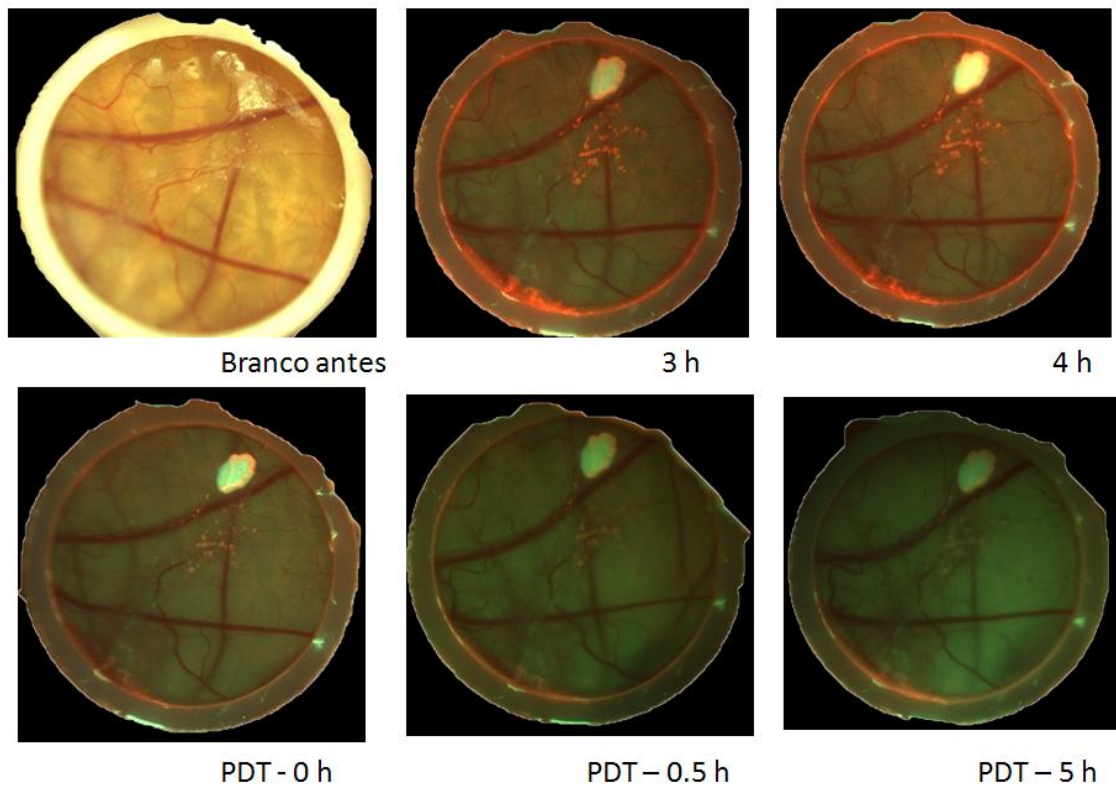


Figura 46 - Acompanhamento da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor após aplicação da terapia fotodinâmica, com uso de Photogem® tópico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferentemente do ALA, após consumido todo o Photogem® no tecido, não há mais produção e, conseqüentemente, nem aumento da fluorescência. O gráfico apresentado na Figura 47 mostra esse comportamento. A melhor curva de ajuste para os dados antes da TFD não obedece a equação (2) porque a iluminação aconteceu antes do decaimento, entretanto, o τ encontrado foi de 2,18 horas, mostrando que o decréscimo da fluorescência é mais rápido quando a luz é aplicada, como era esperado.

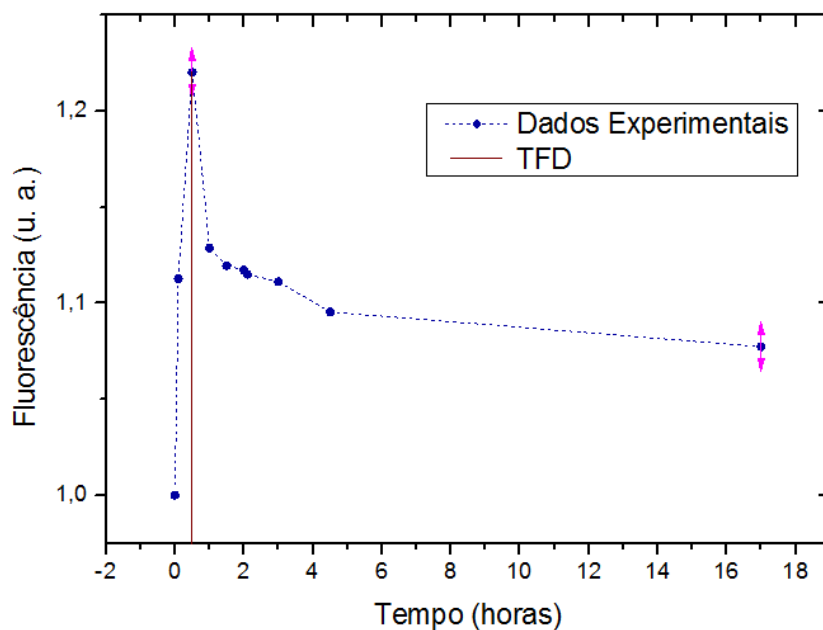


Figura 47 - Gráfico da fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de Photogem® tópico. A linha vertical vermelha corresponde ao instante da iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o mesmo método de análise do microscópio confocal, mostrando o canal de emissão entre 600 e 700 nm, foi também feita a análise do tumor nas condições sem aplicação de Photogem®, após 4 horas de incubação, 2 horas depois da iluminação e 24h após a TFD. A Figura 48 mostra a seqüência de microfotografias para o Photogem®.

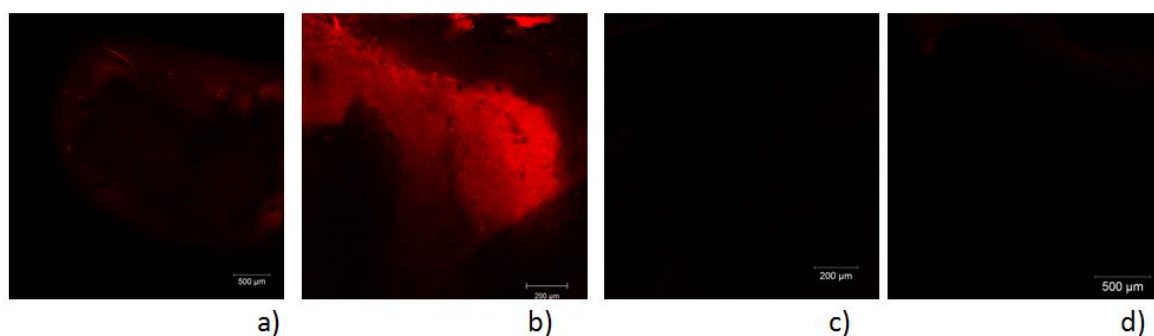


Figura 48 - Microfotografia por microscopia confocal no canal de emissão entre 600 - 700 nm para Photogem®. a) controle, sem FS. b) 4 horas após aplicação do Photogem®. c) 2 horas após iluminação. d) 24 horas após iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferentemente do comportamento da produção da PpIX e conforme o esperado a partir da análise das imagens de fluorescência, o controle não apresentou fluorescência intensa

no vermelho. Após 4 horas da aplicação do Photogem® há o acúmulo de FS na região tumoral (Figura 48-b) indicado pela emissão de fluorescência e, tanto 2 horas quanto 24 horas depois da iluminação, o consumo do FS fica evidente, uma vez que a fluorescência vermelha intensa já não aparece mais.

Tanto para aplicação do ALA quanto do Photogem®, foi possível perceber a destruição do tecido tumoral quando a porção com tumor foi excisionada para que pudesse ser analisada por microscopia. A análise qualitativa também permitiu visualizar a destruição da malha vascular na região tumoral e, a análise no confocal, mostrou regiões com vasos sanguíneos descontinuados após a aplicação da TFD, bem como regiões com redução do diâmetro dos vasos, mostrando que os vasos sanguíneos irradiados também sofreram ação fotodinâmica, o que já era esperado. (83,113-114) A Figura 49 mostra dois exemplos dessa destruição vascular, com microfotografias de transmissão da luz e com setas indicando a região exata do dano em cada vaso.

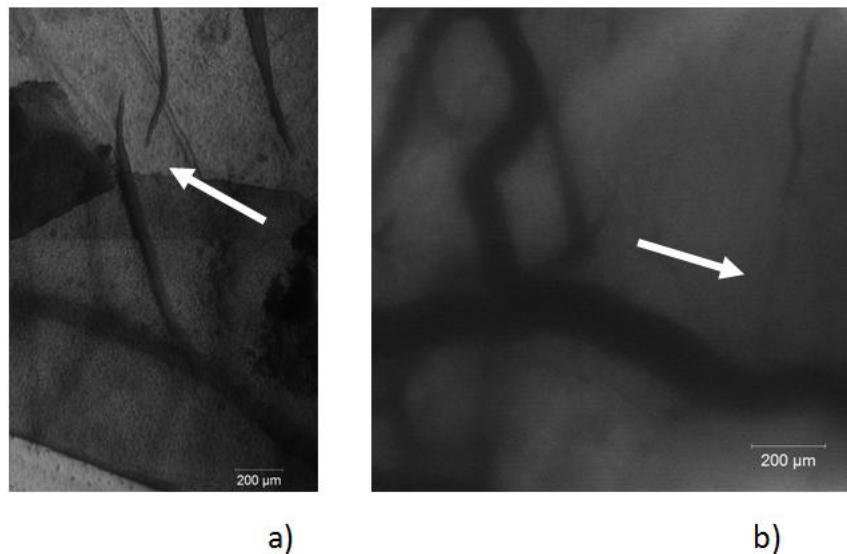


Figura 49 - Destruição dos vasos sanguíneos pós TFD. a) Quebra do vaso sanguíneo. b) Redução do diâmetro vascular. As setas indicam a região de dano vascular.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise histológica com verificação por microscopia óptica foi realizada para avaliar as modificações causadas pela TFD no modelo CAM-tumor. Após a aplicação da luz com o uso do Photogem® foi possível observar uma alteração significativa das estruturas do modelo. A Figura 50 mostra algumas microfotografias das lâminas pós-PDT, mostrando a ausência de estruturas definidas (50-a e 50-b), os quais antes eram observados – Figuras 20 e 21 – bem como um exemplo da perda da integridade da membrana, que fica em pedaços (Figura 50-c). Além da redução dos núcleos celulares da Figura 50-d quando comparada à Figura 21-c.

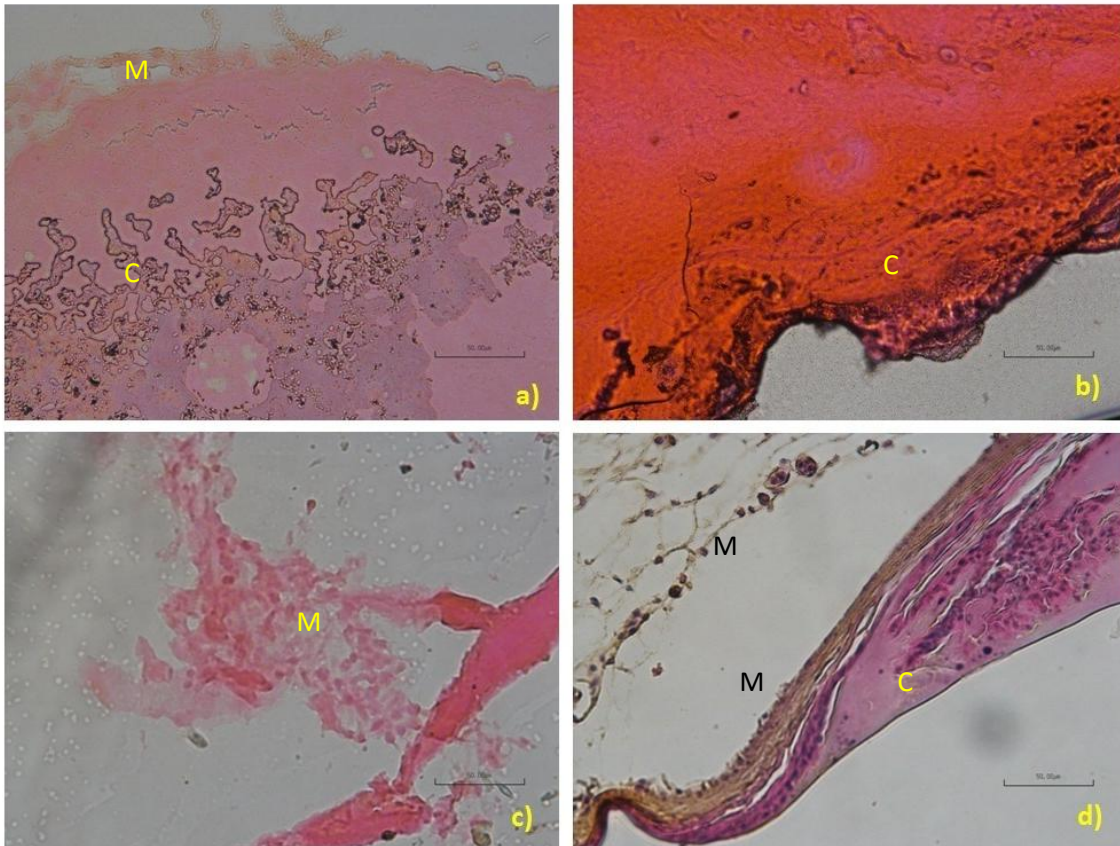


Figura 50 - Histologia da CAM e tumor após TFD com uso de Photogem. Na figura, M corresponde à Membrana e C às Células. a) Perda das estruturas da CAM. b) Ausência dos núcleos celulares definidos. c) Destruição da CAM. d) Redução dos núcleos celulares.

Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os ovos receberam antibiótico a cada dois dias para evitar contaminação por bactéria. Entretanto, alguns ovos apresentaram contaminação por fungo ao longo do processo. Para explorar as possibilidades com o sistema formado por vasos, tumor e fungo, foi aplicado o mesmo protocolo para a terapia fotodinâmica com ALA tópico nestes casos, permitindo tanto análises individualizadas quanto uma avaliação qualitativa global das respostas desse sistema. Nesses casos, o fungo se desenvolveu justamente na região tumoral, em cima do tumor.

As imagens de luz branca mostradas na Figura 51 mostram o sistema formado por fungo, tumor e vasos sanguíneos como função do tempo e as alterações causadas depois da aplicação da TFD. Além disso, fica evidente o efeito do espalhamento de luz e a diferença entre uma imagem sob estas condições e uma imagem de luz branca obtida quando há apenas o conjunto tumor e vasos sanguíneos (por exemplo, da Figura 43).

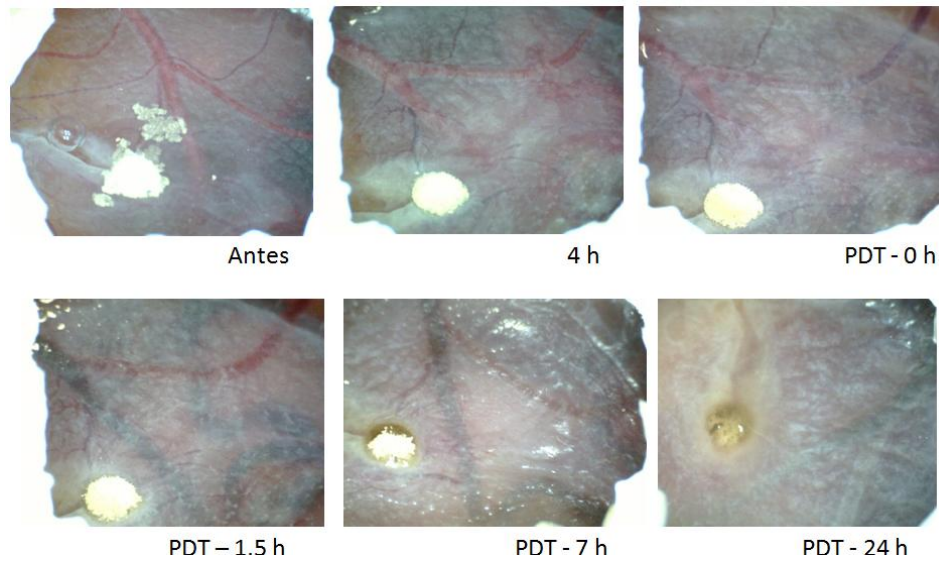


Figura 51 - Acompanhamento com imagem de luz branca nos vasos e no tumor contaminado com fungo ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de ALA tópico.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 52 mostra que a fluorescência ficou evidente apenas nos vasos sanguíneos, uma vez que o fungo impediu a visualização clara da fluorescência na região de tumor. Após a iluminação, houve redução na intensidade dessa fluorescência e, 24 horas depois da TFD, não havia qualquer sinal de viabilidade celular ao redor do conjunto tumor e fungo, indicada pela ausência de fluorescência na região ao redor do mesmo. Entretanto, como parte da solução de ALA ainda se fazia presente na região, a PpIX continuou sendo produzida em todo o sistema, o que corresponde ao aumento de intensidade observado no gráfico da Figura 53.

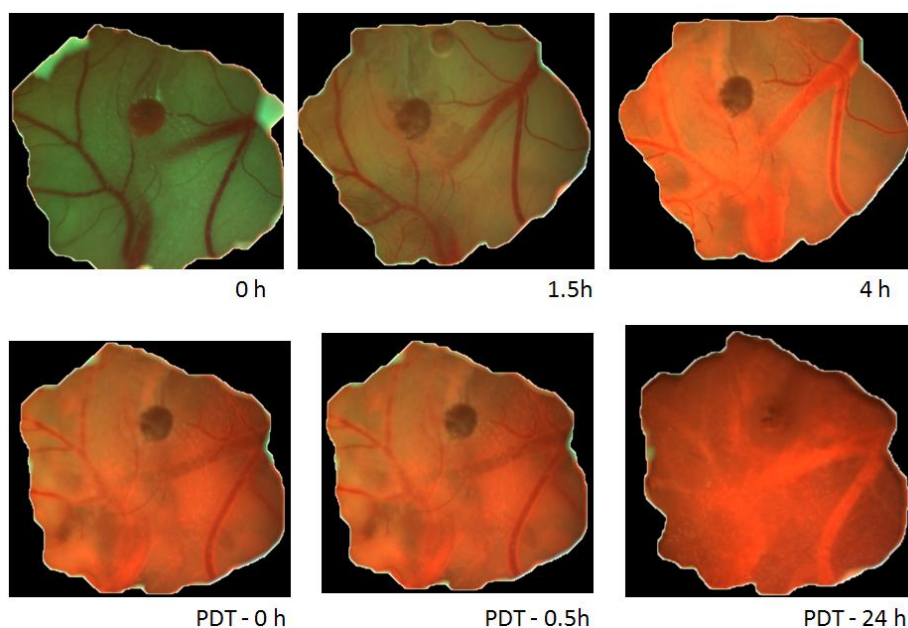


Figura 52 - Acompanhamento da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor contaminado com fungo ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de ALA tópico.

Fonte: Elaborada pela autora.

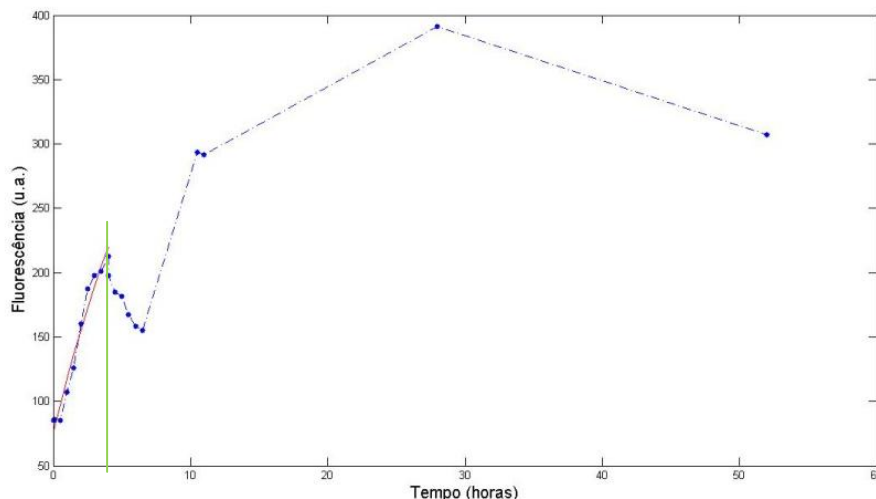


Figura 53 - Gráfico da Fluorescência da PpIX nos vasos e no tumor contaminado com fungo ao longo do tempo após aplicação da Terapia Fotodinâmica, com uso de ALA tópico. A linha vertical verde corresponde ao instante da iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Depois da terapia fotodinâmica houve uma mudança de aspecto do conjunto. O indicativo de não haver mais produção de PpIX ao redor do tumor depois de 24 horas corrobora com o fato de que a TFD foi eficiente na eliminação do conjunto tumor e fungo, uma vez que as células precisam estar viáveis para que a produção aconteça. O aspecto do conjunto observado na imagem branca também mostra a grande alteração macroscópica promovida após a TFD, mostrando um efeito localizado intenso.

4.4 Efeito Vascular da Curcumina com Terapia Fotodinâmica

A curcumina é um composto que possui efeito anti-angiogênico mesmo sem o uso da luz e já foi usado em diversos experimentos que comprovam essa característica. (114–116) Além disso, esse composto é conhecido por seu uso como fotossensibilizador quando utilizado em associação a luz azul, com pico de absorção em 430 nm. (60) Embora outros fotossensibilizadores tenham sido usados para aplicação em efeito vascular, o uso de um composto com essa característica prévia (ou seja, sem estímulo luminoso), foi uma proposta para verificar se haveria potencialização desse efeito quando associado à luz. Por efeito vascular, entende-se a destruição da malha de vasos sanguíneos e o modelo de membrana corioalantóica possibilita uma fácil observação desse efeito.

A curcumina consiste em uma mistura de curcumina e seus derivados, também chamados de curcuminóides. Esse composto já é utilizado em testes clínicos e pré-clínicos no

tratamento de doenças e inativação microbiana, comprovando sua eficácia como fotossensibilizador. (53–55)

O grupo controle recebeu apenas a luz azul no intuito de garantir que a luz sozinha não causaria qualquer dano vascular e, como o esperado, com os parâmetros de iluminação utilizados, não houve alteração nos vasos sanguíneos.

Quando só a curcumina foi aplicada sem a luz, para todas as concentrações usadas, obteve-se um princípio de alteração na malha de vasos sanguíneos na área onde foi aplicada a solução, com diminuição do diâmetro e do número de vasos. Essa resposta vascular induzida apenas com o uso da curcumina ficou mais evidente a medida que a concentração da curcumina foi aumentada, como pode ser observado nas figuras 54 e 55, comparando a concentração de 0,1 mM/cm² e 10 mM/cm². As imagens da membrana foram feitas antes da aplicação da curcumina, após os 40 minutos de incubação e a cada 30 minutos desde então até que fossem atingidos os 300 minutos pós-incubação.

Na Figura 54, as setas estão indicando um dos vasos que teve seu diâmetro reduzido ao longo do tempo.

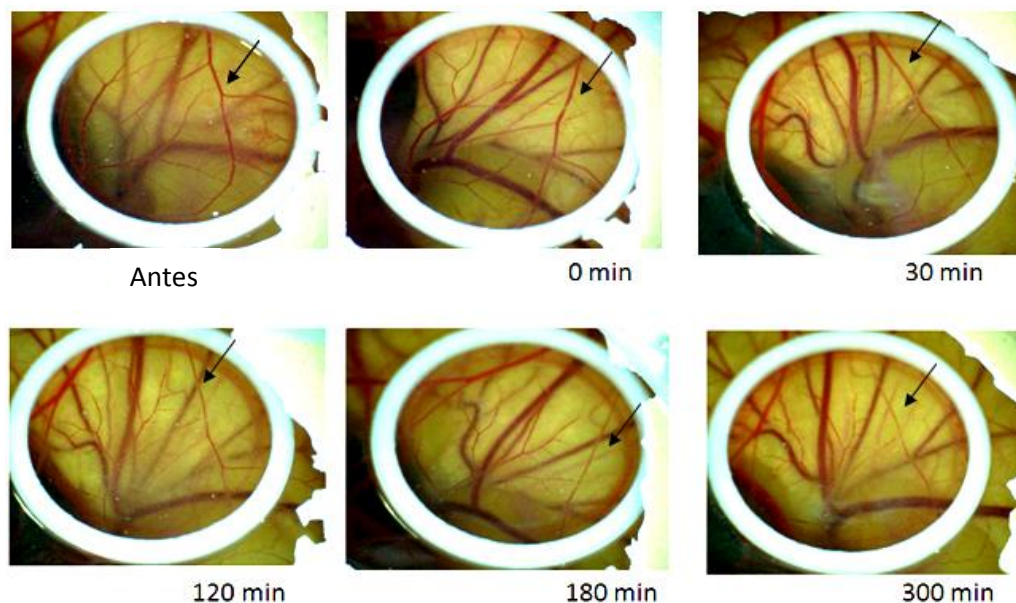


Figura 54 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo só curcumina com concentração 0,1 mM/cm². As setas indicam um exemplo de vaso que sofreu ação vascular e teve redução de seu calibre ao longo do tempo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Aumentando a concentração da solução de curcumina para 10 mM/cm², o efeito nos vasos foi mais rápido quando comparado com concentrações menores. Com as imagens mostradas na Figura 55, é possível observar que a redução dos diâmetros começa já 30 minutos depois da incubação e ao final dos 300 minutos de observação os dois vasos

indicados pelas setas estão colapsados em alguns pontos. Esse efeito é esperado, já que maior concentração do composto significa maior viabilidade para induzir o efeito vascular.

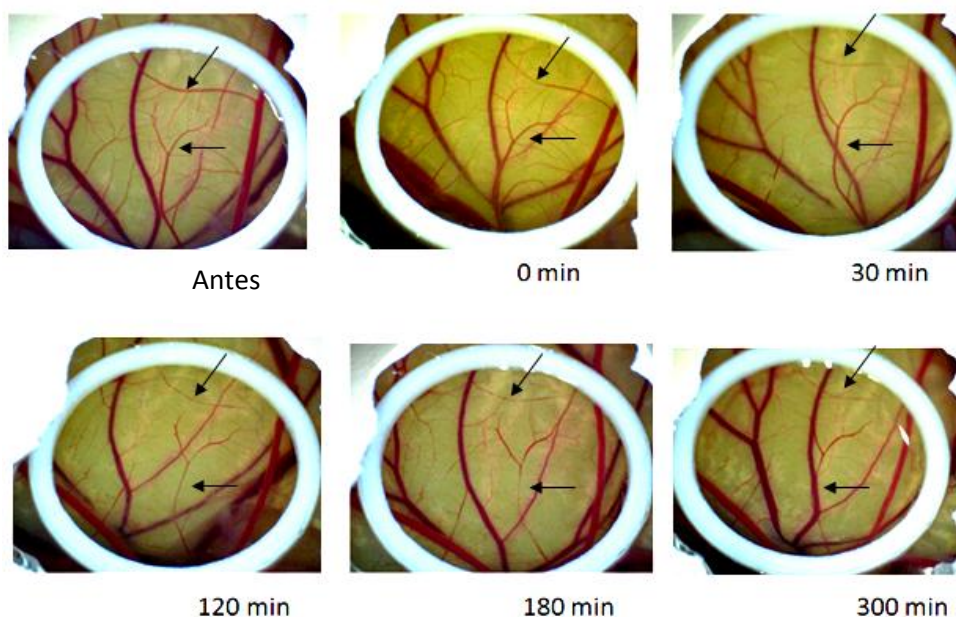


Figura 55 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo só curcumina com concentração 10 mM/cm². As setas indicam dois vasos que sofreram ação vascular e tiveram redução de seu calibre ao longo do tempo. Fonte: Elaborada pela autora.

Com isso, o efeito vascular descrito na literatura foi confirmado nos grupos com todas as concentrações de curcumina testados (Curcumina [1], Curcumina [2], Curcumina [3], Curcumina [4], Curcumina [5], Curcumina [6]), sendo observado uma redução no diâmetro dos vasos sanguíneos, principalmente os de menores calibres, em todos os grupos, com efeito cada vez mais acentuado a medida que a concentração foi aumentada. Apesar de quase todos os vasos de pequeno calibre apresentarem redução, poucos se mostraram colapsados por completo.

A partir desses resultados e atrelando o efeito vascular observado da curcumina, a região foi iluminada para somar a este efeito natural o da terapia fotodinâmica. A TFD com outros fotossensibilizadores testados no modelo de CAM se mostrou eficiente na redução da malha vascular, chegando à 60% de redução no número e tamanho dos vasos. (82)

Usando as mesmas concentrações e após iluminação, as imagens foram feitas antes da iluminação, imediatamente após e de 30 em 30 minutos até 300 minutos pós-terapia. Os resultados de 0,1 e 10 mM/cm² são apresentados nas Figuras 56 e 57, respectivamente.

A Figura 56 mostra, apesar da pequena concentração de 0,1 mM/cm², um efeito quase imediato após a iluminação, com redução do calibre de quase todos os vasos periféricos em torno do vaso principal. Esse efeito permanece ao longo dos 300 minutos. Como a luz azul

não penetra nas camadas mais profundas, o efeito esperado é que seja apenas superficial e que atinja as primeiras camadas da CAM, já que o aparato de iluminação era a base de LEDs em 460 nm.

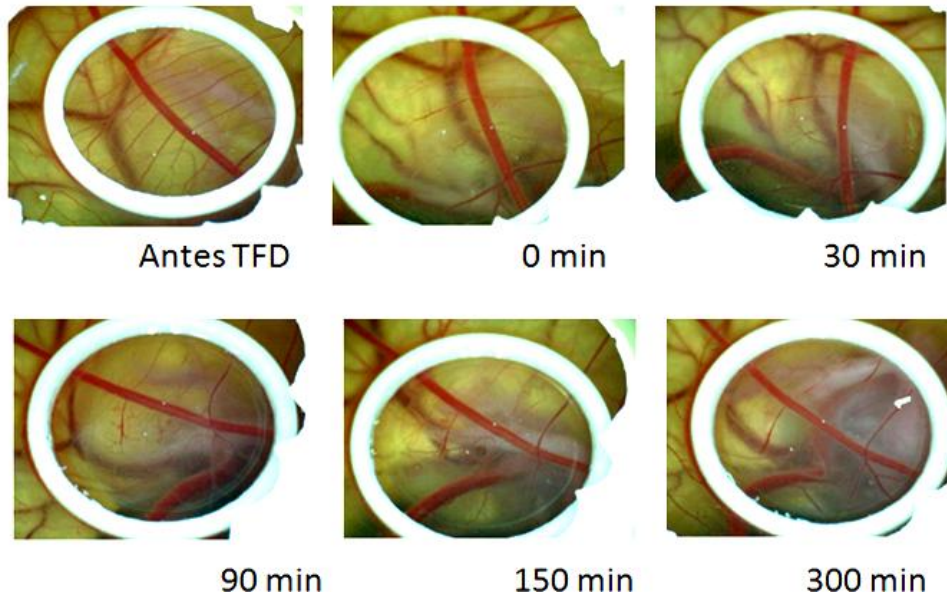


Figura 56 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo curcumina com concentração 0,1 mM/cm² + luz.
Fonte: Elaborada pela autora.

É esperado, portanto, que se observe um efeito sinérgico entre a anti-angiogênese natural da curcumina e o estímulo luminoso, com resposta acentuada na redução dos vasos sanguíneos. Aumentando a concentração de curcumina para 10 mM/cm², então, haveria um efeito ainda mais drástico na redução de toda a malha vascular.

A Figura 57 mostra esse efeito de redução com a maior concentração testada nos vasos periféricos imediatamente após a iluminação. Ao longo dos 300 minutos, não há mais nenhum vaso periférico, além da evidente redução do diâmetro do vaso principal. Este resultado mostra que a PDT com curcumina é uma técnica eficiente na redução vascular.

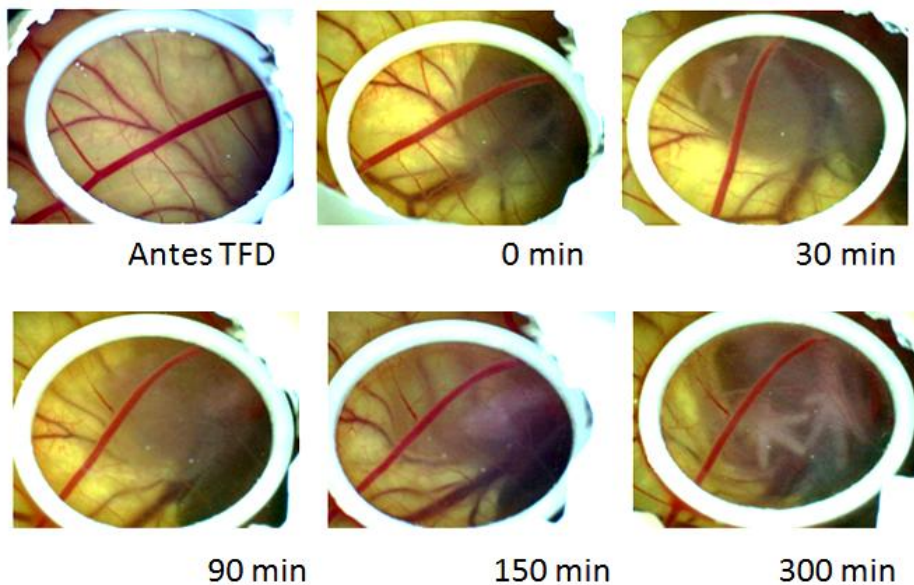


Figura 57 - Imagens ao longo do tempo da CAM do grupo curcumina com concentração 10 mM/cm² + luz.
Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos com os grupos TFD1, TFD2, TFD3, TFD4, TFD5, TFD6 confirmam o efeito sinérgico com a aplicação da luz quando comparadas as mesmas concentrações do uso somente da curcumina. A aplicação da terapia fotodinâmica apresentou o colapso de quase todos os vasos periféricos, além da redução dos vasos de maior calibre em todas as concentrações. Além disso, esse efeito foi mais rápido, sendo observado imediatamente após a aplicação da luz.

Portanto, o uso da curcumina como agente anti-angiogênico pode ser acelerado quando explorado seu potencial como fotossensibilizador, mostrando-se uma ferramenta importante no tratamento de diferentes doenças, desde aquelas que envolvem diretamente o problema da vascularização, como é o caso de varizes ou úlceras até o tratameto de tumores superficiais.

5 CONCLUSÕES

O modelo tumoral desenvolvido em membrana corioalantóica mostrou-se uma ferramenta importante para o entendimento dos mecanismos de crescimento e destruição do tumor. Foi estabelecido a biópsia de tumor de Ehrlich como a forma mais vantajosa para a obtenção do modelo.

O ALA, que dá origem à protoporfirina IX dentro das células, possibilita não apenas acompanhar a formação do fotossensibilizador, mas também avaliar a viabilidade das células tumorais. Os experimentos realizados permitiram definir a aplicação tópica como a melhor forma para análise do modelo, utilizando uma dose de 50 J/cm², com irradiância de 80 mW/cm² e tempo de iluminação de 10 minutos. Com base nesse protocolo, foi aplicada a terapia fotodinâmica no modelo de vasos e tumor.

Foi possível traçar os comportamentos do ALA e do Photogem[®] e determinar uma equação que os descrevam, com proximidade entre os dados experimentais e o modelo teórico sempre maiores que 80%. Os tempos característicos analisados apenas na região tumoral e comparados a todo o modelo foi sempre maior, mostrando maior afinidade dessas moléculas com o tumor, como é desejado.

A aplicação da TFD nos tumores com ambos os fotossensibilizadores mostrou-se eficiente quanto a inviabilização celular, já que os tumores foram destruídos, adquirindo aspecto e fluorescência diferenciados. Entretanto, o ALA, para esse modelo, se mostrou mais eficiente por sua homogeneidade e destruição regular da região tumoral e, após a iluminação, por haver ALA remanescente, houve o recomeço da produção de PpIX em regiões diferentes da tumoral. Quando aplicada ao sistema tumor e fungo, foi inviabilizada toda a região ao redor do fungo e do tumor, mostrando o potencial desse modelo para análise individual e sistêmica de lesões ou infecções.

A combinação da ação anti-vascular natural e fotossensibilizadora da curcumina potencializou a destruição da malha vascular, embora esta sinergia fique limitada a um efeito superficial, já que a curcumina absorve na região azul do espectro, que não apresenta grande penetração em meios biológicos túrbidos. A curcumina, então, se mostrou um potencial fotossensibilizador para uso vascular.

Com o entendimento mais profundo da TFD no modelo de CAM, estudos pré-clínicos e clínicos podem vir a ser conduzidos com mais segurança, uma vez que é permitido testar diferentes protocolos para estabelecimento empírico da resposta fotodinâmica. Isso possibilita o entendimento de maneira mais individualizada e eficiente de como se dá o dano vascular

associado à TFD, as diferenças entre dano celular e vascular para diferentes fotossensibilizadores, e o estudo mais controlado da técnica e mais próximo de mimetizar as condições existentes em tumores.

REFERÊNCIAS

- 1 REDDY, K. B.; NABHA, S. M.; ATANASKOVA N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 22, n. 4, p. 1395–403, 2003
- 2 BRYAN, G. T. Histórias naturais dos canceres. In: LOVE, R. R.(Ed.).*Manual de oncologia clínica*. São Paulo: Fundação Oncocentro, 1999. p. 28–31.
- 3 CORREA, J. C. *Fotodegradação do photoditazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser*. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 4 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Estimativas e incidência sobre o câncer no Brasil 2016*. Disponível em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/estimativa_incidencia_cancer_2016>. Acesso em: 05 jan. 2016.
- 5 JOESTEN, M. D.; WOOD, J. L. *World of chemistry*. Philadelphia : Saunders College, 1991. 731 p.
- 6 PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 25, n. 4, p. 396–402, 2005
- 7 SHEELA, M. L.; RAMAKRISHNA, M. K.;SALIMATH, B. P. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra. *International Immunopharmacology*, v. 6, n. 3, p. 494-498, 2006.
- 8 FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*,v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.
- 9 FOLKMAN, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Annals of Surgery*, v. 175, n. 3, p. 409-416, 1972
- 10 WANG, L. et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with angiogenic phenotype and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer*,v. 8, n. 1, p. 18-28, 2005.
- 11 STRAUME, O.; AKSLEN, L. A. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression. *American Journal of Pathology*, v. 160, n. 3, p. 1009–1019, 2002.
- 12 RAO, M.; YANG, W.; SEIFALIAN, A. M.; WINSLET, M. C. Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2004.
- 13 BALKE, M. et al. Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Research Notes*, v. 3, p. 58, 2010. doi: 10.1186/1756-0500-3-58.
- 14 KANDEL J. et al. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, v. 66, n. 6, p. 1904, 1991.
- 15 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine & Biology*, v. 53, n. 9, p. R61-R109, 2008.
- 16 ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry & Photobiology*, v. 74, n. 5, p. 656-659, 2001.

- 17 DOUGHERTY, T. et al. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998. doi: 10.1093/jnci/90.12.889
- 18 TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M.; STEWART, F. A. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist*, v. 1, n. 9, p. 1034-1044, 2006.
- 19 DOUGHERTY, T. et al. Review - photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
- 20 BUZZA, H. H. *Avaliação do efeito vascular da terapia fotodinâmica empregando derivados de porfirina e clorina na membrana corioalantóica*. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 21 BUZZÁ, H. H. et al. Photodynamic therapy: progress toward a scientific and clinical network in Latin America. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 2015. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.08.004.
- 22 RAMIREZ, D. P. et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, v. 11, n. 11, p. 22-26, 2014. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.11.001
- 23 PRATAVIEIRA, S.; CORREA, T. Q.; ONO, B.; KURACHI, C. História da terapia fotodinâmica. In: BAGNATO, V. S. *Terapia fotodinâmica dermatológica: programa TFD Brasil*. São Carlos: Compacta, 2015. p. 23–38.
- 24 ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clinical Endoscopy*, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013.
- 25 PATRICE, T. (Ed.). *Photodynamic therapy*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003.
- 26 ABDEL-KADER, M. H. (Ed.). *Photodynamic therapy from therapy to application*. New York: Springer, 2014.
- 27 ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.
- 28 VOLLET-FILHO J. D. *Correlação de fluorescência superficial e profundidade de necrose em terapia fotodinâmica: possibilidade de dosimetria em tempo real*. 2011. 127 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 29 ZHOU, X.; CHEN, B.; HOOPES, P. J.; HASAN, T.; POGUE, B. W. Tumor vascular area correlates with photosensitizer uptake: analysis of verteporfin microvascular delivery in the Dunning rat prostate tumor. *Photochemistry & Photobiology*, v. 82, n. 5, p. 1348-1357, 2006.
- 30 VOLLET-FILHO J. D.; CARACANHAS M. A.; GRECCO, C.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence for photodynamic therapy outcome. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2010.
- 31 DERMEO Paris. *A luz intensa pulsada*. 2016. Disponível em: <http://www2.dermeo.com/technologie_lumiere_pulsee.php?lang=PT>. Acesso em 16 jan. 2016.
- 32 COTLER, H. B.; CHOW, R. T.; HAMBLIN, M. R.; CARROLL, J. The use of low level laser therapy (LLLT) for musculoskeletal pain. *MOJ Orthopedics & Rheumatology*, v. 2, n. 5, 2015. Disponível em: < <http://medcraveonline.com/MOJOR/MOJOR-02-00068.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2015.
- 33 NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOŁĄB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

- 34 ROBERTS, D. J. H.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *British Journal of Plastic Surgery*, v. 48, n. 6, p. 360-370, 1999.
- 35 HENDERSON, B. W.; FINGAR, V. H. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic therapy of a murine tumor model. *Photochemistry & Photobiology*, v. 49, n. 3, p. 299-304, 1989.
- 36 MIDDELBURG, T. A. et al. Topical hexylaminolevulinatate and aminolevulinic acid photodynamic therapy: complete arteriole vasoconstriction occurs frequently and depends on protoporphyrin IX concentration in vessel wall. *Journal of Photochemistry & Photobiology B*, v. 126, p. 26-32, 2013. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.06.014.
- 37 WIEMANM, T. J. et al. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*, v. 104, n. 3, p. 512-517, 1988.
- 38 REED, M. W. R. et al. A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation. *Radiation Research*, v. 119, n. 3, p. 542-552, 1989.
- 39 FINGAR, V. H.; WIEMANM, T. J.; WIEHLE, S. A.; CERRITO, P. B. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Research*, v. 52, n. 18, p. 4914-4921, 1992.
- 40 HENDERSON, B. W.; VAUGHAN, L.; BELLNIER, D.; VAN LEENGOED, H.; JOHNSON, P. G.; OSEROFF, A. R. Photosensitization of murine tumor, vasculature and skin by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin. *Photochemistry & Photobiology*, v. 62, n. 4, p. 780-789, 1995.
- 41 LEVY, A. G. The pathological action of light. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 32, n. 3, p. 387-399, 1926.
- 42 MCGOVERN, V. J. The mechanisms of photosensitivity. *Archives Dermatology*, v. 83, n. 1, p. 40-51, 1961.
- 43 FINGAR, V. H. Vascular effects of photodynamic therapy. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v. 14, n. 5, p. 323-328, 1996.
- 44 DELLIAN, M.; ABELS, C.; KUHNLE, G. E.; GOETZ, A. E. Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium in 1995 interaction: differences between normal and tumor tissue. *British Journal of Cancer*, v. 72, n. 5, p. 125-130, 1995.
- 45 FINGAR, V. H.; WIEMANM, T. J.; DOAK, K. W. The role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy - induced tumor destruction. *Cancer Research*, v. 50, p. 2599-2603, 1990.
- 46 HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry & Photobiology*, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.
- 47 MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
- 48 COLUSSI, V. C.; NICOLA, E. M. D.; NICOLA, J. H. I. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 42, n. 4, p. 229-236, 1996.
- 49 OLIVEIRA, K. T.; INADA, N. M.; SILVA, A. P.; CARBINATTO, F. M. Fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica. In: BAGNATO, V. S. *Terapia fotodinâmica dermatológica: programa TFD Brasil*. São Carlos, Compacta, 2015. p. 61-71.
- 50 ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, v. 6, n. 3, p. 817-840, 2013.

- 51 OLIVEIRA, K. T.; MOMO, P. B.; ASSIS, F. F.; FERREIRA, M. A. B.; BROCKSOM, T. J. Synthesis of new Chlorin - trimethyl and protoporphyrin IX dimethyl Ester derivates and their photophysical and electrochemical characterizations. *Current Organic Synthesis*, v. 11, p 42-58, 2014.doi: 10.2174/15701794113106660085.
- 52 PIERRE, M. B. R.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M.; BENTLEY, M. V. L. B. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study. *BMC Dermatology*, v. 1, n. 5, 2001.doi: 10.1186/1471-5945-1-5.
- 53 SILVA, A. P. *Inativação dos micro-organismos causadores da onicomiose por terapia fotodinâmica* - estudo in vitro e clínico. 2013. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 54 PASCHOAL, M. A.; TONON, C. C.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; BAGNATO, V. S.; GIUSTI, J. S.; SANTOS-PINTO, L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*,v. 10, n. 3, p.313-319 2013; doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.02.002.
- 55 ARAUJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M. E. M. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 30, n. 7, p. 393–399, 2012.
- 56 SHISHODIA, S.; CHATURVEDI M. M.; AGGARWAL, B. B. Role of curcumin in cancer therapy. *Current Problems in Cancer*,v. 31, n. 4, p. 243–305, 2007.
- 57 AMMON, H. P.; WAHL, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medicinal*, v.57, n. 1, p. 1–7, 1991.
- 58 DASH, J. R.; PARIJA, S. C. Spasmolytic effect of curcumin on goat ruminal artery is endothelium independent and by activation of sGC. *Research in Veterinary Science*, v. 95, n. 2, p. 588–593, 2013.
- 59 SHEHZAD, A.; REHMAN, G.; LEE, Y. S. Curcumin in inflammatory diseases. *BioFactors*, v. 39, n. 1, p. 69–77, 2013.
- 60 BERND, A. Visible light and/or UVA offer a strong amplification of the anti-tumor effect of curcumin. *Phytochemistry Reviews*,v. 13, n. 1, p. 183–189, 2014.
- 61 RANJAN, A. P.; MUKERJEE, A.; HELSON, L.; GUPTA, R.; VISHWANATHA, J. K. Efficacy of liposomal curcumin in a human pancreatic tumor xenograft model: inhibition of tumor growth and angiogenesis. *Anticancer Research*, v. 33, n. 9, p. 603-609, 2013.
- 62 GONG, C. et al. Improving antiangiogenesis and anti-tumor activity of curcumin by biodegradable polymeric micelles. *Biomaterials*, v. 34, n. 4, p. 1413-1432, 2013.
- 63 INOUE K. et al. The clinical trial on the safety and effectiveness of the photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer using fluorescent light – guided cystoscopy after oral administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, 2016.doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.12.011.
- 64 PENG, Q.; WARLOE, K. B. 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy - clinical research and future challenges. *Cancer*, v. 79, n. 12, p.2282–2308, 1997.
- 65 ALLISON, R. R.; CUENCA, R.; DOWNIE, G. H.; RANDALL, M. E.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. PD/PDT for gynecological disease: a clinical review. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*. v. 2, p. 51-63, 2005.
- 66 FU, Y.; BAO, Y.; HUI, Y.; GAO, X.; YANG, M.; CHANG, J. Topical photodynamic therapy with

5-aminolevulinic acid for cervical high-risk HPV infection. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 13, p. 29–33, 2016.

67 CHEN, X. et al. Clinical efficacy of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of moderate to severe facial acne vulgaris. *Experimental Therapeutic Medicine*, v. 10, n. 3, p. 1194–1198, 2015.

68 DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 2004.

69 MELO, C. A. S. et al. Pharmacokinetics of photogem using fluorescence monitoring in wistar rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 73, n. 3, p. 183–188, 2004.

70 BONINI, D. *Correlação entre bioquímica celular e necrose tecidual em regimes de fracionamento de doses de luz em terapia fotodinâmica*. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

71 NOWAK-SLIWINSKA, P.; BALLINI, J. P.; WAGNIÈRES, G.; VAN DEN BERGH, H. Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model. *Microvascular Research*, v. 79, p. 21–28, 2009.

72 STEINER, R. Angiostatic activity of anticancer agents in the chick embryo chorioallantoic membrane assay. *EXS*, v. 61, p. 449–454, 1992.

73 STATION, C. A.; STRIBBLING, S. M.; TAZZYMAN, S.; HUGHES, R.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 85, p. 233–248, 2004.

74 LANGE, N. 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.

75 DANI, S. U.; ESPINDOLA, R. A model system for testing gene vector using murine tumor cells on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Genetics and Molecular Research*, v. 1, n. 2, p. 167–175, 2002.

76 KUNZI-RAPP, K.; GENZE, F.; KÜFER, R.; REICH, E.; HAUTMANN, R. E.; GSCHWEND, J. E. Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *Journal of Urology*, v. 166, n. 4p. 1502–1507, 2001.

77 JONES, T. A.; JONES, S. M.; PAGGETT, K. C. Emergence of hearing in the chicken embryo. *Journal of Neurophysiology*, v. 96, n. 1, p. 1281–1291, 2006.

78 ČAVARGA, I. et al. Photodynamic effect of hypericin after topical application in the ex ovo quail chorioallantoic membrane model. *Planta Medica*, v. 80, n. 1, p. 56–62, 2014.

79 ZEISSER-LABOUÈBE, M.; DELIE, F.; GURNY, R.; LANGE, N. Screening of nanoparticulate delivery systems for the photodetection of cancer in a simple and cost-effective model. *Nanomedicine*, v. 4, n. 2, p. 135–143, 2009.

80 MONDON, K.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; GURNY, R.; MÖLLER, M. MPEG-hexPLA micelles as novel carriers for hypericin, a fluorescent marker for use in cancer diagnostics. *Photochemistry & Photobiology*, v. 87, n. 2, p. 399–407, 2011.

81 HAMMER-WILSON, M. J.; AKIAN, L.; ESPINOZA, J.; KIMEL, S.; BERNS, M. W. Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 53, p. 1–3, p. 44–52, 1999.

- 82 BUZZÁ, H. H.; SILVA, L. V.; MORIYAMA, L. T.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Evaluation of vascular effect of photodynamic therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 138, p. 1–7, 2014.
- 83 YOON, J. H.; YOON, H. E.; KIM, O.; KIM, S. K.; AHN, S. G.; KANG, K. W. The enhanced anti-cancer effect of hexenyl ester of 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy in adriamycin-resistant compared to non-resistant breast cancer cells. *Lasers in Surgery Medicine*, v.44, n. 1, p. 76–86, 2012.
- 84 KELTY, C. J.; BROWN, N. J.; REED, M. W.; ACKROYD, R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochemistry & Photobiology Science*, v. 1, n. 13, p.158–168, 2002.
- 85 NOWAK-SLIWINSKA, P.; VAN BEIJNUM, J. R.; VAN BERKEL, M.; VAN DEN BERGH, H, GRIFFIOEN, A.W. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis*, v. 13, n. 4, p. 281-292, 2010
- 86 ROFSTAD, E. K.; LYNG, H. Xenograft model system for human melanoma. *Molecular Medicine Today*, v. 2, n. 9, p. 394–403, 1996.
- 87 CHEN, L.; WATIKINS, J. K. Evidences against the presence of 112 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumor cells. *Nature*, v. 225, n. 5234, p. 734-735, 1970.
- 88 SEGURA, J. A.; BARBERO, L.G.; MARQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduced responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. *Immunology Letters*, v. 74, p. 111–115, 2000.
- 89 VINCENT, P. C.; NICHOLLS, A. Comparison of the growth of the Ehrlich ascites tumor in male and female mice. *Cancer Research*, v. 27, p. 1058–1065, 1967.
- 90 FASTAIA, J.; DUMONT, A. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 56, p. 547–549, 1976.
- 91 EHRLICH P. Experimentally carcinomstudien an Mäusen. *Arbeit aus dem Institut für Experimentelle Therapie Frankfurt*, v. 1, p. 78–80, 1906.
- 92 LACOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. New York: Plenum, 1999.
- 93 ATKINS, P. *Fisico Quimica*. 8. ed. Rio de Janeiro: LCT; 2006.
- 94 VOLLET-FILHO J. D. *Identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância na terapia fotodinâmica*. 2007. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- 95 GRECCO, C. *Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando fonte de luz pulsada no regime de femtossegundos*. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 96 COSTA, M. M. D. *Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontológico*. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 97 ANDRADE, C. T. *Identificação de lesões de pele por detecção fotodinâmica mediada por ácido aminolevulínico*. 2012. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 98 PRATAVIEIRA, S.; ANDRADE, C. T.; KURACHI, C. Fotodiagnóstico. In: BAGNATO, V. S. *Terapia fotodinâmica dermatológica: programa TFD Brasil*. São Carlos: Compacta, 2015. p. 263–277.

- 99 PENG, Q.; BERGG, K.; MOAN, J. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochemistry & Photobiology*, v. 65, n. 2, p. 235–251, 1997.
- 100 DE ANDRADE, C. T.; VOLLET-FILHO, J. D.; SALVIO, A. G. Identification of skin lesions through aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, v. 11, n. 3, p. 409-415, 2014.
- 101 BUZZA, H. H. et al. Evaluation of the photodynamic therapy effect using a tumor model in chorioallantoic membrane with melanoma. *Cells*, 2014. doi: 10.1117/12.2040714.
- 102 FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*, v. 14, n. 1, p. 125-132, 1990.
- 103 PRATAVIEIRA, S. *Montagem e caracterização de um microscópio óptico não linear para imagens de tecidos biológicos*. 2014. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- 104 PRATAVIEIRA, S. et al. Assembly and characterization of a nonlinear optical microscopy for in vivo and ex vivo tissue imaging. *Proceedings of SPIE*, v. 8948, 2014. doi: 10.1117/12.2037757.
- 105 MOL - Microscopia Online. *Conceitos básicos de observação de preparados histológicos ao microscópio de luz: módulo I*. 2016. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/mol/1basico48.html>>. Acesso em 05 jan. 2016.
- 106 CHIU, L. L.Y.; RADISIC, M. Scaffolds with covalently immobilized VEGF and angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials*, v. 31, n. 2, p. 226-241, 2010.
- 107 VISHNUBALAJI, R.; ATTEYA, M.; AL-NBAHEEN, M.; OREFFO, R. O. C.; ALDAHMAH, A.; ALAJEZ, N. M. Angiogenic potential of human neonatal foreskin stromal cells in the chick embryo chorioallantoic membrane model. *Stem Cells International*, 2015. doi: 10.1155/2015/257019.
- 108 NISSEN, C. V.; PHILIPSEN, P. A.; WULF, H. C. Protoporphyrin IX formation after topical application of methyl aminolaevulinate and BF-200 aminolaevulinic acid declines with age. *British Journal of Dermatology*, v. 173, n. 3, p. 760-766, 2015.
- 109 FRITSCH, C. et al. Optimum porphyrin accumulation in epithelial skin tumours and psoriatic lesions after topical application of delta-aminolaevulinic acid. *British Journal of Cancer*, v. 79, n. 9-19, p. 1603-1608, 1999.
- 110 JUZENAS, P.; SHARFAEI, S.; MOAN, J.; BISSONNETTE, R. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumours and normal skin of hairless mice after topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 67, n. 1, p. 11-17, 2002.
- 111 ROBINSON, D. J. et al. Photobleaching during and re-appearance after photodynamic therapy of topical ALA induced fluorescence in UVB-treated mouse skin. *Photochemistry & Photobiology*, v. 67, p. 140–149, 1998.
- 112 KELLY, K. M. et al. Combined photodynamic and photothermal induced injury enhances damage to in vivo model blood vessels. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 34, p. 407-413., 2004.
- 113 XIANG, L. et al. Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor. *Journal of Biomedical Optics*, v. 12, n. 1, p. 014001, 2013.
- 114 GURURAJ, A. E. et al. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 297, n.4, p. 934–942, 2002.

115 XIE, P. et al. Suppression of experimental choroidal neovascularization by curcumin in mice. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e53329, 2012.

116 NAGARAJU, G. P et al. Antiangiogenic effects of a novel synthetic curcumin analogue in pancreatic cancer. *Cancer Letters*,v. 357, n. 2, p. 557-565, 2015.