# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

PHAMILLA GRACIELLI SOUSA RODRIGUES

Estudos da formação de protoporfirina IX induzida por ácido aminolevulínico: um enfoque no aprimoramento da Terapia Fotodinâmica

### PHAMILLA GRACIELLI SOUSA RODRIGUES

Estudos da formação de protoporfirina IX induzida por ácido aminolevulínico: um enfoque para o aprimoramento da Terapia Fotodinâmica

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 Doutor em ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador

Bagnato

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

São Carlos 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)

Rodrigues, Phamilla Gracielli Sousa Estudos da formação de protoporfirina IX induzida por ácido aminolevulínico: um enfoque no aprimoramento da Terapia Fotodinâmica / Phamilla Gracielli Sousa Rodrigues; orientador Vanderlei Salvador Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2016. 117 p.

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

Rolos de Microagulhas. 2. Tape stripping. 3.
 Injeção livre de Agulhas. 4. Transição epitéliomesenquimal. I. Bagnato, Vanderlei Salvador, orient.
 II. Título.



### **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, à Prof. Dra. Cristina Kurachi, e ao Prof. Dr. Kristian Berg que na convivência muito me ensinaram, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Espelharme-ei, e carregarei sempre um pouco de vocês na minha carreira científica.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado e à Universidade de Oslo (*Radiumhospitalet*) pela realização de um ano de intercâmbio.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

Aos Professores, Dr. Andrigo Barbosa de Nardi, e Dr. André Escobar, à Mestre em cirurgia veterinária Rozana Wendler da Rocha e a todos os veterinários da Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, por não medirem esforços em contribuir com a pesquisa, pela disposição durante os experimentos, por cederem o espaço de clínica e cirurgia veterinária, e pelo aprendizado que me concederam.

Aos (às) pesquisadores (as) e aos (às) estudantes da Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos - Alessandra Keiko Lima Fujita, Angelo Biassi Govone, Carolina de Paula Campos, Fernanda Paolillo, José Dirceu Vollet Filho, Marcela Sene Fiorese, Marciana Pierina Uliana, Michelle Barreto Requena, e Priscila Fernanda Campos de Menezes - pelo apoio durante a realização dos experimentos, por contribuírem no deslocamento até a Universidade do Estado de São Paulo, e, também, por contribuírem com seus conhecimentos e experiências.

Aos (às) Integrantes do Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT), do Laboratório de Instrumentação Eletrônica (LIEPO), da Oficina Mecânica, e ao integrante do Grupo de óptica: Evaldo José Pereira de Carvalho, pelo auxílio com a instrumentação.

À Priscila Weis por contribuir com seus conhecimentos em técnica histológica. À Dra. Clara Maria Pinheiro, e à técnica de Laboratório Tereza de Fátima Fatori Piassi, por me ensinarem a técnica de microtomia e por cederem o criostato nas instalações da Universidade Federal de São Carlos.

Ao grupo de Biotecnolgia Molecular pelo empréstimo do freezer vertical quando necessário.

Ao Técnico e pesquisador Dr. Sebastião Pratavieira e ao Professor Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães pelo auxílio durante as coletas de imagens utilizando microscopia confocal.

Aos (às) amigos (as) e colegas da Universidade de Oslo (*Radiumhospitalet*, Oslo/Noruega) - Ane Sofie Viset Fremstedal, Cathrine Elizabeth Olsen, Eirini Giannakopoulou, Manish Kakar, Maria Elizabeth Brandal Berstad, Theodossis Theodossiou, e a todos os demais técnicos e pesquisadores - que me ajudaram, me ensinando e sanando dúvidas durante a realização dos experimentos.

Ao, Ramon Gabriel Teixeira Rosa, e à Thereza Cury Fortunato, até então, estudantes de doutorado, pelo auxílio durante as preparações de rotinas utilizando o software com linguagem MATLAB.

Às secretárias e ao secretário do Grupo de óptica e à Coordenação e Secretaria de Pós-Graduação pela prontidão nos serviços prestados.

Às pesquisadoras que me ajudaram na correção, e com seus comentários concernentes a tese: Cynthia Aparecida de Castro, Karina Ana da Silva, Lilian Tan Moriyama, e Luciana de Matos.

Aos (às) pesquisadores (as) do Grupo de Óptica por me auxiliarem nas dúvidas técnicas durante a realização da pesquisa.

À bibliotecária Maria Neusa de Aguiar Azevedo pela revisão e formatação da tese.

Certa de que muitos outros nomes deveriam estar inclusos neste capítulo de agradecimentos, agradeço aos (às) estudantes, técnicos (as) e aos (às) professores (as) envolvidos no grupo de Biofotônica, assim como aos (às) componentes da equipe do Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica (CEPOF), pela disposição em ajudar sempre que necessário.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado e bolsa de intercâmbio (PDSE) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À FAFQ, pelo auxílio financeiro após o meu retorno ao Brasil e finalização da bolsa CAPES/PDSE.



### **RESUMO**

RODRIGUES, P. G. S. Estudos da formação de protoporfirina IX induzida por ácido aminolevulínico: um enfoque para o aprimoramento da Terapia Fotodinâmica. 2016. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica não invasiva usada no tratamento de lesões de pele, como câncer basocelular, queratose actínica, e doença de Bowen, dentre outros. Basicamente, a combinação da administração de um fotossensibilizador (FS), com a irradiação de luz adequada e o oxigênio celular, gera uma série de reações oxidativas que provocam a morte do tecido. Contudo, o principal efeito colateral desta terapia é a fotossensibilidade prolongada ocasionada pela administração de fotossensibilizadores sistêmicos. Por outro lado, a via tópica não apresenta esta limitação, pois o tratamento é realizado no local da lesão através de pró-drogas. O ácido aminolevulínico, ALA, está entre as pró-drogas mais utilizadas para indução do acúmulo do agente fotossensível na pele, a protoporfirina IX, ou PpIX. Contudo, a via tópica não permite penetração suficiente e homogênea do creme para o tratamento de lesões espessas. Visando a melhoria da TFD, foram realizados estudos in vivo e in vitro. Nos estudos in vivo, técnicas mecânicas - rolos de microagulhas, tape stripping e injeção livre de agulhas foram estudadas buscando encontrar a mais eficiente nos quesitos de: promoção da penetração da pró-droga no tecido, distribuição homogênea e de indução do acúmulo de PpIX. Para isto, foi o utilizado o modelo porcino, in vivo, conhecido como o modelo que possui a pele mais similar à pele humana. Os resultados *in vivo* mostram que as técnicas têm resultados similares na produção de PpIX e na distribuição de porfirina mais homogênea na superfície. Além disso, todas as técnicas estudadas in vivo têm se destacado em promover uma entrega mais homogênea de ALA também na profundidade da pele quando comparadas ao grupo controle. Nos estudos in vitro, foram examinadas possíveis diferenças na capacidade de formação da PpIX e/ou de resistência de células ao tratamento por TFD entre células expressando diferentes características de transição epitélio-mesenquimal. Os resultados in vitro indicam que as células com características epitélio-mesenquimal mais acentuadas produzem mais PpIX e são mais responsivas à TFD. Estes resultados indicam que a TFD tem maior efetividade no tratamento de células mesenquimais, e os estudos in vivo mostram que no tecido normal há maior seletividade de produção na camada da epiderme e apêndices da pele sugerindo que a terapia pode ser utilizada com maior eficiência em lesões superficiais e, até mesmo diminuir as taxas de recorrência devido a heterogeneidade de distribuição do creme na pele quando umas das técnicas mecânicas são utilizadas.

Palavras-chave: Rolos de Microagulhas. *Tape stripping*. Injeção livre de Agulhas. Transição epitélio-mesenquimal.

#### **ABSTRACT**

RODRIGUES, P. G. S. Studies of aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX production: an approach for optimization of Photodynamic Therapy. 2016. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Photodynamic therapy (PDT) is a noninvasive technique used to treat skin lesions, such as basal cell cancer, actinic keratosis and Bowen's disease. Basically, the administration of a photosensitizer (PS), combined with the illumination of adequate light and the cellular oxygen, generate a series of oxidative reactions that cause tissue death. However, the major side effect of the treatment is prolonged photosensitivity caused by the systemic administration of photosensitizers. On the other hand, the topical therapy does not show this limitation, and it is performed at the lesion site via prodrugs. The aminolevulinic acid, ALA, is the most popular pro-drug in topical PDT. This prodrug induces PpIX production that is a photosensitive porphyrin. However, when ALA is used topically, the cream does not provide enough or homogeneous penetration for the treatment of deep lesions. Therefore, with the aim of improving PDT therapy, studies in vivo and in vitro were performed. In the in vivo analysis, mechanical techniques - microneedle roller, tape stripping, and needle-free injection- were studied looking for the most effective regarding to improve the following purposes: promoting penetration of the prodrug into the tissue, homogeneous distribution, and at inducing PpIX accumulation. The evaluations were made by fluorescence spectroscopy, biopsy of skin, and fluorescence images, using the porcine model, in vivo, known as the most similar of human skin tissue. The in vivo results showed that all techniques have similar results in the production of PpIX, and perform a more homogeneous porphyrin distribution in the skin surface. Moreover, all the techniques have excelled in promoting a homogeneous distribution of PpIX in the deep of the skin when compared to the control group. In addition to the skin penetration, studies of PpIX production were performed in vitro in cells expressing different levels of epithelial-mesenchymal transition characteristics. The studies were made in regard to a possible difference in PpIX formation capacity and / or a resistance to the PDT treatment. The in vitro results showed that cells with more epithelial-mesenchymal characteristics produce more PpIX and are more responsive to the PDT therapy. These results indicate that PDT therapy may have a better effectiveness in the treatment of mesenchymal cells and also the results in vivo showed that the ALA-induced PpIX in normal tissue seems to be selective to epidermal and skin appendages, indicating that the topical therapy may be used with a higher efficiency in

superficial injuries providing lower recurrence rates when they combine with one of the techniques studied.

Keywords: Microneedle rollers. Tape stripping. Needle-free injection. Epithelial-mesenchymal transition.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama de Jablonski
Figura 2 -	Espectro de absorção e emissão da PpIX
Figura 3 -	Biossíntese do Heme
Figura 4 -	Vias de penetração de fármacos na pele
Figura 5 - L	Lâminas histológicas de pele suína e humana. Folículos pilosos (FP), Glândulas sudoríparas (G. Sud.), Glândulas Sebáceas (G. Seb.), músculo eretor do pelo (Musc. e apontado pela flexa), adipócitos (Ad).
Figura 6 -	Disposição das agulhas no rolo de microagulhas (esquerda) e exemplar de rolos de microagulhas (direita)
Figura 7 -	Exemplo de um rolo de microagulha com metade da face lateral do cilindro coberta com 92 agulhas (RMs, esquerda) e a outra metade com cerca de 7 agulhas interespaçadas de 7 mm (FIs, direita)
Figura 8 -	Kit de Injeção livre de agulhas produzido pela Injex, Alemanha. Injetor a), ampola b), e caixa resetadora c)
Figura 9 -	Dispositivo de coleta e visualização de imagens de fluorescência de campo amplo
Figura 10 -	Sistema portátil de diagnóstico por espectroscopia de fluorescência46
Figura 11 -	Imagens relativas aos passos do procedimento experimental. 1- Anestesia e preparação do animal; 2- raspagem do pelo; 3- Limpeza com gaze embebida em soro; 4- aplicação dos rolos de microagulhas; 5- aplicação do creme; 6- oclusão com plástico filme e papel alumínio
Figura 12-	Ilustração dos tratamentos realizados nos experimentos a, b e c. Em laranja são ilustradas as regiões onde foram coletados espectros e imagens de fluorescência de campo amplo da superfície da pele. Em verde estão ilustradas as regiões onde foram realizadas biópsias por meio de <i>punches</i> e cortes de bisturi para análise da distribuição da PpIX em profundidade50
Figura 13-	Cronologia dos procedimentos realizados nos animais 1-3 relativos aos experimentos a,b e c
Figura 14 -	- Em laranja é apresentado uma ilustração das três repetições (A, B, C) dos tratamentos realizados no dorso do quinto animal, utilizado nas comparações entre RMs e TS por meio de espectroscopia. As regiões em verde ilustram regiões onde foram extraídas as biópsias por <i>punches</i>
Figura 15 -	Ilustração dos tratamentos utilizados no experimento comparando ILA e TS54

Figura 16 -	Exemplar de placa de 96 poços após a adição de DMSO ao formazan formado nas células durante a realização de MTT. As diferenças nas tonalidades da cor roxa se equiparam a viabilidade celular, onde a mais escura representa maior viabilidade.
Figura 17 -	Espectros da autofluorescência da pele, e da fluorescência da pele na presença de PpIX sob excitação em 532 nm após 3 horas de incubação de ALA tópico em pele de porco. Os espectros apresentados estão normalizados
Figura 18 -	Cinética de acúmulo de PpIX até 5 horas após a aplicação do creme 60
Figura 19 -	Triplicatas (experimentos a, b, e c) das cinéticas de fluorescência superficial de PpIX em pele de porco <i>in vivo</i> para os grupos onde foram aplicadas as técnicas de rolos de microagulhas de diversas profundidades (0,5, 1,0 ou 1,5 mm) ou <i>tape stripping</i> anteriormente a aplicação do creme. O grupo controle não recebeu nenhuma das técnicas, mas apenas creme.
Figura 20-	Média dos valores dos coeficientes angulares (normalizados pelo grupo controle) obtidos nos experimentos <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> . * RM Representa os tratamentos onde foi utilizada a aplicação prévia de rolos de microagulhas
Figura 21	Exemplos de Imagens de fluorescência de campo amplo da fluorescência natural da pele, ou autofluorescência (em verde) e da fluorescência na presença de PpIX (regiões em vermelho). * RM Representa os tratamentos onde foi utilizada a aplicação prévia de rolos de microagulhas, e Autof. é a autofluorescência da pele
Figura 22	- Intensidade de fluorescência da PpIX para as triplicatas dos tratamentos utilizando rolos de microagulhas de diversas profundidades, tape stripping e controle. Os espectros do grupo controle foram coletados utilizando um evidenciador de fluorescência (Evince ®) como guia.
Figura 23 -	Produção de PpIX ao redor de furos individuais (FI) de 0.5, 1.0 e 1.5 mm 71
Figura 24 -	Produção de PpIX para concentrações de até 20% de ALA em soro, injetados sob injeção livre de agulhas e para ALA 20% na via tópica utilizando a aplicação prévia de <i>tape stripping</i>
Figura 25 -	Espectros de emissão de fluorescência: anteriormente a aplicação da injeção (AF da pele), no ponto de aplicação da injeção imediatamente após a realização desta (F no centro da ILA-0h), e no ponto de aplicação da injeção 3 horas após a aplicação (F no centro da ILA-3h)
Figura 26 -	Exemplos de imagem superficial de campo amplo após 2 horas da aplicação de injeção livre de agulhas de ALA em soro fisiológico
Figura 27 -	Médias (barras) e coeficientes de variação (pontos azuis) dos níveis de cinza (valores de 0-255) no canal vermelho das imagens superficiais de fluorescência de campo amplo
Figura 28	- Perfis de intensidades no canal vermelho passando pelo ponto central da realização da ILA

Figura 29 -	- Exemplar de perfis de intensidades no canal vermelho de uma imagem de fluorescência da superfície da pele para o grupo controle. Tal imagem foi registrada após três horas da aplicação do creme (ALA 20%) durante a realização do experimento b.	81
Figura 30 -	- Imagem de fluorescência de campo amplo de biópsia de pele por meio de <i>punch</i> após 3 horas da aplicação do creme. A superfície da pele está na direção vertical a esquerda, e a profundidade da pele cresce na direção horizontal no sentido esquerda-direita da imagem	83
Figura 31 -	Exemplar de um mapa de intensidades no canal vermelho de uma imagem de fluorescência de uma biópsia extraída por <i>punch</i> após a produção de PpIX. A profundidade da pele cresce na horizontal, na direção da direita para a esquerda da página.	83
Figura 32 -	Perfil de distribuição da PpIX em profundidade. A componente vermelha das imagens varia de 0 à 255 (255 em vermelho escuro) e a superfície da pele está voltada para o eixo y da imagem (à esquerda). O tempo de 0h se refere ao momento da aplicação do creme.	84
Figura 33 -	Exemplar do procedimento adotado para realização do perfil de intensidade no canal vermelho da imagem de uma amostra extraída por <i>punch</i> após 3 horas da aplicação do creme.	85
Figura 34 -	Perfis de intensidades no canal vermelho relativos à emissão de fluorescência da PpIX com a profundidade da pele para os diferentes tratamentos utilizados. Os perfis foram traçados nas imagens das biópsias por <i>punches</i> de pele. Os experimentos 1, 2 e 3 se referem, cada qual, à um diferente animal	86
Figura 35 -	Na imagem à esquerda: Um exemplo de corte transversal à superfície da pele extraído após 3horas da aplicação de ALA por meio de Injeção livre de agulhas. E à direita: Linhas onde foram realizados os perfis de intensidade, no local da injeção (C), e nas laterais esquerda (LE) e direita (LD) à região de aplicação	88
Figura 36 -	Perfis de intensidades no canal vermelho da imagem, nas regiões centrais e laterais do ponto de aplicação da injeção livre de agulhas. Cada amostra 1, 2 , e 3 foi extraída de um animal diferente três horas a partir da administração do ALA.	89
Figura 37 -	Triplicatas dos perfis de intensidade de emissão da fluorescência da PpIX a partir de cortes transversais à pele três horas após a aplicação de ALA 20% quando a pró-droga é administrada por meio de injeção livre de agulha. As imagens se referem às amostras utilizadas para gerarem os perfis 1, 2 e 3 apresentados na Figura 36, e estão em sequência.	91
Figura 38	- Imagens da fluorescência por microscopia confocal de cortes de pele criopreservados.	.93
Figura 39	- Expressão de Axl nas células MDA-MB-231, shAxl278 e ShAxl280, na sequência.	98

(280) após a realização da TFD utilizando o tempo de incubação de 4 horas e vários tempos de iluminação	98
Figura 41 - Fluorescência relativa da PpIX nas células MDA-MB-231 (231), ShAxl278 (278), e ShAxl280 (280) após quatro horas de incubação de ALA (triplicata).	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 19 (a, b, e c) em unidades arbitrária (U.A.). Os menores valores de coeficientes encontrados nos experimentos a, b, e c, estão em vermelho na tabela.	63
Tabela 2 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 19 (a, b, e c) quando normalizados pelo grupo controle (razões, R). Valores apresentados em unidade arbitrária – U.A.	63
Tabela 3 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 22 (experimento d), quando normalizados (R) ou não pelo grupo controle. Valores apresentados em unidade arbitrária – U.A.	68
Tabela 4 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos apresentados na Figura 23, quando normalizados (R) ou não pelo grupo controle. O menor valor obtido está destacado em vermelho, e todos os valores estão em unidade arbitrária – U.A.	71
Tabela 5 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 24, quando normalizados (R) ou não pelo grupo controle. Valores apresentados em unidade arbitrária – U.A.	73

# **SUMÁRIO**

1 INTRO	ODUÇÃO	21
1.1 TER	RAPIA FOTODINÂMICA	23
1.2 FOT	ΓOSSENSIBILIZADORES (FS)	24
1.3 PRC	OMOÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	: UMA
ABORDA	GEM PARA A TFD.	29
1.4 MO	DELO PORCINO NA MIMETIZAÇÃO DA PELE HUMANA	32
1.5 TRA	ANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E A TERAPIA FOTODINÂMIO	CA34
2 MOTI	VAÇÃO E OBJETIVOS GERAIS	37
2.1 OBJ	JETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 MATE	ERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 EXI	PERIMENTOS IN VIVO	41
3.1.1	Modelo animal	41
3.1.2	Agentes químicos	41
3.1.3	Dispositivos para realização de canais de penetração	42
3.1.4	Imagens de Fluorescência de Campo Amplo	44
3.1.5	Espectroscopia de Fluorescência	46
3.1.6	Criopreservação de biópsias de cortes de pele	47
3.1.7	Microscopia confocal	47
3.1.8	Desenvolvimento experimental	48
3.2 EXI	PERIMENTOS IN VITRO	54
3.2.1	Modelo celular	54
3.2.2	Agentes químicos	55
3.2.3	Western Blotting	56
3.2.4	Medidas de viabilidade celular	57
3.2.5	Medidas de fluorescência celular: Citometria de fluxo	58
4 RESU	LTADOS E DISCUSSÕES DOS EXPERIMENTOS IN VIVO	59
4.1 ESP	PECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	59
4.1.1	Estudo piloto	59
4.1.2	Rolos de Microagulhas (RMs) e Tape Stripping (TS)	61

4.1.3 Furos individuais na produção de PpIX	70
4.1.4 Injeção livre de agulhas e <i>Tape Stripping</i>	72
4.2 IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA NA AVALIAÇÃO DA	DISTRIBUIÇÃO
SUPERFICIAL E EM PROFUNDIDADE DA PPIX	76
4.2.1 Produção superficial de PpIX	76
4.2.2 PpIX na profundidade da pele	82
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	97
5.1 PRODUÇÃO E RESPOSTA CELULAR À TFD <i>IN VITRO</i>	97
6 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE A – Publicações relacionadas ao tema	117

### 1 INTRODUÇÃO

Entre os diversos tipos de câncer, o câncer de pele é o mais comum no Brasil. Estatísticas mundiais apresentadas pela *Skin Cancer Foundation* dizem que há mais novos casos de câncer de pele a cada ano do que a incidência de câncer de mama, próstata, pulmão e colo de útero combinados. (1) Além disso, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), este tipo de câncer está crescendo no mundo em um ritmo alarmante, com 14 milhões de casos em 2012 e estimativa de 22 milhões por ano nas próximas duas décadas. (2)

Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, o câncer de pele, além de ser o mais frequente, corresponde a 25% de todos os tumores diagnosticados, onde, deste total, 96% são correspondentes ao tipo não-melanoma. (3) A principal causa destas ocorrências é a ampla exposição, sem proteção, à radiação ultravioleta (UV) proveniente do sol.

As formas de tratamento para o câncer de pele variam de acordo com o tipo, acessibilidade e extensão da lesão, com foco na segurança e bem-estar do paciente. Em geral, os tratamentos são realizados por remoção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, e têm obtido boa eficácia no tratamento, porém, com presença de efeitos secundários a curto e longo prazo (cicatrizes, náuseas, vômitos, alopecia, etc.). Neste contexto, uma nova terapia chamada terapia fotodinâmica (TFD, ou, do inglês, *Photodynamic Therapy*-PDT) tem sido amplamente estudada e adotada em prática clínica, uma vez que esta é seletiva, não invasiva e permite um tratamento sem efeitos colaterais graves.

A terapia fotodinâmica (TFD) é realizada basicamente por meio da combinação de um fotossensibilizador (FS) com a irradiação de luz em comprimento de onda adequado, que desencadeia uma série de processos com o oxigênio celular resultando na morte do tecido. O principal efeito colateral desta terapia é a fotossensibilidade prolongada ocasionada pela administração de FSs, ou de pró-drogas, pela via sistêmica. Em contrapartida, a TFD pela via tópica (onde a pró-droga é administrada diretamente na pele), não apresenta este efeito. (4)

Na dermatologia, a TFD tem sido utilizada com êxito no tratamento de lesões mais superficiais de pele e do câncer não-melanoma, tais como câncer basocelular superficial, queratose actínica e Doença de Bowen. Porém, ainda há casos de recorrência, e algumas lesões mais espessas que dois milímetros podem apresentar apenas uma resposta parcial. O ácido aminolevulinico (ALA) é o agente mais utilizado no tratamento por TFD pela via tópica, porém seu caráter hidrofílico causa uma baixa penetração através da pele, que tem sido uma das

limitações no tratamento de lesões mais profundas e na recorrência das lesões após o tratamento.

Além da penetração do creme, a homogeneidade de distribuição do fotossensibilizador na lesão é um fator importante na eficiência do tratamento. Embora o fotossensibilizador induzido por ALA (a protoporfirina IX) seja reconhecido por acumular seletivamente no tecido lesionado quando comparado ao tecido normal (5-6), a literatura também mostra casos de formação de PpIX de forma heterogênea na área do tumor. (7) Esta heterogeneidade de formação do fotossensibilizador pode acarretar numa eliminação parcial da lesão, desencadeando na recorrência desta.

A formação heterogênea da PpIX também se dá no âmbito celular, uma vez que algumas células podem se tornar mais fotossensíveis que outras utilizando de um mesmo protocolo. (8) A literatura sugere que células de transição epitélio-mesenquimal, além de presentes em tumores agressivos, são mais resistivas à tratamentos (9), desta maneira, é possível induzir que células com fenótipos mesenquimais mais acentuados, podem apresentar variabilidade de resposta à TFD e até mesmo no acúmulo de PpIX.

Sendo assim, além de melhorar a profundidade de penetração do creme na pele, também se faz necessário buscar entender os processos envolvidos nesta heterogeneidade de acúmulo do fotossensibilizador através das diferenças de resposta celular à terapia fotodinâmica, com vistas à melhoria da eficiência do tratamento.

Diante disso, diversos meios têm sido pesquisados para aprimorar a penetração e o acúmulo do fotossensibilizador (PpIX) na lesão. Dentre estes meios, a busca por novos agentes fotossensibilizadores, e a associação com técnicas mecânicas, tais como, de abrasão (raspagem superficial da pele ou realização de *tape stripping*), microfuros, injeção livre de agulhas, dentre outros.

Neste contexto, este estudo visa avaliar e buscar a mais efetiva entre estas técnicas mecânicas, no que diz respeito ao aprimoramento da penetração do tópico, produção e uniformidade de entrega da pró-droga mais comumente utilizada na terapia fotodinâmica, o ALA. Além disso, será analisada uma possível relação entre a resistência ao tratamento via TFD de células apresentando fenótipo mesenquimal ou mais epitelial.

### 1.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia que vem sendo utilizada principalmente no tratamento de diversas lesões, tais como: queratose actínica, câncer de pulmão, colo do útero e pele, dentre outros. Esta terapia dispõe de um fotossensibilizador (FS), uma luz específica e do oxigênio presente na célula para promover, de maneira seletiva, e minimamente invasiva, a morte tecidual de células atípicas. (4)

Em linhas gerais, o tratamento é feito mediante a aplicação do FS (ou de uma pró-droga que induzirá o acúmulo do FS no tecido), seguido de um determinado período de tempo para o acúmulo do FS na lesão, e, da iluminação do tecido com luz de energia apropriada.

A eficiência desta terapia depende do FS, da sua seletividade para a lesão, e do tempo de exposição da luz no tecido. No caso da terapia realizada por via tópica também depende da penetração do medicamento tópico e sua capacidade em induzir a fotossensibilidade na célula. Além disso, a oxigenação do tecido, o tipo e a profundidade da lesão e a fonte de luz são considerados fatores que também influenciam na resposta a TFD. (10)

A Figura 1, ilustra o processo que ocorre com o FS durante a realização da TFD.



Figura 1 - Diagrama de Jablonski. Fonte: Adaptada de KONAN et al. (11)

Na TFD, ao receber luz em comprimento de onda adequado, o FS é excitado e levado do seu estado fundamental singleto (FS<sub>0</sub>) para um novo estado de maior energia também singleto (FS<sub>n</sub>), onde pode retornar para o estado fundamental emitindo fluorescência, sofrer relaxação não-radioativa (conversão interna), ou decair para um estado tripleto (<sup>3</sup>FS, com tempo de vida relativamente longo) por meio de cruzamento intersistema, caracterizado pela inversão de spin. No estado tripleto, a energia pode ser dissipada por processos de conversão interna, e o FS pode emitir fosforescência e retornar para o estado fundamental, ou reagir diretamente com o substrato (membrana das células, ou uma molécula).

As reações com o substrato que podem levar a morte celular são as reações do tipo I e as reações do tipo II. A reação do tipo I ocorre quando, no estado singleto ou tripleto, o FS reage com uma molécula, e forma radicais ao transferir um átomo de hidrogênio (ou elétron). Estes radicais interagem com o oxigênio formando produtos oxidados. A reação do tipo II é a mais comum e a principal causadora de morte celular na TFD. Nela, o FS no estado tripleto transfere sua energia diretamente para o oxigênio (também tripleto) formando oxigênio singleto, que pode voltar ao estado fundamental ou reagir com componentes celulares, uma vez que este oxigênio é altamente reativo. Os dois tipos de reação ocorrem simultaneamente e os seus produtos são altamente citotóxicos, induzindo várias reações com componentes da célula (proteínas, membrana celular, dentre outros), levando a morte do tecido, e, consequentemente, ao tratamento da lesão. (5-11)

#### 1.2 FOTOSSENSIBILIZADORES (FS)

Diante do exposto na seção anterior, fica claro que a eficiência da TFD depende de parâmetros fotofísicos e fotoquímicos como por exemplo: o tempo de vida do FS no estado tripleto, o tempo de vida do oxigênio no estado singleto, da concentração de oxigênio no tecido, da concentração de FS e a sua afinidade com a lesão, e da possibilidade de encontro entre o oxigênio e as moléculas. Dentre outras características importantes, é ideal que o FS absorva energia em comprimento de onda suficiente para boa penetração no tecido, tenha curto tempo de acumulo na lesão e que seja rapidamente eliminado do tecido normal, o que garante a seletividade do tratamento.

Dentre os FS frequentemente empregados em TFD estão as porfirinas e seus derivados, uma vez que estes se acumulam mais seletivamente no tecido lesionado do que no tecido sadio. Embora se saiba pouco sobre a razão desta seletividade, ela pode ser compreendida como sendo devido ao fato de as células tumorais possuírem uma membrana modificada, ao fato de as fibras de colágeno serem mais imaturas permitindo maior ligação às porfirinas, fatores como menor pH intracelular, a alta atividade metabólica das células neoplásicas, a alta afinidade das porfirinas por lipoproteínas de baixa densidade presentes nessas células, entre outras. (12)

A Hematoporfirina (Hp) e o seu derivado (HpD – derivado de hematoporfirina) foram os primeiros FSs sistêmicos a serem utilizados clinicamente. (13) Com o passar do tempo, outros FSs foram sendo utilizados e aprovados para uso por Terapia Fotodinâmica. Dentre estes,

em 1996 a FDA (*Food and Drug Administration*), agência norte-americana para controle de drogas e alimentos, aprovou o uso de Photofrin® (porfímero sódico, um derivado de hematoporfirina parcialmente purificado) para o tratamento de doentes com tumores do esôfago, e desde 1997 o mesmo medicamento foi aprovado para uso em tratamentos de câncer endobronquial. (14)

Além dos Estados Unidos, outros países como França, Alemanha e Japão aprovaram o uso do porfímero sódico, porém a fotossensibilização da pele e dos olhos tem sido reportada de 4 a 6 semanas após sua administração, período no qual o paciente deve evitar a exposição à luz solar. (14) Este mesmo composto é usado *off label*, para tratamentos de lesões pré-malignas e não-melanoma de pele. (15)

Outros derivados de Hematoporfirina, e análogos comerciais, são chamados de Photosan®, Photoheme®, Photogem® e outros. Dentre estes, o Photogem® é aprovado para uso clínico no Brasil (desde 2003) e na Rússia. (16) Estes derivados de Hp são chamados de FSs de primeira geração, principalmente devido sua estrutura a partir de misturas complexas resultantes de processos de síntese, e por apresentarem um comprimento de onda de máxima absorção menor que 630 nm. (17)

A penetração da luz em 630 nm na pele varia de acordo com a região. Contudo, estimase que, neste comprimento de onda, a luz possa ser capaz de penetrar cerca de 6 mm. (18) Ainda assim, estudos têm mostrado uma efetividade da TFD principalmente nos tratamentos de lesões mais superficiais, entre 1-3mm, já que o tratamento depende de outros fatores além da penetração da luz, tais como: a dose de luz utilizada e a quantidade de fotossensibilizador acumulada na região. (19-19) Além disso, os derivados de Hp apresentam maior fototoxidade para o vasos e estruturas intersticiais, e são menos tóxicos em nível celular. (20)

A faixa ideal de absorção do FS é entre 600 e 800 nm, também chamada de janela terapêutica. Esta faixa é ideal pois torna a TFD mais eficiente evitando a absorção da luz por parte de substâncias presentes no organismo (como a hemoglobina que absorve na faixa de 425nm, 544 e 577 nm, e a água que absorve energia em comprimento de onda maior que 1200 nm) o que não permitiria uma penetração eficiente da luz. (20)

Enquanto nenhum FS ideal foi encontrado, há uma busca constante de novos FS que apresentem uma região de absorção mais propícia e que sejam melhores quanto à sua estrutura, chamados fotossensibilizadores de segunda geração.

Dentre estes FS de segunda geração, há os da família das porfirinas, na qual o Foscan® (meso-tetra (hidroxifenil) clorina (-mTHPC), ou Temoporfin®) é aprovada na União Européia, Noruega e Islândia para câncer de cabeça e pescoço. Este fotossensibilizador possui uma facilidade em penetrar membranas devido sua propriedade mais anfifílica, porém não possui boa solubilidade. (21)

Em 2010, TPCS2a (Amphinex®, tetrafenil clorina dissulfonada) foi estudado pela primeira vez para uso como fotossensibilizador. TPCS2a tem absorção na faixa da janela terapêutica, em 652 nm, e é internalizado na célula por meio de vesículas endocíticas. Devido esta característica, TPCS2a pode ser utilizado tanto como FS, ou como um meio para realização da entrega de outras drogas por internalização fotoquímica (PCI, *Photochemical internalization*). (22-23)

O cloridrato do ácido 5-Aminolevulinico (ALA) é uma pró-droga aprovada pela União Europeia e Estados Unidos para o tratamento de queratose actínica, e o cloridrato de aminolevulinato de metila (Metil-ALA) foi aprovado nos Estados Unidos para o uso por via tópica no tratamento de queratose actínica enquanto na União Europeia além de ser utilizado para este mesmo fim, o Metil-ALA também é utilizado no tratamento de carcinoma basocelular. (24) No Brasil, ALA e Metil-ALA são as pró-drogas precursoras da Protoporfirina IX (fotossensibilizador) mais utilizadas em tratamentos clínicos, com registros na ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária).

ALA é um composto que é produzido naturalmente no nosso organismo durante a síntese do Heme, fazendo parte do processo a formação da protoporfirina IX (PpIX, como chamado daqui por diante). Para a realização da terapia, o ALA pode ser administrado por via intravenosa, oral ou tópica como pró-droga precursora para induzir o acúmulo de porfirina fotoativa, PpIX, no organismo, ou, no caso tópico, especificamente na lesão. Uma fotossensibilização suficiente para a realização da terapia mediante o uso do ALA tópico ou injetável (ou Metil-ALA tópico) é detectada após 3-8 horas da administração e é eliminada do organismo de 24-48 horas após a administração, (25) enquanto os derivados de Hp causam uma fotossensibilidade de até 2-3 meses. (26)

A Figura 2 apresenta o espectro de absorção e emissão da PpIX. Como observado, o maior comprimento de onda de absorção desta porfirina está em 630 nm, com emissão de fluorescência em 635 e 705 nm. Embora Foscan® apresente absorção na banda de 652 nm comparado a 633 nm para a Protoporfirina IX induzida por ALA e seus derivados, o que permite

o tratamento de lesões mais profundas, uma das principais desvantagens do uso sistêmico do Foscan® e dos demais FS de segunda geração é a fotossensibilidade prolongada.

No caso do Foscan® e TPCS2a, há permanência de fotossensibilidade no organismo de 2 à 4 semanas, e três meses, respectivamente. Devido à fotosensibilidade geral do organismo no uso sistêmico, o paciente deve se privar da luz solar, o que não acontece com o uso de pródrogas de uso tópico, tais como ALA e Metil-ALA, uma vez que sua administração pode ser local. (24, 27-28) Além disso, as boas taxas de respostas encontradas por via tópica, a privação de outros efeitos adversos, além da fotossensibilidade geral causados pelo FS administrado pela via sistêmica, têm sido uma das motivações desses agentes tópicos serem amplamente usados e está entre as razões de ALA ter sido adotado neste estudo.

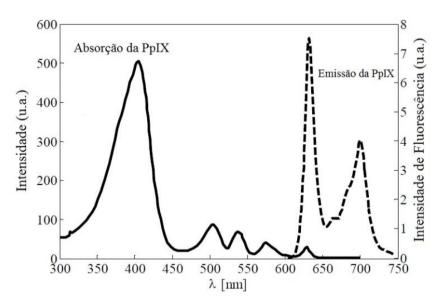


Figura 2 - Espectro de absorção e emissão da PpIX. Fonte: Adaptada de HAJ-HOSSEINI. (27)

A produção da PpIX induzida naturalmente no nosso organismo pelo ALA é demonstrada na Figura 3. Basicamente, uma reação na mitocôndria da célula, entre a Glicina e Succinil-CoA catalisada pela enzima ALA sintase causa a produção de ALA. O ALA é então transportado para o citoplasma onde duas moléculas de ALA são dimerizadas para formar Porfobilinogênio (PBG), através da enzima ALA dehidrogenase. Após, quatro moléculas de PBG são condensadas em preuroporfirinogênio através da enzima porfobilinogênio desaminase. Esta, por sua vez, pode formar o uroporfirinogênio I e III, sendo que o I não é metabolizável, e o III é descarboxilado e modificado em coproporfirinogênio III e, novamente

no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX, que é convertido em PpIX, pela enzima protoporfirinogênio oxidase. Por fim, a enzima ferroquelatase é responsável por inserir ferro (III) na PpIX dando origem ao heme. (29-31)

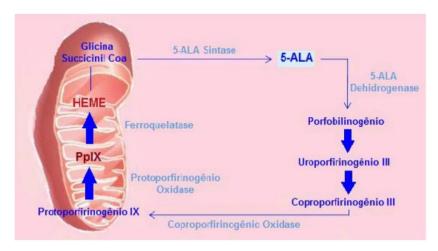


Figura 3 - Biossíntese do Heme. Fonte: Adaptada de FERREIRA. (29)

A biossíntese do grupo heme está presente em todos os tecidos animais principalmente na medula óssea e fígado e é usada, principalmente, na composição da hemoglobina. Em condições normais não há acúmulo de PpIX nas células pois há um mecanismo de *feedback* negativo quando há um excesso natural de ALA o organismo deixa de sintetizá-lo. (31) No caso da aplicação exógena de um excesso de ALA, por creme, por exemplo, o ALA entra na célula e induz a formação e acúmulo de PpIX, principalmente em tecidos lesionados.

As possíveis razões para um acúmulo seletivo de PpIX nas células anormais são debatidas. Dentre estas razões, têm sido mostrado que a atividade das enzimas porfobilinogenio desaminase são mais elevadas nestas células, enquanto a atividade das enzimas ferroquelatases e a presença de ferro são mais baixas, deixando de haver complexação de ferro na PpIX para formar o heme. (32-33) Outros fatores como baixo pH, maior temperatura, atividade metabólica, dentre outros, também são discutidos. (34-35) Além disso, quando ALA é aplicado topicamente, há uma maior facilidade de permeação através do tecido alterado, o que facilita o diagnóstico de tumores através da fluorescência emitida pela PpIX.

A administração de derivados de ALA como o Metil-ALA, sofrem o mesmo processo para o acúmulo de PpIX, porém, logo após a penetração há a desmetilação (no caso do Metil-ALA), seguido do mesmo processo de formação de PpIX.

# 1.3 PROMOÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS: UMA ABORDAGEM PARA A TFD.

A pele é o maior órgão do corpo humano. Ela é dividida em três camadas principais, a epiderme, derme e tecido subcutâneo. O estrato córneo (EC) é a camada mais externa da epiderme. Com cerca de 10-20 μm de profundidade, o EC é um tecido formado por células mortas queratinizadas, os corneócitos, e reconhecido como a principal barreira à penetração de medicamentos por via tópica na pele. (36)

As vias de penetração de fármacos através do EC podem ser intercelulares, transcelulares (transepidermais), ou através dos apêndices da pele (folículos pilosos, poros, e glândulas sebáceas), como mostradas na Figura 4. (36)

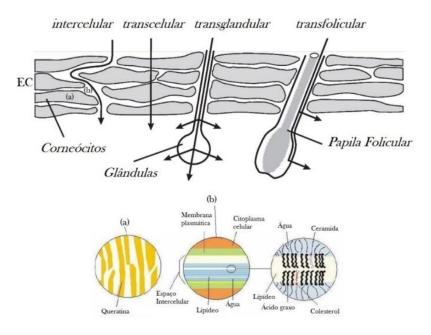


Figura 4 - Vias de penetração de fármacos na pele. (a) Corneócitos, (b) espaço intercelular. Fonte: Adaptada de TROMMER; NEUBERT. (36); SOUZA. (38)

A via transcelular exige que o fármaco cruze diretamente o tecido passando tanto por caminhos hidrofílicos das queratinas dos corneócitos quanto lipídicos do estrato córneo. Na via intercelular, o fármaco atravessa pelo espaço entre os corneócitos, composta por água e por bicamadas lipídicas de ácidos graxos, ceramidas e colesterol. As várias bicamadas lipídicas no espaço intracelular são formadas por fosfolipídios com as cabeças polares (hidrofílicas) voltadas para água e as caudas apolares (hidrofóbicas) ligadas entre sí. (36-38)

Os apêndices da pele são reconhecidos como vias de pequena contribuição na penetração de tópicos, uma vez que constituem apenas cerca de 0,1% do total da superfície da pele. A via transcelular é a mais utilizada por drogas de caráter hidrofílico devido à natureza hidrofílica dos corneócitos, contudo a droga também precisa fluir através dos lipídeos do espaço intercelular. Já a via intercelular é conhecida como a predominante na penetração de fármaco de caráter mais hidrofóbico devido a presença de lipídeos no espaço intercelular, porém, também há presença de água no espaço intercelular. Assim, para uma boa penetração na pele, tanto na via intercelular quanto na via transcelular, o fármaco necessita ter tanto caráter hidrofílico quanto lipofílico. (39)

Transpondo estes conhecimentos para a TFD, até então, nenhum fármaco tem apresentado características ótimas de permeação cutânea. Embora o ALA seja uma molécula pequena com baixo peso molecular, o que facilita a penetração na pele, ele tem um caráter hidrofílico, apresentando dificuldades em atravessar a membrana celular e as camadas da pele compostas por moléculas de caráter mais lipofílico, o que tem sido uma das causas de ser utilizado para tratamentos de lesões mais superficiais de pele. Para permitir o tratamento de lesões mais profundas, melhorias na permeação da pró-droga estão sendo buscados através de métodos físicos e químicos.

Promotores de permeação presentes na formulação do creme utilizado para a preparação de ALA 20% e formulações de derivados de ALA são exemplos de métodos químicos utilizados na melhoria da absorção de fármacos na pele. Através da esterificação, por exemplo, é possível obter um fármaco mais lipofílico acarretando numa melhoria na penetração do tópico na pele. Por este método, o Metil-ALA e outros ésteres derivados de ALA vêm sendo amplamente estudados.

Porém, além da penetração, a taxa de conversão em ALA (tempo de hidrólise) para a produção de PpIX é outro fator importante. Estudos tem mostrado resultados menos eficientes, e em certas vezes similares, na produção de PpIX com uso de Metil-ALA. Resultados *in vitro* em linhas de células (40-41) e *in vivo* em pele de ratos (42-43) mostraram menor quantidade de PpIX em relação ao ALA com uso do Metil-ALA. Também, em pele humana tem sido apontado que o Metil-ALA tem menor produção de PpIX que o ALA, além de ALA se tornar sistêmico mais rapidamente que o Metil-ALA, o que confirma esta hipótese. (43-46) Porém, estes resultados podem ser diferentes para outros derivados de ALA.

Além dos métodos químicos, o uso de métodos físicos como injeção local, iontoforese, *tape stripping* e microperfurações têm sido propostos como meio de vencer a barreira do estrato córneo para uma maior entrega e, em maior profundidade, do ALA. (45, 47-55)

Rolos de microagulhas (RMs) são usados para uma diversidade de tratamento, tais como na estética para indução de colágeno, e na entrega de medicamentos tópicos, bem como estudos com ALA e seus derivados para a Terapia Fotodinâmica. Eles permitem, assim como os lasers ablativos, realizar microcanais de permeação no estrato córneo, porém, a um de baixo custo e fácil manipulação. Estudos associando RMs na entrega de medicamentos tópicos têm sugerido que estes microcanais permitem aumentar a penetração de ALA e têm mostrado que não adicionam eritema ou dor à terapia, além de não provocarem alterações nos vasos sanguíneos. (55-57)

Dentre os estudos *in vivo* utilizando RMs na entrega transdérmica de ALA, Donnelly et al. (55) mostrou melhor penetração de ALA e produção de PpIX com matrizes de agulhas de 0,27 mm de comprimento em pele de murino (*in vivo*), pele de porco (*ex vivo*) e camundongos *hairless* (*in vivo*). Para Mikolajewska et al. (57), o uso de RMs de 0,6 mm de comprimento na pele humana (*in vivo*) aumentou a fluorescência de PpIX.

Outras técnicas tais como *tape stripping* (TS) e injeção livre de agulhas (sob pressão, ILA) também são utilizados como promotores de permeação.

O TS, assim como a curetagem, *debulking*, e a dermoabrasão, visa remover a camada mais externa da pele, o EC, através de múltiplas aplicações de fitas adesivas. Smits et al. (58) mostrou uma correlação entre a espessura do EC e a intensidade de fluorescência da PpIX em lesões queratinócitas de pele. Kleinpenning et al. (59) mostrou que lesões de psoríase apresentam formação heterogênea de PpIX, com maior formação em regiões de menor espessura do estrato córneo. Em concordância, Ibbotson et al. (60) identificou maior fluorescência em pele humana *in vivo* quando se utiliza TS.

Os injetores livres de agulhas utilizam de alta pressão para forçar o liquido a sair por um pequeno orifício em fração de segundos e penetrar por diversos tecidos da pele de forma rápida. (61) Embora sejam poucos os estudos utilizando injeção livre de agulhas (ILA) para melhoria da TFD, Barolet et al. (62) e Li et al. (63) registraram não haver recorrência, ou haver melhorias nas taxas de recorrência de câncer basocelular e candiloma acuminado através da utilização do dispositivo.

Embora todos os meios de promoção da permeação de ALA e produção de PpIX tenham apresentado resultados positivos na literatura, não foram encontrados estudos reportando comparações entre as técnicas de RMs, TS e ILA, no que diz respeito à efetividade de homogeneidade e de produção de PpIX em um modelo de pele adequado.

### 1.4 MODELO PORCINO NA MIMETIZAÇÃO DA PELE HUMANA

Porcos são reconhecidos como os mais similares aos humanos em termos de anatomia, genética e fisiologia. (64) Tais similaridades fazem do modelo suíno um dos mais viáveis para fins científicos.

No estudo de Schmook et al. (65) foi comparada a absorção percutânea de drogas de diversas polaridades na pele humana com a absorção na pele de ratos, porcos e modelos reconstrutores da pele humana. Este estudo mostrou que o modelo suíno foi o mais similar ao humano. Contudo, a maioria dos estudos científicos de permeação cutânea de drogas utiliza-se de roedores, devido ao fácil manuseio e baixo custo, muito embora seja considerado mais permeável que a pele humana ou a pele suína. (65-67)



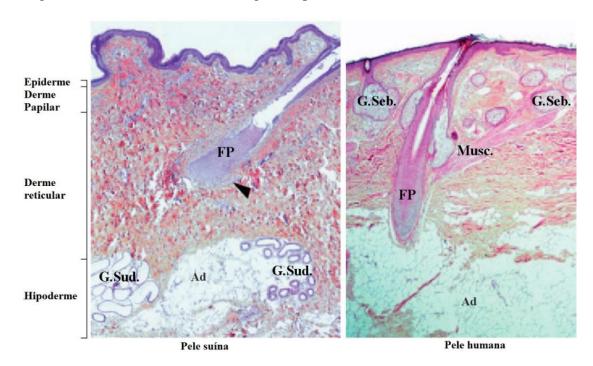


Figura 5 - Lâminas histológicas de pele suína e humana. Folículos pilosos (FP), Glândulas sudoríparas (G. Sud.), Glândulas Sebáceas (G. Seb.), músculo eretor do pelo (Musc. e apontado pela flexa), adipócitos (Ad). Fonte: Adaptada de DEEBER. (68)

Como mostrado na figura, assim como a pele humana, a pele suína é dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme. (68) Assim como na pele humana a espessura do EC de suínos varia de acordo com a região do corpo. Geralmente o EC é mais espesso onde a epiderme é mais espessa. (69) Sato, K. et al. (67) mostrou que espessura do estrato córneo no peitoral humano varia entre 15-21 µm, enquanto no dorso de suínos varia entre 15-19 µm, e a epiderme de ambos tem em média 51 µm. Também Vardaxis, N.J et al. (70) registrou que para ambos o EC é mais espesso no dorso que no ventre.

A camada da epiderme de suínos também é muito similar a humana, apresentando camadas estratificadas e queratinizadas. As diferenças encontradas por Deeber, S. et al. (68) foram: uma menor espessura da camada celular granular e uma menor quantidade de melanina e melanócitos presentes na camada basal da epiderme. Ainda assim, o porco foi descrito como o único animal que pode sofrer queimadura solar da mesma forma que o homem. (71)

No que refere à derme suína, as fibras de colágeno são mais finas e mais esparsas que a pele humana, mais abundantes na camada da derme papilar (mais próxima da epiderme) do que na reticular (mais próxima da hipoderme). (68-69) Contudo, ainda são conhecidos como o mamífero mais similar aos humanos. (70)

Uma das grandes diferenças em relação a pele humana, é que, excluso a região nasolabial e a região do carpo, o porco não contém glândulas sudoríparas écrinas, mas suas glândulas sudoríparas são do tipo apócrinas, ou seja, estão presentes no tecido subcutâneo e se estendem associando a um folículo piloso, porém seus ductos se abrem na superfície da pele independentemente do local onde o pelo se encontra. Também possuem menores glândulas sebáceas que o homem, e são encontradas mais esparsas na pele. A literatura também registra um maior número de vasos sanguíneos na derme que os humanos, certamente para realização da termoregulação, uma vez que não possui glândulas sebáceas écrinas. (69-72)

Embora semelhanças e diferenças sejam encontradas entre os dois modelos, o grau de similaridade é muito significante e supera a dissimilaridade quando o objetivo é o estudo de permeação transdérmica. Desta forma, o modelo porcino é reconhecido como o melhor modelo de mimetização da pele humana em estudos *in vivo*.

### 1.5 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E A TERAPIA FOTODINÂMICA

Como dito anteriormente, uma das causas de não haver uma eliminação total das lesões profundas por meio da TFD é o creme não alcançar de forma homogênea toda a profundidade da lesão. Quando não há eliminação total da lesão, há grandes probabilidades de haver o reaparecimento desta. Além deste fator, o alcance da luz no tecido e a própria resistência da célula à TFD podem acarretar na recorrência da lesão.

Como meio de promover uma entrega do tópico em maior profundidade na lesão, técnicas mecânicas tais como microperfurações, injeção local e curetagem podem ser utilizadas. Porém, em um mesmo tumor é possível encontrar uma diversidade de características, (73) que podem ou não conferir resistência ao tratamento. Desta maneira, não basta melhorar a profundidade de entrega do creme de forma homogênea, é necessário também entender as diferenças de resposta quanto ao acúmulo do fotossensibilizador e de resposta à TFD relacionando-a, com a heterogeneidade intratumoral, e, assim, abrir caminhos para novas possibilidades de aprimoramento da TFD.

Estudos mostram que o carcinoma de células escamosas apresenta taxas de recorrência por TFD maiores que 50%, e o carcinoma basocelular apresenta valores entre 9-18%. (74-78) É possível que estas taxas estejam relacionadas ao poder de invasão atingido por estas lesões no momento da terapia. Embora o carcinoma basocelular não tenha tendência à metástase como o carcinoma de células escamosas, uma vez que ele inicia o processo a eficiência da terapia é limitada. A literatura mostra, que tumores metastáticos podem sofrer processo de transição epitélio-mesenquimal, (79) geralmente associado com a resistência à terapias. (9)

Os estudos de Regula et al. (80) e Angell-Petersen et al. (81) mostram haver regiões de células viáveis nas bordas do tumor após a aplicação da TFD utilizando ALA pela via sistêmica. Também um recente estudo, mostrou uma região de células viáveis nas margens do tumor até mesmo próximas à superfície da pele, onde a luz alcançaria, quando a TFD foi realizada utilizando de outros fotossensibilizadores também por esta via. (82-83) Uma possível explicação para este ocorrido, é que, a vasculatura no centro do tumor são altamente sensitivos à TFD enquanto nas bordas do tumor, a resposta à TFD é dependente da resistência das células ali presentes.

Muitas pesquisas cientificas buscam uma possível explicação para a resistência de tumores à terapias, e a transição epitélio-mesenquimal (EMT *epithelial-mesenchymal* 

transition) tem sido uma forte aliada. (9) Através do processo de EMT, células perdem características epiteliais e ganham fenótipos mesenquimais. Uma das principais características do processo de EMT é a perda ou diminuição da transcrição da proteína E-caderina responsável pela ligação entre as células, e um aumento de vimentina, que, ao ocorrerem, conferem às células um poder de invasão, migração, e resistência a apoptose. Uma conexão entre os níveis de e-caderina e chances de sobrevivência do paciente são relacionados na literatura. (85) EMT também pode ser revertido pelas células e estas células que reverteram seu caráter mesenquimal para epitelial (MET, *mesenchymal-epithelial transition*) podem reiniciar um novo processo de EMT. (84) Além destes, alterações em fatores de transcrição tais como Twist, ZEB, SNAIL e TGF-β são associados ao processo de EMT. (84)

Como dito anteriormente, em um mesmo tumor pode haver a presença de células malignas de diferentes características. (73) A literatura relata que marcadores de transição epitélio-mesenquimal (EMT), como o SNAIL e β-catenina, são encontrados na frente invasiva, do tumor. (80,86-88) Também Bhangu et al. (85) mostrou em seu estudo, uma probabilidade de se encontrar EMT nas margens e frente invasiva do tumor, e também sobre todo o tumor. Isto indica que a resistência à TFD nas margens do tumor pode estar relacionada a presença de células com características de EMT nestas áreas.

A possibilidade da presença de EMT nas bordas tumorais resistentes à TFD e em lesões com altos índices de recorrência após à TFD, dão indícios de que EMT pode estar relacionada à resistência no tratamento. Sendo confirmada esta relação, a inibição do fenótipo mesenquimal pode ser uma das alternativas na melhoria da prática clínica. (89)

Recentemente, um membro dos receptores tirosina-quinase, Axl, foi reconhecido como desencadeado via EMT. Axl foi detectado em altos níveis em lesões metastáticas, e requerido para a formação, metástase e progressão do câncer de mama, além de estar relacionado a um mau prognóstico do paciente. Axl se mostrou presente em diversas células metastáticas do câncer de mama, incluindo a célula de câncer de mama humano, MDA-MB-231. (89)

Em concordância, no estudo de Vuoriluoto et al. (90) foi mostrado um aumento na expressão de vimentina por EMT, e um aumento no poder migratório das células, ambos relacionados com uma maior expressão de Axl em células de câncer de mama pré-malignas. Desta maneira, é presumível que Axl seja encontrado na frente invasiva do tumor.

Outro estudo mostrou que quando Axl era atenuado - utilizando a droga MP470 (Amuvatinib) - o processo de EMT era revertido e a quimiosensitividade era reestabelecida em

células tronco do câncer de mama reconhecidas por serem altamente invasivas e resistentes a terapias. (91) Diante destes estudos, Axl pode ser usado como um modelo nas avaliações do papel da EMT na resistência de tumores à TFD. Uma vez que seja confirmado o papel de EMT na resistência à TFD, drogas inibidoras de Axl podem ser associadas à TFD para uma melhor resposta.

# 2 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS GERAIS

Os tratamentos para câncer de pele mais efetivos exigem cirurgias que necessitam extrair uma área de segurança atingindo não somente a área da lesão, como também do tecido saudável ao seu redor, tendo como resultado cicatrizes. Além disso, não são todos os pacientes que podem, querem ou devem passar por um processo cirúrgico, por fazerem uso de anticoagulantes, ou pelos riscos associados a idade. Diante disso, a TFD entra como uma nova técnica no tratamento dessas lesões de forma minimamente invasiva.

A partir de então, esta terapia passou a ser estudada e utilizada mais comumente para tratamento de lesões de pele pré-malignas ou de câncer, como carcinoma basocelular, doença de Bowen, e queratose actínica. Além destes tratamentos, o uso de ALA tem se expandido para outros campos de estudo tais como: aplicações para psoríase, papiloma, micoses fungóides, odontologia e estética, apresentando eficácia. (34,37,57,92-95)

Ainda que a TFD esteja expandindo sua aplicação para novas áreas, como dito, o uso do ALA pela via tópica ainda é limitado quanto à penetração do creme na pele, e a heterogeneidade de formação de PpIX na lesão. A pobre distribuição transdérmica do ALA tem sido considerada como um dos principais fatores que limitam a TFD para o tratamento de lesões de até três milímetros de espessura, consideradas lesões de pele superficiais, e, também, das taxas de resposta completa após a TFD não chegarem à 100%. (96-98) Isto está relacionado ao fato da penetração limitada ou heterogênea do ALA na pele acarretar na ineficiência do tratamento na área onde não houve produção do fotossensibilizador, e, consequentemente, na recorrência da lesão.

A literatura registra alguns relatos de taxas de respostas de 100% após a TFD para doenças superficiais, geralmente ocasionadas pela exposição intensa ao sol sem proteção, como por exemplo, para o tratamento de queratose solar (99), carcinoma basocelular (CBC) superficial, (100-101) e queratose actínicas (102), enquanto para os tipos de CBC nodular os resultados chegam apenas a 42 %. (103) Dentre os tipos de tratamentos de lesões de pele nãomalignas, pré-malignas e de câncer, comumente realizados por TFD, a eficácia varia de 50% a 100% para as doenças de Bowen, carcinoma basocelular, queratose actínica, psoríase e outras lesões. (34)

Por outro lado, estudos mostram que taxas de recorrência para certas lesões são altas. Para carcinoma de células escamosas, por exemplo, foram relatadas taxas maiores de 50%. (74-

76) e para carcinoma basocelular estas taxas foram documentadas entre 9 e 18% (77-78), e, segundo uma revisão feita por Morton et al. (104) para doença de Bowen as taxas de recorrências variam de 0 a 40%.

O uso de técnicas físicas na pele para a melhoria na entrega do ALA pode ser utilizado como um meio de promover uma maior formação de PpIX em profundidade, bem como de ocasionar uma entrega mais homogênea do ALA sobre toda a lesão, de forma que as taxas de recorrência pós-TFD possam diminuir e, até mesmo, abrir caminhos para que estas técnicas possam ser utilizadas para melhoria da entrega de outros fármacos de pouca penetração na pele.

Embora técnicas físicas tais como rolos de microagulhas (RMs), tape stripping (TS) e injeção livre de agulhas (ILA) tenham sido reportadas na literatura objetivando melhorias na penetração transdérmica de medicamentos tópicos, incluindo o ALA, neste estudo a hipótese a ser testada é que uma das técnicas mecânicas (TS, RMs ou ILA) resultaria em uma maior eficiência na intensificação do acúmulo de PpIX, profundidade de alcance, e homogeneidade do FS na pele quando comparada entre as demais. Tais avaliações serão realizadas por espectroscopia de fluorescência, imagens de fluorescência de campo amplo e imagens de fluorescência confocal utilizando de um modelo animal adequado.

Através do uso de ILA, propõe-se vencer a limitação da penetração do ALA. Utilizando de um mecanismo injetável vence-se o tempo necessário para perfusão do creme na pele, e, assim, se a produção de ALA atingir um patamar máximo em um período anterior a três horas da injeção, o tempo necessário para iluminação por TFD em prática clínica seria menor, diminuindo o tempo de espera de três horas do paciente.

Além da heterogeneidade de acúmulo no fotossensibilizador, dentre outras possíveis causas, o fato da PpIX se acumular preferencialmente em certos tipos celulares, (8) e a heterogeneidade de células de diferentes características no mesmo tumor podem, também, estar relacionados às diferenças de taxas de resposta e com a recorrência para certos tipos de lesões. Na literatura é relatada a presença de uma resistência à terapia nas margens do tumor, onde são mais susceptíveis de se encontrar sítios de transição epitélio-mesenquimal, e células com fenótipos mesenquimais. Avaliar possíveis diferenças de resposta e acúmulo do fotossensibilizador em células expressando fenótipos mesenquimais ou epiteliais podem abrir novos caminhos para o tratamento por TFD, como por exemplo, a associação da TFD com novas drogas.

Outra possível explicação para tais recorrências após o tratamento, é que células em processo de EMT sejam menos responsivas à TFD, (9) e estas possam ser encontradas nas margens do tumor, resistivas à TFD. É possível pensar, então, que o tratamento esteja sendo mais efetivo nas células com fenótipo mais epitelial que para as células com fenótipo mesenquimal, ocasionando na recorrência do tumor.

Recentemente, Gjerdrum et al. (89), mostrou que Axl é um receptor tirosina quinase reconhecido como sendo induzido pelo processo de EMT em células de tumor de mama com fenótipos mesenquimal de alto poder metastático (MDA-MB-231) e foi até mesmo correlacionado com um baixo prognóstico do paciente. Os autores também mostram que a redução da expressão de Axl por transdução retroviral nesta célula provocou um decréscimo nas características de invasão, sugerindo que Axl é requerido para manutenção do fenótipo metastático da lesão.

Para avaliar a possível relação de EMT na resistência ao tratamento e na diferença de produção de PpIX, um outro estudo, *in vitro*, foi adicionado ao trabalho. Na análise indireta destas indagações, foram utilizadas células com diferentes expressões de Axl, e as medidas de morte celular pós-TFD e acúmulo de FSs foram realizadas por meio da técnica de MTT e citometria de fluxo, respectivamente.

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar dentre as técnicas de rolos de microagulhas de diversas profundidades (0,5, 1,0 e 1,5 mm), tape stripping, e injeção livre de agulhas, a mais efetiva no que diz respeito:
- À formação de PpIX, na superfície da pele;
- À homogeneidade de distribuição de PpIX na pele;
- À profundidade de formação de PpIX na pele;
- Analisar uma possível relação entre células com diferenças na expressão de Axl, na resposta à TFD e na produção de PpIX.

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EXPERIMENTOS IN VIVO

#### 3.1.1 Modelo animal

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foi empregado o modelo suíno (Landrace/*Sus Scrofa Domestica*). Foram selecionados porcos com peso médio corpóreo de 20±3 Kg e idade de 2 meses. Estes receberam dieta baseada em ração comercial e água. Foram alocados na Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Os procedimentos descritos foram feitos sob os cuidados de médicos veterinários especializados e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil, de número 007296/13, local onde foram realizados os estudos.

## 3.1.2 Agentes químicos

# Anestesia

Os animais foram mantidos em uma baia específica e submetidos a jejum alimentar sem restrição hídrica por um período de 12 horas anterior ao experimento. A contenção química foi realizada com a administração intramuscular da associação de cetamina (12 mg/Kg), midazolam (0,5 mg/Kg), acepromazina (0,1 mg/Kg) e atropina (0,02 mg/kg). Após 15 minutos, realizou-se a cateterização da veia auricular lateral com cateter 22 Gauge para posterior administração de fármacos e fluidoterapia.

A indução anestésica foi realizada com propofol (3 mg/kg) pela via intravenosa. Logo após foi realizada a intubação orotraqueal com sonda Magill de tamanho adequado, a anestesia foi mantida com isofluorano diluído em oxigênio com concentração capaz de manter o animal em plano anestésico sob ventilação espontânea. A artéria auricular medial foi cateterizada para a monitoração da pressão arterial invasiva. A pressão arterial foi mantida acima de 60 mmHg com a administração de dobutamina por meio de infusão intravenosa (1-5 μg/kg/min). Para garantir a analgesia durante o procedimento, foi realizada a infusão contínua de morfina (10 mg), cetamina (30 mg) e lidocaína (150mg), diluídos em 1 L de NaCl 0,9% e taxa de infusão

de 10 mL/kg/h. Os parâmetros fisiológicos dos animais, foram monitorados a cada 10 minutos durante todo o procedimento anestésico.

Após o fim dos procedimentos experimentais, os animais eram retirados da anestesia geral inalatória. A eutanásia foi realizada com o mesmo protocolo da contenção química descrita anteriormente. A indução anestésica foi feita com a aplicação intravenosa de propofol na dose suficiente para causar parada respiratória. Em seguida, foi feita a aplicação intravenosa de pancurônio (2 mg/kg).

## Pró-droga

Para a realização dos experimentos com ALA tópico a pró-droga - Ácido Aminolevulínico (ALA, PDT Pharma Ind e Com.de Produtos Farmacêuticos Ltda Epp. Cravinhos, SP, Brasil) - foi preparada em uma concentração de 20% em creme base. A emulsão para a mistura contém: água (~70%), cerca de 20% de agentes emulsificantes (O/A), agentes preservativos de viscosidade (alcoóis), agentes umectantes e hidratantes (ureia e propilenoglicol), hidroxitolueno butilado BHT (0,05%), dimetilsulfóxido (DMSO, 5%) e ácido etilenodiamina tetracético (EDTA, 0,15%).

Em experimentos com administração injetável, o ALA em pó foi solubilizado em soro fisiológico (0,9%) na concentração de 20%.

## 3.1.3 Dispositivos para realização de canais de penetração

Foram utilizadas três técnicas para promoção da penetração de ALA pela via tópica: rolo de microagulhas, *tape stripping*, e Injeção livre de agulhas. A seguir a descrição de cada uma das técnicas.

#### Rolo de microagulhas (RMs)

Foram utilizados rolos de microagulhas (MT- Microneedle Therapy System, China) na realização de microfuros. Os dispositivos contêm 192 microagulhas distribuídas em 24 linhas e 8 colunas, interespaçadas de aproximadamente 1,4 mm cada linha e 2,3 mm cada coluna, e comprimentos de microagulhas de 0,5, 1,0 e 1,5 mm e espessura de 0,2 mm. A distribuição das microagulhas no dispositivo e um exemplar de um rolo de microagulhas são mostrados na Figura 6.

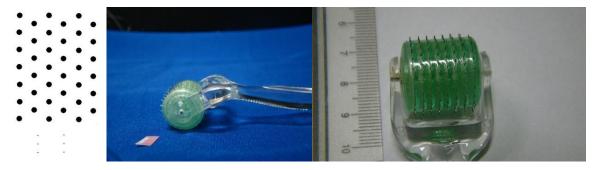


Figura 6 - Disposição das agulhas no rolo de microagulhas (esquerda) e exemplar de rolos de microagulhas (direita).

Fonte: Elaborada pela autora.

#### *Furos individuais* (FI)

Na avaliação da formação de PpIX ao redor de um único furo, agulhas dos RMs foram extraídas de metade da face lateral do cilindro do RM, desta forma, em um mesmo RM poderia ser aplicado tanto cerca de 92 agulhas quanto os furos individuais. Da área onde foram retiradas agulhas, as que restaram ficaram interespaçadas de no mínimo 7 mm. Uma imagem de um RM após a extração de agulhas pode ser vista na Figura 7.

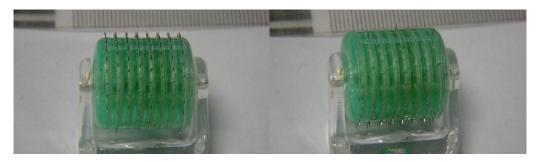


Figura 7 - Exemplo de um rolo de microagulha com metade da face lateral do cilindro coberta com 92 agulhas (RMs, esquerda) e a outra metade com cerca de 7 agulhas interespaçadas de 7 mm (FIs, direita).

Fonte: Elaborada pela autora.

# Tape Stripping (TS)

Para a realização da técnica de *tape stripping* cortes de fita adesiva (Fita Scotch, 3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) foram aplicadas e removidas 23 vezes de uma mesma região, sendo massageada por 4 vezes na direção craniocaudal anteriormente a remoção à ~ 45°. (105, 106, 107, 108) Este procedimento é feito como uma simulação do *debulking* ou curetagem, para a remoção do estrato córneo, e logo após o creme foi aplicado.

# Injeção livre de agulhas (ILA)

Outro dispositivo utilizado como meio de melhoria da penetração do ALA em pele foi uma Injeção livre de agulha (Safe-inject, Injex Pharma, Alemanha), apresentada na Figura 8. Este dispositivo contém uma microampola com 0,17 mm de orifício para a entrega da droga, com pressão de cerca de 3000 psi, que é comercializado para injeção de insulina e anestesia bucal (também em uso pediátrico) com a possibilidade de injetar até 30UI (0,3 ml) de líquido.

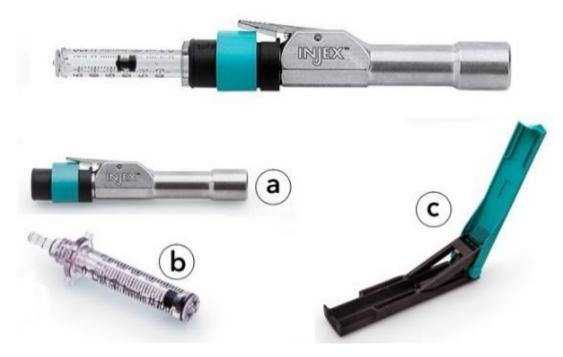


Figura 8 - Kit de Injeção livre de agulhas produzido pela Injex, Alemanha. Injetor a), ampola b), e caixa resetadora c).

Fonte: Adaptada de TECHNOLOGIE...(109)

# 3.1.4 Imagens de Fluorescência de Campo Amplo

Para visualização direta e captura de imagem de fluorescência da PpIX na superfície da pele e em profundidade por meio de *punches* e cortes de pele foi utilizado o dispositivo Evince® (MMOptics, São Carlos-SP, Brasil) acoplado à uma câmera digital com zoom óptico de 15x (Sony DSC-H50 9.1MP) e a uma lente macro. Uma demonstração desta montagem é mostrada na Figura 9. Todas as imagens de fluorescência de campo amplo, foram realizadas em ambiente escuro e coletadas a partir da distância focal da lente, com mesmo zoom óptico e tempo de exposição

O equipamento Evince consiste de um conjunto de Diodos Emissores de Luz (LEDs, sigla do inglês) que emitem energia em comprimento de onda de 400 nm, com irradiância de cerca de 40 mW/cm<sup>2</sup>.

Para a quantificação da homogeneidade de distribuição da PpIX na superfície da pele, estas imagens foram redimensionadas para um mesmo número de pixel e processadas por uma rotina em linguagem Matlab® 7,5 (The MathWorks, EUA). Em linhas gerais, algoritmos separam a matriz RGB em regiões de interesse (ROI) e obtém o valor da soma, média, e desvio padrão dos valores de intensidade (0-255) para o canal vermelho de cada imagem. A normalização de 0 a 1 foi feita a partir da soma das intensidades do canal vermelho dividida pelo maior valor encontrado entre todas as imagens, independente do tratamento.

Para as análises das imagens das biópsias por *punches* e cortes de pele, as imagens eram separadas em regiões de interesse, e perfis de intensidade no canal vermelho da imagem eram traçados utilizando-se a função *improfile* do Matlab ® a partir da superfície da pele. As imagens em escalas de cores (0-255) foram realizadas a partir do canal vermelho da imagem utilizando a função *Imagesc* do Matlab ®.



Figura 9 - Dispositivo de coleta e visualização de imagens de fluorescência de campo amplo. Fonte: Elaborada pela autora.

#### 3.1.5 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão da fluorescência da PpIX foram coletados usando um sistema portátil de diagnóstico composto de um espectrômetro (USB2000, Ocean Optics, EUA), um notebook com um software específico para aquisição de dados (OOIBase32, Ocean Optics, EUA), e uma sonda de investigação óptica tipo Y para coleta e distribuição de luz simultaneamente. O sistema foi montado conforme apresentado na Figura 10.

Neste sistema, há possibilidade de dois lasers de excitação, um laser Neodímio:YAG dobrado com excitação em 532 nm, utilizado nas realizações experimentais, e um laser semicondutor de diodo em 408 nm (AIX-532-30, AIXIZ Lasers, Houston, TX, EUA). (110-111) Além disso, filtros passa-alta (atenuando a amplitude das frequências abaixo da utilizada para a excitação) foram utilizados para filtragem da luz retroespalhada.

Nos experimentos, os espectros foram monitorados por um período de três horas após a aplicação do creme. Para as análises, a normalização das intensidades foi realizada dividindo o valor de intensidade relativa a cada comprimento de onda pelo valor da soma de todas as intensidades entre 540-600 nm do referido espectro (região de emissão da autofluorescência da pele). Logo após, cada espectro foi subtraído pelo espectro médio da fluorescência natural da pele (autofluorescência).

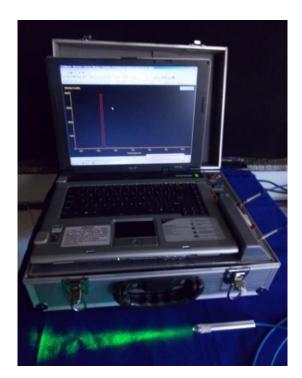


Figura 10 - Sistema portátil de diagnóstico por espectroscopia de fluorescência. Fonte: Elaborada pela autora.

#### 3.1.6 Criopreservação de biópsias de cortes de pele

Após três horas da administração de ALA utilizando injeção livre de agulhas, biópsias por meio de cortes de pele foram extraídas até a fáscia do músculo com o animal ainda em ambiente cirúrgico. Para o congelamento destas biópsias de tecidos, os cortes de pele foram lavados com soro fisiológico e limpos em gaze para retirada do excesso sanguíneo. Logo após a biópsia, foi envolvida em um composto de glicóis e resinas hidrossolúveis (Meio tissue-tek O.C.T. compound, Miles Scientific, EUA).

Em separado, numa caneca metálica, foi adicionado cerca de 20 ml de Isopentano (99% P.A. Vetec) ou n-Hexano (Sigma, EUA), e a caneca foi posta em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Foi tomada a devida precaução para que o nitrogênio não adentrasse a caneca.

Após Hexano (ou Isopentano) terem trocado calor com o nitrogênio líquido, a biópsia foi mergulhada na caneca e em cerca de segundos, quando o O.C.T. atingiu coloração branca, a pele foi retirada e guardada dentro de tubos de criopreservação que foram mantidos em gelo seco, e preservados da luz durante o período de deslocamento ao freezer vertical (-80°C) onde foram mantidos até o momento da avaliação por meio de microscopia confocal. As biópsias ainda envoltas em tissue-tek foram cortadas em fatias de 10 μm, utilizando de um micrótomo criostato cedido pela Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP. O micrótomo foi mantido em temperatura de -20°C durante o uso, e os cortes foram montados em lamínulas.

## 3.1.7 Microscopia confocal

Para as imagens de microscopia foi utilizado um microscópio confocal invertido (Zeiss LSM780) com excitação em 405 nm. As emissões em 507 nm e 680 nm de cada uma das lamínulas foram utilizadas para geração de dois canais das imagens. No processamento das imagens foram postas as barras de escala e aplicado o contraste de 0,001% em cada um dos canais de todas as imagens.

#### 3.1.8 Desenvolvimento experimental

No total foram utilizados seis animais para a realização do estudo. Os animais foram anestesiados e o pelo da região dorsal foi removido com auxílio de um aparelho barbeador descartável e creme de barbear dissolvido em água (Bozzano pele sensível, Hypermarcas, São Paulo, SP, Brasil), e logo após, a pele foi limpa com gaze embebida em soro fisiológico. As ilustrações destes procedimentos podem ser visualizadas na Figura 11 nos itens 1-3.

Para a realização dos experimentos, o dorso do animal foi dividido em regiões de área de 4 cm² utilizando uma fita adesiva, após a aplicação do creme (ALA 20% em ~35mg/cm²) ou ILA, a região foi oclusa com filme plástico de PVC e alumínio para fins de proteção da luz. Os itens 4-6 da Figura 11 ilustram esta descrição.

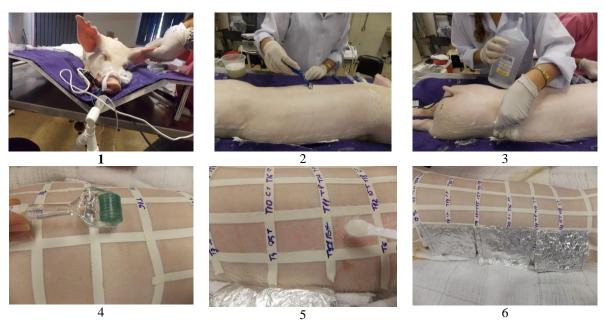


Figura 11 - Imagens relativas aos passos do procedimento experimental. 1- Anestesia e preparação do animal; 2raspagem do pelo; 3- Limpeza com gaze embebida em soro; 4- aplicação dos rolos de microagulhas;
5- aplicação do creme; 6- oclusão com plástico filme e papel alumínio.
Fonte: Elaborada pela autora.

Logo em seguida, foi iniciada a investigação da cinética de formação da PpIX através de espectroscopia e, em seguida, a coleta de imagens de fluorescência da superfície ou da profundidade da pele através de biópsias de pele.

Para as cinéticas, 90 espectros no estudo piloto e 15 espectros para os demais estudos foram obtidos em diversos tempos (entre 0 e 3 horas) após a administração do ALA. A

intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda de 636nm foi avaliada como uma medida indireta da concentração de PpIX. É importante salientar que os espectros foram coletados em pontos randômicos dentro da área delimitada para cada tratamento. As imagens de fluorescência foram realizadas três horas após a aplicação do creme, logo após a finalização da coleta dos espectros.

## 3.1.8.1 Estudo Piloto (animal 1)

Os espectros de fluorescência da emissão da PpIX induzido por ALA em pele de porco *in vivo* foram realizados com excitação em 532 nm, e a medida da produção de Protoporfirina IX (PpIX) foi obtida de maneira indireta a partir da intensidade de emissão da fluorescência da PpIX em 636 nm.

Neste estudo, a intensidade de emissão de fluorescência da PpIX foi avaliada desde a aplicação do ALA até o tempo de 5 horas após a aplicação deste. A partir deste estudo foi definido o tempo máximo de aplicação do creme para as posteriores comparações entre as técnicas de RMs, TS e ILA por meio de espectroscopia de fluorescência. Neste estudo não foram realizadas coletas de imagens de fluorescência.

#### 3.1.8.2 Comparação entre Rolos de Microagulhas e Tape Stripping

Nos experimentos comparando as técnicas de rolos de microagulhas e *tape stripping* foram realizados quatro experimentos. Cada experimento realizado será chamado de experimento *a, b, c*, e *d*, respectivamente, no decorrer do texto.

Em todos os experimentos *a-d*, a fluorescência natural da pele foi tomada anteriormente a aplicação das técnicas (RMs ou TS) e do creme, e, após a realização da técnica o creme foi aplicado e se deu a continuidade das medições espectrais até o tempo de três horas após a aplicação do creme quando a coleta espectral foi interrompida e, imediatamente após, foram capturadas imagens de fluorescência da superfície da pele.

É importante enfatizar que a direção de aplicação dos rolos de microagulhas é definida como sendo craniocaudal para todas as aplicações de RMs.

#### Experimentos a-c (animais 2-4):

Nos experimentos *a, b* e *c* foram realizadas três repetições de cada tratamento, cada qual em um animal. Uma ilustração da subdivisão do dorso de cada animal para a realização dos diversos tratamentos é apresentada na

## Figura 12.

As regiões na cor laranja apresentadas na

Figura 12 ilustram as áreas onde foram realizadas as cinéticas espectrais (0-3h após administração de ALA). Logo após a finalização dos espectros, foram coletadas as imagens de fluorescência da superfície da pele destas mesmas regiões (3h da administração do ALA). Porém, nestes experimentos, nas regiões onde o ALA foi administrado por meio de ILA não foram coletados os espectros, mas apenas imagens de fluorescência de campo amplo da superfície da pele. As regiões na cor verde na

Figura 12 ilustram as áreas onde foram realizadas biópsias por punches e por cortes de pele (biópsias por bisturi). Estas biópsias permitiram avaliar a formação de PpIX em profundidade após três horas da administração do ALA, seja por via tópica ou injetável.

Experimentos a-c
Tratamentos realizados

TS	FI 0,5	X
RM 0,5	FI 1,0	X
RM 1,0	FI1,5	ILA20%*
RM 1,5	С	ILA/20%*
C	RM0,5	ILA/0%*
ILA/20%	RM1,0	AF#
ILA/0%	RM1,5	TS
Cauda		

Figura 12- Ilustração dos tratamentos realizados nos experimentos a, b e c. Em laranja são ilustradas as regiões onde foram coletados espectros e imagens de fluorescência de campo amplo da superfície da pele. Em verde estão ilustradas as regiões onde foram realizadas biópsias por meio de *punches* e cortes de bisturi para análise da distribuição da PpIX em profundidade.

Siglas: AF= nenhum tratamento, C= controle; RM 0,5= Rolo de microagulha de 0,5 mm, RM 1,0 == Rolo de microagulha de 1,0 mm, RM de 1,5= Rolo de microagulha de 1,5 mm, TS = *Tape Stripping*, FI 0,5 =

Furos individuais de 0,5 mm, FI 1,0= Furos individuais de 1,0 mm, FI1,5 = Furos individuais de 1,5 mm, ILA/20%= ILA de 20% ALA, ILA/0%= ILA de NaCl.

# **AF** refere-se a uma região onde não foi aplicado nenhum tratamento e foram extraídas biópsias por cortes ou *punches* de pele como meio de se obter a autofluorescência da pele.

Fonte: Elaborada pela autora

Os Punches com diâmetro de corte de 3 mm (Paramount) foram utilizados para as biópsias dos tratamentos controle, RM de 0,5, RM de 1,0 e RM de 1,5 mm, e TS. No caso dos tratamentos que envolviam ILA (0% e 20%), as biópsias foram realizadas manualmente com o auxílio de lâminas de bisturi (cortes) até a região da fáscia, tendo assim uma visão geral de distribuição do líquido ao redor do ponto central da injeção. Imagens de fluorescência de campo amplo destas biópsias foram realizadas logo após a extração e limpeza com soro fisiológico.

Das regiões onde foram extraídas biópsias por *punches* para as imagens de fluorescência de campo amplo, também foram realizadas biópsias com bisturi (cortes) que foram congeladas em nitrogênio líquido para uma posterior análise por meio de microscopia confocal. Após a finalização destes procedimentos, deu-se a eutanásia.

Os procedimentos realizados nos três animais estão descritos no fluxograma apresentado na Figura 13.

<sup>\*</sup>regiões onde não foram realizadas biópsias por meio de punch mas apenas cortes de pele.

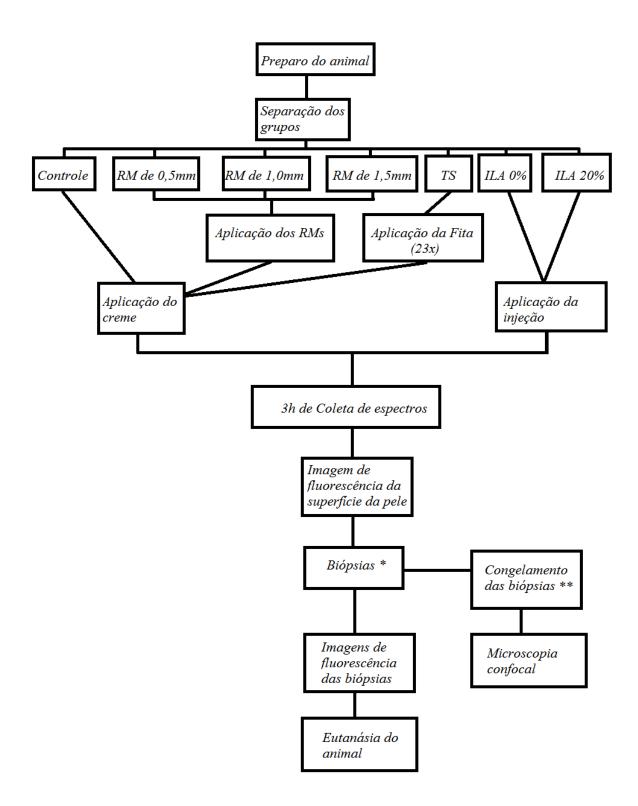


Figura 13 - Cronologia dos procedimentos realizados nos animais 1-3 relativos aos experimentos a,b e c.

\*As biópsias não foram realizadas nas mesmas regiões onde foram capturadas as imagens da superfície da pele

\*\* As biópsias congeladas não são as mesmas nas quais foram realizadas imagens de fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

# Experimento d (animal 5):

No experimento d, foi realizado outro teste com três réplicas de cada tratamento em um mesmo animal. Uma ilustração dos tratamentos realizados na área do dorso é apresentada na Figura 14.

Dorso do animal 5 Experimento d

RM0,5	RM 1,5	C
RM1,0	TS	
X	RM 0,5 <sub>B</sub>	RM0,5 <sub>C</sub>
X	RM 1,0 <sub>B</sub>	RM 1,0 <sub>C</sub>
X	RM 1,5 <sub>B</sub>	RM1,5 <sub>C</sub>
RM 0,5 <sub>A</sub>	Св	Cc
RM 1,0 <sub>A</sub>	$TS_B$	TS <sub>C</sub>
TS <sub>A</sub>	RM 1,5 A	СА
Cauda		

Figura 14 - Em laranja é apresentado uma ilustração das três repetições (A, B, C) dos tratamentos realizados no dorso do quinto animal, utilizado nas comparações entre RMs e TS por meio de espectroscopia. As regiões em verde ilustram regiões onde foram extraídas as biópsias por *punches*. C refere-se ao grupo Controle.

Fonte: Elaborada pela autora

As regiões em laranja da Figura 14 ilustram regiões onde foram realizados espectros (0-3h da administração do ALA), já em verde são ilustradas regiões onde foram extraídas biópsias por *punches* para comparação de profundidade de detecção da formação da PpIX. No experimento d, as amostras extraídas por *punches* foram realizadas não apenas no tempo de 3h, mas também, nos tempos de 0h, 1h e 2h após a aplicação do creme.

#### 3.1.8.3 Comparação entre ILA e *Tape Stripping* (animal 6)

Para a comparação da produção de PpIX a partir da técnica de ILA, TS e controle, foram realizadas três repetições de cada tratamento em um mesmo animal. Ilustração dos tratamentos realizados no dorso deste animal são apresentadas na Figura 15.

Após o dorso do animal ter sido dividido em regiões, foi injetado 0,15ml (15 UI) de ALA em solução de soro fisiológico (0,9%) nas concentrações de peso por volume de 0%, e 20%. Neste caso, a concentração de 0% se refere à aplicação de solução de soro na ausência de ALA. Os tratamentos controle (sem associação de qualquer técnica) e *tape stripping* utilizaram de ALA-20% na forma de creme.

Neste animal, da mesma maneira que nos demais, foi realizada a cinética espectral no período de 0-3h após a administração de ALA.

# | ILA0%A | CB | ILA 0%C | | ILA20%A | ILA0%B | ILA20%C | | TSA | TSB | TSC | | CA | ILA20%B | CC | | Cauda |

**ILA X TS** 

Figura 15 - Ilustração dos tratamentos utilizados no experimento comparando ILA e TS. Fonte: Elaborada pela autora.

#### 3.2 EXPERIMENTOS IN VITRO

## 3.2.1 Modelo celular

Células tumorigênicas de mama MDA-MB-231 foram cultivadas em RPMI 1640, enquanto as células MDA-MB-231 que sofreram transdução retroviral (as células chamadas: shAx1278 e ShAx1280) foram cultivadas em um meio de cultura rico em nutrientes F12hamK, todos suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (gentamicina e

estreptomicina). As células foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> de área superficial em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, e mantida a 37°C.

As células ShAxl278 e ShAxl280, foram obtidas por transdução retroviral da célula MDA-MB-231 e o procedimento foi realizado pelo Professor James Lorens da Universidade de Bergen, Noruega. Após o procedimento, as células foram gentilmente cedidas ao Professor Kristian Berg da Universidade de Oslo, *Radiumhospitalet*, onde os experimentos foram realizados. A eficiência da manutenção da transdução celular foi monitorada através da fluorescência de GFP (proteína verde fluorescente). A separação celular foi realizada utilizando FACSdiva (BD Bioscience) quando necessário.

#### 3.2.2 Agentes químicos

#### Pró-droga

Para induzir o fotossensibilizador, ALA foi preparado em uma concentração de 1 mM, diretamente em meio de cultura (Media) a partir de uma solução estoque de 15 mM preparada no momento da experimentação.

## MTT-Teste de viabilidade celular in vitro

Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetratozolium]) ou MTT (Sigma) foi preparado em uma concentração de 0,25mg/ml em meio de cultura e, após quatro horas de incubação nas células, o meio foi removido e adicionado DMSO (dimetilsulfóxido). A placa foi agitada por cerca de 20 minutos, e logo após, foram tomadas as medidas de espectroscopia absorbância (570 nm).

MTT é um teste colorimétrico de viabilidade celular. Enzimas presentes em células metabolicamente viáveis quebram o anel de tetrazólio presente do MTT transformando-o em um composto de coloração roxa chamado formazan, que é solubilizado em dimetilsulfóxido e o nível de coloração do solvente é realizado mediante medidas de absorbânica. Um exemplar de uma placa de 96 poços após a adição de DMSO é apresentada na Figura 16. Nesta figura, são apresentadas as diferenças de sobrevivência celular que podem ser equiparadas aos tons de roxo, onde o mais escuro representa maior viabilidade celular.

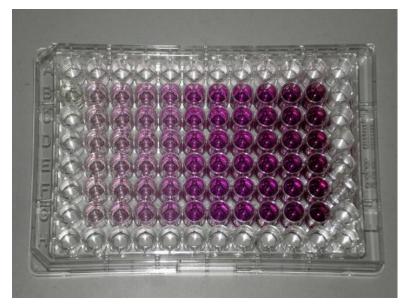


Figura 16 - Exemplar de placa de 96 poços após a adição de DMSO ao formazan formado nas células durante a realização de MTT. As diferenças nas tonalidades da cor roxa se equiparam a viabilidade celular, onde a mais escura representa maior viabilidade.

Fonte: LECTOR (115)

#### 3.2.3 Western Blotting

As três linhagens celulares foram cultivadas em mesmo número em frascos de 75cm². A contagem celular foi realizada através do equipamento *Coulter counter*® (Beckman coulter). Ao atingirem uma confluência de 80% as células foram lavadas em PBS gelado, o PBS foi succionado, e, para a extração da proteína total, receberam 500μl de solução tampão de lise a partir da solução de RIPA modificada. Cada mililitro da solução tampão de lise contém: 945μl de RIPA, 0,02M de β-glicerol fosfatase, 10μl/ml de coquetel inibidor de fosfatase I (Sigma), 10μl/ml de Coquetel inibidor fosfatase II (Sigma), 10μl/ml de coquetel inibidor de protease (Sigma), 1mM Ortovanadato de Sódio, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), e 1 mM de fluoreto de sódio (NaF). Para a preparação da solução tampão RIPA foi utilizado: 1xPBS, 1% de octil-fenoxi-polietoxi etanol, 0,5% de deoxicolato de sódio, e 0,1% de SDS (Dodecil sulfato de Sódio).

Após este período, o conteúdo foi raspado do frasco, alocado em tubos de 1,5ml, e o conteúdo total de proteína de cada amostra foi medido através do método de Bradford (BSA). Cada extrato foi então preparado numa mesma concentração em TBS-T (tampão trisma-salina) contendo 5x Laemmli buffer (diluído para 1x). As amostras foram deixadas por 5minutos em 95°C, centrifugadas, e aplicadas por poços do mini-gel.

As proteínas foram separadas em cerca de 1hora, à 180 volts em gel de eletroforese. Como marcador de peso molecular foi utilizando o padrão *Dual color standart (Precision plus protein: Dual color standart, Biorad).* 

Após a corrida das proteínas no gel, estas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do equipamento *Trans blot turbo* (Biorad). Em seguida, as regiões não ocupadas foram bloqueadas com leite em pó (5%) em TBS-T (tampão trisma-salina 1x). Após o bloqueio as membranas receberam o anticorpo primário (Human Axl, R&D systems, Reino Unido) por cerca de 12 horas, logo após foram lavadas três vezes (5 minutos cada) em solução de leite 5% em TBS-T (1X) e incubadas com o anticorpo secundário (Anti-Goat, R&D systems) por uma hora. Os anticorpos primários e secundários foram preparados em diluição de 1:1000.

Após estes procedimentos, as bandas foram observadas utilizando o equipamento ChemiDoc (Biorad) após minutos da aplicação do reagente de quimiluminescência (SuperSignal<sup>TM</sup> West Dura, Thermo Fisher). O software ImageLab (Biorad) foi utilizado para exportação das imagens.

#### 3.2.4 Medidas de viabilidade celular

As células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspendidas em meio de cultura e preparadas em várias concentrações a partir da solução estoque. As várias concentrações preparadas foram utilizadas para a contagem da concentração celular na solução estoque utilizando o equipamento *Coulter counter*® (Beckman Coulter). A partir da contagem, foram plaqueadas 1,6 x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> em placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

No dia seguinte o meio de crescimento celular foi succionado e as células foram incubadas por 4 h com ALA 1 mM, após este período foi realizada a iluminação da placa.

Para a iluminação foi utilizada uma lâmpada azul, LumiSource® (PCI Biotech, Oslo, Norway), emitindo energia em ~435 nm e intensidade de 11,5 mW/cm², a irradiância da lâmpada varia em menos que 10% na área de iluminação.

Após 48 horas da iluminação foi realizada a medida de viabilidade celular através da técnica de MTT.

#### 3.2.5 Medidas de fluorescência celular: Citometria de fluxo

Após as células atingirem 80% de confluência, 150000 células foram cultivadas por poço em placas de 6 poços. No dia seguinte as células receberam ALA (1 mM) e foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por quatro horas. Em seguida as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrigugadas e ressuspendidas em 300 μl de PBS gelado. Para a realização da Citometria de fluxo foi utilizado o sistema LSRII (BD Bioscience). A fluorescência da PpIX foi realizada utilizado o modo APC (excitação em 640 nm e observação em 670±14 nm). Para calibração, foram utilizadas células na ausência de fotossensibilizador. O experimento foi realizado em triplicata com medição de 10000 células em cada um deles. Os dados foram analisados através da mediana subtraída da mediana da autofluorescência da célula utilizando o software Flowjo (Flowjo LLC, Oregon).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS EXPERIMENTOS IN VIVO

# 4.1 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

# 4.1.1 Estudo piloto

A viabilidade de um sistema portátil de espectroscopia de fluorescência facilitou os estudos de produção superficial de PpIX em pele de porco *in vivo*. Além da vantagem de ser portátil, o sistema proporciona a possibilidade de escolha de excitação em dois comprimentos de onda diferentes, o 532 nm e 408 nm, ambos situados dentro das bandas de absorção da PpIX, já reconhecidas na literatura e apresentadas anteriormente na Figura 2. Nela, é visto que os picos de absorção da PpIX estão localizados na banda de Soret em 409 nm seguido das bandas Q, em 509, 544, 584, e 635 nm. (116)

Nos experimentos empregando espectroscopia foi utilizada a excitação em 532 nm, localizado na III banda Q do espectro de absorção da PpIX. O motivo da escolha deste comprimento de onda para excitação é porque este permite menor degradação da porfirina com o tempo de medida se comparado ao comprimento de onda de 409 nm, além de alcançar maior penetração na profundidade da pele.

A Figura 17 apresenta um exemplo de espectro de emissão da fluorescência da pele na ausência de PpIX (autofluorescência da pele) e na presença de PpIX (fluorescência) utilizando 532 nm para a excitação.

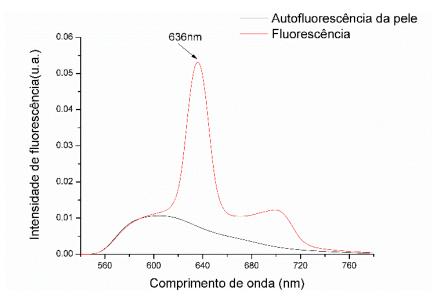


Figura 17 - Espectros da autofluorescência da pele, e da fluorescência da pele na presença de PpIX sob excitação em 532 nm após 3 horas de incubação de ALA tópico em pele de porco. Os espectros apresentados estão normalizados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 17 é evidente que a autofluorescência da pele apresenta uma emissão máxima em ~ 608 nm, e quando há o acúmulo de PpIX - após a administração do ALA- são visíveis as bandas com emissões máximas em 636 nm e 705nm. Estas bandas são reconhecidas na literatura como sendo respectivas à emissão da PpIX, e já haviam sido apresentadas anteriormente no texto (Figura 2).

O valor de intensidade de emissão da fluorescência da PpIX no comprimento de onda de 636 nm foi utilizado para comparação direta da produção de PpIX, como já visto na literatura. (117-119) Estudos publicados por Krieg et al. (120) e Iinuma et al. (121) mostram que a medida do sinal de emissão de fluorescência da PpIX pode ser utilizado como uma forma de calibração da quantidade da porfirina na célula.

A Figura 18 mostra a cinética de emissão da fluorescência da PpIX, onde a média do valor da intensidade em 636 nm foi verificada em diversos tempos (0-5horas) após a aplicação do creme.

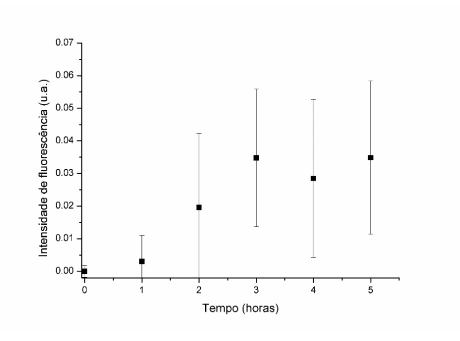


Figura 18 - Cinética de acúmulo de PpIX até 5 horas após a aplicação do creme. Fonte: Adaptada de RODRIGUES. (133)

De acordo com a Figura 18, não houve um significante acréscimo na emissão da produção da PpIX na pele entre os tempos de três e cinco horas da aplicação do ALA, indicando que uma saturação poderia ter sido atingida dentro deste período. Na literatura, a produção de PpIX aumenta com a administração da pró-droga até que alcance uma produção máxima, na qual se estabiliza, certamente esta estabilização está relacionada a capacidade enzimática máxima da célula em acumular PpIX. (122-124) De acordo com Peng et al. (125) o platô é

geralmente alcançado entre 4-14 horas após a aplicação do creme, variando conforme a concentração da droga, a quantidade aplicada por área e o tempo de aplicação.

Cinéticas como a da Figura 18 serão apresentadas ao longo deste capítulo para a avaliações de possíveis diferenças na produção de PpIX na pele quando o ALA é administrado após a aplicação de diferentes técnicas mecânicas, tais como: RMs, TS ou mediante ILA. Nestes casos, contudo, o tempo máximo de coleta de espectros não foi de cinco horas como o utilizado no estudo piloto, mas foi de aproximadamente três horas.

Uma das razões para as avaliações das cinéticas terem finalizado em tempos de até três horas é que durante a realização do experimento piloto foi observado que após cerca de cinco horas de anestesia o animal apresentou instabilidade, com alterações cardiovasculares importantes o suficiente para ocasionar interferência no experimento. Considerando que a preparação do animal despende um tempo considerável, foi decidido que os próximos experimentos seriam realizados em até três horas após a administração do creme.

Além disso, o tempo de três horas está dentro do protocolo clínico empregado em tratamentos clínicos por TFD com administração da pró-droga pela via tópica, uma vez que na prática clínica a iluminação tecidual ocorre entre 3-8 horas após a aplicação do creme permitindo a penetração do mesmo na lesão e síntese da PpIX. (125) Sendo assim, a fim de tornar o tratamento mais eficaz empregando o mesmo tempo ou até mesmo reduzindo o tempo de aplicação do creme, avaliar a produção de PpIX até o tempo de três horas seria suficiente para as análises de comparação entre das técnicas.

#### 4.1.2 Rolos de Microagulhas (RMs) e *Tape Stripping* (TS)

Definido o tempo de até três horas para as avaliações de produção de PpIX, deu-se início aos experimentos de comparação da produção superficial de PpIX através das cinéticas de fluorescência da PpIX. Nos experimentos apresentados neste capítulo, foi verificada a atuação das técnicas de RMs ou TS aplicadas anteriormente a administração do creme em promover uma maior produção de PpIX na superfície da pele quando comparadas ao controle que recebeu apenas creme. No caso dos RMs, diversas profundidades de agulhas foram utilizadas (0,5, 1,0 e 1,5 mm).

Após a devida normalização dos espectros e subtração da intensidade natural da fluorescência da pele, como já descrito na metodologia, as médias e desvios padrões das intensidades dos sinais obtidos no comprimento de onda de 636 nm foram diretamente relacionadas a produção superficial de PpIX.

A Figura 19 (*a-c*) mostra as cinéticas de produção superficial de PpIX de três repetições de cada variável (tratamento) cada qual em um animal. Esta figura, se refere aos resultados dos experimentos a, b e c, respectivamente, onde o método de realização foi descrito na seção 3.1.8, do capítulo de materiais e métodos.

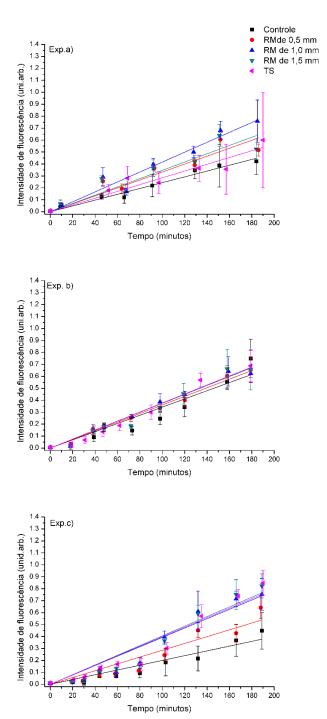


Figura 19 - Triplicatas (experimentos a, b, e c) das cinéticas de fluorescência superficial de PpIX em pele de porco *in vivo* para os grupos onde foram aplicadas as técnicas de rolos de microagulhas de diversas profundidades (0,5, 1,0 ou 1,5 mm) ou *tape stripping* anteriormente a aplicação do creme. O grupo controle não recebeu nenhuma das técnicas, mas apenas creme.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com Svaasand et al. (126), o acúmulo de PpIX pode ser representado pela função do tipo  $I(t) = C_0(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right))$ . Esta categoria de exponencial representa um aumento temporal na produção de PpIX estabilizando no tempo para uma produção máxima de amplitude  $C_0$ , que seria o platô de produção, e  $\tau$  é o tempo de relaxação da porfirina, e pode ser visto como o tempo necessário para que a produção de PpIX atinja 63% (1-1/e) do valor desta estabilização.

Neste estudo, foi assumido que os grupos apresentam mesmos valores de  $C_0$ . Além disso, uma vez que o período estudado compreende t $<<\tau$ , o regime passa a ser praticamente linear, e, pode ser representada por  $I(t) = C_0 \frac{t}{\tau}$ . Diante disto, as curvas de produção de PpIX apresentadas na Figura 19 foram ajustadas a partir de funções do tipo linear através do software Originlab®. Os valores dos coeficientes angulares  $\frac{C_0}{\tau}$  (taxa de acúmulo de PpIX) obtidos para cada curva são apresentados na Tabela 1. E estes mesmos valores de coeficientes normalizados pelo grupo controle (razões ou R) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 19 (*a*, *b*, e *c*) em unidades arbitrária (U.A.). Os menores valores de coeficientes encontrados nos experimentos a, b, e c, estão em vermelho na tabela.

Tratamentos	Experimento a)	Experimento b)	Experimento c)
	$\frac{C_0}{\tau}$ (10 <sup>-4</sup> )	$\frac{C_0}{\tau}$ (10 <sup>-4</sup> )	$\frac{c_0}{\tau}$ (10 <sup>-4</sup> )
	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
Controle	(24,3±0,8)	(34±3)	(20±1)
RM de 0,5 mm	(33±2)	$(36,0\pm0,8)$	(29±2)
RM de 1,0 mm	(42±2)	$(37\pm1)$	(39±3)
RM de 1,5 mm	(35±3)	(37±2)	(41±3)
Tape Stripping	(28±2)	(38±2)	(40±3)

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 19 (*a*, *b*, e *c*) quando normalizados pelo grupo controle (razões, R). Valores apresentados em unidade arbitrária – U.A.

Tratamentos	Experimento a)	Experimento b)	Experimento c)
	R	R	R
	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
Controle	$(1,00\pm0,05)$	$(1,0\pm0,1)$	$(1,0\pm0,1)$
RM de 0,5 mm	$(1,4\pm0,1)$	$(1,05\pm0,08)$	$(1,4\pm0,2)$
RM de 1,0 mm	$(1,7\pm0,1)$	$(1,09\pm0,09)$	$(2,0\pm0,2)$
RM de 1,5 mm	$(1,4\pm0,1)$	$(1,09\pm0,09)$	$(2,0\pm0,2)$
Tape Stripping	$(1,17\pm0,09)$	$(1,1\pm0,1)$	$(2,0\pm0,2)$

Fonte: Elaborada pela autora.

Para facilitar a análise, as médias dos valores das razões apresentados na Tabela 2 (R, ou seja, os coeficientes angulares normalizados) e obtidas nos experimentos *a*, *b* e *c* para cada variável tratamento, são apresentados na Figura 20.

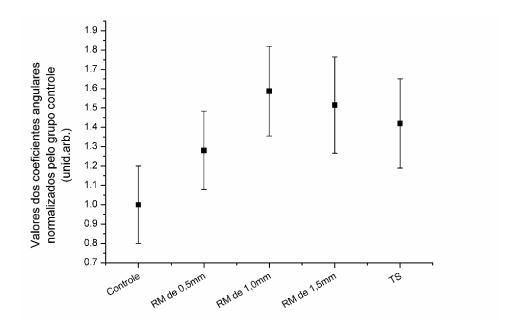


Figura 20 — Média dos valores dos coeficientes angulares (normalizados pelo grupo controle) obtidos nos experimentos *a, b* e *c.* \* RM Representa os tratamentos onde foi utilizada a aplicação prévia de rolos de microagulhas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os coeficientes de determinação dos ajustes (R<sup>2</sup>) dos dados apresentaram valores acima de 0,94, indicando que ao utilizar esta função acima de 94% dos dados se ajustam à curva.

Ao observar os ajustes lineares traçados para os experimentos a, b e c (Figura 19 a, b, e c), é evidente que durante o período monitorado não foram observados os platôs, o que indica que o período de três horas de cinética não é suficiente para determinar o tempo para máximo de acúmulo da protoporfirina IX sob estas condições. Sendo assim, é possível que a produção de PpIX prossiga em tempos posteriores a três horas de incubação do creme independente do tratamento utilizado. Assim, os resultados sugerem que nenhum dos tratamentos estão promovendo uma entrega rápida o suficiente do creme para que a produção máxima de PpIX que a célula pode atingir (C<sub>0</sub>) ocorra em um intervalo de tempo de até três horas.

Estudos indicam que a produção de PpIX diferencia de acordo com a concentração e até mesmo com a quantidade de droga aplicada. (43,123,128-129) Partindo da hipótese de que diferenças nas taxas de perfusão do creme influenciam na disponibilidade da droga no tecido e,

consequentemente, na quantidade de PpIX formada, possíveis diferenças no acúmulo e na taxa de acúmulo de PpIX entre os tratamentos seriam passíveis de serem observadas através dos coeficientes angulares das funções obtidas.

Os tratamentos que apresentaram as menores taxas de acúmulo de PpIX são apresentados em vermelho, pelos coeficientes angulares da Tabela 1. O grupo que apresentou menor taxa de produção de PpIX no experimento a foi o grupo controle e o que recebeu Tape Stripping, enquanto para o experimento b todos obtiveram valores muito similares entre sí, e, para o experimento c, o grupo controle e que recebeu RM de 0,5 mm foram os que apresentaram menores taxas de acúmulo.

Em termos comparativos, ao observar estes valores normalizados, na Tabela 2, observase que para os experimentos *a* e *c* todos os grupos acumulam PpIX numa taxa maior que o grupo controle. Também, através da Figura 20, quando se faz uma média das taxas de acúmulo apresentadas nos três animais, há indícios de que furos entre 0,75 mm e 1,5 mm possam acumular PpIX numa taxa maior que a taxa avaliada para o grupo TS, enquanto a taxa de produção de PpIX para furos de profundidade de 0,5 mm se equiparam com as taxas de produção obtida pelo grupo TS.

Uma das possíveis razões é que as técnicas mais superficiais, TS, RM de 0,5 mm, assim como o controle, exigem um maior tempo para difusão do creme na pele. Desta maneira, a penetração do creme ocorre de forma mais lenta, o que provavelmente acarretaria em um menor valor de média de intensidade de fluorescência, e de valores coeficientes angulares. Nesta linha de raciocínio, furos de profundidade abaixo de 0,5 mm produziriam mais superficialmente, e similar ao grupo TS, enquanto os comprimentos de 0,75-1,5 mm de profundidade de agulha apresentariam maiores acúmulos, e os microfuros acima de 1,5 mm, poderiam estar entregando mais droga na profundidade em detrimento das camadas mais superficiais. Nesta alusão, é possível que furos muito profundos apresentem baixos valores de taxas de acúmulo, ou até mesmo, equiparados ao controle.

Antes de afirmar estas hipóteses, contudo, outros fatores que podem influenciar nas comparações de respostas de permeação tópica devem ser mencionados, e devem ser levados em consideração durante as análises, dentre eles: as variações climáticas do ambiente (umidade e temperatura), o estado de hidratação da pele de cada animal, a variabilidade de resposta entre os animais, o ato de depilação animal, ou, até mesmo, erros sistemáticos durante a realização dos experimentos. (130-131)

Não se deve descartar o efeito destes fatores, porém, alguns indícios podem ser tomados a partir da observação de tendências similares durante as repetições dos experimentos. Neste

sentido, o grupo controle apresentou as menores médias de intensidades de emissão de fluorescência da PpIX em dois de três experimentos (*a*, *b* e *c*) como se observa na Figura 19. Os grupos que apresentaram uma segunda menor produção de PpIX foram o TS no experimento a, e o RM de 0,5 mm no experimento c, e os demais apresentaram valores muito similares dentro da margem de erro.

Outro indício foi tomado a partir da grande dispersão dos dados de fluorescência coletados, como observado pelos altos valores de desvios padrões na Figura 19, sugerindo uma grande heterogeneidade na formação da PpIX no tecido. Esta heterogeneidade de distribuição da fluorescência no grupo controle quando confrontadas aos demais grupos foram verificadas através de imagens de fluorescência de campo amplo cujos exemplos podem ser observados na Figura 21.

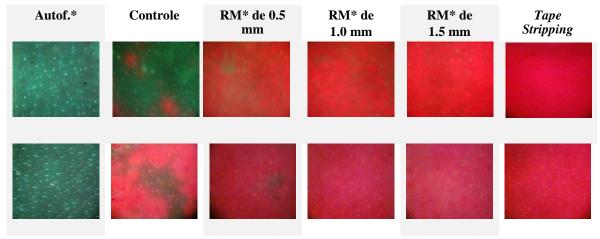


Figura 21 - Exemplos de Imagens de fluorescência de campo amplo da fluorescência natural da pele, ou autofluorescência (em verde) e da fluorescência na presença de PpIX (regiões em vermelho). \* RM Representa os tratamentos onde foi utilizada a aplicação prévia de rolos de microagulhas, e Autof. é a autofluorescência da pele.

Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens apresentadas na Figura 21 mostram que para o grupo controle a produção de PpIX se deu apenas em pontos específicos da região de aplicação do creme (fluorescência vermelha em forma circular ao redor de canais de permeação). Esta heterogeneidade de produção também foi detectada durante o uso de outra pró-droga mais lipofílica (Metil-ALA), e foi recentemente publicada em artigo científico, o que demonstra que ainda que a pró-droga apresente caráter mais lipofílico a heterogeneidade de penetração do creme não é totalmente vencida. (132)

Contudo, nos grupos onde RMs e TS foram adicionados, a distribuição foi mais homogênea sobre a área. Nos grupos onde RMs foram aplicados, pode-se observar regiões

circulares de formação da porfirina, muito provavelmente onde houve a realização dos microfuros, o que confirma o potencial da técnica em promover canais de permeação da droga. A quantificação desta heterogeneidade de produção será mostrada na sessão 4.2, e reafirmam resultados previamente publicados. (133)

A heterogeneidade na produção influencia diretamente sobre os resultados das médias de emissão de fluorescências apresentados dado que os espectros podem ser coletados em regiões com níveis de PpIX bastante diferentes. Esta é outra possível explicação para as variações nos coeficientes angulares obtidos para cada experimento e dos altos valores de desvios padrões (observados na Figura 19a, Figura 19b, e Figura 19c).

A partir deste resultado, optou-se por realizar mais um experimento de cinética (experimento d), porém utilizando a visualização da fluorescência de campo amplo (Evince®, MMOptics, São Carlos, Brasil) para guiar a coleta do espectro de emissão com a fibra óptica, evitando-se assim, coletar espectros em regiões onde não havia significante emissão da PpIX.

Os resultados dessa coleta de espectros guiada estão apresentados na Figura 22, e os coeficientes angulares, relativas ao experimento d (Figura 22) são apresentados na Tabela 3.

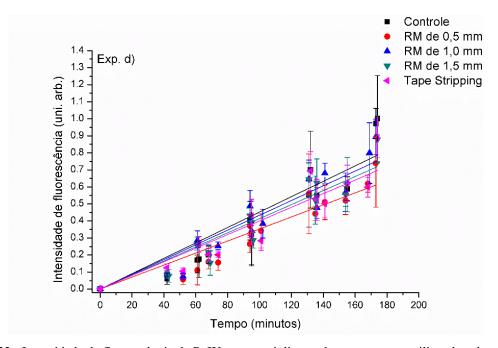


Figura 22 - Intensidade de fluorescência da PpIX para as triplicatas dos tratamentos utilizando rolos de microagulhas de diversas profundidades, tape stripping e controle. Os espectros do grupo controle foram coletados utilizando um evidenciador de fluorescência (Evince ®) como guia.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 22 (experimento d), quando normalizados (R) ou não pelo grupo controle. Valores apresentados em unidade arbitrária – U.A.

Tratamentos	Experimento d)	Experimento d)
	$\frac{c_0}{\tau} (10^{-4})$ (U.A.)	<i>R</i> (U.A.)
Controle	(45±3)	(1,00±0,09)
RM de 0,5 mm	(35±2)	$(0.78\pm0.07)$
RM de 1,0 mm	(43±2)	$(0.96\pm0.08)$
RM de 1,5 mm	(41±2)	$(0.91\pm0.08)$
Tape Stripping	(40±2)	$(0.89\pm0.07)$

Fonte: Elaborada pela autora.

Neste experimento todos os grupos, apresentaram uma tendência similar de médias de intensidade de fluorescência de PpIX, como observado através da Figura 22. As intensidades mostradas na Figura 22, apontam que as diferenças de produção de PpIX entre o grupo controle e os demais grupos foram sanadas através do método de coleta diferenciado. Isto confirma o papel da heterogeneidade de produção da PpIX sob as comparações de intensidades de produção de PpIX no tempo, além de destacar a importância da associação de outras técnicas mecânicas na aplicação do creme para uma distribuição homogênea sobre a área de lesão durante a realização da TFD.

Embora haja melhorias na homogeneidade de formação de PpIX, os grupos RM de 0,5 mm e TS foram os grupos que apresentaram menores valores de taxas de produção de PpIX no tempo (Tabela 3). Esta tendência de que estes grupos apresentem menores intensidades médias e coeficientes angulares pôde ser vista não apenas neste experimento, onde as triplicatas foram realizadas em um mesmo animal, como também nos experimentos onde as triplicatas foram realizadas em animais diferentes (experimentos a, e c).

Embora seja susceptível se relacionar a grande variabilidade de produção de PpIX para o grupo TS à uma diferença na espessura do estrato córneo, na literatura, há conflitos de correlação entre a espessura do estrato córneo e a respostas de permeação percutânea (134-137) muito embora artigos científicos confirmem o papel da técnica em promover a permeação de medicamentos. (138-141)

De acordo com Levin et al. (137), as respostas com *tape stripping* podem variar não apenas com o número de vezes em que a fita adesiva foi aplicada, como também com o número de camadas de células do estrato córneo e da coesão entre estas camadas na região de aplicação,

além de outros fatores relacionados a fita adesiva, tais como o tempo de aplicação da fita adesiva, a velocidade de remoção da fita, e as propriedades desta. Neste estudo, a aplicação da técnica foi realizada por um único aplicador, com um único modelo de fita adesiva, foi fixo o número de 23 vezes para aplicação e remoção da fita, e o número de quatro vezes para pressionar a fita e ocasionar a aderência à pele, na direção craniocaudal, anteriormente a remoção. Embora a pressão manual exercida pelo aplicador e a velocidade de retirada da fita adesiva assim como o grau de hidratação da pele no momento da aplicação da fita pode alterar a aderência fita na pele de forma que nem toda a camada pode ter sido removida, e consequentemente resultar em uma maior variabilidade de resposta, como visto no experimento a, acredita-se que o grau de coesão do estrato córneo seja um dos principais responsáveis na variabilidade de resposta para este tratamento.

Concernente aos RMs de 0,5 mm, além de possíveis erros sistemáticos, conforme já reportado na literatura, a elasticidade da pele pode fazer com que haja uma deformação da pele em torno da agulha tornando o procedimento de perfuração ineficiente, sendo ainda menos efetiva para agulhas mais curtas (menores que 300  $\mu$ m, em pele humana). (142-144) Sendo assim, a dificuldade em vencer a elasticidade da pele pode ter sido uma das razões pela qual o RM de 0,5 mm obteve resultados similares aos RMs de 1,0 e 1,5 mm nos experimentos a e b, porém discrepantes nos experimentos c e d.

Além destas hipóteses, é preciso considerar que há diferenças na profundidade da epiderme e derme no próprio animal, e que isto pode influenciar não apenas na difusão do medicamento, mas também no sinal de fluorescência detectada.

Recentemente um estudo mostrou que não apenas o estrato córneo seria uma barreira na permeação tópica em profundidade da pele, mas também a própria epiderme. (138) Os autores mostraram que o sistema ideal para permeação em profundidade seria o que além de romper a barreira do estrato córneo também ultrapassasse a camada da epiderme. Esta explicação não entra em acordo com os resultados aqui obtidos ao considerar que a epiderme do porco atinge cerca de 50 µm na região dorsal, desta forma todos os RMs ultrapassariam a profundidade da epiderme e apenas o TS deveria apresentar menor formação de PpIX.

No geral, todos estes resultados *in vivo* aqui apresentados confirmam que a integridade do estrato córneo dificulta a permeação do creme e, como consequência, da produção de PpIX. Com vistas à melhoria da entrega tópica de ALA, os resultados indicam que quaisquer das técnicas poderiam ser utilizadas resultando em melhorias na produção de PpIX na superfície da pele quando comparado à ausência de técnica mecânica associada. Entretanto, há vantagens sobre as técnicas de RMs de profundidades de 1,0 e 1,5 mm e *tape stripping* por não atingirem

profundidade suficiente para ocasionar sensação dolorosa e por terem obtido, na maioria das repetições dos experimentos, maiores valores de taxas de acúmulo de PpIX quando comparados ao controle e ao RM de 0,5 mm.

De acordo com as discussões e induções aqui propostas, deve-se levar em consideração que o manuseio dos RMs, a escolha da profundidade da agulha com relação ao local de aplicação (regiões onde o estrato é espesso agulhas mais profundas são indicadas), ou do número de repetições na retirada da fita adesiva e a coesão do estrato córneo de acordo com a região aplicada a técnica de TS (mesma finalidade do *debulking* ou curetagem) terão efeitos sobre a produção de PpIX.

Entretanto, em se tratando de melhoria da entrega tópica para TFD, outros resultados de profundidade de penetração alcançada pelo creme devem ser realizados para avaliar uma possível similaridade de produção em profundidade, uma vez que espectros de fluorescência em pele no comprimento de onda de excitação de 532nm alcançam apenas as camadas mais superficiais da pele (epiderme e derme mais superficial). Para isso, novas análises de profundidade de alcance do creme, através de registros de imagens de fluorescência da PpIX, serão posteriormente apresentadas por meio de biopsias de pele.

## 4.1.3 Furos individuais na produção de PpIX.

Através das análises apresentadas na seção anterior, foi visto que há formação similar entre os rolos de microagulhas, porém, em alguns casos o RM de 0,5 mm apresentou menores valores de taxa de produção de PpIX, supostamente por não romper a elasticidade da pele e ocasionar a perfuração em toda a extensão da pele. Neste capítulo foram comparadas a produção de PpIX ao redor de microperfurações de 0,5, 1,0, e 1,5 mm de profundidade, porém as agulhas do rolo foram extraídas de forma que se fosse possível aferir a fluorescência ao redor de um único furo, que, a partir de então, serão chamados de furos individuais (FIs). As imagens do dispositivo foram previamente apresentadas na Figura 7.

Para medição das intensidades de fluorescência emitidas em 636 nm ao redor destes FIs, os pontos de fluorescência foram visualizados com o auxílio do sistema de visualização de fluorescência de campo amplo, Evince®, e a fibra óptica foi guiada ao ponto de emissão.

Nas comparações, foram calculadas as médias das intensidades de fluorescência da PpIX ao redor de três diferentes furos de cada tratamento - FI de 0,5 mm; 1,0 mm e 1,5 mm- e plotadas como função do período de incubação do creme. Os resultados das cinéticas são apresentados na Figura 23.

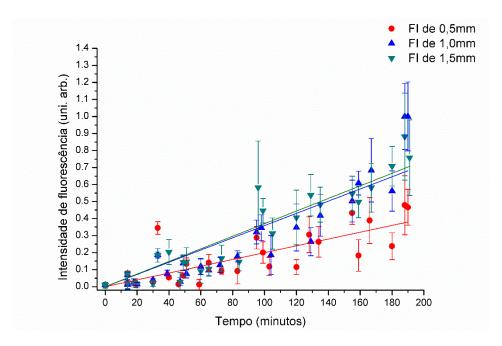


Figura 23 - Produção de PpIX ao redor de furos individuais (FI) de 0.5, 1.0 e 1.5 mm. Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como foi realizado nos experimentos apresentados na seção anterior, nesta seção as curvas de produção de PpIX apresentadas na Figura 23 foram ajustadas a partir de funções do tipo linear, através do software Originlab®. Os valores dos coeficientes angulares (taxas de acúmulo de PpIX) obtidos para cada curva estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos apresentados na Figura 23, quando normalizados (R) ou não pelo grupo controle. O menor valor obtido está destacado em vermelho, e todos os valores estão em unidade arbitrária – U.A.

Tratamentos	Experimento d)	Experimento d)
	$\frac{c_0}{\tau}$ (10 <sup>-4</sup> )	R
	(U.A.)	(U.A.)
FI de 0,5 mm	(20±2)	$(1,0\pm0,1)$
FI de 1,0 mm	(36±2)	$(1,8\pm0,2)$
FI de 1,5 mm	(37±2)	$(1,9\pm0,2)$

Fonte: Elaborada pela autora.

As intensidades (Figura 23), e os coeficientes angulares (Tabela 4), das cinéticas dos espectros obtidos para os FIs em 635 nm, apontam que o F.I. de 1,5 mm e o F.I. de 1,0 mm obtiveram intensidades de cerca de 2 vezes o valor da intensidade dos FIs de 0.5 mm, e similares entre sí.

Nos experimentos que utilizaram RMs, foi visto que em algumas das repetições havia tendência de que o RM de 0,5 mm apresentasse menor produção de PpIX, esta tendência se tornou mais clara quando se utilizou FIs. Além de observar uma menor produção para o FI de 0,5 mm quando comparado aos de maiores comprimentos, neste estudo, a média de intensidade dos RMs de 0,5 mm foi cerca de 1,6 vezes a média de intensidade dos FIs de 0,5 mm. Esta diferença é visível ao se comparar as médias apresentadas no gráfico da Figura 23 com os gráficos da Figura 19 e da Figura 22. Por outro lado, as intensidades dos FIs de 1,0 e 1,5 mm não alteram consideravelmente quando se utiliza maior densidade de agulhas.

Uma hipótese a ser considerada, foi proposta por Martanto et al. (145) e Gomma et al. (146) de que durante a perfuração de rolos de agulhas os de maiores comprimentos causam uma compactação da pele nas primeiras horas liberando o líquido intersticial, ocasionando diminuição do fluxo da droga quando sob maior densidade de agulhas. Isto apoiaria a idéia de que para furos mais profundos, quando em maior densidade de agulhas, ao invés de aumentar a penetração do medicamento, causam um impedimento, e, certamente, após a descompressão da pele o fluxo possa voltar a aumentar. Yan et al. (144) mostrou que agulhas mais profundas (1.1 mm comparado a 0.6 mm) tiveram maior penetração do medicamento, porém, concorda com os autores citados acima de que densidades de agulhas menores (2000 agulhas/cm²) foram melhores no transporte de aciclovir em pele de cadáver humanos.

Diante destas análises e dos resultados apresentados, vê-se que as densidades de agulhas afetam na produção de PpIX, e além disso, com obviedade, na homogeneidade de acúmulo na área do tecido.

#### 4.1.4 Injeção livre de agulhas e Tape Stripping

Este estudo foi realizado a fim de compreender a relação da taxa de produção de PpIX quando se utiliza ALA (20±3%) injetado (0,15ml de uma solução estoque de 1ml preparada no momento da aplicação) através de injeção livre agulha (sob pressão, aqui chamado de ILA) após dissolvido em soro fisiológico (0.9%) com a taxa produção a partir da via tópica.

A fim de elucidar estes pontos, as concentrações de ALA utilizadas para a injeção foram de 0 e 20%, onde 0% significa uma injeção de apenas soro. A técnica de TS, anteriormente comparada com os RMs, foi adicionada ao experimento, com o intuito de avaliar a produção mediante ALA injetado e do ALA creme. Para o grupo TS, foi utilizado ALA tópico na concentração de 20%.

A Figura 24 mostra o resultado das cinéticas de fluorescência da PpIX. O grupo onde apenas soro fora injetado (0% ALA-ILA) se manteve próximo de zero para todo o período de incubação do ALA, indicando não haver interferência na emissão da fluorescência da pele. Além disso, não foi observada diferença de produção de PpIX significativa entre os grupos, mas os dois apresentaram similar taxa de produção no tempo como pode ser observado na Tabela 5.

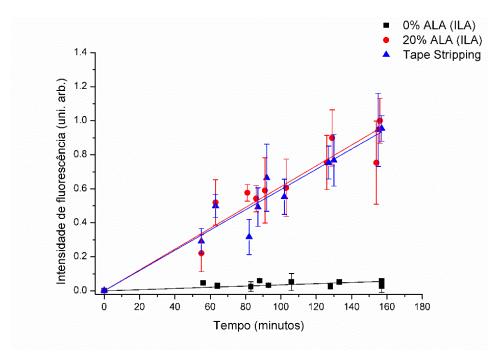


Figura 24 - Produção de PpIX para concentrações de até 20% de ALA em soro, injetados sob injeção livre de agulhas e para ALA 20% na via tópica utilizando a aplicação prévia de *tape stripping*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 – Coeficientes angulares obtidos através das curvas traçadas nos gráficos da Figura 24, quando normalizados (R) ou não pelo grupo controle. Valores apresentados em unidade arbitrária – U.A.

Tratamentos	Experimento d)	Experimento d)
	$\frac{C_0}{\tau}$ (10 <sup>-4</sup> )	<i>R</i> (U.A.)
ILA - 0% ALA	(U.A.) (3,5±0,5)	$(0.A.)$ $(1,0\pm0,2)$
ILA - 20% ALA ILA - 20% ALA	(5,5±0,5) (61±3)	$(1,0\pm0,2)$ (17±3)
Tape Stripping	(60±2)	(17±2)

Fonte: Elaborada pela autora.

Surpreendentemente, não foi detectada diferença na taxa de produção de PpIX entre os dois métodos. Uma vez que a injeção proporciona uma entrega muito mais rápida da droga na

pele suprimindo o tempo de difusão necessário pelo creme, esperava-se observar uma tendência de produção diferente entre os grupos, ou até mesmo o ponto de saturação de produção da PpIX em tempos de incubação menores que três horas do momento da injeção nos casos onde o ALA é administrado por ILA.

A única possível diferença observada foi uma queda na intensidade de fluorescência da PpIX para duas de três regiões que receberam ILA no tempo de 170 minutos. No entanto, as barras de erro não nos permitem afirmar que este seja o tempo onde o platô seria alcançado. Uma cinética para tempos posteriores a 180 minutos possivelmente exibiria uma queda na produção de PpIX, o que deve ser confirmado mediante outros estudos.

Ainda assim, devemos levar em consideração a limitação do sistema de espectroscopia utilizado para medidas em profundidade. Com respeito a esta limitação, o laser no comprimento de onda de 532 nm pode alcançar cerca de 2 mm dependendo do tecido, ou seja, até a camada mais superficial da derme. (18) Sendo assim, as informações obtidas nos mostram que nas camadas superficiais da pele a formação está ocorrendo similarmente entre os dois grupos e, muito provavelmente o creme alcança toda a extensão da epiderme no grupo que associa TS.

Embora posteriormente seja apresentada a distribuição da PpIX induzida por ALA injetável na profundidade na pele, este dado indica que o TS serve como um meio potencial na entrega de tópicos nas camadas da epiderme, além de ser menos invasivo que a técnica de ALA injetável.

Apesar das cinéticas nos indicarem produção muito similar entre as duas técnicas, nos experimentos apresentados anteriormente há indícios de que a penetração do creme é dependente do procedimento de realização da técnica, das propriedades da região (profundidade, hidratação, temperatura, pH, dentre outras) ou, até mesmo, se o número de 23 vezes de aplicação da fita adesiva foi suficiente para desencadear as alterações no estrato córneo em todas as regiões. Em contrapartida, ao utilizar o mecanismo de ILA, esta limitação seria vencida já que a administração é independente destes fatores, além de sugerir um poder de alcance em profundidade maior. Por outro lado, a distribuição do líquido na pele pode influenciar nos resultados de PpIX, uma vez que, se o líquido for ejetado em maior profundidade, haveria menor quantidade de ALA disponível na superfície e provavelmente menor produção de PpIX.

Além das análises de fluorescência apresentadas, foram coletados espectros no ponto de injeção do líquido na pele. Tais espectros são apresentados na Figura 25 normalizados pela área total sob o espectro. Nesta figura é apresentada uma média da autofluorescência natural da pele

e da fluorescência no ponto de aplicação da injeção de ALA-20% logo após a administração da injeção (0h), e 3 horas após a aplicação desta.

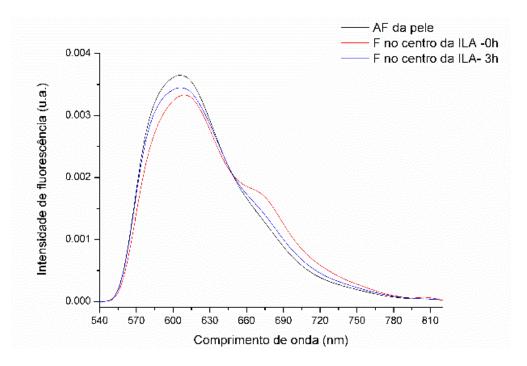


Figura 25 - Espectros de emissão de fluorescência: anteriormente a aplicação da injeção (*AF da pele*), no ponto de aplicação da injeção imediatamente após a realização desta (*F no centro da ILA-0h*), e no ponto de aplicação da injeção 3 horas após a aplicação (*F no centro da ILA-3h*).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nenhuma banda de emissão relativa a formação de PpIX foi observado próximo ao comprimento de onda de 636 nm confirmando não haver acúmulo de PpIX na região de aplicação. Contudo, observa-se o aparecimento de uma banda de emissão próxima de 680 nm que certamente se relaciona a alterações na fluorescência da pele devido ao dano ocasionado pela injeção, uma vez que não há, ou há pouca produção de fotossensibilizadores no momento da aplicação para que seja comparado à emissão de fluorescência de fotoprodutos destes.

A Figura 26 mostra um exemplar de uma imagem de fluorescência de PpIX, a partir de uma aplicação com a ILA e concorda com o resultado obtido pelos espectros no centro da aplicação, uma vez que não há detecção de fluorescência da PpIX no ponto da aplicação.

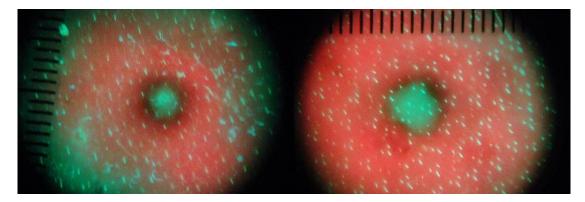


Figura 26 - Exemplos de imagem superficial de campo amplo após 2 horas da aplicação de injeção livre de agulhas de ALA em soro fisiológico.

Fonte: Elaborada pela autora.

O fato de não haver produção de PpIX no ponto de injeção indica que a pressão da injeção possivelmente alterou o material tecidual durante a perfuração. Este é um indicativo de que este método não seja o mais viável para o tratamento de lesões mais superficiais de pele, sendo, nestes casos, mais indicado o método TS, ou outros métodos menos invasivos, uma vez que possuem produção de PpIX similares na camada da epiderme e, com distribuição homogênea. Contudo, novos estudos devem ser realizados confirmando estes indicativos, e, tal afirmativa deve levar em consideração as análises de profundidade de permeação que serão discutidas posteriormente.

# 4.2 IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA NA AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO SUPERFICIAL E EM PROFUNDIDADE DA PPIX

#### 4.2.1 Produção superficial de PpIX

A homogeneidade de produção de PpIX na superfície da pele do animal foi realizada através da avaliação de imagens de fluorescência de campo amplo. Exemplos de imagens da fluorescência vermelha emitida pela PpIX foram previamente mostradas na Figura 21 e na Figura 26.

Em concordância com as discussões realizadas durante a apresentação dos resultados dos espectros, por uma análise visual das imagens é visto que há uma distribuição mais homogênea de pixels vermelhos relativos à formação de PpIX na superfície da pele quando há a prévia aplicação de RMs ou TS.

Outra percepção tomada pela observação visual das imagens é que, no grupo tratado com rolo de 0.5 mm, embora mais homogêneo que o grupo controle, há regiões "falhas", ou seja, regiões onde não há formação de PpIX. Exemplos podem ser observados nas imagens

apresentadas na Figura 21. Isto confirma a hipótese previamente apresentada de que a elasticidade da pele tem influência na eficiência da perfuração para agulhas deste comprimento, e consequentemente, na heterogeneidade de distribuição do medicamento para este tratamento.

As imagens também mostram que a porfirina se concentra em certas áreas circulares para os grupos tratados com RMs e para o grupo controle, o que comprova que os microcanais realizados por agulhas servem como poros adicionais para penetração da droga. Entretanto, o grupo TS parece formar porfirina mais homogeneamente pela área.

Com o intuito de quantificar esta heterogeneidade da PpIX produzida sobre a área da superfície de aplicação do creme, foi realizada uma média e desvio padrão dos valores de intensidade no canal vermelho (0-255). A partir destes números, foi calculado o coeficiente de variação (CV, razão do desvio padrão pela média de intensidades) que quantifica a variabilidade das intensidades na área.

As médias de intensidades com seus respectivos desvios e os coeficientes de variação no canal vermelho para a autofluorescência da pele, e para os tratamentos utilizando RMs, TS, injeção de ALA (20%) através do uso de ILA e para o grupo controle foram realizadas em triplicata (a, b e c – três diferentes animais). As imagens foram coletadas após três horas da aplicação do creme, e os resultados da quantificação são apresentados na Figura 27.

Como as imagens utilizadas para quantificação da heterogeneidade para os grupos controle, RMs e TS, foram tomadas nos mesmos animais cujos resultados das cinéticas espectrais foram apresentados na Figura 19 *a, b* e *c,* estes resultados são passíveis de comparação. Já os resultados dos espectros e imagens associando ILA foram realizados em animais diferentes.

As médias de intensidades do canal vermelho das imagens apresentaram resultados muito similares aos resultados dos espectros apresentados na Figura 19. Na Figura 19 a, foi mostrado uma menor intensidade espectral para os grupos TS e controle. Semelhantemente, na Figura 27a as imagens de fluorescência mostram menores intensidades médias no canal vermelho para estes grupos.

Da mesma forma, na Figura 19b os espectros mostraram intensidades espectrais de emissão de fluorescência muitos similares entre os grupos dentro da margem do desvio padrão, porém em alguns tempos de coleta espectral houve menor intensidade média de emissão de fluorescência para o grupo controle, e na Figura 19c foram apresentadas menores intensidades para o grupo controle e para o grupo que recebeu RM de 0,5 mm. Tais respostas foram similares aos obtidos por meio das médias de emissão de fluorescência das imagens como observado na Figura 27.

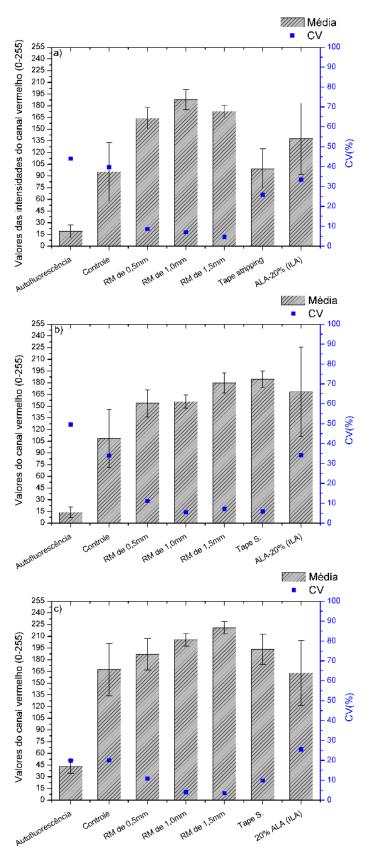


Figura 27 - Médias (barras) e coeficientes de variação (pontos azuis) dos níveis de cinza (valores de 0-255) no canal vermelho das imagens superficiais de fluorescência de campo amplo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros nos fornecem informações de formação de PpIX relativas aos pontos onde foram coletados na área, por isso as análises de heterogeneidade de distribuição da formação por meio dos desvios padrões seriam grandemente influenciadas pelos pontos de coleta. Já as imagens nos fornecem informações de um campo amplo da superfície, assim, além de obter a intensidade de emissão no ponto de interesse, o que está relacionada a quantidade de porfirina ali formada, é possível obter também a localização rápida e precisa dos pontos de máxima emissão pela análise visual.

Assim, além da informação comparativa do quanto de PpIX está formando entre os grupos, as imagens também podem fornecer informações da variabilidade de distribuição na área superficial. Tal variabilidade, apresentada através dos coeficientes de variação (CV), é revelada pelos pontos azuis na Figura 27 (*a*, *b* e *c*).

Os valores dos CVs indicam a porcentagem do desvio padrão em relação à média de intensidades. Desta maneira, oferecem informações quantitativas da heterogeneidade de formação de PpIX na área. Observa-se, na Figura 27, que, para estes experimentos, o grupo controle foi o que obteve os maiores valores de CVs com variação aproximada de 30-40% em torno da média. Na sequência, o grupo que recebeu ILA obteve variação aproximada de 25-35%, o TS, no experimento *a*, com variação de aproximadamente 25%, e o grupo que recebera RM de 0,5 mm com variação de aproximadamente 10-15%. Estes números representam a flutuação das médias na área e confirmam a heterogeneidade de acúmulo na área.

Com respeito a heterogeneidade de produção para o grupo onde a aplicação de ALA se deu através do uso de ILA, acredita-se que a razão da heterogeneidade seja devido à ausência de produção de porfirina na região de aplicação, como apresentado na Figura 26, e, também, às possíveis diferenças de distribuição do líquido na pele. Para dar base a esta pressuposição, a Figura 28 mostra o perfil de intensidades na linha passando pelo ponto de realização da ILA.

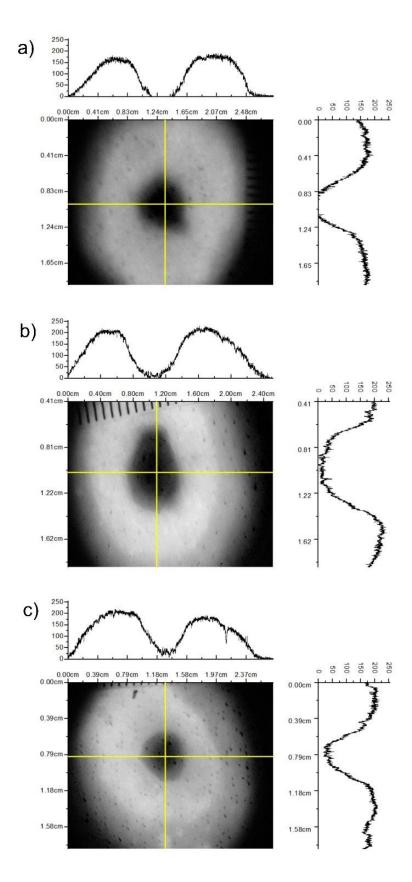


Figura 28 - Perfis de intensidades no canal vermelho passando pelo ponto central da realização da ILA. Fonte: Elaborada pela autora

Nesta figura, é visto que o perfil de intensidades é baixo no ponto de aplicação da injeção aumentando para as extremidades. Na figura respectiva ao experimento c, é visto também que em uma das laterais ao ponto de injeção (lateral esquerda à figura) houve maior emissão de fluorescência indicando que o líquido se distribui mais para uma das laterais do ponto de injeção no momento da aplicação. Ainda que a aplicação tenha sido realizada em ângulo de 90º à superfície, é natural que os desníveis da pele ocasionem diferenças no modo de aplicação.

Além destas informações, pelas escalas da régua, foi constatado que a área onde não houve emissão de florescência foi de cerca de 3 mm de raio (a partir do ponto da injeção), iniciando-se o acúmulo a partir de então por uma extensão de 4 mm de raio. Ainda que estes números possivelmente variem de acordo com a injeção utilizada e o quão perpendicular a injeção estava no momento da administração, eles proporcionam indícios dos cuidados que devem ser tomados no momento de aplicação. De acordo com estes números, para este protocolo, é possível que a melhor maneira de se administrar a solução seja pelas laterais da lesão, com uma distância mínima de 3 mm.

Os altos valores de coeficientes de variação para o grupo controle podem ser melhores entendidos ao observar a Figura 29. Nela, é apresentado o canal vermelho de uma imagem de emissão de fluorescência da superfície da pele para o grupo controle. Nesta imagem foram traçadas duas linhas, uma horizontal e uma vertical, nas quais os perfis de intensidades correspondentes à cada uma delas são apresentados na imagem.

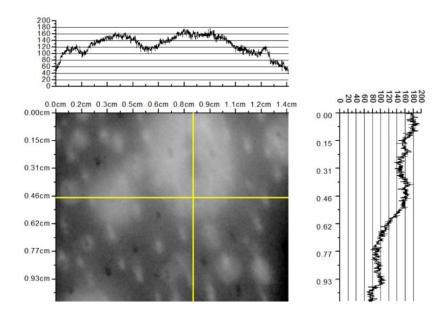


Figura 29 - Exemplar de perfis de intensidades no canal vermelho de uma imagem de fluorescência da superfície da pele para o grupo controle. Tal imagem foi registrada após três horas da aplicação do creme (ALA 20%) durante a realização do experimento b.

Fonte: Elaborada pela autora.

<sup>\*</sup>O perfil de intensidade da linha horizontal é apresentado na parte superior da imagem.

Nesta figura, o perfil de intensidades da linha de corte horizontal apresenta regiões com intensidades de fluorescência de cerca de 160 (de um máximo de 255), e, o perfil de intensidade da imagem passando pela linha vertical à imagem apresenta intensidades máximas de 180 e mínimas de 80. Estas variações nos valores de intensidades confirmam a heterogeneidade de formação de PpIX na área para o grupo controle.

Esta observação também foi levantada mediante as análises dos dados espectrais. Ambas as técnicas pressupõem que a principal diferença entre produção de PpIX relativas ao grupo controle e os demais grupos associando técnicas mecânicas em pele sadia se deve especialmente à heterogeneidade de produção na área e/ou à capacidade da técnica utilizada em vencer a barreira de penetração do estrato córneo e da elasticidade da pele.

Além de confirmar a heterogeneidade de formação de PpIX na área, a Figura 29 mostra que os locais de máxima estão localizados em regiões que certamente se referem aos locais de crescimento dos pelos, enquanto os demais grupos apresentaram emissões de fluorescência sobre toda a área. Isso indica que as técnicas aqui apresentadas têm habilidade de criar canais de permeação da droga e promover uma melhoria na formação mais homogênea da PpIX no tecido a ser tratado.

Embora todos os grupos tenham obtido melhoria na homogeneidade de formação da PpIX quando comparado ao controle, tanto os espectros quanto as imagens mostraram que os RMs com profundidades de 1,0 e 1,5 mm conseguiram manter maior homogeneidade na produção de PpIX se comparado aos demais tratamentos. Também estes grupos e o grupo que recebeu ILA obtiveram alta reprodutibilidade nos resultados de produção de PpIX, obtendo os maiores valores de taxas de acúmulo independentemente do animal.

#### 4.2.2 PpIX na profundidade da pele

Com o intuito de comparar a profundidades de penetração do creme dentre os grupos controle, os que receberam RMs de 0,5 mm, 1,0 mm, 1,5 mm e o grupo que recebeu TS, foram extraídas biópsias por *punch* de cada uma das áreas dos diferentes tratamentos.

Em um estudo inicial foram realizadas biópsias da autofluorescência da pele, e nos tempos de 1hora, 2horas, e três horas após a aplicação do creme. Nas demais repetições deste experimento (n=3), foram extraídas biópsias da autofluorescência e no tempo e três horas após a aplicação do creme.

A imagem de uma amostra extraída por *punch* é apresentada na Figura 30. Nela, observa-se em vermelho a emissão da fluorescência da PpIX. Imagens como esta foram

submetidas a uma rotina através do software Matlab® e o mapa de intensidades (no canal vermelho) foi gerado para cada uma delas.



Figura 30 - Imagem de fluorescência de campo amplo de biópsia de pele por meio de *punch* após 3 horas da aplicação do creme. A superfície da pele está na direção vertical a esquerda, e a profundidade da pele cresce na direção horizontal no sentido esquerda-direita da imagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 31 mostra um exemplar de um mapa de intensidades de fluorescência da PpIX de uma amostra com a superfície da pele paralela ao eixo vertical. Nela, as intensidades da componente vermelho da imagem (RGB) variam de 0 à 255 em degradê de cor, onde o tom vermelho escuro correspondente à intensidade máxima da fluorescência, e azul escuro corresponde à ausência da fluorescência da PpIX (fundo). As escalas do eixo x e y na Figura 31 estão em milímetros. A conversão de pixels para milímetros foi possível devido ao uso de uma escala milimétrica fotografada junto de cada biópsia (a escala pode ser observada na parte superior da Figura 30).

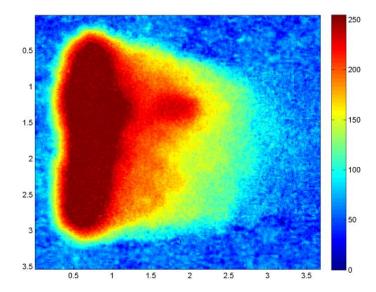


Figura 31 - Exemplar de um mapa de intensidades no canal vermelho de uma imagem de fluorescência de uma biópsia extraída por *punch* após a produção de PpIX. A profundidade da pele cresce na horizontal, na direção da direita para a esquerda da página.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os mapas de intensidades, como o apresentado na figura, correspondentes às imagens de fluorescência das biópsias ao longo das três horas após a aplicação do creme para os tratamentos controle, e que receberam RMs de 0.5, 1.0 e 1.5 mm ou TS são apresentados na Figura 32.

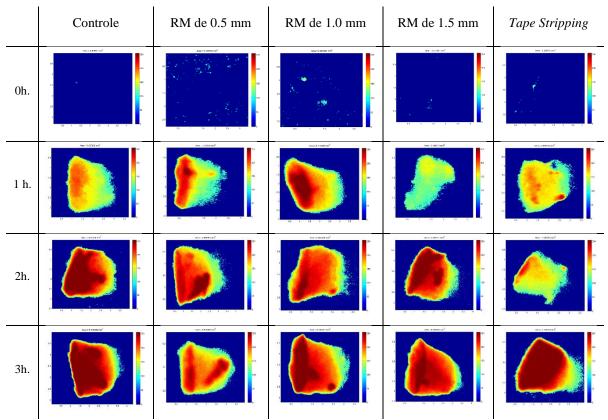


Figura 32 - Perfil de distribuição da PpIX em profundidade. A componente vermelha das imagens varia de 0 à 255 (255 em vermelho escuro) e a superfície da pele está voltada para o eixo y da imagem (à esquerda). O tempo de 0h se refere ao momento da aplicação do creme.

Fonte: Elaborada pela autora.

As biópsias do grupo controle foram extraídas das regiões onde foi verificada a emissão de fluorescência na superfície, devido à grande heterogeneidade superficial de formação de porfirina, discutido anteriormente.

De acordo com os mapas de intensidades, já no tempo de uma hora após a aplicação do creme foi observada emissão de fluorescência numa profundidade média entre 1,5 e 2 mm, sem diferenças significativas na profundidade máxima alcançada entre os grupos. Também há indícios de que as regiões de maiores intensidades de emissão de fluorescência da PpIX na profundidade da pele, se concentram em linhas, certamente proveniente de folículos pilosos ou do furo realizado na região.

De acordo com Svaasand et al. (126) considerando que o coeficiente de difusão é de aproximadamente  $10^{-9}$  m²/s - típico para lesões com alta difusão e baixa taxa de eliminação pelo organismo- a droga alcançaria profundidade de cerca de 1 e 2 mm entre 15 min. e 1 hora. Considerando uma difusão consideravelmente baixa e alta taxa de eliminação pelo organismo, de cerca de  $10^{-10}$  m²/s, estas profundidades seriam alcançadas em cerca de 3h e 12h, respectivamente.

Através da colocação dos autores seria possível inferir que há uma difusividade considerável da droga nos grupos apresentados e que os pelos (no grupo controle), e a danificação do estrato córneo nos demais grupos servem como mediadores da difusão do ALA na profundidade do tecido, incluindo a derme. Contudo, deve-se pontuar que a presença de emissão de fluorescência visualizada em aproximadamente 2 mm abaixo da superfície da pele, pode ser devida ao espalhamento da luz provinda de regiões de alta emissão ali localizadas, tais como pelos e furos já que estas regiões apresentaram alta intensidade de emissão já que a imagem não é realizada no plano focal.

Embora a técnica de TS tenha demonstrado alta intensidade de florescência sobre toda a área no tempo de três horas (Figura 32), mais estudos, envolvendo um maior número de observações precisavam ser realizados confirmando esta hipótese. Para confirmar esta última observação, perfis de intensidade no canal vermelho de imagens das amostras extraídas por *punches* foram realizados em três indivíduos. Nestas repetições, as imagens foram coletadas após três horas da aplicação do creme, para cada um dos tratamentos e os perfis de intensidades de uma linha horizontal perpendicular à superfície da amostra foram traçados, conforme mostra o exemplo da Figura 33.

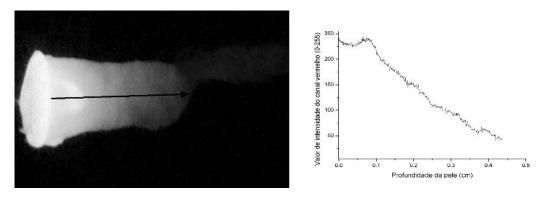


Figura 33 - Exemplar do procedimento adotado para realização do perfil de intensidade no canal vermelho da imagem de uma amostra extraída por *punch* após 3 horas da aplicação do creme.

Fonte: Elaborada pela autora

Basicamente, para gerar o perfil, a imagem foi redimensionada para centímetros, uma linha perpendicular à superfície foi traçada na imagem RGB a partir do início da epiderme, e o

perfil de intensidade do canal vermelho da imagem foi determinado. Os perfis traçados para cada um dos grupos podem ser observados na Figura 34.

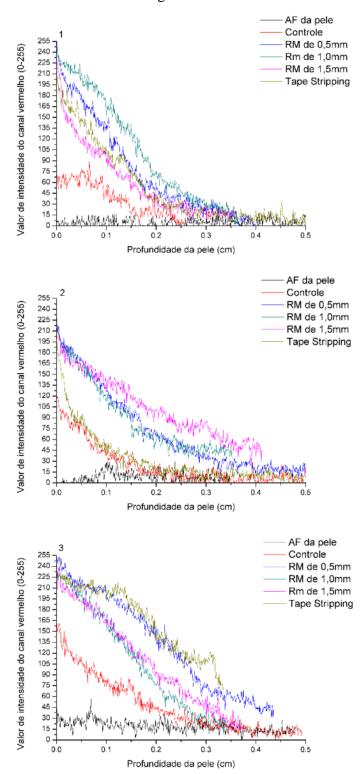


Figura 34 - Perfis de intensidades no canal vermelho relativos à emissão de fluorescência da PpIX com a profundidade da pele para os diferentes tratamentos utilizados. Os perfis foram traçados nas imagens das biópsias por *punches* de pele. Os experimentos 1, 2 e 3 se referem, cada qual, à um diferente animal.

Fonte: Elaborada pela autora.

<sup>\*</sup>AF se refere à fluorescência natural da pele.

Através destes gráficos é visto que todas as amostras obtiveram similar profundidade de detecção de emissão de fluorescência da PpIX quando uma das técnicas mecânicas foi adicionada. No grupo controle, observa-se a emissão da fluorescência da PpIX até aproximadamente 2-2,5 mm de profundidade, enquanto que os grupos que receberam RMs ou TS, esta emissão foi observada até 3-4 mm. Além disso, também se verifica um menor valor de intensidade de fluorescência na superfície da biópsia do grupo controle (o ponto zero do gráfico, com intensidade de cerca de 60-150). Este valor de intensidade foi atingido pelos demais tratamentos já em uma profundidade de cerca de 2 mm.

A análise dos perfis de intensidades da Figura 34 mostra que a resposta tecidual frente ao uso dos RMs e TS variou de animal para animal, pois observa-se que, em a) a curva de maior intensidade em profundidade corresponde ao RM de 1 mm, já em b) a curva referente a 1,5 mm, e em c), as curvas correspondentes aos grupos RM 0,5 mm e TS obtiveram maior intensidade, com resultados semelhantes.

Além da variação de resposta entre animais, esta variabilidade nos resultados indica que fatores intrínsecos às regiões de aplicação são mais determinantes na emissão da fluorescência da PpIX na profundidade do que a técnica em si. Tal variabilidade certamente está relacionada ao fato de que as técnicas de RMs e TS dependem de diversos parâmetros, como a pressão exercida durante a aplicação, além das características intrínsecas da pele no momento da aplicação, já discutidas anteriormente.

Além destes fatores, a densidade de pelos na região, ou de poros podem ser determinantes na quantidade de fluorescência, uma vez que estes podem promover a permeação do creme e espalhamento da luz. No entanto, estes perfis de emissão de fluorescência confirmam que tanto o uso de RM quanto o TS aumentam a eficiência da produção da PpIX em profundidade se comparado ao caso onde as técnicas não são aplicadas, indicando que essas técnicas mecânicas são capazes de melhorar a permeação dérmica do ALA em creme.

Quando se trata da técnica de ILA, as análises de distribuição em profundidade 3 horas a partir da aplicação do ALA foram realizadas a partir de biópsias realizadas com bisturi de modo a extrair um fragmento de aproximadamente 2,5 mm x 1 mm transversal à superfície, passando pelo ponto da injeção. Deste modo, se observa não apenas o alcance de formação de PpIX na profundidade, mas também o perfil de entrega da solução. Um exemplo de um corte transversal à superfície pele é apresentado na Figura 35.

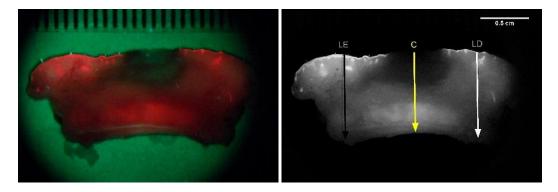


Figura 35 - Na imagem à esquerda: Um exemplo de corte transversal à superfície da pele extraído após 3horas da aplicação de ALA por meio de Injeção livre de agulhas. E à direita: Linhas onde foram realizados os perfis de intensidade, no local da injeção ( C), e nas laterais esquerda (LE) e direita (LD) à região de aplicação

Fonte: Elaborada pela autora.

Os perfis de intensidades de três diferentes cortes, cada qual na região do ponto de aplicação da injeção (C) e nas laterais esquerda (LE) e direita (LD) do ponto central da injeção, são apresentados na Figura 36. As linhas traçadas para os perfis de intensidades das regiões laterais ao ponto de injeção foram iniciadas de pontos aleatórias ao redor da região de aplicação, porém, foi adotado o critério de que estas linhas iniciassem de pontos onde foi observada a presença de emissão de fluorescência na superfície.

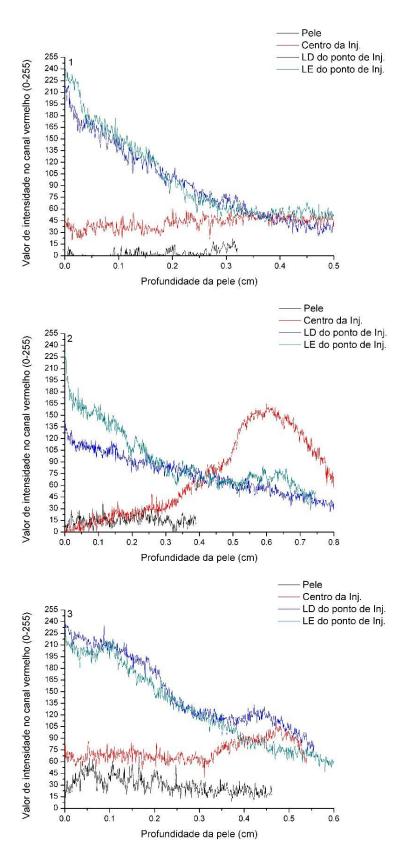


Figura 36 - Perfis de intensidades no canal vermelho da imagem, nas regiões centrais e laterais do ponto de aplicação da injeção livre de agulhas. Cada amostra 1, 2 e 3 foi extraída de um animal diferente três horas a partir da administração do ALA.

\*Inj. significa injeção. LD e LE referem-se as laterais esquerda e direita do ponto de injeção. Fonte: Elaborada pela autora.

Em todas as amostras (1, 2 e 3 - extraídas cada qual de um animal), a emissão de fluorescência da PpIX no ponto central de aplicação foi menor do que a intensidade nas laterais do ponto de injeção até a profundidade de aproximadamente 3 mm. Nas amostras dois e três, contudo, houve um aumento na intensidade de fluorescência da PpIX a partir desta profundidade na região do ponto de aplicação (C). Certamente, na primeira amostra (1), o corte transversal à pele ocorreu pelas periferias do ponto central da injeção não mostrando este aumento de intensidade na profundidade.

Da mesma maneira que para as técnicas mecânicas de TS e RMs, as intensidades de emissão de fluorescência da PpIX nas laterais do ponto da injeção decaíram com a profundidade. Ao se comparar os perfis de intensidades das injeções (Figura 36) com os perfis obtidos quando se utilizam as técnicas de RMs e TS, é visto detecção de PpIX em maior profundidade quando se utiliza ILA. Ao utilizar ILA foi detectada a emissão de fluorescência em até 8 mm.

Por outro lado, a maneira como as biópsias foram extraídas, por *punch* ou por bisturi, pode influenciar na comparação com os grupos onde as amostras foram extraídas por *punches*, já que as amostras por *punches* são extraídas na forma de cone afunilando para a profundidade, influenciando nas comparações de escalas da régua. Desta maneira, a comparação foi realizada posteriormente através do uso de imagens por microscopia confocal, que serão brevemente apresentadas.

Na Figura 36-2, verifica-se que há maior intensidade de fluorescência na superfície da pele na lateral esquerda ao ponto de injeção que na LD, provavelmente relacionado a direção que o liquido injetou na pele. Esta comparação se confirma ao observar os mapas de intensidades apresentados na Figura 37.

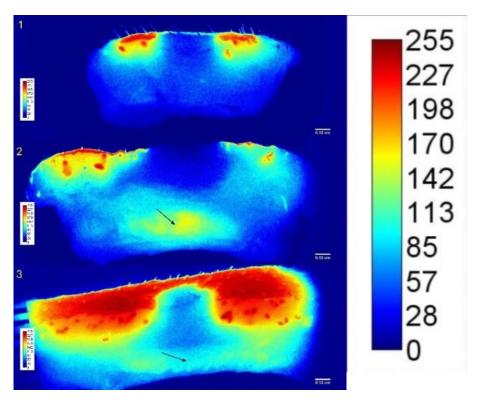


Figura 37 - Triplicatas dos perfis de intensidade de emissão da fluorescência da PpIX a partir de cortes transversais à pele três horas após a aplicação de ALA 20% quando a pró-droga é administrada por meio de injeção livre de agulha. As imagens se referem às amostras utilizadas para gerarem os perfis 1, 2 e 3 apresentados na Figura 36, e estão em sequência.

\*A escala da régua equivale a 0,12cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Mapas de intensidades foram gerados a partir das mesmas imagens das triplicatas dos cortes perpendiculares à superfície da pele utilizados para gerarem os perfis apresentados na Figura 36. Estes mapas mostram a distribuição das intensidades de emissão de fluorescência da PpIX na pele três horas a partir da aplicação do ALA, de modo que as cores em vermelho escuro representam a máxima emissão de fluorescência vermelha, e na cor azul, a ausência de fluorescência na região da imagem.

Nas repetições mostradas na Figura 37, há detecção de fluorescência logo abaixo e nas laterais da região de passagem da injeção. Intensidades de emissão de fluorescência na profundidade da pele- indicadas pelas setas na figura- fornecem evidência de que a solução de ALA injetada atingiu até as regiões subcutâneas da pele. Outro estudo reportado em jornal científico utilizando do mesmo injetor reportou uma profundidade de alcance de 3-9 mm. (147)

Embora o protocolo utilizado ocasionou a detecção de fluorescência em profundidades de até 8 mm, não se pode afirmar que a fluorescência detectada no tecido subcultâneo se refere à produção de PpIX ou de outros fluoróforos ativados após a injeção. Contudo, há indicações de que o líquido atingiu principalmente esta região.

Já foi reportado na literatura que a profundidade e distribuição da solução na pele varia de acordo com o tipo do dispositivo utilizado, a região de aplicação da injeção, viscosidade do líquido, e a pressão do equipamento. (148-149) Além disso, de acordo com Schramm-Baxter et al. (150) a forma e profundidade de alcance do liquido dependem do diâmetro do orifício e velocidade de saída do líquido pelo injetor. Os autores registram haver entrega ao longo de toda a profundidade da pele com injetores de orifícios acima de 100 µm e velocidade fixa em 160m/s.

Há poucas diferenças entre os injetores comerciais no que se refere ao diâmetro do orifício da seringa e velocidade de aplicação. A maior parte das injeções apresentam orifícios de cerca de 150-300 μm, e velocidade de 100-200 m/s. (151-152) Isto indica que a maioria delas são de entrega subcutânea.

Tanto nas imagens dos cortes transversais quanto nos perfis de intensidades, não é visto emissão de fluorescência na área central da pele, ou seja, no ponto da injeção, sugerindo ser o caminho de passagem da solução de ALA no momento da injeção. Pressupõe-se que a ausência de fluorescência na região de aplicação até o tempo de três horas após a aplicação do ALA deve-se ao dano tecidual ocasionado pela passagem do liquido durante a injeção.

Ainda que não tenha sido observada fluorescência na região de aplicação, recentemente, foram registrados resultados clínicos satisfatórios utilizando de ILA na realização da TFD. Barolet et al. (62) registraram o tratamento por TFD de um carcinoma basocelular nasal recorrente utilizando o método de ILA. Neste estudo, não houve recorrência do carcinoma nodular após dois anos da intervenção. Além disso, neste estudo foi observada a presença de crosta durante 6 dias.

Outro estudo reportado por Li et al. (63) comparou o método de aplicação da pró-droga por meio de ILA com o método de aplicação externa no tratamento de condiloma acuminado. Os autores registraram redução nas taxas de recorrência nas lesões espessas e extensas quando se utiliza o dispositivo de ILA.

Uma análise mais detalhada da entrega do creme e formação da PpIX na pele submetida às diferentes técnicas mecânicas foi realizada por meio de imagens de fluorescência por microscopia confocal. Tais imagens são apresentadas na

Figura 38.

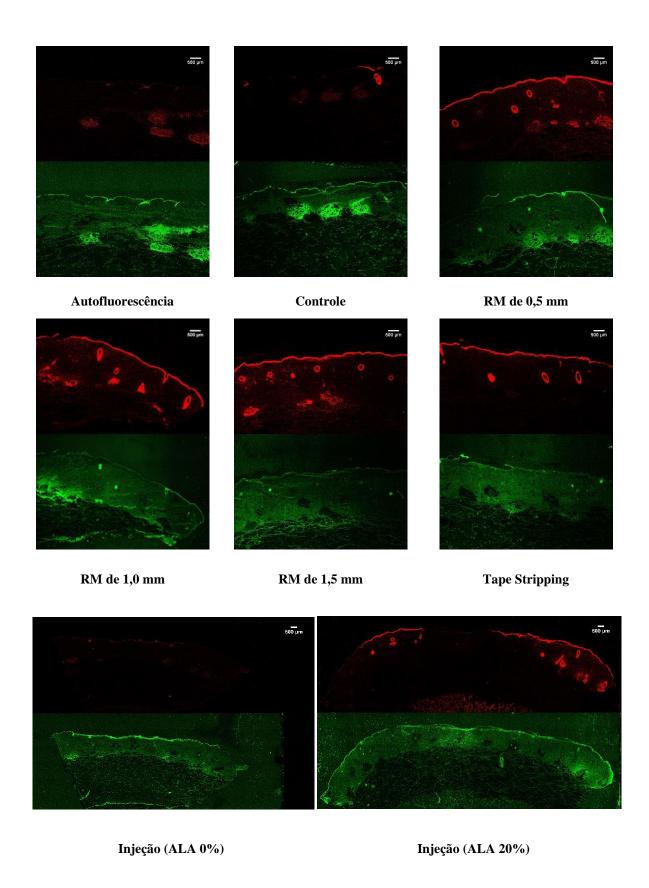


Figura 38 - Imagens da fluorescência por microscopia confocal de cortes de pele criopreservados. Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens via microscopia confocal permitem uma avaliação da emissão de fluorescência da PpIX das regiões da pele de forma a atenuar as contribuições de emissões de fluorescência fora do plano focal de coleta. Isto auxilia a avaliar de forma mais precisa, a profundidade de penetração do creme e a localização deste.

Comparando as imagens de fluorescência da PpIX (vermelha) com a fluorescência (verde), fica evidente que a fluorescência da PpIX foi mais intensa na epiderme e ao redor de cavidades dos folículos pilosos e em glândulas sudoríparas.

Observando as imagens, vê-se uma baixa emissão de fluorescência também no grupo que não recebeu ALA, denominada "autofluorescência", caracterizando uma emissão de fluorescência intrínseca da pele, principalmente em glândulas. Para o grupo controle é visto que não há fluorescência da PpIX sobre toda a epiderme, mas especialmente em locais de desnível, que provavelmente se refere à periferia da região de crescimento do pelo. Excluindo o controle, todos os grupos submetidos à RMs ou TS apresentaram emissão de fluorescência de forma mais pronunciada na camada mais superficial da pele, provavelmente a epiderme. Além disso, todos apresentaram um aumento na fluorescência nos apêndices da pele, como glândulas e folículos.

Contudo, assim como registrado na literatura, a fluorescência na derme foi praticamente nula se comparada à emissão da epiderme. (153-154) Nas imagens de emissão de fluorescência de campo amplo, havia sido quantificada e registrada por meio de imagens e mapas de intensidades, a presença de emissão de fluorescência na derme. Por outro lado, as imagens de campo amplo podem detectar a emissão da fluorescência advinda de regiões fora do plano focal, o que certamente deve ter contribuído para a observação de maior intensidade desta emissão. Além disso, observa-se nas imagens de microscopia confocal, a presença de fluorescência em glândulas, já na intersecção com a hipoderme.

A fluorescência detectada confirma que há uma facilidade do creme em permear através dos folículos pilosos. Em concordância, as glândulas sudoríparas dos porcos são essencialmente do tipo apócrinas, com ductos de secreção ligados ao folículo capilar, o que sugere que a emissão da fluorescência vermelha detectada nas glândulas mais profundas da pele provém do creme que permeia através dos ductos ligados aos folículos pilosos. (70,155)

Mesmo que a pró-droga seja administrada na forma injetável, a fluorescência detectada na derme também foi observada principalmente nos folículos pilosos e glândulas, o que indica uma seletividade de formação de PpIX nestas regiões. Outros estudos também reportam a preferência de localização da PpIX na epiderme e nos apêndices da pele. (118, 156)

Quando se utiliza da ILA para administração de ALA, foi detectado um aumento da fluorescência vermelha também na hipoderme, como foi sugerido anteriormente através das

análises por imagens de fluorescência de campo amplo. Sendo assim, é razoável que a injeção tenha alcançado a hipoderme. Considerando que a ILA promove a penetração subcutânea do líquido, pode resultar na interação com nervos e vasos sanguíneos e ocasionar a sensação de dor.

Assim como observado através das informações espectrais, e por imagens de fluorescência de campo amplo, as imagens de microscopial confocal confirmaram a ausência de emissão de fluorescência na região central da injeção por um período de três horas após a aplicação do ALA. O dano ocasionado pela injeção pode resultar na ausência de produção de PpIX no ponto de aplicação, e, possivelmente interferir no tratamento. Por outro lado, estas análises precisam ser confirmadas em tempos posteriores a três horas, e em casos de injeções que utilizam de outros parâmetros de pressão, ou diferente diâmetro do orifício de ejeção do liquido, ou até mesmo quando injetando líquidos de diferentes viscosidades.

Os resultados sugerem que mediante quaisquer das técnicas mecânicas seja RMs ou TS houve melhoria na entrega do ALA em profundidade se comparado ao grupo controle. Isto sugere o importante papel do estrato córneo na penetração de medicamentos, e a importância das técnicas mecânicas como meio de favorecer a penetração do creme e para que o dano após a terapia ocorra homogeneamente sobre a lesão.

Porém, há indícios de que esta pró-droga tem seletividade na produção de PpIX para a epiderme e apêndices da pele. Partindo deste pressuposto e de que o ALA administrado por injeção (ILA) alcançou a derme, porém não produziu PpIX nesta região, é possível induzir que ainda que o creme tenha alcançado maior profundidade no tecido, o protocolo utilizado não gerou produção de PpIX em níveis quantificáveis nesta região.

Embora tenha sido observada fluorescência principalmente na epiderme, é possível que, para o tecido tumoral, esta produção possa se dar em maior profundidade se comparada ao tecido normal. Por outro lado, os resultados sugerem que o tratamento com ALA utilizando das técnicas mecânicas é indicado principalmente nos casos de dermatoses ou lesões envolvendo a epiderme e tais apêndices, promovendo uma entrega homogênea, e assim, certamente, contribuindo para diminuir os riscos de recorrência associados à heterogeneidade de penetração do ALA na pele.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS EXPERIMENTOS IN VITRO

# 5.1 PRODUÇÃO E RESPOSTA CELULAR À TFD *IN VITRO*

Os resultados apresentados a seguir foram adquiridos durante o intercâmbio da autora na Universidade de Oslo, Noruega. Os estudos foram realizados sob supervisão do Professor Dr. Kristian Berg. Uma vez que este estudo não foi realizado como um precedente do estudo anterior, para que não ocasione conflito ao leitor, os resultados *in vitro* foram apresentados no último capítulo que segue, na ordem cronológica de execução.

Além da penetração do creme e da luz na pele, características celulares podem ser uma das responsáveis por uma menor capacidade de formação da PpIX e/ou de resistência celular ao tratamento. Estudos científicos mostram uma região de borda de lesão tumoral com células resistivas à TFD, inclusive em regiões próximas à superfície da pele onde a fonte de luz atingiria. (83) A presença de células viáveis nas regiões de borda após a realização da TFD muito provavelmente se relaciona a uma maior presença de EMT nesta área, culminando na recorrência do tumor.

Entender as características das células que tem preferência no acumulo da PpIX ou que são menos responsivas ao tratamento, permite repensar a possibilidade de novos adjuvantes na terapia, tais como a combinação com novas drogas que vão agir especificamente no alvo. Diante disso, este estudo apresentará o papel da transformação epitélio-mesenquimal - através da expressão de Axl - na resistência à TFD. Com este intuito, foram utilizadas células humanas de câncer de mama MDA-MB-231que naturalmente expressam altos níveis de Axl, e, também, esta mesma linhagem de célula, porém após sofrer transdução retroviral para expressar menor quantidade de Axl (shAxl278 (278) e shAxl280 (280)).

Uma avaliação qualitativa das diferenças na expressão de Axl entre as diferentes células foi realizada por meio da técnica de *western blotting*. Na Figura 39, observa-se uma maior expressão da proteína na célula MDA-MB-231 (231), e em menor quantidade na célula shAxl278 (278) e, na sequência, com menor quantidade, a shAxl280 (280). Tais resultados também podem ser encontrados na literatura. (89)



Figura 39 - Expressão de Axl nas células MDA-MB-231, shAxl278 e ShAxl280, na sequência. Fonte: Elaborada pela autora.

A sobrevivência celular após a realização da terapia fotodinâmica foi utilizada para estimar a fototoxidade da TFD nas diferentes células. Para a realização da TFD, as células receberam ALA numa concentração de 1 mM e foram iluminadas com variados tempos de exposição a uma fonte de luz azul. A quantificação da sobrevivência celular à TFD foi realizada após 48horas da iluminação através da técnica de MTT.

Os resultados de viabilidade das diferentes células à TFD com diferentes tempos de iluminação são apresentados na Figura 40. Os grupos controles apresentados na figura se referem às células que não receberam ALA.

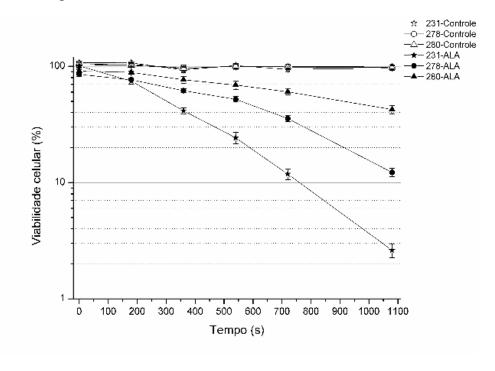


Figura 40 - Sobrevivência das células MDA-MB-231 (231), shAxl278(278) e shAxl280 (280) após a realização da TFD utilizando o tempo de incubação de 4 horas e vários tempos de iluminação (0-1100s).

Fonte: Elaborada pela autora

Como esperado, a morte celular na presença de ALA e luz são dependentes do tempo e exposição à luz, já as células do grupo controle se mantiveram em 100% de sobrevivência. No entanto, o teste de viabilidade celular mostrou maior resistência à TFD para as células com menor expressão de Axl, ou seja, para as células de fenótipos mais epiteliais. Os tempos

necessários para matar 50% das células shAxl280 e shAxl278 foram 3 e 2 vezes maiores que o tempo necessário para a células com maior expressão de Axl (MDA-MB-231).

Uma vez que a quantidade de PpIX induzida por ALA tem influência sobre os resultados de eficácia à TFD, a quantidade de PpIX nas células foram avaliadas por meio de citometria de fluxo. Para isto, foram avaliadas a fluorescência da PpIX de 10000 células por grupo após a incubação de ALA, e, após a subtração da fluorescência natural da pele os resultados foram plotados no gráfico apresentado na Figura 41.

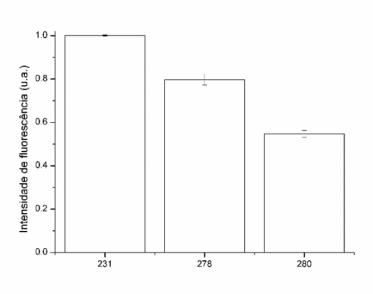


Figura 41 - Fluorescência relativa da PpIX nas células MDA-MB-231 (231), ShAxl278 (278), e ShAxl280 (280) após quatro horas de incubação de ALA (triplicata).

Fonte: Elaborada pela autora

Em concordância com os resultados de fototoxidade, o acúmulo de PpIX foi mais baixo nas células com menor expressão de Axl, o que explica a maior resistência à TFD. Isto indica que as diferenças em fototoxidade entre as células foi devido as diferenças em quantidade de PpIX induzida por ALA.

Embora outros estudos tenham reportado maior acumulo e fototoxidade à TFD em células tumorais se comparado ao tecido normal os mecanismos não são completamente explanados. (5) As elucidações se referem à anomalias na biossíntese do heme, tais como menor enzimas ferroquelatases e maior presença da enzima porfobilinogenase. (8) Contudo, este estudo, sugere que outros fatores relacionados aos fenótipos celulares podem, também, estar envolvidos.

Esperava-se, através deste estudo, que as células com fenótipo mesenquimal fossem mais resistivas ao tratamento, desta maneira, o uso de drogas ou inibidores poderia ocasionar melhorias de resposta nas margens de tumores tratados via TFD, apontadas como sendo resistivas ao tratamento. Em contrapartida, a TFD se mostrou mais prejudicial às células com características mais agressivas, o que corrobora para à afirmação de seletividade da técnica.

Sendo assim, outras razões devem estar envolvidas na resistência das margens do tumor. É possível que estas margens não estejam sendo efetivamente tratadas devido aos fatores relacionados a entrega do fotossensibilizador ou da luz no tecido. Como mostrado anteriormente, a literatura registra a presença destas margens quando o fotossensibilizador é entregue pela via sistêmica. Uma das elucidações é que a chegada do FS pode ocorrer principalmente pela alta vascularização na área central do tumor, o que explicaria a presença de bordas com células viáveis após a TFD. Embora, a luz também apresente limitação de profundidade de penetração no tecido, isto não correlaciona com a presença de bordas resistivas ao tratamento visualizadas nas margens próximas à superfície.

Ao sugerir uma maior emissão de fluorescência da PpIX em células tumorais de fenótipos mesenquimais, reafirma-se o poder da emissão de fluorescência da PpIX como forma de facilitar a identificação de margens durante cirurgia de excisão, quando necessária, e até mesmo diferenciar tecidos neoplásicos através de diagnóstico por fluorescência.

Embora este estudo tenha indicado alta seletividade na resposta celular ao tratamento e na produção de PpIX, novos estudos precisam confirmar estas respostas também *in vivo* e considerando outros tipos celulares. Sendo EMT um processo reversível pelas células, é importante observar, *in vivo*, se as células com características de fenótipos epiteliais, que neste estudo foram mais resistivas ao tratamento, podem, ou não, acarretar na recorrência do tumor.

Foi apresentado no capítulo anterior, que quando utilizando das técnicas mecânicas, houve uma afinidade de acúmulo de PpIX na camada epidermal do tecido normal, indicando que o ALA pode ocasionar resultados satisfatórios nos casos de dermatoses ou lesões envolvendo a epiderme. Em adição, neste estudo foi apresentada maior afinidade do ALA em se acumular e produzir PpIX em células com fenótipos mesenquimais, o que indica que o tratamento via TFD pode também ser um coadjuvante no tratamento de tumores mais agressivos.

Por outro lado, é preciso, também, considerar que o conteúdo mitocondrial das células pode ter sido afetado pelo processo de transdução, o que poderia interferir nas diferenças de acúmulo de PpIX e, consequentemente, de resposta à TFD.

# 6 CONCLUSÃO

Tanto as imagens de fluorescência quanto os espectros mostram que as técnicas de microagulhas e TS têm obtido resultados similares em termos de produção superficial de PpIX e melhoria da homogeneidade de distribuição da PpIX na pele. Contudo, em algumas das repetições o RM de 0,5 mm e o *Tape Stripping* obtiveram menor produção de PpIX na área da superfície da pele quando comparado aos demais RMs (de 1,0 mm e 1,5 mm).

O estudo também mostrou que a profundidade do RM não causa diferença significativa dentro do desvio padrão nas intensidades de fluorescência da PpIX detectadas via espectros de fluorescência. Além disso, os dados dos espectros coletados ao redor de um único furo de 0,5 mm, 1,0 mm e 1,5 mm indicam que a densidade de agulhas pode ter efeito nos resultados.

O grupo controle, onde não há aplicação de técnicas de promoção de penetração, obteve resultados similares em produção de PpIX quando comparado aos grupos onde foram aplicadas as técnicas mecânicas de TS ou RMs, porém, com heterogeneidade de distribuição de formação de porfirina, como revelam os espectros e imagens de fluorescência. Esta heterogeneidade foi consideravelmente sanada com a aplicação das técnicas de TS, RMs e ILA.

No que refere à produção de PpIX na profundidade da pele, nos experimentos utilizando ILA, RMs e TS foi detectada produção de PpIX principalmente na epiderme e apêndices da pele, e, os resultados indicaram que o ALA administrado por meio da ILA alcança principalmente as camadas subcutâneas. No grupo controle, a fluorescência da PpIX se deu de forma heterogênea na superfície, formando especialmente nas regiões próximas dos pêlos.

Os resultados dos experimentos *in vitro* indicaram que as células de fenótipos mesenquimais induzidos por EMT obtiveram melhores resposta à TFD, e produziram mais PpIX.

No geral, os resultados mostram a importância da associação de outras técnicas à protocolos de TFD clínica como meio de promover uma penetração do medicamento de forma mais homogênea. Esta associação pode diminuir as taxas de recorrência de lesões de pele pós-TFD e, até mesmo, acarretar no uso da TFD tópica para tratamentos de lesões mais profundas de pele.

O fato de a técnica TS se mostrar promissora na produção de porfirina, e com efetividade comparável às demais técnicas é um resultando estimulante, uma vez que esta técnica é menos invasiva, e pode ser usada, sem dor, não apenas na obtenção de uma melhora nos casos de recidivas em TFD tópica e na eficácia da TFD, como aqui proposto, como também, para entrega de outros medicamentos, e, como coadjuvante na estética.

Células com maiores níveis de Axl, induzido pelo processo de transformação epitéliomesenquimal, obtiveram melhores respostas ao tratamento, indicando que outras causas podem estar relacionadas com a resistência das margens do tumor à TFD, e que, uma vez que houve maior seletividade na produção de PpIX para estas células, a emissão de fluorescência pode representar um meio efetivo no diagnóstico de lesões.

O estudo *in vitro* sugere que além da preocupação com o meio de entrega do prófármaco, é necessário, também, avaliar as diferenças na formação de PpIX por tipos celulares envolvidos, uma vez que as características celulares podem ser determinantes na capacidade de formação de PpIX. Contudo, estudos futuros necessitam ser realizados com o intuito de comprovar as hipóteses estabelecidas, e avaliá-las também *in vivo*.

# **REFERÊNCIAS**\*

- 1 CANCER facts & figures 2014. **Atlanta**: American Cancer Society, 2014. Disponível em:<a href="mailto:khttp://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf">khttp://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf</a> >. Acesso em: 18 set. 2014.
- 2 BULLETIN of the World Health Organization. **World Health Organization**, 2014. Disponível em: < http://www.who.int/bulletin/volumes/92/3/14-010314/en/ >. Acesso em: 18 set. 2014.
- 3 INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Radiação**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/conteudo\_view.asp?ID=21>. Acesso em: 18 set. 2014.
- 4 BAGNATO, V.S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008. 239p.
- 5 DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3. n. 5, p. 380-387, 2003.
- 6 ORENSTEIN, A. et al. Comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 8, p. 937–944, 1996.
- 7 TOPE, W. D. et al. Lack of selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for basal cell carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid: implications for photodynamic treatment. **Archives of Dermatological Research**, v. 287, n. 7, p. 665-674, 1995.
- 8 KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:** biology, v. 14, n. 4, p. 275-292, 1992.
- 9 DAVE, B. et al.. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 202, p.1-5, 2012.
- 10 AGOSTINES, P. et.al. Photodynamic Therapy of Cancer: Un Update. CA: a cancer journal for clinicians, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.
- 11 KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**: biology, v. 66, n. 2, p.89–106, 2002.
- 12 SETÚBAL, C. A. **Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica.** 2007. 101 p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

-

<sup>\*</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 13 DOUGHERTY, T. J. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.14, n. 5, p. 219–221, 1996.
- 14 MCCAUGHAN, J. S. Jr. Photodynamic therapy: a review. **Drugs & Aging,** v.15, n. 1, p. 49-68, 1999.
- 15 ZEITOUNI, N. C; OSEROFF, A. R.; SHIEH, S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers: current review and update. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 17–18, p.1133–1136, 2003.
- 16 DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v.233-234, p.351-371, 2002. doi: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6.
- 17 ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy (review). **Materials**, v. 6, n. 3, p. 817-840, 2013.
- 18 RIGEL, D. S. et al. Photodynamic therapy in skin cancer. In: MORTON, C.A. Cancer of the Skin. 2nd ed. New York: Saunders Elsevier, 2011. cap. 45, p.498-507.
- 19 KRAMMER, B.; PLAETZER, K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. **Photochemical & Photobiological Science,** v.7, n. 3, p. 283-284, 2008.
- 20 SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.
- 21 MORITZ, M. N. O. **Potencial apoptótico de uma nova clorina anfifílica como fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica.** 2014. 77 p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- 22 BERG, K. et al. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1637-1651, 2011.
- 23 LUND, K. et al. The novel EpCAM-targeting monoclonal antibody 3–17I linked to saporin is highly cytotoxic after photochemical internalization in breast, pancreas and colon cancer cell lines. **MAbs**, v. 6, n. 4, p. 1037-1050, 2014.
- 24 TRIESSCHEIJN, M.et al. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist,** v.11, n. 9. p. 1034-1044, 2006.
- 25 KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical and Experimental Dermatology,** v. 24, n. 3, p. 143-148, 1999.
- 26 SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Therapeutics Focus, Reviews,** v 4, n. 11, p.507-517, 1999.

- 27 HAJ-HOSSEINI, N. Fluorescence spectroscopy for quantitative demarcation of glioblastoma using 5-aminolevulinic acid. 2012. 77 p. (Master thesis) Department of Biomedical Engineering, Linköping University, Linköping, Sweden, 2012.
- 28 SULTAN, A. A. et al. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a)-induced photochemical internalization of bleomycin in patients with solid malignancies: a phase 1, dose-escalation, first-in-man trial. **Lancet Oncology**, v. 17, n. 9, p.1217-1229, 2016.
- 29 FERREIRA, D. M. Estudo de sistemas nanocarreadores para o àcido 5-aminolevulinico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na eletroquimioterapia e terapia fotodinâmica contra o câncer de pele. 2012. 93 p Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- 30 TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. F. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009.
- 31 VOET, D.; VOET, J. G.; PRAT, C. W. **Fundamentos de bioquímica:** a vida em nível molecular. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1200p.
- 32 NAVONE, N. M et al. Heme biosynthesis in human breast cancer--mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. **International Journal of Biochemistry**, v. 22, n.12, p. 1407-1411, 1990.
- 33 EL-SHARABASYL, M. M. H. et al. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. **British Journal of Cancer**, v. 65, n. 3, p. 409-412, 1992.
- 34 LOPEZ, R. F. V. et al. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 1, p. 77-94, 2004.
- 35 KRIEG, R. C. et al. Metabolic characterization of tumor cell–specific protoporphyrin ix accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. **Photochemistry and Photobiology,** v. 76, n. 5, p. 518–525, 2002.
- 36 SOUZA, J. G. Avaliação da penetração cutânea iontoforética da zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS4) e estudos de citotoxicidade em cultura de células tumorais. 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- 37 MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** V. 52, n. 2, p. 103–112, 2001.
- 38 TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration (a review). **Skin Pharmacologic and Physiologic,** v. 19, n. 2, p. 106–121, 2006.
- 39 JHAWAT, V. C. et al. Transdermal drug delivery systems: approaches and advancements in drug absorption through skin. **International Journal of Pharmeutical Sciences Review and Research**, v. 20, n. 1, p. 47-56, 2013.

- 40 WASHBROOK, R.; RILEY, P. A. Comparison of delta-aminolaevulinic acid and its methyl ester as an inducer of porphyrin synthesis in cultured cells. **British Journal of Cancer**, v. 75, n. 10, p.1417–1420, 1997.
- 41 GAULLIER, J.-M. et al. Use of 5-aminolevulinic acid Esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. **Cancer Research**, v. 57, n. 8, p.1481-1486, 1997.
- 42 MOAN, J.; MA, L-W.; IANI, V. On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. **International Journal of Cancer,** v.92, n. 1, p. 139–143, 2001.
- 43 JUZENIENE, A. et al. Topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: considerations for dosimetry in mouse skin model. **Photochemistry and Photobiology,** v. 76, n. 3, p. 329–334, 2002.
- 44 FRITSCH, C. et al. Preferential relative porphyrin enrichment in solar keratosis upon topical application of 5-aminolevulinic acid methylester. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 2, p. 218-221, 1998.
- 45 WIEGELL, S. R. et al. Pain associated with photodynamic therapy using 5-Aminolevulinic acid or 5-Aminolevulinic Acid Methylester on tape-stripped normal skin. **Archives of Dermatology**, V. 139, n. 9, p. 1173-1177, 2003.
- 46 MOAN, J.et al. Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. **International Journal of Cancer**, v. 103, n. 1, p.132-135, 2003.
- 47 RHODES, L. E. et al. Iontophoretic delivery of ALA provides a quantitative model for ala pharmacokinetics and ppix phototoxicity in human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 108, n. 1, p. 87–91, 1997.
- 48 LOPEZ, R.F.V. et al. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **Journal of Controled Release**, v.88, n.1, p.65-70, 2003.
- 49 LOPEZ, R. F. V. et al. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 3, p. 311-315, 2001.
- 50 BODDÉ, H. E.; ROEMELÉ, P. E. H.; STAR, W. M. Quantification of topically delivered 5-aminolevulinic acid by iontophoresis across ex vivo human stratum corneum. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 4, p. 418-423, 2002.
- 51 BARTOSIK, J. et al. Ultrastructural alteration of tape-stripped normal human skin after photodynamic therapy. **European Journal of Dermatology**, v.14, n. 2, p. 91-95, 2004.
- 52 GOFF, B.A. et al. Effects of photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:** biology, v. 15, n. 3, p. 239–251, 1992.
- 53 NICOLODELLI, G.et al. Effect of photodynamic therapy on the skin using the ultrashort laser ablation. **Journal of Biophotonics**, v. 7, n. 8, p. 631-637, 2014.

- 54 MARMUR, E. S.; SCHMULTS, C. D.; GOLDBERG, D. J. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. **Dermatology Surgery**, v. 30, n. s2, p. 264–271, 2004.
- 55 DONNELLY, R. F. et al. Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: Potential for enhanced topical photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 129, n. 3, p. 154-162, 2008.
- 56 ZHANG, L.-W.; FANG, Y.-P.; FANG. J.-Y. Enhancement techniques for improving 5-aminolevulinic acid delivery through the skin. **Dermatologica Sinica**, v. 29, n. 1, p.1-7, 2011.
- 57 MIKOLAJEWSKA. P. et al. Microneedle pre-treatment of human skin improves 5-aminolevulinic acid (ALA)- and 5-aminolevulinic acid methyl ester (MAL)-induced PpIX production for topical photodynamic therapy without increase in pain or erythema. **Pharmaceutical Research,** v. 27, n. 10, p. 2213–2220, 2010.
- 58 SMITS, T. et al. Fluorescence diagnosis in keratinocytic intraepidermal neoplasias. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, p. 824-831, 2007.
- 59 KLEINPENNING, M. M. et al. Heterogeneity of fluorescence in psoriasis after application of 5-aminolaevulinic acid: an immunohistochemical study. **British Journal of Dermatology**, v.155, n. 3, p. 539–545, 2006.
- 60 IBBOTSON, S. H. et al. Characteristics of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in human skin in vivo. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 22, n. 3, p.105-110, 2006.
- 61 DONNELLY, R. F.et al. Influence of solution viscosity and injection protocol on distribution patterns of jet injectors: application to photodynamic tumour targeting. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:** biology, v. 89, n. 2-3, p. 98-109, 2007.
- 62 BAROLET, D.; BOUCHER, A. No-Needle jet intradermal aminolevulinic acid photodynamic therapy for recurrent nodular basal cell carcinoma of the nose: a case report. **Journal of Skin Cancer**, v. 2011, p.1-5, 2011.
- 63 LI, X. et al. Needle-free injection of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy for the treatment of condylomata acuminata. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 1, p. 236-240, 2013. doi:10.3892/etm.2013.1092.
- 64 MEURENS, F. et al. The pig: a model for human infectious diseases. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 1, p.50-57, 2012.
- 65 SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1–2, p. 51-56, 2001.
- 66 CATZ, P.; FRIEND, D. R. Transdermal delivery of levonorgestrel. VIII. effect of enhancers on rat skin, hairless mouse skin, hairless guinea pig skin, and human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 93-102, 1990.

- 67 SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of Nicorandil. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 2, p. 104-107, 1990.
- 68 DEBEER, S. et al. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 456-466, 2013.
- 69 MOWAFY, M.; CASSENS, R. G. Microscopic structure of pig skin. **Journal of Animal Science**, v.41, n.5, p.1281-1290, 1975.
- 70 VARDAXIS, N. J. et al. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. **Journal of Anatomy**, v. 190, n. 4, p. 601–611, 1997.
- 71 DOUGLAS, W. R. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, sus scrofa, in human medical research. **Space Life Sciences**, v. 3, n. 3, p. 226-234, 1972.
- 72 INGRAM, D. L. Stimulation of cutaneous glands in the pig. **Journal of Comparative Pathology**, v. 77, n. 1, p. 93-99, 1967.
- 73 MARUSYK, A.; POLYAK, K. Cancer cell phenotypes, in fifty shades of grey. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 528-529, 2013.
- 74 PETRELLI, N. J. et al. Photodynamic therapy in the management of neoplasms of the perianal skin. **Archives of Surgery**, v. 127, n. 12, p. 1436-1438, 1992.
- 75 KUBLER, A. C. et al. Photodynamic therapy of primary nonmelanomatous skin tumours of the head and neck. **Lasers in Surgery and Medicine,** v. 25, n. 1, p. 60-68, 1999.
- 76 GROSS, D. J. et al. Squamous cell carcinoma of the lower lip involving a large cutaneous surface. **Archives of Dermatology**, v. 126, n. 9, p. 1148–1150, 1990.
- 77 ZEITOUNI, N. C.; SHIEH, S.; OSEROFF, A. R. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. **Clinics in Dermatology,** v. 19, n. 3, p. 328–339, 2001.
- 78 LANGMACK, K. et al. Topical photodynamic therapy at low fluence rates—theory and practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:** biology, v. 60, n. 1, p. 37-43, 2001.
- 79 MAJIMA, Y.et al. Twist 1 as a possible biomarker for metastatic basal cell carcinoma. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 92, n. 1, p. 621-622, 2012.
- 80 REGULA, J. et al. Photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for experimental pancreatic cancer--prolonged animal survival. **British Journal of Cancer**, v. 70, n. 2, p. 248–254, 1994.
- 81 ANGELL-PETERSEN, E. et al. Influence of light fluence rate on the effects of photodynamic therapy in an orthotopic rat glioma model. **Journal of Neurosurgery**, v. 104, n. 1, p. 109-117, 2006.

- 82 NORUM, O. J. et al. Photochemical internalization of bleomycin is superior to photodynamic therapy due to the therapeutic effect in the tumor periphery. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 3, p. 740-749, 2009.
- 83 SCHACHT. V.; SZEIMIES, R. M.; ABELS, C. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces distinct microcirculatory effects following systemic or topical application. **Photochemical & Photobiology Science**, v. 5, n. 5, p. 452-458, 2006.
- 84 LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial—mesenchymal transition. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v.15, n. 3, p. 178–196, 2014.
- 85 BHANGU, A. et al. Epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer: Seminal role in promoting disease progression and resistance to neoadjuvant therapy. **Surgical Oncology**, v. 21, n. 4, p. 316-323, 2012.
- 86 WALDMANN, J. et al. Expression of the transcription factor snail and its target gene twist are associated with malignancy in pheochromocytomas. **Annals of Surgical Oncology**, v. 16, n. 7, p. 1997-2005, 2009.
- 87 SÁNCHEZ-TILLÓ, E. et al. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. **Oncogene**, v. 29, n. 24, p. 3490-3500, 2010.
- 88 BRABLETZ, T.; JUNG, A.; KIRCHNER, T. B-Catenin and the morphogenesis of colorectal cancer, **Virchows Archiv**, v. 441, n. 1, p.1-11, 2002.
- 89 GJERDRUM, C. et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 3, p. 1124-129, 2010.
- 90 VUORILUOTO, K. et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. **Oncogene**, v. 30, n. 12, p. 1436-1448, 2011.
- 91 ASIEDU, M.K. et al. AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. **Oncogene**, v. 33, n. 10, p. 1316-1324, 2014.
- 92 HONGCHARU, W. et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 183-192, 2000.
- 93 SILVA, A. P. et al. Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 328-330, 2013.
- 94 GURSOY, H. et al. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 4, p. 1113-1125, 2013.
- 95 ITOH, Y. et al. Photodynamic therapy for acne vulgaris with topical 5-aminolevulinic acid. **Archives of Dermatology**, v. 136, n. 9, p. 1093-1095, 2000.

- 96 DEROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 2, p. 1447-1455, 2000.
- 97 JUARRANZ Á. et al. Photodynamic therapy of cancer. basic principles and applications. **Clinical and Translational Oncology**, v. 10, n. 3, p. 148-154, 2008.
- 98 KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389-416, 2000.
- 99 WOLF, P.; RIEGER, E.; KERL. H. Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid: an alternative treatment modality for solar keratosis, superficial squamous cell carcinomas, and basal cell carcinomas? **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 17-21, 1993.
- 100 SVANBERG, K. et al. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumors of the skin using topical δ-aminolevulinic acid sensitization and laser irradiation. **British Journal of Dermatology**, v. 130, n. 6, p. 743-751, 1994
- 101 MORTON, C. A.et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. **Archives of Dermatology**, v. 134, n. 2, p. 248-249, 1998.
- 102 CALZAVARA-PINTON, P. G. Repetitive photodynamic therapy with topical  $\delta$ -aminolevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:** biology, v. 29, n. 1, p. 53-57, 1995.
- 103 SOLER, A. M. et al. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 3, p. 467-471, 2001.
- 104 MORTON, C.A. et al. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. **British Journal of Dermatology**, v.146, n. 4, p. 552–567, 2002.
- 105 MORHENN, V. B.; CHANG, E-Y.; RHEINS, L. A. A noninvasive method for quantifying and distinguishing inflammatory skin reactions. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 41, n. 5, p. 687-692, 1999.
- 106 BERRUTTI, L. E.; SINGER, A. J.; MCCLAIN, S. A. Histopathologic effects of cutaneous tape stripping in pigs. **Academic Emergency Medicine**, v. 7, n. 12, p. 1349-1353, 2000.
- 107 KLANG, V. et al. Facilitating in vitro tape stripping: application of infrared densitometry for quantification of porcine stratum corneum proteins. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 5, p. 256-268 2011.
- 108 BOUDRY, I. et al. Percutaneous penetration and absorption of parathion using human and pig skin models in vitro and human skin grafted onto nude mouse skin model in vivo. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, n.5, p.645-657, 2008.

- 109 TECHNOLOGIE. 2015. Disponível em: <a href="http://rojex.info/technologie">http://rojex.info/technologie</a>. Acesso em: 2 out. 2016.
- 110 GRECCO, C.et al. Necrosis response to photodynamic therapy using light pulses in the femtosecond regime. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 4, p. 1177–1182, 2013.
- 111 PRATAVIEIRA, S.et al. Optical imaging as auxiliary tool in skin cancer diagnosis. In: LA PORTA, C. A. M. (Ed.) **Skin cancers** risk factors, prevention and therapy Intech, 2011. cap. 7, p. 159-172. doi: 10.5772/25465.
- 112 LINCE. 2015. **MMOptics**. Disponível em: <ptb/>pt-mmo.com.br/produtos/medicina/lince>. Acesso em: 2 out. 2016.
- 113 LINCE terapia fotodinâmica. 2014. Disponível em: <a href="http://www.aqua.med.br/lince-terapia-fotodinamica/">http://www.aqua.med.br/lince-terapia-fotodinamica/</a>. Acesso em: 2 out. 2016.
- 114 FUJITA, A. K. L. Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da associação dos precursores da PpIX (ALA e MAL) em epitélio suíno. 2016. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 115 LECTOR de placas. 2010. Disponível em: <a href="https://es.wikipedia.org/wiki/Lector\_de\_placas/">https://es.wikipedia.org/wiki/Lector\_de\_placas/</a>. Acesso em: 2 out. 2016.
- 116 MACCORMACK, M. A. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. **Photodynamic Therapy in Dermatology,** v. 27, n. 1, p. 52-62, 2008.
- 117 DI VENOSA, G. M. et al. Investigation of a novel dendritic derivative of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy, **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 1, p. 82-91, 2006.
- 118 JUZENIENE, A. et al. Topical application of 5-aminolevlinic acid, methyl 5-aminolevulinate and hexyl 5-aminolevulinate on normal human skin. **British Journal of Dermatology**, v. 155, n. 4, p. 791-799, 2006.
- 119 JUZENAS, P. et al. Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy during application of 5-aminolevulinic acid in vivo. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, n. 10, p. 745-748, 2002.
- 120 KRIEG, R. C. et al. Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 2, p. 226-233, 2000.
- 121 IINUMA, S. et al. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. **British Journal of Cancer**, v. 70, n. 1, p. 21-28, 1994.
- 122 UEHLINGER, P.et al. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**: biology, v. 54, n. 1, 30, p. 72-80, 2000.

- 123 DE BLOIS, A. W. et al. In vivo pharmacokinetics of protoporphyrin IX accumulation following intracutaneous injection of 5-aminolevulinic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:** biology, v. 61, n. 1–2, p. 21-29, 2001.
- 124 DÖGNITZ, N. et al. Comparison of ALA- and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth distribution in human skin carcinoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:** biology, v. 93, n. 3, p. 140-148, 2008.
- 125 PENG, Q. et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. **Cancer**, v. 79, n. 12, p. 2282–2308, 1997.
- 126 SVAASAND, L. O. et al. Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administrated photosensitizers. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 139-149, 1996.
- 127 AALDERS, M. C. G. et al. A mathematical evaluation of dose-dependent PpIX fluorescence kinetics in vivo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 2, p. 311-317, 2001.
- 128 VAN DEN AKKER, J. T. H. M. et al. Topical application of 5-Aminolevulinic acid Hexyl Ester and 5-Aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in Protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 5, p. 681-689, 2000.
- 129 ELÉOUET, S. et al. *In Vitro* fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by δ-Aminolevulinic Acid (ALA) or ALA-Esters. **Photochemistry and Photobiology,** v. 71, n. 4, p. 447-454, 2000.
- 130 CHANG, S. K.; RIVIERE, J. E. Percutaneous absorption of parathion in vitro in porcine skin: effects of dose, temperature, humidity, and perfusate composition on absorptive flux. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 494-504, 1991.
- 131 CRAIG, N.; CUMMINGS, E. G.; SIM, V. M. Environmental temperature and the percutaneous absorption of a cholinesterase inhibitor, Vx. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 68, n. 6, p. 357-361, 1977.
- 132 FUJITA, A. K. L. et al. Fluorescence evaluations for porphyrin formation during topical PDT using ALA and Methyl ALA mixtures in pig skin model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, n. 1, p. 236-244, 2016.
- 133 RODRIGUES, P. G. S. et al. Assessment of ALA-induced PpIX production in porcine skin pretreated with microneedles. **Journal of Biophotonics.** v. 8, n. 9, p. 723-729, 2015.
- 134 FELDMANN, R. J.; MAIBACH, H. Regional variation in percutaneous penetration of 14C cortisol in man, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 48, n. 2, p. 181-183, 1967.
- 135 FAIRLEY, J. A.; RASMUSSEN, J. E. Comparison of stratum corneum thickness in children and adults, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 5, p. 652-654, 1983.

- 136 ELIAS, P. M. et al. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 76, n. 4, p. 297-301, 1981.
- 137 LEVIN, J.; MAIBACH, H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 2, p. 291-299, 2005.
- 138 ANDREWS, S. N.; JEONG, E.; PRAUSNITZ, M. R. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 4, p. 1099-1109, 2013. doi: 10.1007/s11095-012-0946-7.
- 139 WALTERS, K. A. Trandermal drug delivery. In: \_\_\_\_\_. **Topics in pharmacology:** routes of drug administration. 2nd ed. London: United Kingdom, 1990. cap. 4. p.78-137.
- 140 WEERHEIM, A.; PONEC, M. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. **Archives of Dermatological Research**, v. 293, n. 4, p. 191-199, 2001.
- 141 BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, n. 1, p. 85-97, 1987.
- 142 MARTANTO, W. et al. Microinfusion using hollow microneedles. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 1, p. 104-113, 2006.
- 143 VERBAAN, F. J. et al. Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method, **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 1, p. 80-88, 2008.
- 144 YAN, G. et al. Evaluation needle length and density of microneedle arrays in the pretreatment of skin for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, n. 1-2, p. 7-12, 2010.
- 145 MARTANTO, W. et al. Mechanism of fluid infusion during microneedle insertion and retraction. **Journal of Controlled Release**, v. 112, n. 3, p. 357-361, 2006.
- 146 GOMMA, Y. A. et al. Effects of microneedle length, density, insertion time and multiple applications on human skin barrier function: assessments by transepidermal water loss. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 7, p. 1971-1978, 2010.
- 147 WAGNER, S. et al. Assessment of biological performance of the needle-free injector INJEX using the isolated porcine forelimb. **British Journal of Dermatology**, v. 150, n. 3, p. 455-461, 2004.
- 148 CHASE, C. C. L. et al. Needle-free injection technology in swine: progress toward vaccine efficacy and pork quality. **Journal of Swine Health and Production**, v. 16, n. 5, p. 254-261, 2008.
- 149 DONNELLY, R. F.et al. Influence of solution viscosity and injection protocol on distribution patterns of jet injectors: application to photodynamic tumor targeting, **Journal of Photochemistry and Photobiology B**: biology, v. 89, n. 2-3, p. 1011-1344, 2007. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2007.09.009.

- 150 SCHRAMM-BAXTER, J.; MITRAGOTRI, S. Needle-free jet injections: dependence of jet penetration and dispersion in the skin on jet power. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 527-535, 2004.
- 151 KALE, T. R.; MOMIN, M. Needle free injection technology an overview. **Innovations in Pharmacy**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2014.
- 152 MITRAGOTRI, S. Current status and future prospects of needle-free liquid jet-injectors. **Nature Reviews:** drug discovery, v. 5, n. 7, p. 543-548, 2006.
- 153 DE ROSA, F. S. et al. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy, **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 3, p. 359-366, 2000.
- 154 DIVARIS, D. X.; KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration of 5-aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. **American Journal of Pathology**, v. 136, n. 4, p. 891-897, 1990.
- 155 MAWAFY, M.; CASSENS, R. G. Microscopy structure of pig skin. **Journal of Animal Science**, v.41, n.5, p.1281-1290, 1975.
- 156 SAKAMOTO, F. H. et al.. Porphyrin distribution after topical aminolevulinic acid in a novel porcine model of sebaceous skin. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 2, p. 154-160, 2009.

## APÊNDICE A – Publicações relacionadas ao tema

### ARTIGO CIENTÍFICO

**RODRIGUES, P. G. S.**; CAMPOS DE MENEZES, P. F.; FUJITA, A. K. L.; ESCOBAR, A.; BARBOZA DE NARDI, A.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Assessment of ALA-induced PpIX production in porcine skin pretreated with microneedles. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 723-729, 2015. DOI: 10.1002/jbio.201400081.

FUJITA, A. K. L.; **RODRIGUES, P. G. S.**; REQUENA, M. B.; ESCOBAR, A.; ROCHA, R. W.; DE NARDI, A. B.; KURACHI, C.; CAMPOS DE MENEZES, P. F.; BAGNATO, V. S. Fluorescence evaluations for porphyrin formation during topical PDT using ALA and Methyl ALA mixtures in pig skin model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 15, n. 1, p. 236-244, 2016. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.05.008.

PAOLILLO, F.R.; ROMANO, R. A.; MATOS, L. de; **RODRIGUES, P.G.S.**; PANHÓCA, V.H.; Martin, A.A.; SOARES, L.E.S.; NETO, J.C.de C.; BAGNATO, V.S. Fluorescence spectroscopy of teeth and bones of rats to assess demineralization: *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**. v. 165, n.1, p.291-297. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.10.035.

#### CAPÍTULO DE LIVRO

STRINGASCI, M. D.; **RODRIGUES, P. G. S**.; FUJITA, A. K. L.; RUSSIGNOLI, P. E.; BAGNATO, V. S. Perspectivas para terapia fotodinâmica. In: **Terapia fotodinâmica dermatológica**: programa TFD Brasil. São Carlos: Compacta, 2015. p. 301-313.

#### **PROCEEDING**

RODRIGUES, P. G.S.R, MENEZES, P.F.C., FUJITA, A.K.L., REQUENA, M.B., GOVONE A. B., DE NARDI, A.B., KURACHI, C, BAGNATO, V.S. Microneedles rollers as a potential device to increase ALA diffusion and PpIX production: evaluations by wide-field fluorescence imaging and fluorescence spectroscopy. In SPIE Photonic west: Photonic Therapeutics and Diagnostics X, 2014, San Francisco-CA. DOI: 10.1117/12.2040618.