UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAROLINA DE PAULA CAMPOS

Terapia fotodinâmica na pele fotoenvelhecida de camundongos *hairless*:
iluminação única e fracionada

São Carlos

2015

CAROLINA DE PAULA CAMPOS

Terapia fotodinâmica na pele fotoenvelhecida de camundongos *hairless*:
iluminação única e fracionada

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

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2015

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

Campos, Carolina de Paula

Terapia fotodinâmica na pele fotoenvelhecida de camundongos hairless: iluminação única e fracionada / Carolina de Paula Campos; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2015.
95 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Fotoenvelhecimento. 3. Iluminação Fracionada. 4. Camundongo hairless. 5. Histologia. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

Aos meus pais, Ana Maria e Horigenes,
e minha irmã, Camila, por acreditarem em mim,
serem meu porto seguro e minha fonte de inspiração

Agradecimentos

À Deus, pela minha vida e pelos ensinamentos que modelam o meu caráter e me trazem tranquilidade em momentos de necessidade.

Aos meus pais, Ana Maria e Horigenes, pela criação que me deram e valores que me passaram. Agradeço por estarem sempre ao meu lado me dando força, conselhos e muito amor. Vocês são meu orgulho e exemplo de vida.

À minha irmã, Camila, que sempre comemorou de longe cada vitória que tive durante minha graduação e mestrado. Obrigada pelo apoio e carinho.

A toda minha família, pelo apoio e amor incondicional.

À minha orientadora, Prof. Dra. Cristina Kurachi, por me receber como aluna e me orientar durante o mestrado. Obrigada pelos ensinamentos, atenção e carinho durante essa minha jornada científica.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Bagnato, pelas valiosas contribuições para este trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro ao projeto.

À Ana Elisa Jorge e à Camila D'Almeida, pessoas que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela amizade e por estarem sempre à disposição para me auxiliar com experimentos e boas discussões.

A todos os colegas do Laboratório de Biofotônica, por proporcionarem um agradável ambiente de trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar, em especial Clóvis Grecco, Sebastião Pratavieira, José Dirceu Filho e Marcelo Nogueira.

Ao pessoal do Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT), Laboratório de Instrumentação Eletrônica (LIEPO) e da oficina mecânica pelo auxílio com a instrumentação.

Às minhas amigas de Mogi das Cruzes, Paula, Camila, Caroline, Ellen, Júlia e Maíra, que mesmo à distância sempre torceram por mim. Obrigada pelo carinho!

Aos meus amigos de São Carlos, em especial, Laís, Ana Laura, Thomás, Ilaiáli, Bruno, Camila e Angelo, que estiveram sempre presentes. Obrigada pelo carinho, pela amizade e pela ajuda com o trabalho, vocês fizeram toda a diferença!

RESUMO

CAMPOS, C. P. **Terapia fotodinâmica na pele fotoenvelhecida de camundongos *hairless***: iluminação única e fracionada. 2015. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

O fotoenvelhecimento é uma condição dérmica decorrente da sobreposição do envelhecimento cronológico e dos efeitos da exposição crônica à radiação ultravioleta (UV) solar. A pele fotodanificada é um local propício para o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas que podem evoluir para casos de câncer de pele. Logo, o tratamento dessa condição não é apenas de cunho estético, mas também preventivo. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que se baseia na fotoativação de uma molécula fotossensível, que na presença de oxigênio, produz espécies citotóxicas que levam à morte da célula e tecido alvo. Esta técnica tem sido utilizada em estudos clínicos para o tratamento da pele fotoenvelhecida, e tem apresentado bons resultados funcionais e cosméticos. São muitas as variações em parâmetros como fonte de luz, dose e tipo de fotossensibilizador. A TFD fracionada utiliza um tempo de escuro entre frações da dose total e mostra-se mais eficiente que a iluminação em uma única dose, porém seu efeito no tratamento da pele fotoenvelhecida ainda é desconhecido. Neste trabalho, um protocolo de TFD foi desenvolvido para comparar o resultado da terapia com iluminação dose única e fracionada aplicada no fotoenvelhecimento. A avaliação foi através de histologia e espectroscopia de fluorescência e tempo de vida de fluorescência. Camundongos *hairless* foram fotoenvelhecidos e tratados com luz LED violeta (404 nm) e creme 20% ALA (1h de incubação) com dose única (1 J.cm^{-2}) e fracionada (duas frações de $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$ e 10 min de escuro). O efeito da TFD fracionada foi mais intenso, causando ulcerações na pele e alterações histológicas características. Esse resultado mostrou que a TFD com iluminação fracionada não foi adequada para o tratamento da pele fotoenvelhecida. A análise por tempo de vida de fluorescência foi capaz de mostrar alterações durante as semanas de recuperação. Acredita-se que essa informação venha da epiderme devido ao remodelamento observado nessa camada.

Palavras-chave: Fotoenvelhecimento. Terapia fotodinâmica. Iluminação fracionada. Camundongos *hairless*.

ABSTRACT

CAMPOS, C. P. **Photodynamic Therapy on hairless mice photoaged skin: single and fractionated illumination.** 2015. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Photoaging is a skin condition resulting from the overlap of chronological aging and the effects of chronic exposure to sunlight ultraviolet (UV). Photodamaged skin is more susceptible for the development of pre-cancerous lesions, which can become skin cancer. Therefore, the treatment of this condition is not only of aesthetic concern but it is also of preventive nature. Photodynamic therapy (PDT) is a technique based on the photoactivation of a light-sensitive molecule, which, in the presence of oxygen produce cytotoxic species that lead to cell death and tissue destruction. This technique has been used in clinical trials for the treatment of photoaged skin, and it has presented good functional and cosmetic results. There are many variations on PDT parameters such as the light source, dose and type of photosensitizer. Fractionated PDT is one these variations which uses a dark interval between light fractions. Studies show that this illumination scheme enhances the therapeutic efficacy, although its effects in the treatment of photoaged skin are still unknown. In this work, a protocol was developed to compare the outcome of PDT with single and fractionated illumination applied in photoaging. The assessments were made by histology and by the optical technics: steady state and lifetime fluorescence spectroscopy. Photoaging was induced in hairless mice skin which were then treated with violet LED (404 nm) and 20% ALA cream (1h of incubation) with either single (1 J.cm⁻²) or fractionated (2 fractions of 0.5 J.cm⁻² and 10 min of dark interval) doses. The effect of fractionated PDT was more intense, causing ulcerations on the skin and distinctive histological changes. This result shows that PDT with fractionated illumination was not suitable for the treatment of photoaged skin. The analysis by fluorescence lifetime spectroscopy was able to reveal changes during the recovery weeks. It is believed that this information comes from the epidermis due to the remodeling observed in this layer.

Keywords: Photoaging. Photodynamic therapy. Fractionated illumination. Hairless mice.

Lista de Figuras

Figura 1 –	Camadas da pele.....	21
Figura 2 –	Representação esquemática das características da pele jovem, envelhecida e fotoenvelhecida. A pele jovem apresenta um balanço na composição e distribuição de suas células e componentes. A pele intrinsecamente envelhecida apresenta redução na espessura da epiderme (E) e da derme (D) e diminuição da quantidade de colágeno e elastina. A pele fotoenvelhecida revela espessamento da camada córnea (EC), derme e epiderme, presença de queratinócitos atípicos e células inflamatórias além de achatamento da junção derme-epiderme (JDE). O conteúdo de colágeno é menor e danificado e há uma maior população de fibras elásticas formando uma estrutura não funcional.....	24
Figura 3 –	Ilustração esquemática da TFD. CIS: Cruzamento Intersistema, EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.....	27
Figura 4 –	Perfil espectral de absorção e emissão da PpIX.....	29
Figura 5 –	Janela terapêutica do tecido. Os espectros de absorção da água, oxi (HbO ₂) e desoxihemoglobina (Hb) e melanina estão mostrados em escala logarítmica.....	30
Figura 6 –	Espectros de absorção e emissão dos principais fluoróforos da pele.....	33
Figura 7 –	Camundongo <i>hairless</i> , linhagem HRS/J.....	37
Figura 8 –	Montagem dos grupos experimentais.....	38
Figura 9 –	Aparato de iluminação para o fotoenvelhecimento.....	39
Figura 10 –	Medida da irradiância nos potes. A. Posição dos potes em relação às lâmpadas. B. arranjo da medida de irradiância dentro dos potes.....	39
Figura 11 –	Gráficos do espectro de emissão das lâmpadas tubulares Philips TL 40W/12 RS medido com o espectrofotômetro USB 4000. A: Espectro completo, B: Região do UV.....	40
Figura 12 –	Posicionamento das gaiolas sobre a mesa para nova medida de irradiância.....	41
Figura 13 –	A: Espectro de emissão das lâmpadas na faixa do UV medido com o espectroradiômetro. B: Valores da irradiância nas quatro posições dos recipientes.....	42
Figura 14 –	A: Dispositivo LED utilizado para a iluminação da TFD. B: Espectro de emissão do LED.....	44
Figura 15 –	Procedimentos da TFD.....	45
Figura 16 –	A: Equipamento fotográfico e B: Maleta com o sistema de diagnóstico.....	46
Figura 17 –	Representação do sistema de aquisição de medidas de tempo de vida de fluorescência.....	47
Figura 18 –	Medidas de tempo de vida de fluorescência no flanco dos camundongos.....	48
Figura 19 –	Esquema das medidas de espessura da derme e epiderme (A) e contagem de células (B) no programa ImageJ.....	50
Figura 20 –	Cálculo da variável densidade. A: Imagem da absorbância. B: Imagem em tons de cinza com os 8 perfis traçados. C: Média dos 8 perfis em função da profundidade.	51
Figura 21 –	Esquema dos principais procedimentos realizados com os animais durante este trabalho. FE: Fotoenvelhecimento.....	52
Figura 22 –	Comparação da pele envelhecida e fotoenvelhecida. A: Camundongo envelhecido (GC) com 22 semanas de idade. B: Camundongo fotoenvelhecido (GF) com 18	

	semanas de idade após 10 semanas de radiação.....	53
Figura 23 –	Imagens histológicas da pele envelhecida (A) e fotoenvelhecida (B) coradas com HE (1) e TM (2). Aumento 100x, barra de escala 100 μ m.....	54
Figura 24 –	Registro fotográfico da produção e consumo da PpIX pré (imagens superiores) e pós TFD (imagens inferiores). A: animal do grupo TFD 1; B: animal do grupo TFD 2 e C: animal do grupo E-TFD 2	56
Figura 25 –	Exemplo dos espectros de fluorescência obtidos, mostrando a produção e o consumo de PpIX. A: Espectros referentes a um camundongo do grupo TFD 2, B: Espectros referentes a um camundongo do grupo Envelhecido + TFD 2. Laser centrado em 532 nm.....	58
Figura 26 –	Lesão imediatamente após a TFD 2 em um animal do subgrupo G6.....	58
Figura 27 –	Acompanhamento fotográfico dos animais pós TFD. As colunas A, B e C são referentes a animais dos subgrupos G1, G3 e G5, respectivamente. Cada linha contém a foto de determinado dia: linhas 1 a 6 equivalem aos dias 1, 3, 5, 7, 12 e 14 pós TFD.....	60
Figura 28 –	Acompanhamento fotográfico dos animais pós TFD. As colunas A, B e C são referentes a animais dos subgrupos G2, G4 e G6, respectivamente. Cada linha contém a foto de determinado dia: linhas 1 a 7 equivalem aos dias 1, 3, 5, 7, 13, 21 e 28 pós TFD.....	61
Figura 29 –	Imagens fotográficas dos animais dos grupos TFD 1 (contorno verde) e TFD 2 (contorno roxo) no terceiro dia após a TFD. Na caixa branca, estão as informações que indicam o subgrupo (G1 a G4) e o camundongo (C1 a C5).....	62
Figura 30 –	Imagens do flanco de 3 animais do subgrupo G4 no 17º dia de acompanhamento pós TFD.....	63
Figura 31 –	Espectros de fluorescência de um animal do subgrupo G6 durante as 4 semanas pós TFD. Em destaque estão os principais picos dos perfis espectrais obtidos.....	65
Figura 32 –	Gráficos das razões R_a (1), R_b (2) e R_c (3) para os animais fotoenvelhecidos tratados com TFD 2 (A) e para os animais envelhecidos tratados com a TFD 2 (B)...	66
Figura 33 –	Imagens histológicas da pele de dois camundongos de cada subgrupo. Coloração HE. Aumento 400x. Barra de escala 50 μ m.....	69
Figura 34 –	Imagens histológicas da pele de dois camundongos de cada subgrupo. Coloração TM. Aumento 400x. Barra de escala 50 μ m.....	71
Figura 35 –	Densidade de células na derme.....	74
Figura 36 –	Gráficos das espessuras da epiderme (A) e da derme (B) dos animais.....	74
Figura 37 –	Imagens de absorbância e gráficos de V_{DENS}	76
Figura 38 –	Comportamento dos parâmetros a_1 e a_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 378 nm.....	80
Figura 39 –	Comportamento dos parâmetros τ_1 e τ_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 378 nm.....	81
Figura 40 –	Comportamento dos parâmetros a_1 e a_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 445 nm.....	82
Figura 41 –	Comportamento dos parâmetros τ_1 e τ_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 445 nm.....	83

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Doses diárias e respectivos tempos de irradiação do protocolo de fotoenvelhecimento.....	41
Tabela 2 –	Doses diárias iniciais e corrigidas do protocolo de fotoenvelhecimento.....	42
Tabela 3 –	Doses de luz utilizadas na TFD por subgrupo.....	56
Tabela 4 –	Dias em que os subgrupos foram fotografados após a TFD. As células escuras marcam o dia da morte dos animais.....	59
Tabela 5 –	Aumento e diminuição percentuais das espessuras da epiderme e da derme dos subgrupos G1 a G6 relativos ao GC e GF.....	75

Lista de Siglas e Abreviaturas

ALA – Ácido 5-aminolevulínico
CA – Ceratose actínica
CBC – Carcinoma basocelular
CEC – Carcinoma espinocelular
CIS – Cruzamento Intersistema
D – Derme
DMSO – Dimetilsulfóxido
E – Epiderme
EC – Camada córnea
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FAD – Flavina adenina dinucleotídeo
FE – Fotoenvelhecida
FS – Fotossensibilizador
GAG – Glicosaminaglicanos
GC – Subgrupo envelhecido
GF – Subgrupo fotoenvelhecido
Hb – Desoxihemoglobina
HbO₂ – Oxihemoglobina
HE – Hematoxilina-eosina
IP – Via intraperitoneal
IPL – Luz intensa pulsada
JDE – Junção derme-epiderme
LED – Light emitting diode
MAL – Metil aminolevulinato
MEC – Matriz extracelular
MED – Dose mínima eritematosa
MMPs – Proteases da matriz extracelular
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PDL – Laser pulsado

PpIX – Protoporfirina IX

TCSPC – Time Correlated Single Photon Counting

TM – Tricômio de masson

TFD – Terapia fotodinâmica

UV – Radiação ultravioleta

UVA – Radiação ultravioleta A

UVB – Radiação ultravioleta B

Sumário

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Fotoenvelhecimento	21
2.2 Terapia Fotodinâmica.....	25
2.2.1 Fotossensibilizador	28
2.2.2 Fonte de Luz	29
2.3 Terapia Fotodinâmica na Pele Fotoenvelhecida	31
2.4 Diagnóstico Óptico	32
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Animais.....	37
4.2 Grupos do Estudo.....	37
4.3 Protocolo de fotoenvelhecimento	38
4.4 Terapia Fotodinâmica.....	43
4.5 Avaliação Clínica.....	45
4.6 Avaliação por fluorescência	46
4.7 Avaliação Histológica.....	49
4.8 Organograma dos métodos do estudo	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Pele fotoenvelhecida.....	53
5.2 Comparação entre TFD 1 e TFD 2.....	55
5.2.1 Produção e Consumo da PpIX	56
5.2.2 Resultado Clínico	59
5.2.3 Fluorescência da pele.....	64
5.2.4 Histologia.....	67
5.2.5 Tempo de vida de fluorescência	79
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO

Ao envelhecer, a pele humana sofre modificações em sua aparência e em sua função mecânica. Estes fenômenos podem ser agravados e antecipados por agentes ambientais como a radiação solar (1) A exposição crônica a essa radiação resulta em efeitos biológicos como o fotoenvelhecimento cutâneo e, em casos mais graves, a fotocarcinogênese. (2) No Brasil, grande parte do território apresenta índices de radiação UV que chegam a níveis extremos de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS). (3) A frequente exposição abusiva ao sol combinada à falta de proteção adequada torna a população brasileira predisposta ao fotoenvelhecimento e, em casos mais severos, ao câncer de pele.

A preocupação com o fotoenvelhecimento não é apenas de cunho estético, mas também funcional. Logo, a busca por tratamentos que revertam ou previnam essa condição é de grande importância. Nas últimas duas décadas, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido amplamente utilizada no tratamento de diversas condições dermatológicas. Esta é uma técnica não invasiva que utiliza luz, moléculas fotossensíveis e oxigênio para gerar espécies citotóxicas e promover a morte seletiva do tecido alvo. (4)

No ramo dermatológico, a TFD é aplicada no tratamento de ceratose actínica (CA), câncer de pele não-melanoma e condições não-oncológicas como acne, psoríase, verrugas e infecções. (5) A sua utilização na pele fotoenvelhecida vem ganhando espaço principalmente em estudos clínicos e tem apresentado bons resultados. (6–12) No entanto, a maioria dos estudos apresenta apenas os resultados macroscópicos devido à inviabilidade estética de obter uma biópsia da pele do rosto humano. Dessa forma, ainda não há um completo entendimento do processo de recuperação do tecido após a terapia, especialmente no que se refere à pele fotoenvelhecida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fotoenvelhecimento

A pele é o maior órgão do corpo humano e exerce funções vitais, principalmente como primeira barreira física protetora contra microorganismos e agentes químicos e físicos. Esta é organizada em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). Estão presentes na epiderme: melanócitos, células de Langerhans e queratinócitos, esses últimos correspondendo à vasta maioria (90-95%). Na interface entre epiderme e derme encontra-se a junção derme-epiderme (JDE), uma membrana com papel fundamental no suporte mecânico da adesão entre as duas camadas. Na derme, estão células como os fibroblastos e mastócitos, e moléculas que compõem a matriz extracelular (MEC), como colágeno, elastina, glicosaminoglicanos (GAG), glicoproteínas e proteoglicanos. (13) Todos esses componentes apresentam alterações durante o processo de envelhecimento, processos patológicos e de reparação.

Figura 1 – Camadas da pele.

Fonte: Adaptada de SKIN (14)

O envelhecimento da pele é um fenômeno complexo que ocorre através de dois processos distintos, um intrínseco e um extrínseco. O envelhecimento intrínseco (ou cronológico) é um processo natural caracterizado por mudanças químicas e

morfológicas. Já o envelhecimento extrínseco é causado por fatores externos, principalmente a exposição crônica à radiação solar. Nas regiões do corpo expostas ao sol, como dorso das mãos, braços, rosto e pescoço, há a sobreposição destes efeitos, definindo o processo chamado fotoenvelhecimento. (15)

O principal agente externo responsável pelo fotoenvelhecimento é a radiação ultravioleta (UV) presente na luz solar. Os raios UV do tipo A (UVA, 315 – 400 nm) e do tipo B (UVB, 290 – 315 nm) provocam danos através de 2 mecanismos: i) a radiação é absorvida diretamente por componentes celulares, os quais são excitados e podem reagir com outras moléculas, ou ii) a radiação é usada para excitar cromóforos endógenos para o estado triplete, que podem, através de transferência de elétrons, gerar radicais livres (reação Tipo I) ou gerar oxigênio singlete transferindo energia para o O_2 (reação Tipo II). (16) O oxigênio singlete e as espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, formados por esses mecanismos são responsáveis pelo estresse oxidativo na célula. As EROs podem interagir com biomoléculas como proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) diretamente ou através de reações em cadeia. (17) Vias de sinalização relacionadas com crescimento, diferenciação, senescência e degradação do tecido conjuntivo também pode ser ativadas pelas EROs. (18) Isso significa que estas não apenas podem promover danos funcionais e estruturais nas proteínas da MEC, interagindo diretamente com elas, mas também podem, por exemplo, aumentar a atividade de proteases da MEC (MMPs, do inglês *matrix metalloproteases*) (18) resultando em degradação de componentes da matriz e promovendo características da pele fotoenvelhecida. Em casos mais severos, a radiação UV pode induzir danos no DNA e provocar mutações genéticas que culminam no desenvolvimento de câncer de pele. (19)

Ao nível macroscópico, a pele intrinsecamente envelhecida e a fotoenvelhecida apresentam diferenças discerníveis. Alguns sintomas clínicos do envelhecimento cronológico são pele fina, flácida, presença de rugas finas, pigmentação homogênea e ocasional incidência de lesões pré-malignas. Já no fotoenvelhecimento, os sintomas são pele espessa, nodular, amarelada, com presença de rugas acentuadas, manchas de pigmentação e alta incidência de lesões pré-malignas. (17) Estas características clínicas distintas são decorrentes de alterações histológicas particulares para cada tipo de envelhecimento.

Tanto a epiderme quanto a derme sofrem modificações devido à exposição crônica aos raios UV. Entretanto, a camada dérmica apresenta mudanças mais evidentes em termos de proporção e funcionalidade de seus componentes extracelulares. (20) A resposta inicial da epiderme ao fotodano é um reparo hiperproliferativo, resultando em seu espessamento. Também estão presentes sutis mudanças displásicas como atipia celular, perda da polaridade dos queratinócitos e aumento da melanogênese. (17) A JDE apresenta um achatamento devido à redução de colágeno tipo VII (fibrila de ancoragem) responsável pela sua estabilização. (18) Na derme, há uma diminuição na quantidade de colágeno devido à redução na produção das fibras e ao aumento da atividade de MMPs. Além disso, há menor quantidade de colágeno maduro devido à diminuição das ligações cruzadas de colágeno provocadas pela radiação UV. É observada também a presença de elastose - caracterizada por um material elastótico formado por fibras elásticas disfuncionais e estruturalmente desorganizadas - além de um aumento na quantidade de células inflamatórias, GAGs e fibroblastos com formato alongado e colapsado. (15,20) Ainda na derme é possível notar uma considerável redução e desorganização de pequenos vasos sanguíneos e também um marcante aumento no tamanho das glândulas sebáceas. (17)

Em contraste, a pele intrinsecamente envelhecida apresenta uma leve redução na espessura da epiderme e redução em número e função dos melanócitos. Assim como no fotoenvelhecimento, ocorre a diminuição do contato entre derme e epiderme devido ao achatamento da JDE. Na derme, há uma diminuição da biossíntese de colágeno e elastina, reduzindo a quantidade dessas moléculas na pele envelhecida. No entanto, há um aumento na quantidade de colágeno maduro. Além disso, é observada uma leve diminuição na microvasculatura e um aumento no tamanho das glândulas sebáceas. (17,21) A Figura 2 resume as principais características da pele jovem, envelhecida e fotoenvelhecida.

Figura 2 – Representação esquemática das características da pele jovem, envelhecida e fotoenvelhecida. A pele jovem apresenta um balanço na composição e distribuição de suas células e componentes. A pele intrinsecamente envelhecida apresenta redução na espessura da epiderme (E) e da derme (D) e diminuição da quantidade de colágeno e elastina. A pele fotoenvelhecida revela espessamento da camada córnea (EC), derme e epiderme, presença de queratinócitos atípicos e células inflamatórias além de achatamento da junção derme-epiderme (JDE). O conteúdo de colágeno é menor e danificado e há uma maior população de fibras elásticas formando uma estrutura não funcional.

Fonte: Adaptada de WLASCHEK et al. (18)

Devido às dificuldades éticas e estéticas de obtenção de biópsias da pele humana para melhor compreensão dos efeitos histológicos do acúmulo de radiação UV, houve a necessidade da introdução de um modelo animal cujas modificações dos tecidos se assemelhassem com as ocorridas em humanos. Em 1980 foi publicado o primeiro trabalho demonstrando indução de elastose em camundongos *hairless* (sem pelo). (22) Nos anos seguintes, outros estudos experimentais (23–27) comprovaram que o camundongo *hairless* mimetiza as características da pele fotoenvelhecida humana, tornando-o o modelo ideal para este tipo de estudo.

Existem diferentes linhagens desse animal, tais como o SKH-1 (Charles River Laboratory, EUA) e o HRS/J (The Jackson Laboratory, EUA). (28) Ambas as linhagens carregam um gene mutante para ausência de pelo (28), o que facilita principalmente estudos dermatológicos; além disso, os animais são albinos, favorecendo a utilização de técnicas ópticas para a análise da pele. Os camundongos HRS/J são menos utilizados que os SKH-1, pois possuem leucemia.

No entanto, são camundongos isogênicos e por isso retiram a variabilidade genética do experimento, podendo-se diminuir o seu número por grupo em experimentos.

Os primeiros pesquisadores a utilizarem camundongos *hairless* para examinar o fotoenvelhecimento foram Kligman e colaboradores. Estes irradiaram camundongos SKH-1 principalmente com UVB, 3 vezes por semana, por 30 semanas. As doses foram gradativas e atingiram no máximo 6 vezes a dose mínima eritematosa (MED), menor dose necessária para causar eritema visível após 24 horas. As principais mudanças observadas foram hiperplasia da epiderme, aumento das glândulas sebáceas, espessamento da derme, elastose, dano ao colágeno maduro e aumento de GAGs. (23), comprovando histologicamente a semelhança com a pele fotoenvelhecida humana.

As alterações visíveis presentes na pele fotodanificada também foram estudadas em modelo animal. Moloney e seu grupo irradiaram camundongos SKH-1 com luz UVB 3 vezes por semana, por 20 semanas. Na décima semana a dose acumulada foi de $4,4 \text{ J.cm}^{-2}$ e ao final do protocolo foi de $9,8 \text{ J.cm}^{-2}$. Foram observados sinais de rugas nos animais irradiados a partir da sexta semana e, através de análises morfométricas, foi constatado um aumento na espessura da epiderme – 22 μm no animal controle e 54 μm no animal irradiado. (25)

2.2 Terapia Fotodinâmica

TFD é uma técnica não invasiva utilizada para tratamento de diversas disfunções da pele, tais como o câncer e condições pré-cancerígenas. (29) Esta consiste na combinação de luz, um fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular, gerando espécies citotóxicas e causando a morte celular por apoptose e necrose tecidual. (4) O nascimento da TFD ocorreu em 1900, quando Oscar Raab e seu professor von Tappeiner observaram que paramédicos morriam quando expostos ao corante laranja de acridina e luz (RAAB, 1900* apud LEE, 2011). Sete anos depois, von Tappeiner e Jodlbauer publicaram um livro no qual esse fenômeno era descrito com participação essencial da molécula de oxigênio, e o chamaram de “reação

* RAAB, O. On the effect of fluorescent substances on infusoria (German). *Zeitschrift fur Biologie*. v. 39, p. 524-526, 1900.

fotodinâmica” (TAPPEINER, 1907[†] apud LEE, 2011). A TFD como é conhecida hoje ganhou força em 1990 quando Kennedy e Pottier introduziram o agente tópico ácido 5-aminolevulínico (ALA) à terapia. Este atua como precursor endógeno da protoporfirina IX (PpIX), uma molécula fotossensível que gera um efeito limitado e localizado. (30)

Desde a década de 90, quando começou a ser utilizada no tratamento de condições oncológicas, a TFD vem ganhando crescente interesse. Tornou-se uma modalidade bem estabelecida nos Estados Unidos no tratamento de CA, lesões pré-malignas advindas da exposição crônica à luz solar, que podem progredir para carcinoma espinocelular (CEC). Na Europa, a terapia se estabeleceu no tratamento de carcinoma basocelular (CBC) e doença de Bowen. Recentemente, a TFD tem sido utilizada em condições dermatológicas não-oncológicas como acne, fotoenvelhecimento, psoríase, verrugas e leishmaniose apresentando resultados promissores. (5)

O direcionamento da TFD para tratamentos cosméticos começou com Patrick Bitter em 2000, quando foi publicado o primeiro trabalho clínico com foco em fotorejuvenescimento. (31) Nesse estudo, luz intensa pulsada (IPL) foi aplicada na pele fotodanificada e foi observada uma melhora estética na região tratada. Seus pacientes consideraram a técnica altamente satisfatória, pois não é invasiva, não gerou o afastamento dos indivíduos de suas atividades e possui efeitos colaterais mínimos. (31) Em 2002, Ruiz-Rodriguez et al. publicou o primeiro trabalho que realmente se tratava de fotorejuvenescimento fotodinâmico, utilizando ALA e IPL. (6) Nos últimos anos, estudos abordando diferentes protocolos de TFD têm sido publicados e o interesse nessa técnica vem crescendo, pois esta tem se mostrado promissora no tratamento da pele fotodanificada com excelentes resultados cosméticos.

A ação da TFD é baseada na formação de substâncias citotóxicas que levam à morte celular. No caso da pele fotoenvelhecida, o alvo é principalmente a camada mais superficial da pele, a epiderme. Após a terapia, os queratinócitos liberam citocinas que, pela via parácrina, induzem a produção de MMPs pelos fibroblastos da derme (32), degradando assim a MEC danificada. Para que isso ocorra, são

[†] TAPPEINER, H.; JOLDLBAUER, A. **The sensitizing action of fluorescent substances**: an overall account of investigations on photodynamic phenomena. Leipzig, Germany: Vogel FCW, 1907.

necessários 3 componentes: um agente fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e oxigênio molecular. O processo se inicia com a ativação do FS por uma fonte de luz com um comprimento de onda apropriado (Figura 3). O FS passa para estado excitado singlete e sofre cruzamento intersistema chegando ao estado tripleto, um estado mais duradouro. Nesse estado, dois tipos de reações podem ocorrer: a tipo I, onde o FS interage diretamente com um substrato formando radicais, que por sua vez interagem com o oxigênio e resulta na formação de EROs e a tipo II que forma oxigênio singlete. Para a TFD a reação tipo II é a mais importante, pois dá origem a uma molécula altamente reativa que, conseqüentemente, leva à morte celular e destruição do tecido por necrose. (4) As características desses três integrantes são de grande relevância para a eficácia da técnica: A TFD depende da penetração seletiva do FS nos tecidos de interesse e da duração da sua aplicação, da habilidade de penetração da luz no alvo terapêutico e do tempo de iluminação e, por fim, do tipo e da oxigenação das células alvo. (33)

Figura 3 – Ilustração esquemática da TFD. CIS: Cruzamento Intersistema, EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.1 Fotossensibilizador

Existem três famílias de FS, definidas com base nas estruturas químicas dessas moléculas: as porfirinas, as clorofilas e os corantes. (34) A PpIX, FS pertencente à família das porfirinas, é uma molécula endógena precursora imediata do grupo heme na via de biossíntese da hemoglobina. Nesta mesma via encontra-se o ALA, um intermediário que precede a PpIX; sendo assim, este começou a ser utilizado como agente precursor desse FS em TFD. (35) Na década de 90, o ALA foi introduzido como precursor de aplicação tópica e em 1999 foi aprovado pelo FDA para uso no tratamento de CA. (29) Desde então, a TFD tem sido realizada com creme tópico de ALA combinado à luz vermelha e azul para a ativação da PpIX, no tratamento de CA, CBC superficiais e doença de Bowen. (6)

Além do ALA, o seu derivado metil aminolevulinato (MAL) é um dos agentes tópicos mais utilizados atualmente em TFD. O MAL é um éster derivado de ALA com características lipofílicas. Seu desenvolvimento foi motivado principalmente pelo seu maior poder de penetração na pele se comparado ao ALA, que possui com características hidrofílicas. (29) Quando aplicados topicamente, estes precursores são absorvidos preferencialmente pelas células displásicas e cancerígenas devido à alta taxa de atividade metabólica, se comparadas às células normais. Como o suprimento de íons ferro no meio intracelular é limitado estas células são incapazes de converter em heme toda PpIX formada, levando a um acúmulo dessa molécula. (36) A alta concentração de PpIX nas células anormais é então aproveitada para o melhor desempenho da TFD.

A PpIX apresenta alta eficiência quando ativada pelo comprimento de onda de 409 nm (violeta), diminuindo sua atividade em comprimentos de onda correspondentes a menores picos do seu espectro de absorção: 509, 544, 584 e 635 nm (Figura 4). A luz violeta pode ser utilizada ativar a molécula com grande eficiência, porém atinge somente camadas superficiais devido à alta absorção por biomoléculas, resultando em uma pequena profundidade de penetração desse comprimento de onda. Outra possibilidade é a utilização de luz vermelha, que, apesar de precisar de maiores intensidades para compensar sua menor eficiência quântica, atinge maiores profundidades no tecido. (33)

Figura 4 – Perfil espectral de absorção e emissão da PpIX.

Fonte: Adaptada de MACCORMACK (30)

O rendimento quântico de formação do oxigênio singleto no caso da PpIX para os comprimentos de onda 646, 630 e 546 nm é 0,60, 0,54 e 0,54 respectivamente. (37) Logo, em média esse FS apresenta mais da metade de suas moléculas em estado tripleto sendo empregadas na formação do oxigênio singleto, como mostra o mecanismo da Figura 3.

2.2.2 Fonte de Luz

Para determinar a quantidade de luz disponível para o FS, é preciso considerar a distribuição espacial da luz no tecido alvo, influenciada pelo seu espalhamento e sua absorção por cromóforos endógenos. Sendo assim, a combinação das informações: (i) importantes cromóforos absorvem em baixos comprimentos de onda, (ii) o espalhamento da luz é menor em comprimentos de onda maiores e (iii) a água absorve acima de 1300 nm, levou à criação do conceito de “janela terapêutica” do tecido (Figura 5). (4) Este se refere à região espectral com penetração tecidual ótima, e direciona a escolha da fonte de luz adequada ao tratamento.

Figura 5 – Janela terapêutica do tecido. Os espectros de absorção da água, oxi (HbO₂) e desoxihemoglobina (Hb) e melanina estão mostrados em escala logarítmica.

Fonte: Adaptada de CASTANO (4)

Mais especificamente, para que a TFD tenha uma resposta eficiente, é preciso selecionar uma fonte de luz apropriada que cumpra certos requisitos importantes. Primeiro, o espectro de emissão da fonte deve conter pelo menos alguma banda de absorção do FS. Segundo, o comprimento de onda deve estar de acordo com o nível desejado de profundidade no tecido e, por fim, a luz necessita entregar taxa de energia suficiente para provocar o efeito fotodinâmico desejado. (30)

Dentre as opções de iluminação utilizadas nos estudos clínicos, estão presentes lâmpadas halógenas, diodos emissores de luz (LED, do inglês *Light Emitting Diode*), luz intensa pulsada (IPL, do inglês *intense pulsed light*), laser pulsado (PDL, do inglês *pulsed dye laser*) e também lâmpadas fluorescentes. (30,38) Geralmente são utilizadas fontes de luz com banda espectral azul ou verde (400 – 570 nm), como a luz azul filtrada, que se limitam às lesões epidérmicas. Além dessas, utilizam-se também fontes com emissão na faixa do vermelho (630 nm) que atingem profundidades maiores, alcançando a derme. (30)

Alguns exemplos de estudos clínicos utilizando essas fontes em TFD são encontrados na literatura e mostram luz azul em conjunto com o ALA sendo usados no tratamento de CA. (7,39–42) Também são encontrados trabalhos utilizando luz vermelha e ALA sendo aplicados no tratamento de CEC. (43)

A entrega da luz pode ser feita de duas formas: em uma única dose ou em duas ou mais frações, onde entre uma fração e outra existe um intervalo de escuro.

Trabalhos baseados na comparação entre essas duas modalidades (44), e também na investigação de melhor tempo de escuro (45) e de doses ótimas (46) têm sido publicados. Os resultados mostram que ALA-TFD com iluminação fracionada aumenta a eficiência terapêutica *in vitro* (47) e *in vivo* (48). Condições dérmicas como CBC (49) e CA (44) têm sido tratadas com esse tipo de terapia, apresentando melhores respostas se comparada à TFD com iluminação dose única. No entanto, o efeito dessa técnica na pele fotoenvelhecida ainda é desconhecido.

2.3 Terapia Fotodinâmica na Pele Fotoenvelhecida

A TFD tornou-se uma alternativa para o tratamento do fotoenvelhecimento quando Ruiz-Rodrigues, ao tratar o quadro de CA, observou que após a terapia não apenas as lesões regrediram como também houve melhora no quadro clínico da pele fotoenvelhecida. (29) Desde então, novos estudos abordando esse tratamento têm sido publicados utilizando diferentes combinações de fontes de luz e FS.

Alguns trabalhos avaliando diferentes protocolos para triagens clínicas foram realizados aplicando ALA em conjunto com IPL em metade da face dos indivíduos e somente a iluminação na outra metade (*split-face*). Os resultados de Marmur et al., Dover et al. e Gold et al. mostraram que houve melhora no quadro geral de fotoenvelhecimento em ambas as partes, porém com melhora significativa do lado em que foi aplicado o ALA. (8–10) Marmur et al. utilizou luz no comprimento de 550 nm entregando uma dose de 24 J.cm^{-2} e observou um aumento na produção de colágeno tipo I. (9) Já Dover et al. entregou doses de 23 a 28 J.cm^{-2} em comprimentos de 515 a 1200 nm e obteve melhora nas manchas de hiperpigmentação e nas linhas finas. (8) Além disso, Gold et al. tratou indivíduos com uma dose de 34 J.cm^{-2} excitando com 550 nm ou 570 nm e reportou melhora nas condições de hiperpigmentação, “pés de galinha” e aspereza da pele. (10)

Em outra abordagem, algumas pesquisas utilizaram o MAL como precursor do FS, aplicando luz vermelha. Zane et al. utilizou luz LED no comprimento de onda de 630 nm para iluminar pacientes com CA e fotodano severo, entregando 37 J.cm^{-2} . Seus resultados apresentaram uma melhora significativa nas manchas de hiperpigmentação, nas linhas finas, na aspereza e na palidez, e ainda espessamento da pele. (11) Issa et al., também entregou para seus pacientes 37 J.cm^{-2} utilizando

um LED emitindo em 635 nm. Reportou melhora nas rugas, na textura e suavidade da pele ao avaliar o efeito de MAL-TFD nos sintomas clínicos do fotoenvelhecimento, observando depois de seis meses do tratamento, uma redução do material elastótico e o aumento das fibras de colágeno. (12)

Apesar de apresentar baixa profundidade de penetração comparada à luz vermelha, a azul mostrou-se eficaz no tratamento da pele envelhecida. (50) Utilizando ALA-TFD com luz fluorescente azul emitindo em 417 nm, Touma et. al. tratou CA e fotodano na face dos pacientes e além de obter uma redução das lesões de CA, reportou também uma resposta cosmética vantajosa. Após apenas uma sessão de TFD, obteve melhora na qualidade da pele, na coloração amarelada e nas rugas finas. (7)

Os estudos apresentados até o momento fornecem algumas informações quanto à melhora clínica e algumas das respostas de reparação tecidual, no entanto, o entendimento dos efeitos induzidos pela ALA-TFD com iluminação azul na pele fotoenvelhecida ainda está incompleto.

2.4 Diagnóstico Óptico

A utilização de técnicas ópticas na área da dermatologia não somente abrange tratamentos, mas também inclui o campo de diagnóstico. Estas vêm sendo amplamente empregadas na investigação de condições dérmicas para auxiliar, complementar ou até mesmo substituir métodos já existentes. Além de não invasivas, podem ser realizadas em tempo real e em diferentes regiões do tecido, o que aumenta ainda mais a relevância desse tipo de diagnóstico, principalmente quando comparado com a histologia - técnica mais demorada, restrita e custosa. (51)

Na investigação do envelhecimento da pele são empregadas técnicas como a microscopia confocal (52,53), tomografia por coerência óptica (54,55) e também aquelas baseadas em fluorescência como imagem de tempo de vida de fluorescência. (56) As técnicas baseadas em fluorescência fornecem informações sobre a composição bioquímica do tecido analisado. A fluorescência é o fenômeno de emissão de luz por uma molécula ou substância quando estas retornam ao seu estado fundamental após terem absorvido fótons com energia específica. (57) Na

pele existem diversas substâncias que apenas absorvem luz (absorvedores), chamadas de cromóforos, tais como água, hemoglobina e melanina. (58) Aquelas que apresentam emissão de fluorescência são chamadas de fluoróforos e incluem porfirinas, ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos como triptofano, componentes da MEC como colágeno e elastina, além de moléculas envolvidas no metabolismo celular como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). (59) A Figura 6 mostra os espectros de absorção e emissão dessas dos fluoróforos endógenos da pele.

Figura 6 – Espectros de absorção e emissão dos principais fluoróforos da pele.

Fonte: Adaptada de MARCU (60)

Espectroscopia de fluorescência e de tempo de vida de fluorescência são duas técnicas complementares de diagnóstico óptico. A primeira delas, quando aplicada à pele, retorna uma curva contendo contribuições de todos os fluoróforos endógenos, cujo formato pode ser considerado uma “impressão digital” do tecido. Diferentemente, a fluorescência resolvida no tempo retorna uma curva de decaimento que proporciona informações sobre o comportamento das moléculas fluorescentes (se estão livres ou ligadas a outras moléculas) e do ambiente intracelular, visto que é dependente de muitos fatores ambientais como pH, viscosidade, temperatura, concentração iônica, saturação de oxigênio, etc. (61)

O tempo de vida da fluorescência de uma molécula é definido como o tempo médio que esta permanece no estado excitado antes de decair para o estado

fundamental, através da emissão de fluorescência. Os principais tempos de vida investigados na pele são os das moléculas NADH e FAD, coenzimas, respectivamente, doadoras e aceptoras de elétrons na fosforilação oxidativa. Células neoplásicas, por exemplo, sofrem alterações metabólicas que são associadas a variações nas concentrações relativas de FAD e NADH. Além disso, essas moléculas possuem diferentes ligantes nas vias metabólicas e alterações nessas vias indicam uma anormalidade no metabolismo celular. (62) Logo, a investigação do tempo de vida dessas moléculas pode fornecer informações sobre as condições do tecido.

NADH e FAD possuem dois tempos de vida médios que são associados as suas formas livre e ligada a uma proteína. Então, nesse caso o decaimento pode ser descrito pela equação:

$$F(t) = a_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + a_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (2)$$

onde τ_1 e τ_2 são os tempos de vida médios chamados de curto e longo, respectivamente e a_1 e a_2 são as concentrações das moléculas excitadas no tempo t , obedecendo a relação $a_1 + a_2 = 100\%$. No caso do NADH, os parâmetros de tempo de vida curto (a_1 e τ_1) são referentes a sua forma livre e os parâmetros de tempo de vida longo (a_2 e τ_2), à forma ligada. Para o FAD, a_1 e τ_1 se referem ao seu estado ligado e a_2 e τ_2 , ao estado livre. (61,62)

As técnicas ópticas por serem não invasivas e não destrutivas se tornam métodos atrativos para o monitoramento *in vivo* das alterações teciduais. Na literatura são encontrados estudos que investigam a espectroscopia de tempo de vida de fluorescência na diferenciação entre tecidos sadios e com alterações como melanoma (63), CBC, (64) e tumor cerebral (65).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o processo de resposta e recuperação tecidual da pele fotoenvelhecida após tratamento pela ALA-TFD com iluminação única e fracionada.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar os efeitos clínicos e histológicos da TFD com iluminação em uma dose única e em dose fracionada;
- Comparar o comportamento da pele fotoenvelhecida e intrinsecamente envelhecida com relação à formação e consumo de PpIX e resposta à TFD fracionada;
- Investigar o período pós-tratamento com espectroscopia de fluorescência e tempo de vida de fluorescência e associar os resultados com as mudanças histológicas observadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos da linhagem HRS/J fêmeas e machos foram adquiridos do Biotério de Produção e Experimentação de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Figura 7). A utilização destes camundongos no presente estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos (CEUA/IFSC), como consta no documento número 02/2014 (ANEXO).

Figura 7 – Camundongo *hairless*, linhagem HRS/J.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas (mini-isoladores de polisulfona, Alesco) com dimensões 37,2 x 24,2 x 19,1 cm forrados com maravalha e com livre acesso a água e ração. As gaiolas foram mantidas em uma estante ventilada, em um ambiente com controle acústico e de temperatura, e iluminação. Além disso, rolos de papelão foram introduzidos nas gaiolas para o enriquecimento ambiental visando o menor nível de estresse dos animais.

4.2 Grupos do Estudo

Trinta e oito camundongos (33 fêmeas e 5 machos) foram distribuídos em 3 grandes grupos de tratamento e 2 subgrupos controle (Figura 8): animais fotoenvelhecidos tratados com TFD dose única – TFD 1, animais fotoenvelhecidos tratados com TFD dose fracionada – TFD 2, animais envelhecidos tratados com TFD

dose fracionada – E-TFD 2 , controle com animais somente fotoenvelhecidos – GF e controle com animais somente envelhecidos – GC. Para uma análise histológica dos efeitos agudos da TFD, os subgrupos G1, G3 e G5 foram mortos após 2 semanas do tratamento e para uma análise mais prolongada, os subgrupos G2, G4 e G6 foram mortos após 4 semanas. Todos os subgrupos possuíam 5 animais – com exceção do G3 que possuiu apenas 3.

Figura 8 – Montagem dos grupos experimentais.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Protocolo de fotoenvelhecimento

Para o processo de indução do fotoenvelhecimento foram adquiridas duas lâmpadas tubulares (Philips TL 40W/12 RS) de 1,2 m de comprimento e 4 cm de diâmetro, com emissão principalmente na faixa do UVB (270 – 400 nm). Elas foram acopladas a 24 cm de distância a uma mesa com altura ajustável (Figura 9). À mesa foram fixadas duas cortinas: uma externa, de papel alumínio, para a contenção da radiação visando à proteção das pessoas presentes no ambiente; e uma interna, de pano preto, para evitar aumento da irradiância devido às reflexões da primeira cortina.

Figura 9 – Aparato de iluminação para o fotoenvelhecimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para confirmação das características das lâmpadas e definição do protocolo de fotoenvelhecimento, foi realizado um estudo do espectro das lâmpadas e de sua irradiância. Para acomodar os animais durante o fotoenvelhecimento foram necessários recipientes de plástico transparente (24 x 24 x 26 cm) cobertos com uma grade metálica para evitar que estes escapassem. Sendo assim, as medidas de irradiância foram feitas no interior destes recipientes. O suporte das lâmpadas foi posicionado a 78 cm do chão (75 cm do dorso dos animais). Nessa altura, os recipientes foram posicionados simetricamente em relação ao centro das lâmpadas (Figura 10A). A irradiância no centro dos recipientes foi medida utilizando-se um radiômetro (P-9710-2, Gigahertz Optik) acoplado com um detector de UV (RCH-106-2, Gigahertz Optik) (Figura 10B). Após a estabilização das lâmpadas (15 min), o valor da irradiância foi $0,154 \text{ mW.cm}^{-2}$ na faixa do UV.

Figura 10 – Medida da irradiância nos potes. A. Posição dos potes em relação às lâmpadas. B. arranjo da medida de irradiância dentro dos potes.

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro de emissão das lâmpadas foi obtido através do espectrofotômetro USB 4000 (USB 4000, Ocean Optics, EUA). A curva completa é mostrada na Figura 11A, enquanto a fração referente à radiação UV é mostrada em destaque na Figura 11B. As porcentagens de UVA e UVB foram calculadas através da integração do espectro: Integrando de 290 a 315 nm a área é $A_{UVB} = 2,55$, de 315 a 400 nm, é $A_{UVA} = 2,79$ e de 270 a 400 nm, é $A_{UV} = 5,63$. Sendo assim, as porcentagens são: 51,5% de UVA e 45,3% de UVB. Como a irradiância na faixa do UV foi de $I_{UV} = 0,154 \text{ mW.cm}^{-2}$, aplicando as porcentagens a esse valor, os valores de irradiância encontrados foram $I_{UVB} = 0,070 \text{ mW.cm}^{-2}$ e $I_{UVA} = 0,079 \text{ mW.cm}^{-2}$.

Figura 11 – Gráficos do espectro de emissão das lâmpadas tubulares Philips TL 40W/12 RS medido com o espectrofotômetro USB 4000. A: Espectro completo, B: Região do UV.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a determinação da irradiância foi possível descobrir a dose mínima eritematosa (MED, *minimal erythema dose*) que representa a menor dose de radiação UVB necessária para causar eritema visível após 24h da irradiação. O valor encontrado para a MED da radiação UVB foi $0,06 \text{ J.cm}^{-2}$. A partir desse resultado e sabendo que Peres e colaboradores utilizaram uma dose total de UVB de $2,9 \text{ J.cm}^{-2}$ no fotoenvelhecimento de camundongos *hairless* (66), foram estabelecidas as doses de irradiação utilizadas no projeto. Foi estipulado que a iluminação seria feita três vezes por semana durante 10 semanas. Nas primeiras 3 semanas, os animais receberam doses diárias equivalentes a 1 MED; nas semanas seguintes estas aumentaram gradativamente como mostrado na Tabela 1. A partir dos valores obtidos para irradiância do UVB ($I_{UVB} = 0,07 \text{ mW.cm}^{-2}$) foi, então, estabelecido o tempo de duração de cada sessão através da equação:

$$I_{UVB} = \frac{dose_{UVB}}{tempo} \quad (2)$$

onde o tempo é dado em segundos. A dose total fornecida foi $2,85 \text{ J.cm}^{-2}$.

Tabela 1 – Doses diárias e respectivos tempos de irradiação do protocolo de fotoenvelhecimento.

Semana	Dose UVB diária (J.cm^{-2})	Tempo de Irradiação (min)
1 a 3	0,06	14,3
3 a 4	0,08	19
5 a 6	0,11	26,2
7 a 10	0,13	31

Fonte: Elaborada pela autora.

A radiação UVA ($I_{UVA} = 0,079 \text{ mW.cm}^{-2}$) foi desconsiderada pois no tempo de irradiação total (11h20min) a dose entregue foi $3,22 \text{ J.cm}^{-2}$. Essa dose é muito menor que as encontradas na literatura (3000 J.cm^{-2} até 13000 J.cm^{-2}) para diferentes fontes de UVA que causam alguma alteração na pele (22).

A irradiação foi aplicada com os animais despertos e sem restrição de movimento. Não houve necessidade de anestesia, uma vez que esse procedimento não causa nenhum sofrimento para os camundongos.

Após o início do protocolo novas medidas de irradiação foram feitas utilizando um espectroradiômetro (USB 2000, Ocean Optics, EUA), que fornece diretamente a irradiância por comprimento de onda. O medidor foi posicionado no interior do pote usado para irradiação através de um orifício na base. A posição do pote foi variada entre as quatro possibilidades como mostra a figura abaixo (Figura 12). O tempo de integração utilizado foi de 1700 ms e calibração para UV.

Figura 12 – Posicionamento das gaiolas sobre a mesa para nova medida de irradiância.

Fonte: Elaborada pela autora

O perfil espectral obtido (Figura 13) foi integrado na faixa do UVB (290 a 315 nm) e os novos valores de irradiância foram calculados. As imagens a seguir mostram o novo espectro e os respectivos valores de irradiância obtidos para cada posição.

Figura 13 – (A) Espectro de emissão das lâmpadas na faixa do UV medido com o espectroradiômetro. (B) Valores da irradiância nas quatro posições dos recipientes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Levando em consideração os resultados obtidos, o valor atualizado da irradiância no UVB foi a média dos valores das quatro regiões medidas: $I'_{UVB} = 0,109 \text{ mW.cm}^{-2}$. Com esse valor, as doses diárias entregues foram corrigidas através do cálculo inverso usando os valores do tempo das sessões. A Tabela 2 mostra as doses corrigidas.

Tabela 2 – Doses diárias iniciais e corrigidas do protocolo de fotoenvelhecimento.

Semana	Dose diária inicial (J.cm ⁻²)	Tempo de irradiação (min)	Dose diária corrigida (J.cm ⁻²)
1 a 3	0,06	14,3	0,09
4 e 5	0,08	19,1	0,12
6 e 7	0,11	26,2	0,17
8 a 10	0,13	31	0,20
DOSE TOTAL	2,86	-	4,35

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Terapia Fotodinâmica

Para a realização da TFD, foi utilizado um creme de ALA tópico. O ALA em pó (PDT Pharma, Cravinhos, SP, Brasil) foi misturado a um creme base na proporção 1g de ALA: 4g de creme. O creme é composto de: 3% de dimetilsulfóxido (DMSO), para auxiliar a penetração do creme na pele; 1 mmol.L⁻¹ de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), agente quelante que inibe a ferroquelatase, impedindo a transformação de PpIX em heme; Polawax (emulsificante); propilenoglicol (emoliente); além de conservantes e antioxidantes. Depois de preparado, o creme 20% ALA é mantido em geladeira e isolado de iluminação até o momento de ser utilizado.

Previamente à aplicação do creme, foi realizado o procedimento de remoção do extrato córneo, chamado *tape stripping*. Esta técnica permite uma maior penetração do creme na pele do animal, favorecendo a produção de PpIX para a terapia. Oito pedaços de fita adesiva (Fita Mágica, Scotch, 3M, Brasil) foram cortados e aplicados individualmente sobre a região do animal a ser tratada. Cada pedaço foi levemente pressionado sobre o flanco e em seguida removido no sentido caudo-cranial. A fim de que o creme fosse concentrado na região desejada do animal, foram utilizadas máscaras com fita crepe com um orifício circular de aproximadamente 1 cm de diâmetro. Uma segunda máscara composta de fita adesiva e um quadrado de papel alumínio foi utilizada para proteger a região contra iluminação e consumo indesejado de PpIX durante o período de incubação do ALA. O tempo escolhido para este pré-fármaco ser incubado foi de 1 hora.

Foi utilizado como fonte de luz um dispositivo montado com um emissor do tipo LED, desenvolvido no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT, Grupo de Óptica, IFSC-USP). Este foi construído com ajuste de potência de 0 a 30 mW e com um LED violeta com comprimento de onda 404 ± 30 nm. (Figura 14).

Figura 14 – A: Dispositivo LED utilizado para a iluminação da TFD. B: Espectro de emissão do LED.

Fonte: Elaborada pela autora.

A dose entregue foi de 1 J.cm^{-2} a uma irradiância de 5 mW.cm^{-2} com a extremidade do dispositivo em contato com a pele do animal. Imediatamente antes das aplicações da luz, a potência foi ajustada para 2,5 mW com o medidor COHERENT LabMax_Top usando o detector LM-2 VIS (área de $0,5 \text{ cm}^2$) de forma que a irradiância ficasse próxima à 5 mW.cm^{-2} . No caso da TFD com iluminação fracionada, a luz foi entregue em duas porções. Primeiramente, 50% da dose total foi aplicada, esperou-se 10 min com o dispositivo desligado e, em seguida, a fração restante foi entregue para finalizar o tratamento. Durante as aplicações os animais permaneceram anestesiados com dois fármacos: 60 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (agente anestésico) e 10 mg/kg de xilazina (agente sedativo, analgésico e relaxante muscular) pela via intraperitoneal (IP).

A Figura 15 resume os passos da terapia. Primeiramente o animal foi anestesiado através da aplicação de isofluorano 2% em oxigênio (A); em seguida o flanco do animal foi levemente limpo com uma gaze embebida em soro fisiológico para remoção de partículas de maravalha ou sujeira (B); um pedaço de fita foi colado no flanco do animal (C), levemente pressionado (D) e removido (E); em seguida uma máscara feita com fita crepe foi colada no animal (F) e o creme foi aplicado com uma espátula de madeira (G); a região foi então ocluída pela segunda máscara contendo papel alumínio (H) e o animal foi retirado da anestesia e colocado em uma gaiola para aguardar a incubação do ALA por 1 h; faltando 10 min para o término do tempo de incubação, os animais foram anestesiados via IP e ao completar 1 h foram submetidos à iluminação (I). Após a iluminação, as máscaras foram removidas e os animais foram colocados em gaiolas com aquecimento

externo - para que se recuperassem da anestesia - e cobertas - para evitar consumo da PpIX restante. Nos primeiros 4 dias pós TFD foi identificada a presença de PpIX, então nesse período as gaiolas foram mantidas sob um tecido preto que os mantinha em total ausência de luz.

Figura 15 – Procedimentos da TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Avaliação Clínica

A análise clínica macroscópica dos resultados da TFD foi realizada através da observação do registro fotográfico dos camundongos após a terapia. Os animais foram colocados por alguns segundos em um recipiente fechado com uma gaze embebida em isoflurano. No momento que paravam de se movimentar, eram retirados do recipiente e colocados sobre um pano preto ao lado de uma régua para escala. Foi utilizada uma câmera digital (Sony, DSC-H50) posicionada a aproximadamente 25 cm dos animais. Os camundongos dos subgrupos G1, G3 e G5 foram fotografados nos dias: 1 a 7, 10, 12 e 14 pós TFD e os dos subgrupos G2,

G4 e G6, nos dias: 1 a 7, 10, 13, 17, 22 e 28. A pele foi avaliada pela presença de sinais de inflamação como edema e eritema e dano tecidual como descamação, ulceração, crosta e necrose. A avaliação clínica foi realizada qualitativamente nas imagens digitalizadas e baseadas nas características apontadas anteriormente.

4.6 Avaliação por fluorescência

Durante a TFD, a formação e o consumo da PplX foram acompanhados por imagem e espectroscopia de fluorescência. Para registro da imagem foi utilizada a mesma câmera digital da avaliação clínica acoplada a uma lente de aumento de 4x e a um protótipo para imagem de fluorescência (67) (Figura 16A). O zoom utilizado foi de 3x e todo o conjunto foi posicionado a 4 cm de distância do animal. As medidas de espectro de fluorescência foram realizadas por um sistema de diagnóstico portátil montado em uma maleta (Figura 16B). Este é composto por dois lasers centrados em 408 nm e 532 nm; uma fibra bifurcada (tipo 'y') para entrega da excitação e coleta da emissão; um suporte para filtro; um espectrofotômetro (USB 2000, Ocean Optics, EUA) e um computador para a utilização do software (OOIBase, Ocean Optics, EUA).

Figura 16 – (A) Equipamento fotográfico e (B) Maleta com o sistema de diagnóstico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Antes da aplicação do creme foram feitas medidas do espectro da autofluorescência da região a ser tratada. Utilizando o laser de 532 nm, 5 medidas em pontos diferentes da região a ser tratada foram coletadas. Após o tempo de incubação a máscara de cima foi removida e a região da pele foi levemente limpa com uma gaze embebida em soro para a remoção do excesso de creme. Na pele exposta foram feitas mais 5 medidas de fluorescência em pontos diferentes. Em

seguida a primeira máscara foi parcialmente removida e foi tirada uma foto da região buscando a fluorescência da PpIX. Através destas imagens foi possível analisar semi-quantitativamente a formação da PpIX na pele e seu consumo após a entrega da dose, além da homogeneidade de produção.

Para avaliar a pele no processo de recuperação pós TFD também foram feitos espectros de fluorescência. O mesmo sistema de diagnóstico portátil foi utilizado para as medidas de espectro, porém utilizando o laser de 408 nm. Além dessas, foram realizadas medidas de fluorescência resolvida no tempo com o objetivo de investigar o metabolismo celular focando nos principais fluoróforos envolvidos nesse processo: NADH e FAD. (58) Para a aquisição das medidas de tempo de vida foi utilizado um sistema composto por: dois lasers – um de comprimento de onda 378 nm e outro de 445 nm (BDL-375-SMC e BDL-445-SMC, Becker and Hickl, Alemanha) para a excitação do NADH e FAD, respectivamente; uma fibra bifurcada (tipo 'y') (Fiber Optics System Inc., EUA); uma fotomultiplicadora e um computador para a utilização do software SPCM (SPC 9.42 Becker and Hickl, Alemanha) (Figura 17). (63)

Figura 17 – Representação do sistema de aquisição de medidas de tempo de vida de fluorescência.

Fonte: Adaptada de NOGUEIRA (68)

Durante o processo, os animais foram submetidos a anestesia inalatória com isoflurano e permaneceram sobre uma cama térmica para impedir que a temperatura corpórea baixasse (Figura 18A). Para os dois lasers foi utilizada uma taxa de repetição de 50 MHz e filtros passa banda de 440 ± 40 nm e 514 ± 30 nm (Semrock, Rochester, EUA) para as fontes de 378 e 445 nm, respectivamente. A fluorescência

foi analisada pelo método de contagem de fótons (TCSPC, *Time Correlated Single Photon Counting*) (69), gerando um perfil de decaimento no tempo (Figura 18B). Estas medidas foram realizadas nos grupos G2, G4 e G6 semanalmente, por 4 semanas.

Figura 18 – Medidas de tempo de vida de fluorescência no flanco dos camundongos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados de tempo de vida de fluorescência foram primeiramente analisados pelo programa SPCImage (SPCImage 3.5.0.0, Becker & Hickl, Berlin, Alemanha), onde a curva de decaimento gerada foi ajustada para um decaimento exponencial de acordo com a equação 2. Dessa forma, para cada laser os 4 parâmetros (a_1 , a_2 , τ_1 e τ_2) fornecidos pelo programa foram processados no Origin (Origin 9.0.0 SR1 b76 (Academic), OriginLab Corporation) e apresentados na forma de *boxplot*. Nos gráficos do tipo *boxplot* a caixa foi mantida com os valores padrões (25% e 75%) e a faixa do *whisker* utilizado foi 10 – 90%.

Tanto os espectros de fluorescência referentes à TFD quanto ao acompanhamento da recuperação após a terapia foram processados no programa Origin. Os espectros foram normalizados pelo maior pico. Além disso, uma rotina para cálculo da razão entre picos dos espectros foi feita no MATLAB® (MATLAB® R2012a (7.14.0.739), The MathWorks, Inc.) e os resultados foram apresentados na forma de *boxplot* com as mesmas configurações dos gráficos de tempo de vida.

4.7 Avaliação Histológica

A análise microscópica dos efeitos da TFD na pele foi feita através de lâminas histológicas. Após a morte dos animais, foi realizada a excisão de uma amostra de pele e esta foi processada até a confecção da lâmina. Foram utilizadas duas substâncias marcadoras: i) hematoxilina-eosina (HE), uma combinação de hematoxilina, corante básico/positivo que cora DNA (basófilo e negativo) de azul/violeta e eosina, corante ácido/negativo que cora proteínas (acidófilas e positivas) de rosa; e ii) tricômio de masson (TM), que cora colágeno de azul, núcleos de azul/preto, eritrócitos de vermelho e músculo de rosa. As imagens das lâminas foram feitas através do microscópio NIKON DS-L3 sob os aumentos de 40, 100 e 400x. As imagens das lâminas de HE foram processadas no ImageJ (ImageJ 1.49g, National Institutes of Health, EUA) para a medida da espessura da epiderme e derme e contagem de células da derme. A Figura 19 mostra como essas medidas foram feitas. Utilizando a escala da imagem (círculo verde) foi determinada a equivalência entre pixels da imagem e milímetros (Figura 19A). Dessa forma pode-se usar a ferramenta de traçar linhas e na janela de resultados a medida destas apareciam já convertidas para milímetros (círculos azuis). Tanto para derme (linhas pretas) quanto para epiderme (linhas brancas) foram feitas 7 medidas de espessura na extensão das imagens de aumento 100x, sendo que elas foram espaçadas de aproximadamente 160 μm . Para cada grupo foram utilizadas as imagens dos 4 primeiros animais (com exceção do G3 que possuiu apenas 3 animais), devido à falta de integridade do corte histológico de alguns animais. Para cada grupo foram calculados média e desvio padrão dessas medidas e o resultado foi apresentado em um gráfico. A contagem de células foi feita em 3 imagens com aumento de 100x de cada subgrupo. Uma região de 16,8 mm^2 contendo apenas derme (excluindo glândulas e cistos) foi selecionada e a contagem foi feita manualmente pela mesma pessoa (Figura 19B). A média das 3 imagens e o desvio padrão para cada subgrupo foram apresentados na forma de gráfico de pontos.

Além dessas análises, foi desenvolvido um algoritmo para avaliação indireta da densidade de fibras colágenas através de um parâmetro chamado de variável densidade (V_{DENS}). Essa avaliação foi feita nas imagens de TM, após a observação que a concentração de corante é proporcional à absorbância e que no caso do

colágeno a absorvância no vermelho era alta enquanto que no azul era baixa, quando comparadas com as outras estruturas presentes na imagem (Figura 20A). Dessa forma foi definida uma variável densidade que é igual à razão da absorvância no vermelho sobre a absorvância no azul. Uma imagem em escala de cinza foi gerada (Figura 20B), onde as regiões mais claras recebiam pontuação de V_{DENS} maiores e as regiões mais escuras recebiam pontuações mais baixas. Foram traçados 8 perfis de 70 μm que se iniciavam na JDE e desciam para a derme (Figura 20B) e a média desses perfis foi colocada em um gráfico em função da profundidade (Figura 20C – linha preta) para uma imagem de cada subgrupo. Para suavização do resultado, foi feita uma convolução da média dos perfis com uma função quadrada de 15 μm de largura (Figura 20C – linha vermelha).

Figura 19 – Esquema das medidas de espessura da derme e epiderme (A) e contagem de células (B) no programa ImageJ.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 : Cálculo da variável densidade. A: Imagem da absorbância. B: Imagem em tons de cinza com os 8 perfis traçados. C: Média dos 8 perfis em função da profundidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 Organograma dos métodos do estudo

A Figura 21 mostra um esquema resumido dos principais procedimentos realizados com os animais em ordem cronológica.

Figura 21 – Esquema dos principais procedimentos realizados com os animais durante este trabalho.
FE: Fotoenvelhecimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pele fotoenvelhecida

Ao final do protocolo, foram verificadas na região dorsal dos animais características da pele fotoenvelhecida tanto macroscopicamente quanto a nível celular. A partir do registro fotográfico foi possível notar as diferenças entre a pele fotoenvelhecida e a pele envelhecida intrinsecamente (Figura 22). Enquanto a pele envelhecida apresentou coloração rosada, maciez ao toque e rugas finas, a pele fotodanificada mostrou coloração amarelada, aumento da quantidade de queratina, leve aspereza ao toque e presença de rugas profundas posicionadas transversalmente ao eixo do troco dos animais. Essas observações corroboram com as características clínicas observadas na pele fotoenvelhecida de camundongos *hairless* contidas na literatura. (22)

Figura 22 – Comparação da pele envelhecida e fotoenvelhecida. A: Camundongo envelhecido (GC) com 22 semanas de idade. B: Camundongo fotoenvelhecido (GF) com 18 semanas de idade após 10 semanas de radiação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando histologicamente a pele fotoenvelhecida (Figura 23B) com a envelhecida (Figura 23A), é possível observar que a primeira apresenta um pequeno espessamento da epiderme devido à hiperplasia dos queratinócitos, hiperqueratose (espessamento do estrato córneo), clareamento na derme papilar, indicando a degradação de colágeno (setas brancas cheias na imagem B.2), hiperplasia das glândulas sebáceas (setas pretas cheias na imagem B.2), e desorganização dos componentes da derme. Essas características comprovam que o protocolo utilizado para fotoenvelhecimento apresentou o efeito desejado. (28)

Figura 23 – Imagens histológicas da pele envelhecida (A) e fotoenvelhecida (B) coradas com HE (1) e TM (2). Aumento 100x, barra de escala 100 μ m.

continua.

continuação

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Comparação entre TFD 1 e TFD 2

Os tratamentos da pele envelhecida com iluminação fracionada e da pele fotoenvelhecida com iluminação única e fracionada foram comparados com relação à produção e consumo da PpIX, aos efeitos clínicos pós terapia, à autofluorescência da pele no período de recuperação, ao tempo de vida de fluorescência dos fluoróforos NADH e FAD também no período de recuperação e as alterações histológicas após 2 e 4 semanas da realização da TFD.

5.2.1 Produção e Consumo da PpIX

Os animais dos subgrupos G1 e G2 foram submetidos à TFD com iluminação dose única, enquanto os animais dos subgrupos G3 a G6 foram iluminados com dose fracionada. As informações sobre as doses utilizadas na terapia estão resumidas na Tabela 3:

Tabela 3 – Doses de luz utilizadas na TFD por subgrupo.

Subgrupos	Condição da pele	1ª fração luz (J.cm ⁻²)	Tempo de escuro (min)	2ª fração luz (J.cm ⁻²)
1 e 2	Fotoenvelhecida	1	-	-
3 e 4	Fotoenvelhecida	0,5	10	0,5
5 e 6	Envelhecida	0,5	10	0,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Imediatamente antes da aplicação da luz e após a entrega da dose total, o flanco dos animais foi fotografado para constatação da produção e consumo da PpIX, respectivamente. A figura a seguir mostra as imagens de animais representantes de cada grupo: TFD 1, TFD 2 e E-TFD 2 (Figura 24).

Figura 24 – Registro fotográfico da produção e consumo da PpIX pré (imagens superiores) e pós TFD (imagens inferiores). A: animal do grupo TFD 1; B: animal do grupo TFD 2 e C: animal do grupo E-TFD 2.

Fonte: Elaborada pela autora.

A autofluorescência da pele dos camundongos apresenta uma emissão verde, enquanto a emissão característica da PpIX ocorre na região do vermelho. Nos animais dos grupos fotoenvelhecidos (Figura 24A e 24B) é possível observar uma produção heterogênea de PpIX restrita à região de aplicação e aos arredores. Já no grupo de animais somente envelhecidos (Figura 24C), essa produção foi homogênea e presente em toda região dorsal dos animais. As fotos pós TFD revelaram que, na região da aplicação da luz, toda PpIX superficial foi consumida nos três casos.

A produção heterogênea da PpIX em tecidos alterados também foi observada clinicamente em pacientes submetidos a TFD com lesões de CA, CBC (70) e de queilite actínica. A pele fotoenvelhecida com CA e carcinomas usualmente apresenta um maior nível de queratinização superficial, o que acarreta em uma menor entrega transcutânea do ALA e, consequentemente, a produção da PpIX apresenta uma heterogeneidade dependendo das características da superfície da epiderme.

A pele intrinsecamente envelhecida dos camundongos não irradiados apresentou características de uma pele saudável, sem barreiras físicas significantes para a penetração do creme de ALA. Como resultado, o tempo de incubação de uma hora foi suficiente para a entrega do ALA não restrita apenas a epiderme e derme superficial, mas também à derme profunda, atingindo vasos sanguíneos e com consequente distribuição sistêmica do composto ativo. Comparativamente à pele humana, a epiderme e derme do camundongo apresentam uma menor quantidade de camadas de células, resultando em uma menor espessura cutânea.

Além das imagens de fluorescência, foram coletadas medidas do espectro de fluorescência da pele do animal antes e depois da aplicação da luz. Quando comparado aos espectros de autofluorescência da pele (antes da aplicação do creme), o perfil espectral obtido logo antes da entrega da luz revelou a presença de picos de emissão da PpIX (Figura 25). Após o término da TFD, é possível observar que os espectros não possuem mais os picos da PpIX com a mesma intensidade, ou ainda que eles estão ausentes evidenciando a fotodegradação superficial.

Figura 25 – Exemplo dos espectros de fluorescência obtidos, mostrando a produção e o consumo de PpIX. A: Espectros referentes a um camundongo do grupo TFD 2, B: Espectros referentes a um camundongo do grupo Envelhecido + TFD 2. Laser centrado em 532 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando os picos de emissão da PpIX, principalmente em 630 nm, é possível constatar que a pele fotoenvelhecida tratada com TFD 1, pós TFD, ainda apresenta um pico em 630 nm, indicando que não houve completo consumo da molécula na área tratada. Já no tratamento com TFD 2, tanto na pele fotoenvelhecida (Figura 25A) quanto na envelhecida (Figura 25B) é possível notar que o pico em 630 nm é praticamente inexistente após a aplicação da luz.

Nos grupos de animais fotoenvelhecidos, nenhum animal apresentou alteração visual na pele após a terapia. Já no caso dos subgrupos G5 e G6 houve o aparecimento de eritema e leve edema na área de aplicação da luz na maioria dos animais (Figura 26).

Figura 26 – Lesão imediatamente após a TFD 2 em um animal do subgrupo G6.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Resultado Clínico

Após a TFD, os animais foram fotografados no decorrer do período de recuperação. Nos primeiros 7 dias as fotos foram tiradas diariamente e a partir do oitavo dia elas foram espaçadas de acordo com o tempo de morte dos subgrupos, como mostra a Tabela 4. As imagens dos dias 1, 3, 5, 7, 12 e 14 - para os subgrupos G1, G3 e G5 e 1, 3, 5, 7, 13, 21, 28 - para os subgrupos G2, G4 e G6 desse seguimento clínico para o animal que melhor representou cada subgrupo são mostradas na Figura 27 e Figura 28, respectivamente. Para uma visualização mais ampla do resultado da terapia, a Figura 29 mostra as fotos do terceiro dia pós TFD dos dez animais tratados com TFD 1 e dos 8 animais tratados com a TFD 2. Esse dia foi escolhido por apresentar o estágio de máximo desenvolvimento das lesões provocadas pela TFD, como pode ser observado na Figura 27 e Figura 28.

Tabela 4 – Dias em que os subgrupos foram fotografados após a TFD. As células escuras marcam o dia da eutanásia dos animais.

Subgrupos	Dias pós TFD							
	1 a 7	10	12	13	14	17	21	28
1, 3 e 5	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-
2, 4 e 6	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 – Acompanhamento fotográfico dos animais pós TFD. As colunas A, B e C são referentes a animais dos subgrupos G1, G3 e G5, respectivamente. Cada linha contém a foto de determinado dia: linhas 1 a 6 equivalem aos dias 1, 3, 5, 7, 12 e 14 pós TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28 – Acompanhamento fotográfico dos animais pós TFD. As colunas A, B e C são referentes a animais dos subgrupos G2, G4 e G6, respectivamente. Cada linha contém a foto de determinado dia: linhas 1 a 7 equivalem aos dias 1, 3, 5, 7, 13, 21 e 28 pós TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 29 – Imagens fotográficas dos animais dos grupos TFD 1 (contorno verde) e TFD 2 (contorno roxo) no terceiro dia após a TFD. Na caixa branca, estão as informações que indicam o subgrupo (G1 a G4) e o camundongo (C1 a C5).

Fonte: Elaborada pela autora.

A resposta da terapia fotodinâmica foi avaliada clinicamente levando em consideração alteração de cor, presença de edema e/ou eritema, alteração de volume, presença de ulceração e processo de cicatrização.

Os animais dos subgrupos G1 e G2, que apresentaram protocolo de tratamento diferindo apenas no tempo de morte, mostraram uma evolução da pele tratada bastante semelhante. A resposta imediata e nas primeiras horas após o tratamento apresentou leves sinais de inflamação, sendo que o eritema estava

presente em 5 animais (50%), havendo resolução em um dos animais no 3º dia e em 2 animais no 5º dia. Em 2 animais, o quadro inflamatório leve no 1º dia evoluiu para uma inflamação entre leve e moderada com ulceração evidente já no 3º dia que progrediu até o 5º dia, neste caso, a partir do 7º dia foi observado o início do processo de reparação. No 14º dia, as lesões se apresentavam re-epitelizadas e com pequena alteração cromática (eritematosas), uma delas desaparecendo no 21º dia e a outra permanecendo até o 23º dia, último dia de avaliação.

Os subgrupos G3 e G4, tratados com o protocolo de terapia fotodinâmica fracionada, apresentaram uma resposta de dano cutâneo mais evidente. Todos os animais apresentaram ulceração, com variabilidade de tamanhos, demonstrando um maior dano induzido pelo protocolo de iluminação fracionada, quando comparado à iluminação contínua. Apesar de maior severidade das ulcerações, todos os animais apresentavam processo de cicatrização em fase final no 14º dia. No 17º dia a pele já estava completamente cicatrizada e 3 animais apresentavam uma leve cicatriz (Figura 30B) que permaneceu até o 28º dia ou que desapareceu no 21º dia (Figura 30A e 29C). Em nenhum caso foi observado quadro de infecção ou qualquer outra complicação decorrente da terapia fotodinâmica.

Figura 30 – Imagens do flanco de 3 animais do subgrupo G4 no 17º dia de acompanhamento pós TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos animais envelhecidos naturalmente, apenas o protocolo de iluminação fracionada foi realizado. A produção da PpIX com o tempo de incubação de 1 hora demonstrou ser sistêmica, sendo possível observar a emissão de fluorescência da porfirimina por toda a pele do animal e não apenas no local de colocação do creme de ALA. Isso demonstra uma limitação do modelo animal para a avaliação da resposta da TFD na pele naturalmente envelhecida. Como resultado dessa produção difusa e espalhada, a resposta inflamatória foi mais evidente, assim como a ulceração

observada. Apesar do quadro inflamatório mais severo, os animais seguiram sem complicações e as lesões ulceradas apresentavam um processo de cicatrização final no 13º/14º dia. A presença de cicatriz foi constatada ainda no 17º dia, diminuindo no 21º dia e permanecendo em apenas um animal até o 28º dia.

De um modo geral, foi observado que a TFD com iluminação fracionada provocou maiores danos que a terapia com dose única. Estudos comparativos dessas duas formas de entrega de luz levantam duas hipóteses para o efeito mais intenso da dose fracionada: a produção adicional de FS e a re-oxigenação. (45,48) No caso de tempos de escuro da ordem de segundos ou minutos, acredita-se que há re-oxigenação do tecido (71,72), aumentando a disponibilidade de oxigênio na célula que será novamente transformado em oxigênio singlete, como mostrado na Figura 3.

Para a aplicação cosmética da TFD, usualmente não se deseja a ulceração da pele, mas sim a indução de um dano leve apenas em camadas superficiais do epitélio e que, este dano, resulte na produção de citocinas que modifiquem a estruturação das proteínas de suporte, especialmente o colágeno e a elastina, e a hidratação da pele. Já para a indicação de tratamento de lesões cutâneas potencialmente malignizáveis, como as CAs com displasia moderada a severa e o carcinoma de Bowen, a resposta à TFD que se busca é de eliminação do tecido alterado. Nesse contexto, a partir dos resultados do estudo, o protocolo de iluminação contínua estaria mais indicado para as aplicações cosméticas e o de iluminação fracionada para o tratamento dos campos de cancerização, áreas com potencial de progressão maligna. Para que o efeito da terapia fracionada na pele fotoenvelhecida seja comparável ao da dose única, é preciso investigar doses ainda mais baixas que 1 J.cm^{-2} , ou ainda diminuir a concentração do ALA, além do acompanhamento em um período mais longo.

5.2.3 Fluorescência da pele

O acompanhamento do período de reparação tecidual após a terapia foi também investigado através de espectroscopia de fluorescência. Para o grupo TFD 1 foram coletadas medidas da primeira semana do G2 e da segunda semana do G1 pois houve indisponibilidade do equipamento no período programado para as medidas seguintes. As medidas de fluorescência do subgrupo GF após o término do

protocolo e do GC (com idade próxima) foram utilizadas como referência de antes da TFD para efeito de comparação (Figura 31). Os animais dos outros grupos apresentaram o mesmo comportamento observado nesse gráfico.

Figura 31 – Espectros de fluorescência de um animal do subgrupo G6. Em destaque estão os principais picos dos perfis espectrais obtidos

Fonte: Elaborada pela autora.

Baseando-se na informação do formato dos espectros de fluorescência do pós TFD, os picos em 555 nm, 630 nm e 668 nm foram analisados através das razões de suas intensidades pela intensidade do maior pico (500 nm):

$$R_a = \frac{I_{555}}{I_{500}} \quad R_b = \frac{I_{630}}{I_{500}} \quad R_c = \frac{I_{668}}{I_{500}} \quad (3)$$

onde I_{500} , I_{555} , I_{630} e I_{668} são as intensidades nos comprimentos de onda dos respectivos picos. No caso do grupo TFD 1, como as medidas de fluorescência foram feitas com subgrupos diferentes e apenas por 2 semanas, optou-se por não utilizar para comparação os gráficos das razões. A Figura 32 mostra o comportamento dessas razões 1,5 semanas antes da terapia (consideradas tempo

zero em relação à TFD) e no decorrer das 4 semanas pós TFD para os animais do grupo TFD 2 e E-TFD 2 .

Figura 32 – Gráficos das razões Ra (1), Rb (2) e Rc (3) para os animais fotoenvelhecidos tratados com TFD 2 (A) e para os animais envelhecidos tratados com a TFD 2 (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da observação do comportamento geral dos *boxplot* para o grupo TFD 2, foi constatado um leve decaimento de Ra no decorrer das semanas. O valor médio partiu de 0,53 na semana anterior à TFD para 0,46 na quarta semana pós

TFD. Já para o grupo E-TFD 2, esse mesmo parâmetro apresentou uma queda na primeira semana depois da terapia, indo de 0,58 para 0,51, mas nas semanas seguintes se manteve praticamente constante. O comportamento das caixas de dados de Rb para o grupo TFD 2 foi decrescente com o tempo, assim como Ra. Os valores médios decaíram suavemente durante as semanas partindo de 0,17 antes da TFD para 0,15 na última semana. Já no caso do grupo E-TFD 2, os valores médios de Rb aumentam de 0,18 para 0,21 na primeira semana pós TFD se mantêm constante na segunda semana, começa a cair na terceira e chega a 0,19 na quarta semana. Tanto para o grupo TFD 2 quanto para o E-TFD 2, os valores médios de Rc se mantiveram praticamente constantes durante todo o período das medidas (entre 0,8 e 0,9 no primeiro grupo e 0,9 e 1,0 no segundo).

De um modo geral, é possível observar que tanto para a pele envelhecida quanto para a fotoenvelhecida, as razões tiveram o mesmo comportamento durante as semanas pós-tratamento. Isso condiz com o que se observou nas imagens clínicas para esses 2 grupos. A diferença entre eles foi os valores médios das razões para cada semana, que no caso do grupo TFD 2 foi menor que o valor do grupo E-TFD 2 em quase todas as medidas (com exceção da semana 3 e 4 do Rc). Essa diferença entre os grupos pode também ser observada nos subgrupos controle, onde o GC apresenta valores médios maiores que GF, mostrando esse comportamento como uma característica de cada tipo de pele.

5.2.4 Histologia

As imagens histológicas das amostras de pele coletadas do flanco dos animais estão mostradas a seguir. A Figura 33 e a Figura 34 apresentam duas imagens de cada subgrupo, referentes à dois animais, feitas no aumento de 400x para coloração de HE (Figura 33) e TM (Figura 34). As imagens foram avaliadas para características como formação de colágeno, densidade de células da derme e espessura da epiderme.

Nos grupos TFD 1 e TFD 2, duas semanas após a terapia (G1 e G3) foi observado que a faixa da derme localizada logo abaixo da epiderme (chamada de grenz zone) apresentou clareamento em comparação com o restante da derme. Isso pode significar uma parcial degradação dos componentes da MEC por proteases

liberadas pós TFD. Já no grupo E-TFD 2 esse efeito não foi observado. Nas imagens de TM, na quarta semana pós TFD (G2, G4 e G6) foi notado o escurecimento relativo e aumento da compactação da grenz zone. Isso sugere que houve uma deposição de fibras colágenas nessa região, como resposta do tecido fotoenvelhecido à TFD. (73,74) O subgrupo G4, comparado aos demais, apresentou essa coloração de azul mais forte em uma região mais extensa devido ao efeito mais intenso da terapia constatado na análise clínica. No entanto, o grupo E-TFD 2 também demonstrou um efeito mais intenso e a indução da produção de colágeno não pareceu ser no mesmo nível que o grupo TFD 2.

Figura 33 – Imagens histológicas da pele de dois camundongos de cada subgrupo. Coloração HE. Aumento 400x. Barra de escala 50 μ m.

continua.

continuação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 34 – Imagens histológicas da pele de dois camundongos de cada subgrupo. Coloração TM. Aumento 400x. Barra de escala 50 μ m.

continua

continuação

G3

G4

G5

G6

Fonte: Elaborada pela autora.

Através das imagens de HE (Figura 33), foi medida a densidade de células (fibroblastos e células inflamatórias) na camada dérmica por mm^2 e os valores médios e respectivos desvios estão apresentados na Figura 35. É possível observar um aumento da população de células da derme nos grupos tratados com relação aos subgrupos controle. Porém esse aumento aconteceu em tempos diferentes para cada grupo. Os animais tratados com iluminação dose única apresentaram essa variação na quarta semana (Figura 36 - G2), sendo que na segunda semana (G1) a população de células foi menor que a do subgrupo GF. Para o grupo tratado com iluminação fracionada, um aumento marcante aconteceu na segunda semana (G3). Esse fato é decorrente da resposta inflamatória provocada pela TFD, que foi muito mais intensa neste grupo. A densidade na quarta semana após a terapia caiu abruptamente para o grupo tratado com TFD fracionada (G4) chegando a apresentar aproximadamente metade da população celular do subgrupo GC e GF. Já para o grupo de animais envelhecidos tratados com TFD 2, a densidade de células na segunda semana foi praticamente igual ao GC e apresentou um aumento na quarta semana (G6). A proliferação e ativação de fibroblastos na derme já foram observadas como um efeito pós TFD. (75) Dessa forma, a constatação de maior densidade de células na derme dos animais tratados corrobora com a observação do aparecimento de regiões mais escuras nas imagens da Figura 34. Esses resultados sugerem que existe uma alteração na evolução temporal dos processos de reparação cutânea, dependendo se a iluminação foi única ou fracionada.

Com relação ao infiltrado inflamatório, um estudo avaliou histologicamente a pele humana 30 dias após tratamento com ALA-TFD e revelou que houve diminuição destas células. (76) O resultado aqui apresentado mostra um aumento da população de células em geral sem distinção entre fibroblastos e infiltrado inflamatório.

Figura 35 – Densidade de células na derme.

Fonte: Elaborada pela autora.

As medidas para análise quantitativa da variação da espessura das peles foi feita como descrito na seção 4.7. Os resultados para espessura média e desvio padrão estão mostrados na Figura 36.

Figura 36 – Gráficos das espessuras da epiderme (A) e da derme (B) dos animais.

Fonte: Elaborada pela autora.

Era esperado que os desvios das espessuras fossem grandes, já que a pele apresenta muitas irregularidades em sua extensão, inclusive no mesmo animal. Ainda assim, é possível comparar os resultados utilizando os valores absolutos médios de cada grupo. A Tabela 5 contém aumentos ou diminuições percentuais de cada subgrupo tratado (G1 a G6) com relação aos valores médios de GF e GC.

Tabela 5 – Aumento e diminuição percentuais das espessuras da epiderme e da derme dos subgrupos G1 a G6 relativos ao GC e GF.

Subgrupos	Epiderme		Derme	
	Porcentagem relativa à GC (%)	Porcentagem relativa à GF (%)	Porcentagem relativa à GC (%)	Porcentagem relativa à GF (%)
G1	19,1	- 4,8	- 1,1	- 4,2
G2	35,8	8,7	- 0,1	- 3,2
G3	216	153	84,4	64,4
G4	27,6	2,2	49	44,4
G5	29,9	4	16,9	13,3
G6	10,2	- 11,8	- 19,3	- 21,8

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da Tabela 5 é possível observar que com relação à espessura da epiderme, todos os subgrupos apresentaram um aumento quando comparados aos seus grupos controle (Figura 36). Após 4 semanas, a epiderme da pele fotoenvelhecida tratada com TFD 1 e TFD 2 estava levemente mais espessa (8,7% e 2,2%, respectivamente) que a pele do GF (Figura 36B). No caso da pele envelhecida tratada com TFD 2, houve um aumento de 10,2% comparada ao GC. O aumento da epiderme após a TFD em modelo animal já foi observado em outros estudos e foi considerado como um resultado com consequências preventivas já que essa camada tem grande importância na proteção contra os danos da radiação UV. (55)

Já em relação à derme, pode-se observar que o grupo TFD 1 apresentou uma pequena redução tanto na segunda (4,2%) quanto na quarta (3,2%) semana pós TFD se comparado ao GF (Figura 36A). O grupo TFD 2 teve uma resposta de espessamento mais notável (Figura 36A), principalmente no subgrupo G3, pois como pode ser visto na Figura 27, nesse subgrupo a ação da TFD foi mais intensa. No período de 2 semanas, a pele ainda apresenta uma resposta aguda à terapia com a proliferação de queratinócitos (aumento na epiderme de 153% em relação ao GF) e elevada infiltração inflamatória aumentando o número de células na derme e induzindo a produção de componentes da MEC (aumento da derme de 64,4%). (73) Após 4 semanas, esse efeito se reduz (aumento de 2,2% na epiderme e 44,4% na derme), porém o grupo TFD 2 é único com aumento da derme após esse período. Por fim, o grupo E-TFD 2 quando comparado ao GC apresentou um aumento de

16,9% na segunda semana e uma redução de 19,3% na quarta semana pós tratamento. Isso mostra que o efeito da TFD fracionada na pele envelhecida foi prejudicial por causar diminuição na espessura da derme o que significa redução dos seus componentes importantes para sustentação e elasticidade da pele.

Quanto à análise da densidade de colágeno na derme superior, para cada subgrupo, uma das duas imagens apresentadas na Figura 34 foi utilizada para a determinação do parâmetro V_{DENS} . A Figura 37 mostra as imagens de absorbância e as respectivas curvas médias para os valores de V_{DENS} em função da profundidade para cada subgrupo.

Figura 37 : Imagens de absorbância e gráficos de V_{DENS} .

continua

continuação

G1

G2

G3

G4

continua

continuação

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar que os primeiros 10 μm do G2 e G4 (4 semanas após a TFD) apresentaram valores de V_{DENS} maiores que o resto da profundidade. Isso sugere um aumento da densidade de colágeno nessa região, assim como pode ser observado nas imagens de TM (Figura 34). Também nos primeiros 10 μm , porém em 2 semanas pós TFD, podemos ver que no G3 houve uma diminuição na V_{DENS} , indicando degradação do colágeno nessa região. Isso foi observado somente para esse grupo, pois a ação da terapia foi mais intensa e acredita-se que o processo de recuperação tenha se estendido. O fato de os outros grupos não apresentarem essa diminuição em 2 semanas (G1 e G5) não significa que não tenham apresentado em um tempo não registrado histologicamente. A inicial degradação de colágeno com posterior deposição de novas fibras após o tratamento da pele fotoenvelhecida com TFD é um resultado já observado na literatura (73), corroborando com o resultado obtido.

5.2.5 Tempo de vida de fluorescência

Durante o período das 4 semanas pós TFD, juntamente com as medidas de espectro de fluorescência, os tempos de vida de fluorescência relacionados ao NADH e FAD foram medidos. A cada semana, foram coletados os parâmetros a_1 , a_2 , τ_1 e τ_2 referentes a esses 2 fluoróforos. Os gráficos a seguir mostram os valores desses parâmetros no formato de *boxplot* na mesma escala para a excitação com o laser de 378 nm: a_1 e a_2 (Figura 38) e τ_1 e τ_2 (Figura 39); e com o laser de 445 nm: a_1 e a_2 (Figura 40) e τ_1 e τ_2 (Figura 41).

Figura 38 – Comportamento dos parâmetros a_1 e a_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 378 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 39 – Comportamento dos parâmetros τ_1 e τ_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 378 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 40 – Comportamento dos parâmetros a_1 e a_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 445 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 41 – Comportamento dos parâmetros τ_1 e τ_2 para os grupos TFD 1 (A e D), TFD 2 (B e E) e E-TFD 2 (C e F) com excitação do laser 445 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 38 é possível observar que sob a excitação com o laser de 378 nm, o valor médio de a_1 do grupo TFD 1 aumenta para 66% na primeira semana e para 70% na terceira semana comparado ao GF (65%) (Figura 38A). No grupo TFD 2 (Figura 38B) comparado a GF e no E-TFD 2 comparado a GC (67%) (Figura 38C) a primeira semana se mantém praticamente constante e o aumento se inicia na segunda semana indo para 68% e 69%, respectivamente. Nas semanas seguintes houve uma redução em a_1 para todos os grupos. Na quarta semana, o valor médio dessa variável foi 67% para G2 e G4 e 68% para G6, se assemelhando mais ao valor médio dos animais envelhecidos que fototenvelhhecidos. A variável a_2 apresentou exatamente o comportamento oposto ($a_1 + a_2 = 100\%$).

Já com relação ao tempo de vida correspondente à a_1 (NADH livre), τ_1 , observa-se que para cada grupo esse parâmetro teve um comportamento diferente durante as 4 semanas (Figura 39). Para o grupo TFD 1 (Figura 39A), houve um decaimento na primeira semana, um aumento na terceira e um novo decaimento da quarta semana. Nesta última, o valor médio de τ_1 (710 ps) ficou abaixo de τ_1 médio para o GC (750 ps), no entanto ficou mais próximo deste grupo que do GF (780 ps). O grupo TFD 2 (Figura 39B) também apresentou um decaimento na primeira semana, mas aumentou na segunda e na terceira e teve uma queda abrupta na quarta semana, ficando com seu valor médio aproximadamente 60 ps abaixo do GC. Da mesma forma que o grupo TFD 1, na última semana de medidas, o valor médio do G4 ficou mais próximo do GC. Para o grupo E-TFD 2 (Figura 39C) houve um aumento de τ_1 médio na semana 1 (770 ps), se mantendo praticamente constante na semana 2 e caindo abruptamente na semana 3 (650 ps). Na última semana, esse valor subiu para 750 ps, se igualando à pele envelhecida.

O tempo de vida referente ao NADH ligado, τ_2 , apresentou uma grande variabilidade entre os animais do grupo TFD 1 (Figura 39D) nas semanas 2 e 3, chegando a 4110 ps nesta última. Na semana 4 houve uma queda e o valor médio de τ_2 foi 3675 ps. Esse valor se encontrou abaixo do mesmo para GC (3750 ps) e GF (3770ps). Para o grupo TFD 2 (Figura 39E), houve uma queda na primeira semana (3580 ps), seguida de um aumento gradativo nas semanas seguinte, chagando a 3700 ps na semana 4. No grupo E-TFD 2 (Figura 39F), τ_2 apresentou um sutil aumento (de 30 ps) nas primeiras 2 semanas, caindo para 3650 ps na

terceira e chegando a 3740 ps na quarta. Novamente, na última semana, as variáveis de tempo de vida tendem a se aproximar do subgrupo GC.

Na Figura 40 estão os valores de a_1 e a_2 obtidos com a excitação em 445 nm, referentes aos estados ligado e livre do FAD, respectivamente. Para o grupo TFD 1 (Figura 40A e 38D) e E-TFD 2 (Figura 40C e 38F) esses parâmetros se comportaram de formas parecidas durante as 4 semanas. Houve um aumento do valor médio de a_1 na semana 1 (76%) comparando com GF e GC (ambos 74%). Nas 2 semanas seguintes esse valor aumentou sutilmente não chegando a 77% e na semana 4 caiu para 75%. Para o grupo TFD 2 (Figura 40B e 38E) esse comportamento foi o oposto. Na semana 1, a_1 apresentou uma diminuição (73%), continuou caindo para 70% na semana 2 e voltou a aumentar na semana 3 chegando a 73% na última semana.

Com relação ao tempo de vida τ_1 , a Figura 41 mostra que o comportamento nos 3 grupos foi bem semelhante. Houve um aumento na semana 1 que se manteve entre 830 e 860 ps para o TFD 2 (Figura 41B) e 825 e 850 ps para o E-TFD 2 (Figura 41C). No caso do grupo TFD 1, o aumento foi maior na semana 1 (975 ps), mas nas semanas seguintes se manteve entre 880 e 910 ps. Comparando as faixas, é possível observar que o subgrupo G2 permaneceu em valores mais altos que o GF (770 ps) e GC (715 ps) quando comparados ao G4 e G6.

Da mesma forma que o τ_1 , o tempo de vida τ_2 apresentou um comportamento bem semelhante entre os grupos tratados com terapia fracionada. Na primeira semana o valor médio de τ_2 aumentou para 3650 ps no G4 (Figura 41E) e 3550 ps no G6 (Figura 41F). No grupo TFD 2, esse parâmetro permaneceu entre 3580 e 3650 ps, chegando a 3600 ps na semana 4. Já no Env. + PDT 2, a faixa foi de 3450 a 3550, valendo 3500 ps na última semana.

O grupo TFD 1 apresentou um aumento nas semanas 1 e 2 chegando a 3800 ps na semana 3. Houve uma grande variabilidade entre os animais desse grupo assim como foi observado para o parâmetro τ_1 . Na última semana o valor médio caiu para 3550 ps. Em todos os casos, após 4 semanas de tratamento o valor de τ_2 foi maior que o do GF (3490 ps) e GC (3400 ps).

Esses resultados mostram que o tempo de vida de fluorescência é sensível para medir as alterações do tecido durante o processo de recuperação da pele. No entanto, não se pode afirmar com certeza que essas alterações são relacionadas

somente ao metabolismo, pois mesmo utilizando comprimentos de onda para excitação preferencial do NADH e FAD, há muitos fluoróforos endógenos que absorvem nesses comprimentos e podem estar interferindo no resultado (Figura 6). Além disso, é preciso considerar que os comprimentos 378 nm e 445 nm possuem baixa penetração na pele, e provavelmente estão coletando excitação apenas da epiderme. Como visto nos resultados histológicos, houve um aumento da espessura da epiderme, principalmente no subgrupo G3. Os resultados de tempo de vida (τ_1 e τ_2) para essa semana não apresentaram alterações marcantes se comparados às outras semanas. No entanto, as quantidades de NADH livre (a_1 – Figura 38B) e FAD livre (a_2 – Figura 39B) para a segunda semana (G3) foram maiores quando comparadas com a mesma semana dos outros grupos (G1 – TFD 1 e G5 – E-TFD 2) e também com as outras semanas do mesmo grupo. Isso pode significar que esse aumento na espessura pode estar metabolicamente relacionado ao aumento na quantidade dessas moléculas.

Ademais, os valores absolutos de a_1 , a_2 , τ_1 e τ_2 obtidos para os subgrupos controle são similares a valores encontrados na literatura para tecidos normais em modelo animal. Pires e colaboradores utilizaram o mesmo sistema de espectroscopia de tempo de vida de fluorescência deste trabalho, para distinguir entre tecido normal e melanoma em camundongos nude balb/c (sem pelo). No tecido normal, com excitação em 378 nm eles obtiveram $a_1 = 68\%$, $a_2 = 32\%$, $t_1 = 800$ ps e $t_2 = 3750$ ps e com excitação em 445 nm, $a_1 = 74\%$, $a_2 = 26\%$, $t_1 = 800$ ps e $t_2 = 3500$ ps. Esses valores estão próximos dos obtidos para a pele dos camundongos do subgrupo GC (378 nm – $a_1 = 67\%$, $a_2 = 33\%$, $t_1 = 750$ ps e $t_2 = 3750$ ps e 445 nm – $a_1 = 74\%$, $a_2 = 26\%$, $t_1 = 770$ ps e $t_2 = 3400$) e GF (378 nm – $a_1 = 65\%$, $a_2 = 35\%$, $t_1 = 780$ ps e $t_2 = 3770$ ps e 445 nm – $a_1 = 74\%$, $a_2 = 26\%$, $t_1 = 715$ ps e $t_2 = 3490$ ps).(63)

De forma geral, não foi constatado um comportamento padrão suficiente para aproximar os dados para uma curva definida. O estudo prolongado desse processo talvez permitisse essa aproximação e também dizer se os valores de τ e a se estabilizam próximos ao tecido fotoenvelhecido ou envelhecido.

6 CONCLUSÕES

A TFD fracionada com os parâmetros: incubação do ALA de 1h, dose de 1 J.cm^{-2} , irradiância de 5 mW.cm^{-2} e intervalo de escuro de 10 min não se mostrou apropriada para pele fotoenvelhecida pois seus efeitos foram além do desejado, com formação de ulceração e cicatriz. Para que a terapia com iluminação fracionada seja aplicável à pele fotoenvelhecida, há a necessidade de um estudo com doses menores que 1 J.cm^{-2} com excitação no comprimento de onda de 404 nm. No entanto, devido a esse resultado, a TFD fracionada seria indicada para o tratamento de displasias dérmicas. Nesses casos, há interesse em eliminar as lesões, sendo necessária uma ação mais intensa da terapia que acaba levando ao desenvolvimento de ulceração. Além disso, nos estudos clínicos de condições com QA são reportados casos em que a aplicação de luz é interrompida por algum tempo devido à dor causada no paciente. Nessa situação, a iluminação fracionada poderia contribuir amenizando o desconforto do paciente.

De maneira geral, foi observado um sutil aumento de colágeno após os dois tipos de iluminação. Através de uma análise computacional, foi revelado um aumento na densidade da derme mais superficial dos grupos fotoenvelhecidos tratados com ambas as terapias. Uma análise mais detalhada do colágeno como espessura e organização das fibras não foi possível devido à variações na coloração das lâminas.

A técnica de diagnóstico óptico com espectroscopia de tempo de vida de fluorescência conseguiu captar variações do processo metabólico de reparação tecidual. No entanto, não foi possível associar os resultados exclusivamente com o NADH e o FAD.

REFERÊNCIAS

- 1 THURSTAN, S. A. et al. Chemical consequences of cutaneous photoageing. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 34, 2012.
- 2 OSMOLA-MANKOWSKA, A. et al. The sun - our friend or foe? **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 19, n. 4, p. 805–809, 2012.
- 3 BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Índice ultravioleta**. Disponível em: <<http://satelite.cptec.inpe.br/acervo/acervo.formulario.logic>>. Acesso em: 10 jun. 2015.
- 4 CASTANO, A. P. et al. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.
- 5 LEE, Y.; BARON, E. D. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 30, n. 4, p. 199–209, 2011.
- 6 RUIZ-RODRIGUEZ, R. et al. Photodynamic photorejuvenation. **Dermatologic Surgery**, v. 28, n. 8, p. 742–744, 2002.
- 7 TOUMA, D. et al. A trial of short incubation, broad-area photodynamic therapy for facial actinic keratoses and diffuse photodamage. **Archives of Dermatology**, v. 140, n. 1, p. 33–40, 2004.
- 8 DOVER, J. S. et al. Topical 5-aminolevulinic acid combined with intense pulsed light in the treatment of photoaging. **Archives of Dermatology**, v. 141, n. 10, p. 1247–1252, 2005.
- 9 MARMUR, E.S. et al. Ultrastructural changes seen after ALA-IPL photorejuvenation: a pilot study. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy** : official publication of the european society for laser dermatology, v. 7, n. 1, p. 21–24, 2005.
- 10 GOLD, M. H. et al. Split-face comparison of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone for photodamage. **Dermatologic Surgery**, v. 32, n. 6, p. 795–801, 2006.
- 11 ZANE, C. et al. Clinical and echographic analysis of photodynamic therapy using methylaminolevulinate as sensitizer in the treatment of photodamaged facial skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 3, p. 203–209, 2007.
- 12 ISSA, M. C. A. et al. Photorejuvenation with topical methyl aminolevulinate and red light: A randomized, prospective, clinical, histopathologic, and morphometric study. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. 1, p. 39–48, 2010.

- 13 KANITAKIS, J. Anatomy , histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390–401, 2002.
- 14 SKIN LAYERS. Disponível em: <<http://imgkid.com/skin-layers.shtml>>. Acesso em: 16 jun. 2015.
- 15 RABE, J. H et al. Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1–19, 2006.
- 16 POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatology Research and Practice**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/135206.
- 17 BENEDETTO, A. V. The environment and skin aging. **Clinics in Dermatology**, v. 16, n. 1, p. 129–139, 1998.
- 18 WLASCHEK, M. et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 63, n. 1-3, p. 41–51, 2001.
- 19 YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 5, p. 874–887, 2007.
- 20 JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, n. 7, p. 801–810, 2002.
- 21 WULF, H. C. et al. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v. 35, n. 3, p. 185–191, 2004.
- 22 KLIGMAN, L. H. The hairless mouse model for photoaging. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 2, p. 183–195, 1996.
- 23 KLIGMAN, L. H. et al. Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 2, p. 181–189, 1982.
- 24 SCHWARTZ, E. Connective tissue alterations in the skin of ultraviolet irradiated hairless mice. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 91, n. 2, p. 158–161, 1988.
- 25 MOLONEY, S. J. et al. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. **Photochemistry and Photobiology**, v. 56, n. 4, p. 505–511, 1992.
- 26 KAMBAYASHI, H. et al. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. **Journal of Dermatological Science**, v. 27 Suppl 1, p. S19–S25, 2001.
- 27 NISHIMORI, Y et al. Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1458–1463, 2001.

- 28 BENAVIDES, F. et al. The hairless mouse in skin research. **Journal of Dermatological Science**, v. 53, n. 1, p. 10–18, 2009.
- 29 GOLDBERG, D. J. Photodynamic therapy in skin rejuvenation. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 608–613, 2008.
- 30 MACCORMACK, M. A. Photodynamic therapy. **Advances in Dermatology**, v. 22, n. 2006, p. 219–258, 2006.
- 31 BITTER, P. H. Noninvasive rejuvenation of photodamaged skin using serial, full-face intense pulsed light treatments. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n. 9, p. 835–843, 2000.
- 32 KARRER, S. et al. Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. **British Journal of Dermatology**, v. 151, n. 4, p. 776–783, 2004.
- 33 MACCORMACK, M. A. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n. 1, p. 52–62, 2008.
- 34 ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.
- 35 KENNEDY, J. C. et al. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 6, n. 1-2, p. 143–148, 1990.
- 36 TOUMA, D. J.; GILCHREST, B. A. Topical photodynamic therapy: a new tool in cosmetic dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 124–130, 2003.
- 37 REDMOND, R. W.; GAMLIN, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 4, p. 391–475, 1999.
- 38 ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.
- 39 JEFFES, E. W. et al. Photodynamic therapy of actinic keratoses with topical aminolevulinic acid hydrochloride and fluorescent blue light. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 1, p. 96–104, 2001.
- 40 KIM, H. S. et al. Topical photodynamic therapy using intense pulsed light for treatment of actinic keratosis: clinical and histopathologic evaluation. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 1, p. 33–36, discussion 36–37, 2005.
- 41 ALEXIADES-ARMENAKAS, M. R.; GERONEMUS, R. G. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic keratoses. **Archives of Dermatology**, v. 139, n. 10, p. 1313–1320, 2003.

- 42 SMITH, S.; PIACQUADIO, D.; MORHENN, V.; ATKIN, D.; FITZPATRICK, R. Short incubation PDT versus 5-FU in treating actinic keratoses. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 2, n. 6, p. 629–635, 2003.
- 43 MORTON, C. A. et al. Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 143, n. 4, p. 767–772, 2000.
- 44 SOTIRIOU, E. et al. Single vs. fractionated photodynamic therapy for face and scalp actinic keratoses: a randomized, intraindividual comparison trial with 12-month follow-up. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. 1, p. 36–40, 2012.
- 45 BRUIJN, H. S. et al. Fractionated illumination after topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless mice: the influence of the dark interval. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 85, n. 3, p. 184–190, 2006.
- 46 ROBINSON, D. J. et al. Dose and timing of the first light fraction in two-fold illumination schemes for topical ALA-mediated photodynamic therapy of hairless mouse skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 3, p. 319–323, 2007.
- 47 DE BRUIJN, H. S. et al. Light fractionated ALA-PDT enhances therapeutic efficacy in vitro; the influence of PpIX concentration and illumination parameters. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, n. 2, p. 241–245, 2013.
- 48 ROBINSON, D. J. et al. Topical 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy of hairless mouse skin using two-fold illumination schemes: PpIX fluorescence kinetics, photobleaching and biological effect. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 6, p. 794–802, 2000.
- 49 HAAS, E.R.M. et al. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 12, p. 2679–2686, 2006.
- 50 SZEIMIES, R. M. et al. Photodynamic therapy for skin rejuvenation: treatment options - results of a consensus conference of an expert group for aesthetic photodynamic therapy. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, v. 11, n. 7, p. 632–637, 2013.
- 51 BIGIO, I. J.; MOURANT, J. R. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 5, p. 803–814, 1997.
- 52 WURM, E. M. T. et al. In vivo assessment of chronological ageing and photoageing in forearm skin using reflectance confocal microscopy. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 2, p. 270–279, 2012.

- 53 LONGO, C. et al. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 3, p. e73–e82, 2013.
- 54 WU, S. et al. Optical features for chronological aging and photoaging skin by optical coherence tomography. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 445–450, 2013.
- 55 JORGE, A. E. S. **Terapia fotodinâmica em pele fotoenvelhecida de camundongo hairless : avaliação por técnicas óptica e histopatológica**. 2014. 182 p. Tese (Doutorado 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.
- 56 WHELLER, L. et al. Noninvasive methods for the assessment of photoageing. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 54, n. 4, p. 290–5, 2013.
- 57 MICHALET, X. et al. The power and prospects of fluorescence microscopies and spectroscopies. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 161–182, 2003. doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.142525.
- 58 KOLLIAS, N. et al. Fluorescence spectroscopy of skin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 28, n. 1, p. 17–23, 2002.
- 59 GILLIES, R. et al. Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 4, p. 704–707, 2000.
- 60 MARCU, L. et al. **Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics**. New York, CRC PRESS, 2010.
- 61 CHORVAT, D.; CHORVATOVA, A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. **Laser Physics Letters**, v. 6, n. 3, p. 175–193, 2009. doi: 10.1002/lapl.200810132.
- 62 SKALA, M. C. et al. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19494–19499, 2007.
- 63 PIRES, L. et al. Time-resolved fluorescence lifetime for cutaneous melanoma detection. **Biomedical Optics Express**, v. 5, n. 9, p. 3080, 2014.
- 64 THOMPSON, A. J. et al. In vivo measurements of diffuse reflectance and time-resolved autofluorescence emission spectra of basal cell carcinomas. **Journal of Biophotonics**, v. 5, n. 3, p. 240–254, 2012.
- 65 BUTTE, P. V. et al. Intraoperative delineation of primary brain tumors using time-resolved fluorescence spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 2, p. 027008, 2015.

- 66 PERES, P. S. et al. Photoaging and chronological aging profile: understanding oxidation of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 103, n. 2, p. 93–97, 2011.
- 67 COSTA, M. M. **Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontológico**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 68 NOGUEIRA, M. et al. Montagem e caracterização de sistema de espectroscopia e tempo de vida de fluorescência utilizando fibra óptica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 24., 2014, Uberlandia. **Proceedings ... Uberlandia: CREB**, 2014. p. 2468–2471.
- 69 BECKER, W. et al. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. **Microscopy Research and Technique**, v. 63, n. 1, p. 58–66, 2004.
- 70 ANDRADE, C. T. et al. Identification of skin lesions through aminolaevulinic acid-mediated photodynamic detection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 3, p. 409–415, 2014.
- 71 BABILAS, P. et al. Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 9, p. 1462–1469, 2003.
- 72 POGUE, B. W.; HASAN, T. A theoretical study of light fractionation and dose-rate effects in photodynamic therapy. **Radiation Research**, v. 147, n. 5, p. 551–559, 1997.
- 73 ORRINGER, J. S. et al. Molecular effects of photodynamic therapy for photoaging. **Archives of Dermatology**, v. 144, n. 10, p. 1296–1302, 2008.
- 74 ROSSI, R. Photodynamic therapy/assisted photorejuvenation. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 01, n. 02, p. 30–35, 2011.
- 75 JANG, Y. H. et al. Prolonged activation of ERK contributes to the photorejuvenation effect in photodynamic therapy in human dermal fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 9, p. 2265–2275, 2013.
- 76 PARK, M. Y. et al. Photorejuvenation induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in patients with actinic keratosis: a histologic analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 62, n. 1, p. 85–95, 2010.

ANEXO

Parecer da Comissão de Ética para uso de Animais

**IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador são-carlense, 400 / 13566-590
Caixa Postal 369 / 13560-970
São Carlos - SP, Brasil
Fone: +55 16 3373-9758
www.ifsc.usp.br

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

Protocolo nº 02/2014

A Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos – CEUA/IFSC, em reunião realizada no dia 24.06.2014, **aprovou** o projeto de pesquisa intitulado “Combinação de duas modalidades terapêuticas na pele fotoenvelhecida de camundongos hairless: Terapia Fotodinâmica e LEDterapia”, submetido pela pesquisadora Carolina de Paula Campos.

São Carlos, 03 de julho de 2014.

Profa. Dra. Cristina Kurachi
Presidente da CEUA/IFSC