UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MICHELLE BARRETO REQUENA

Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele normal de suínos e diferentes fotossensibilizadores

São Carlos
2015

MICHELLE BARRETO REQUENA

Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele normal de suínos e diferentes fotossensibilizadores

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação 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: Dra. Priscila Fernanda Campos de Menezes
Co-Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Versão Corrigida

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

Barreto Requena, Michelle

Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele normal de suínos e diferentes fotossensibilizadores / Michelle Barreto Requena; orientadora Priscila Fernanda Campos de Menezes; co-orientador Vanderlei Salvador Bagnato -- São Carlos, 2015.

100 p.

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

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Luz intensa pulsada. 3. Fotossensibilizadores. 4. Modelo animal. 5. Pele suína. I. Campos de Menezes, Priscila Fernanda, orient. II. Salvador Bagnato, Vanderlei, co-orient. III. Título.

À minha família, com amor, admiração e gratidão
pelo incansável apoio ao longo período de elaboração deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por me guiar rumo aos meus sonhos.

Aos meus pais, João Carlos e Maria Isaura, pelo incentivo aos estudos, apoio e preocupação. À eles, parte do mérito de minhas conquistas e meu amor incondicional.

Ao meu irmão Matheus, pelo orgulho que sente de mim que enche meu coração, amarei independentemente da situação.

Ao meu marido Gabriel, que há anos faz com que tudo se torne mais simples e prazeroso, por me acompanhar tão de perto e me entender tão bem, meu eterno amor e gratidão.

A minha família: avós, tios e primos, sogra e cunhada, que completam meus finais de semana em Araçatuba, os quais eu sinto tanta falta e amor.

Aos meus amigos de graduação, Sabrina Nicoleti, Carla Signori, Tércius Ramos e Larissa de Oliveira, com quem tive momentos incríveis e ainda participam muito da minha vida, meu eterno carinho.

As amigas de Araçatuba, especialmente, Thamires Palomino e Nathália Tonheiro, que sempre torcem e se preocupam comigo.

Ao meu grande amigo José Dirceu Vollet-Filho, uma pessoa maravilhosa, que foi excepcional para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada por tudo!

Um agradecimento especial às amigas Mariana Carreira, Layla Pires, Mirian Stringasci e Cintia Teles, princesas com quem tive o prazer de dividir muitas horas no laboratório, sempre com muito apoio, risadas e amizade.

À amiga Hilde Buzzá, por todos os momentos e conversas nos últimos anos, uma pessoa que eu admiro muito.

Aos amigos Clóvis Grecco e Sebastião Pratavieira, que me ensinaram muito durante estes anos, pessoas que me acompanharam de perto sempre que possível. Obrigada pelos aprendizados e amizade.

Às colegas Thereza Cury e Priscila Weiss pela colaboração com o processamento das imagens e preparo de lâminas.

A minha querida orientadora Priscila, por tudo que me ensinou durante o mestrado e pela amizade que me concedeu, te agradeço imensamente por ter compartilhado tanto comigo.

Ao professor Vanderlei, que além da co-orientação deste trabalho, sou grata pela inspiração científica e pela oportunidade de pertencer há sete anos ao Grupo Óptica que moldou muitos dos meus pensamentos, o meu eterno agradecimento.

À professora Cristina e a todos os colegas do laboratório de Biofotônica, por fazerem minha rotina ser tão prazerosa. Tenho uma imensa satisfação por conviver com vocês.

Às técnicas do laboratório, Natália Inada e Lilian Moriyama, pelo suporte quando necessário e amizade.

Aos professores Andriago Barbosa de Nardi e André Escobar, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP–Jaboticabal, agradeço a colaboração com o trabalho, os ensinamentos e atenção, pesquisadores com quem tive orgulho de trabalhar. Não menos importante, à mestranda Rozana Wendler pela amizade e dedicação aos experimentos com os animais, sempre responsável e prestativa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Óptica e Fotônica (INOF) e ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF), pelo apoio financeiro.

Por último, mas de extrema importância, agradeço muito aos animais, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho! Meu eterno respeito.

RESUMO

REQUENA, M. B. **Avaliação da Terapia Fotodinâmica aplicada com luz intensa pulsada em pele normal de suínos e diferentes fotossensibilizadores.** 2015. 100. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) caracteriza-se por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorre após a administração de compostos fotossensibilizantes, que ficam retidos preferencialmente nos tecidos alterados, ao que se segue a irradiação com luz visível, ativando esses fotossensibilizadores (FS) por meio da absorção da luz. Nesta modalidade terapêutica, ocorrem mecanismos de transferência de energia entre o FS e o oxigênio molecular presente nos tecidos, gerando espécies reativas de oxigênio capazes de levar as células à morte. A TFD tem uma de suas principais aplicações no tratamento do câncer de pele, e este trabalho tem por objetivo otimizar tal aplicação utilizando a luz intensa pulsada (LIP) como sistema de irradiação. Na literatura, estudos demonstram a eficiência da aplicação de LIP na área dermatológica e estética na remoção de pelos, tratamento de lesões vasculares, acne e no fotorejuvenescimento da pele, através de efeitos fotoquímicos e térmicos, mas não há relatos sobre aplicações terapêuticas para o câncer de pele. A aplicação da LIP em TFD leva a diferentes tipos de vantagens destacando-se a possibilidade de diminuição do tempo de tratamento, com consequente redução da dor durante o procedimento. Além disso a possibilidade de aplicação de misturas de FSs que absorvam em diferentes comprimentos de onda, promovendo a ativação simultânea de diferentes bandas de absorção que pode levar a potencialização do efeito da TFD. A ideia da irradiação com LIP é permitir a possibilidade de excitar diferentes bandas do FS simultaneamente, bem como reduzir os níveis de saturação do oxigênio dos tecidos devido a longos períodos de irradiação, minimizando também possíveis efeitos térmicos ocasionados pela irradiação prolongada. Neste trabalho, estudou-se a TFD com um equipamento comercial de LIP (Intense Pulse Light, HKS801) utilizando dois precursores do FS endógeno Protoporfirina (PpIX), 5-ácido aminolevulínico (ALA) e aminolevulinato de metila (M-ALA) e os FSs Photodithazine (PDZ) e Indocianina verde (ICV), em modelo de pele normal de suínos. As diferenças relativas à aplicação tópica de ALA e M-ALA por meio de creme e através da aplicação em sistema de injeção de alta pressão sem agulhas (SAFE INJECT) foram avaliadas. O sistema de injeção também foi utilizado para disponibilização dos FSs na pele. O estudo *in vitro* mostrou que a LIP interagiu com todos os FSs e levou à multiaativação de suas bandas. Com relação aos estudos *in vivo* observou-se diferentes aspectos do uso da LIP para TFD. A avaliação de fluorescência mostrou que a distribuição por injeção foi mais homogênea, sugerindo a possibilidade de protocolos de TFD menos demorados. A análise termográfica mostrou que não ocorre aquecimento relevante do tecido nas aplicações de LIP em aplicações de TFD no protocolo utilizado. A avaliação histológicas das condições entre 24 e 48 horas permitiu observar as diferentes fases do processo cicatricial em função do tempo decorrido. O estudo possibilitou maior entendimento sobre os efeitos da LIP em tecido biológico, especialmente em associação à TFD. Também foi estabelecido, pela primeira vez, um modelo de protocolo para investigação do uso da LIP em modelo animal para TFD em pele, que pode ser extrapolado em futuros estudos para tratamentos oncológicos e dermatológicos. Consideradas as possibilidades oferecidas e a pronta disponibilidade do dispositivo para irradiação, a TFD com LIP torna-se viável técnica e comercialmente para uso clínico.

Palavras chaves: Terapia Fotodinâmica. Luz intensa pulsada. Fotossensibilizadores. Modelo animal. Pele suína.

ABSTRACT

REQUENA, M. B. **Evaluation of Photodynamic Therapy using intense pulsed light on porcine healthy skin with different photosensitizers**. 2015. 100. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Photodynamic Therapy (PDT) is mainly composed of physical, chemical, and biological processes that occur after administration of photosensitizing compounds, which are selectively held in abnormal tissues. After visible light irradiation, those photosensitizers (PS) are activated by light absorption. During treatment, energy transfer mechanisms take place between PS and molecular oxygen that is available in tissues, promoting the generation of reactive oxygen species that bring cells to death. One of this technique's main applications is skin cancer treatment, and this study aims to optimize such a PDT application by using intense pulsed light (IPL) as irradiation system. Literature shows IPL efficacy on dermatological aesthetic procedures, such as hair removal, treatment of vascular lesion, acne and skin photorejuvenation, promoted by photochemical and thermal effects. However, skin cancer treatment was never reported. Using IPL for PDT may bring advantages such as reducing the treatment sessions, which reduces pain during procedures, and the ability to use PS blends that will absorb in different regions of wavelengths, resulting in simultaneous activation of different absorption bands and improving PDT effect. Shorter irradiation may reduce oxygen depletion due to long irradiation periods, and major thermal effects. In this study, PDT was performed using an IPL commercial device (Intense Pulse Light, HKS801) with the application of two PpIX precursors (ALA and MAL) and the exogenous PS Photodithazine (PDZ) and Indocyanine Green (ICG) on porcine health skin model. Administration of the PS or PpIX precursors were investigated both by vehiculation via cream and by high pressure, needle-free injection (SAFE INJECT). The results obtained in this study showed that the damage induced by PDT using the needle-free injection is more expressive than for cream vehiculation. The *in vitro* study showed that IPL interacted with all PS and promoted absorption bands multi-activation. The *in vivo* studies showed different aspects of using IPL for PDT. Fluorescence investigation showed that the distribution by the needle-free injection was more homogeneous, suggesting that shorter PDT protocols are possible. Thermography imaging showed that no relevant heating was observed for IPL applications of PDT during the protocols of choice. Histological analysis of conditions between 24 and 48 hours allowed observing the different stages of the healing process as a function of time. This study provided deeper understanding of IPL effects in biological tissues, and particularly when associated to PDT. In addition, for the first time, an investigation protocol for the use of IPL-PDT in porcine healthy skin was designed, which can be extrapolated for future studies on cancer and skin lesions. Given the possibilities and the prompt availability of the irradiation device, IPL-PDT is readily available technically and commercially for clinical use.

Keywords: Photodynamic Therapy. Intense pulsed light. Photosensitizers. Animal model. Porcine skin.

LISTA DE ABREVIACÕES

DMSO	Dimetilsulfóxido
FS	Fotossensibilizador
HE	Hematoxilina e Eosina
ICV	Indocianina Verde
Nd ³⁺ :YAG	Neodímio YAG (ítrio-alumínio-granada)
PDZ	Photodithazine
PSR	Picro-Sirius Red
PpIX	Protoporfirina IX
PBS	Solução tampão fosfato–salino
TFD	Terapia Fotodinâmica
TM	Tricrômico de Masson

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	FUNDAMENTOS DE TERAPIA FOTODINÂMICA	17
1.2	FONTES DE LUZ	20
1.2.1	<i>Entrega de luz.....</i>	22
1.3	FOTOSENSIBILIZADORES.....	24
1.4	MODELO ANIMAL.....	25
1.5	EXPLORAÇÃO DA LIP COMO FONTE DE LUZ PARA TFD.....	27
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	ANIMAIS.....	31
3.2	FONTE DE LUZ.....	32
3.3	FOTOSENSIBILIZADORES.....	37
3.3.1	<i>Métodos de administração</i>	40
3.4	FOTODEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>	41
3.5	TERAPIA FOTODINÂMICA EM SUÍNOS	42
3.5.1	<i>Fluorescência de campo amplo.....</i>	45
3.5.2	<i>Termografia</i>	48
3.5.3	<i>Histologia.....</i>	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	FOTODEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>	51
4.2	TFD EM SUÍNOS – PILOTO	57
4.3	TFD EM SUÍNOS – GRUPOS EXPERIMENTAIS	63
4.3.1	<i>Fluorescência de campo amplo</i>	64
4.3.2	<i>Termografia</i>	68

4.3.3	<i>Histologia</i>	71
5	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNDAMENTOS DE TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que baseia-se no uso de três componentes: um fotossensibilizador (FS), luz e o oxigênio molecular presente na célula a ser tratada. A interação destes itens promove eventos fotoquímicos de transferência de energia gerando espécies reativas de oxigênio, como radicais livres e oxigênio singleto, que desencadeiam reações fotobiológicas levando as células à morte por apoptose e/ou necrose. (1)

O processo pelo qual a TFD ocorre, inicia-se com o fornecimento de energia ao sistema através da irradiação do tecido fotossensibilizado. A molécula do FS absorve esta energia e passa do estado fundamental (S_0) para um estado mais energético (S_n), sendo ambos os estados singletos. Por conversão interna, há a possibilidade de decaimento até o menor nível vibracional dentro do estado excitado (S_1). Nesta condição, a molécula pode decair para o estado fundamental, emitindo fluorescência ou pode ocorrer um cruzamento intersistema, no qual a molécula do FS pode ir para um estado tripleto excitado (T_1). Neste estado, por sua vez, pode decair para o estado fundamental, emitindo fosforescência; este mesmo estado tripleto excitado também pode interagir com biomoléculas adjacentes, levando aos efeitos esperados na TFD. (2,3) Estes processos estão ilustrados na Figura 1, por uma adaptação do diagrama de Jablonski.

Figura 1 – Diagrama de Jablonski adaptado para descrever as possíveis trajetórias após a excitação da molécula de FS.

Fonte: Adaptação de GRECCO. (4)

Os resultados do cruzamento intersistema são relevantes para a TFD, pois quando o FS está no estado tripleto excitado há a interação com as biomoléculas do ambiente originando oxidações, fotoprodutos citotóxicos ou mesmo espécies reativas de oxigênio.

Há dois tipos predominantes de reações possíveis para TFD, que são nomeadas como reação do tipo I (ou via formação de radicais) e reação do tipo II (ou via formação de oxigênio singlete). Na reação do tipo I, o FS no estado excitado tripleto pode interagir com o substrato biológico transferindo elétrons ou abstraindo um átomo de hidrogênio. A reação do tipo II, por outro lado, é uma reação de estado excitado, na qual o FS no estado tripleto excitado transfere energia para o oxigênio molecular no estado fundamental, também tripleto, levando-o a um estado excitado que favorece a conversão de um spin formando oxigênio singlete, uma espécie reativa de oxigênio que é altamente citotóxica e desencadeia danos celulares responsáveis pela morte da célula. (2)

Ambas as vias de reação tornam este processo bastante eficiente na geração de espécies reativas de oxigênio, que no ambiente celular mostram-se citotóxicas visto que as células não apresentam condições de suprimir grandes quantidades destas espécies, que assim oxidam membranas celulares, organelas e biomoléculas essenciais, levando a célula a lise ou a inviabilidade tal que induz apoptose. Por conta disso, este processo tem sido amplamente utilizado como técnica para o tratamento de variadas condições patológicas, como aquelas de alta proliferação celular como o câncer e o controle de infecções microbiológicas. (5,6)

A TFD apresenta benefícios em relação aos outros tratamentos: é considerada uma técnica pouco invasiva, sendo que um pequeno número de suas aplicações exigem uso de um centro cirúrgico para serem realizadas.

Quando comparada com outras modalidades de tratamentos, em especial oncológicos, além de apresentar efeitos adversos controláveis como no caso da fotossensibilidade, a TFD causa dano seletivo às células tumorais fotossensibilizadas, visto que estas acumulam preferencialmente os FSs, evitando portanto, a morte expressiva de células normais. Além disso, a aplicação da TFD no controle microbiológico de diversas doenças vem apresentando resultados satisfatórios, principalmente quando se leva em conta que não depende de um único sítio de ação, como o fazem os antibióticos, o que previne o surgimento de resistência das linhagens. (5)

Como efeito colateral significativo apresenta apenas a fotossensibilidade temporária do paciente, que pode variar entre dias e semanas, conforme o FS escolhido. No entanto, mesmo essa limitação intrínseca tem sido reduzida: FSs com elevada efetividade e rápida eliminação, bem como precursores de FSs aplicados topicamente, podem permitir redução da fotossensibilidade de períodos. (7)

A TFD ainda se encontra em desenvolvimento uma vez que ainda existem limitações de ordem técnica que vem sendo estudadas e contornadas constantemente. Estas limitações da TFD estão relacionadas com a dificuldade de quantificar as propriedades ópticas do tecido da região a ser tratada e a distribuição da luz no tecido, bem como a concentração de FS e oxigênio disponível. Neste contexto, a busca de novas combinações de fontes de luz e FSs são fundamentais para

aprimorar o entendimento sobre estes parâmetros, o que é indispensável para o aprimoramento da técnica.

Ao realizar TFD, a escolha da fonte de luz para a irradiação é feita com base no local anatômico a ser tratado e na extensão da lesão. Neste sentido, a quantidade de energia que é necessária para o tratamento depende também do tipo de FS que mais se adequa à aplicação. A maioria dos FSs utilizados na TFD possui um espectro de absorção amplo, apresentando uma banda principal na faixa do violeta-azul (banda de Soret) e bandas menores nas regiões do verde e vermelho (bandas Q).

De acordo com a janela óptica (também chamada de janela terapêutica, para TFD) ilustrada na Figura 2, a absorbância dos principais cromóforos presentes na pele (hemoglobina, oxiemoglobina e melanina) diminui no intervalo entre 600-1200 nm, e por isso, comprimentos de onda usados para a irradiação neste intervalo são mais eficazes quando se é necessária uma alta penetração da luz no tecido. (8)

Figura 2 – Espectros de absorbância da água e dos componentes biológicos da pele que caracterizam a janela óptica.

Fonte: Adaptada de PLAETZER. (8)

Uma vez que este trabalho propõe a otimização da interação da luz com o FS por meio da múltipla ativação das bandas de absorção dos FSs com a irradiação com uma fonte de luz de espectro amplo de emissão e alta energia por disparo, convém descrever os tipos de fonte de luz utilizados em TFD, e que vantagens a luz intensa pulsada (LIP) pode apresentar para a terapia.

1.2 FONTES DE LUZ

Uma fonte de luz considerada ideal para a irradiação em TFD pode ser descrita como aquela que forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do FS, sem efeitos térmicos significativos. (9) As fontes de luz diferem entre si, basicamente, pelo seu espectro de emissão e o processo pelo qual emitem luz. Entre as principais fontes de luz utilizadas, estão os lasers, os diodos emissores de luz (LED) e as lâmpadas. Na Figura 3, estão ilustrados os espectros de emissão normalizados destas fontes de luz.

Figura 3 – Espectro de intensidade emissão normalizado de algumas fontes de luz.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em termos de largura do espectro de emissão, os lasers possuem um espectro mais estreito com relação às outras fontes de luz, o que faz com que seu feixe seja considerado monocromático. Isso acontece por conta do processo de emissão estimulada de luz, que permite que fótons de energia muito bem determinada sejam emitidos pelo dispositivo laser. (10)

Os LEDs de cores definidas possuem um espectro de emissão mais amplo em relação a lasers, emitindo luz em uma faixa de comprimentos de onda (aproximadamente 50 nm de largura). Entretanto, LEDs brancos são uma exceção à regra, pois possuem dois picos de emissão originando um espectro mais largo de emissão se comparado a outros LEDs.

Uma lâmpada de xenônio (como a do sistema de LIP utilizado neste estudo), por sua vez, possui uma larga banda de emissão que compreende a região do visível 400-800 nm e uma porção do infravermelho, os picos do espectro correspondem a emissão dos picos característicos do gás de que é composta.

O laser é uma das fontes de luz mais utilizadas em TFD devido à alta intensidade e possibilidade de acoplamento em fibras ópticas, que permitem irradiar regiões de difícil acesso, além da possibilidade de seleção bem determinada de um comprimento de onda que permita ativar uma das bandas específicas de um FS. É possível utilizar para a realização de tratamentos, os lasers de Neodímio YAG (ítrio–alumínio–granada, $\text{Nd}^{3+}:\text{YAG}$) com a obtenção de feixes de 200 nm a 2000 nm, porém possuem alto custo de aquisição e manutenção. Uma alternativa de custo intermediário são os lasers de diodo, com emissão passível de ser obtida em praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo; com este tipo de laser ainda é possível fornecer luz pulsada com considerável potência e precisão sobre o tecido irradiado. Apesar dos benefícios apresentados pelos lasers, o fato de possuírem um espectro de emissão essencialmente monocromático faz com que apenas uma das diferentes possibilidades de transição possíveis para a absorção dos FSs seja aproveitada.

Os diodos emissores de luz podem ser indicados em alguns casos, como por exemplo; para o tratamento de uma região extensa, com a vantagem adicional de um custo reduzido. O LED branco, por exemplo, possui um espectro de emissão ainda mais amplo que os LEDs de cores definidas, permitindo um possível aproveitamento das diferentes bandas de absorção. Contudo, sua penetração no tecido alvo varia muito com o comprimento de onda e, portanto, deve ser analisada com cuidado, devido ao fato de que a energia está distribuída ao longo do espectro. (3,11)

No início dos estudos com TFD, utilizavam-se lâmpadas para a realização da irradiação, mas devido ao uso de filtros para seleção de uma faixa de comprimento de onda para excitação do FS, a intensidade era reduzida. O custo desta fonte de luz é considerado baixo, porém a eficiência é menor, além da necessidade do uso de um sistema para a dissipação do calor para possibilitar o tratamento.

O equipamento de LIP foi comercialmente lançado como um dispositivo médico em na década de 90, a evolução na sua fabricação e montagem permitiu um manejo mais fácil e com maior segurança. Os equipamentos de LIP são dispositivos com lâmpadas de *flash*, com capacitores capazes de gerar luz pulsada de alta intensidade policromática, sendo possível o ajuste de parâmetros por computador. (12)

Antes do surgimento de fontes de LIP, a TFD já se desenvolvia, utilizando fontes de luz como os lasers (e, posteriormente, os LEDs). É válido notar que as diferentes fontes de luz têm seu papel em aplicações como a TFD. Lasers permite amplo acesso a lesões em órgãos ocos como esôfago, estômago e intestinos, por conta da facilidade de acoplamento da luz em fibras ópticas, além das altas potências que se pode gerar com eles, apesar dos altos custos comumente envolvidos. Os LEDs, por sua vez, apresentam custo e consumo muito menores, com razoável monocromaticidade, o que permite que substituam os lasers em várias aplicações, em especial nas lesões superficiais. Nesse sentido, a LIP não vem como um substituto destas fontes, mas como uma

alternativa para os casos em que é preciso alta penetração da luz que ativa o FS (como lesões volumosas), ou em que danos térmicos são uma preocupação importante – uma vez que seu uso prevê a possibilidade de ativação múltipla das bandas de um FS a pulsos curtos, favorecendo a dissipação de energia térmica no tecido nos intervalos dos disparos, e o máximo aproveitamento da ativação do FS.

Existem diversos fatores que podem influenciar na resposta do paciente ao tratamento com LIP, como a temperatura, espessura e fototipo da pele; a perfusão sanguínea local; a quantidade, espessura e coloração dos pelos; presença de glândulas sebáceas; além de bronzeamento ou tatuagens. O uso de LIP provinda de lâmpadas é eficiente na área dermatológica e estética na remoção de pelos e tratamento de lesões vasculares, tatuagens, e no fotorejuvenescimento da pele por causa do dano fotoquímico e térmico seletivo ao alvo pela seleção de comprimento de onda, intensidade, duração e intervalo do pulso. (12) Há estudos que revelam que a utilização da LIP como fonte de luz em TFD no tratamento de acne também apresentou resultados promissores. (13–15)

A utilização de equipamentos de LIP apresenta diversas vantagens, como um menor preço de aquisição e uma maior área de irradiação quando comparados aos lasers, possibilidade de administração em diversas aplicações para a pele, com alta versatilidade e tecnologia robusta. Entretanto, o manípulo possui um peso considerável para a aplicação clínica (já que a lâmpada e mecanismos de refrigeração ficam nesta parte do equipamento) e, dependendo da aplicação, uma área de irradiação grande pode ser uma complicação, já que por conta disso a luz não pode ser focalizada e é necessária a aplicação de um gel no local a ser irradiado. (16)

A aplicação da luz pulsada em TFD com LIP leva a diferentes vantagens, visto que diminui o tempo de tratamento com consequente redução da dor durante o procedimento. Além disso, a TFD com LIP diminui a necessidade de fidelização a um só tipo de FS já que emite luz em diferentes comprimentos de onda (do violeta ao infravermelho) dependendo do tipo de filtro utilizado. A proposta baseia-se na possibilidade da LIP ser capaz de fotoativar um maior número de bandas dos FSs gerando a formação de uma maior quantidade de oxigênio singleto em um tempo relativamente curto, evitando a depleção da oxigenação do tecido pelo tempo elevado de irradiação.

1.2.1 Entrega de luz

A irradiação com luz contínua (CW, do inglês: *continuous wave*) é amplamente utilizada em TFD. (17) Estudos realizados no Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP, compararam os efeitos da TFD utilizando laser CW e o laser de pulsos ultracurtos em regime de femtossegundos. Foram realizados experimentos *in vitro* em diferentes intensidades, avaliando a

taxa de fotodegradação do FS empregado, e estudos *in vivo*, avaliando a profundidade de necrose promovida por essas fontes de luz. (18,19)

Os relatos na literatura não apresentam um consenso sobre a eficiência do uso de fontes de luz pulsada para a realização de TFD. Uma variedade de parâmetros ainda precisa ser determinada para uma dosimetria adequada com esse tipo de irradiação. (20–23) O tempo característico da irradiação em TFD é um fator importante a ser analisado, uma vez que a escala de tempo da entrega da luz influencia diretamente na excitação da molécula de FS. De acordo com o diagrama de Jablonski, discutido na Figura 1 da Seção 1.1, a molécula após ser excitada leva alguns nanosegundos para decair para o estado fundamental emitindo fluorescência; quando por cruzamento intersistema passa para um estado tripleto excitado, o tempo de emissão fosforescência pode variar entre nanosegundos, microssegundos até milissegundos dependendo do tipo de molécula.

Na utilização de uma fonte de luz, como o sistema de LIP, cada disparo contém um trem de pulsos. O número de pulsos deste trem pode ser controlado pela chave seletora do sistema. Cada pulso deste trem possui duração de milissegundos entre um pulso e outro; o tempo entre os disparos é da ordem de segundos (para que o capacitor que alimenta esteja carregado para a realização do próximo disparo). A Figura 4, ilustra os pulsos em um sistema de LIP, que comparados a um sistema de femtossegundos, por exemplo, possuem tempos longos de emissão.

Figura 4 – Esquema característico dos pulsos de um sistema de LIP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o intervalo entre cada pulso do trem é da ordem de milissegundos, acredita-se que este tempo seja suficiente para que as moléculas excitadas pelo pulso anterior tenham retornado ao estado fundamental, quando o próximo pulso chegar até a molécula; além de que o intervalo de tempo entre um disparo e outro, de alguns segundos, é suficiente para que o tecido tenha se reoxigenado. Desta forma, pode-se dizer que a excitação promovida por uma fonte de luz com estas características pode ter uma alta eficiência na TFD, uma vez que o efeito fotodinâmico pode ser intensificado pela maior disponibilidade local de oxigênio.

Comparado com a realização de TFD com sistemas de laser (CW) e LEDs, é possível entregar uma mesma fluência com LIP em um tempo menor de irradiação, devido à irradiação deste sistema de LIP permitir a emissão de vários disparos em poucos minutos. Além disso, o espectro de emissão deste sistema contempla mais de uma banda de absorção do FS, podendo aumentar a eficiência quântica de geração de espécies reativas de oxigênio, por meio de reações fotoquímicas do tipo I (formação de espécies oxidativas) e reações fotoquímicas do tipo II (formação de oxigênio singlete).

1.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

Fotossensibilizadores são substâncias que apresentam sensibilidade à luz. Para o uso em TFD são recomendados aqueles que apresentam solubilidade e estabilidade em solução aquosa com pH fisiológico; seletividade à célula alvo ao tratamento com tempo de incubação viável para a aplicação desejada; possuir alto rendimento quântico; ter nenhuma ou baixa toxicidade a níveis terapêuticos e rápida eliminação ou metabolização pelo organismo para diminuir a fotossensibilidade após o tratamento. (24,25)

Historicamente, as porfirinas foram utilizadas como a primeira geração de FSs testados para o tratamento do câncer de pele em TFD. As porfirinas são produzidas naturalmente pelo corpo humano, sendo a base da produção das moléculas do grupo heme. Existem diferentes formas de disponibilizar porfirinas em quantidade suficientes para obter efeito fotodinâmico em terapias; uma das mais comuns atualmente é a disponibilização de um pró-fármaco, o ácido 5-aminolevulínico (ALA), que forma a Protoporfirina (PpIX) como parte da cadeia de formação das moléculas do grupo heme nas mitocôndrias.(26) Além da forma original, existem diferentes formulações com pequenas variações da molécula do ALA, visando facilitar sua penetração através das barreiras da pele. A mais comum, inclusive disponibilizada comercialmente, é a forma metilada, o aminolevulinato de metila (M-ALA). O ALA é um composto hidrofílico e, portanto, tem uma capacidade limitada de atravessar a membrana celular; apesar disso, possui uma eficiência na produção de PpIX mais alta que a do M-ALA. O último, por sua vez, possui caráter lipofílico e, por isso, possui maior capacidade de atravessar as barreiras biológicas entre a superfície da pele e as células-alvo, atingindo maiores penetrações no tecido, embora sua produção de PpIX não seja tão expressiva como a observada com o uso do ALA.

O Photodithazine (PDZ) é um FS de segunda geração, também conhecido como clorina e₆, é obtido a partir de uma alga (*Spirulina platensis*). Uma vez que este FS possui baixa fotoestabilidade e baixo limiar de dose (27) tornou-se uma opção viável para TFD clínica, além do fato de que possui uma banda de absorção em comprimentos de onda maiores que os comumente

observados para as porfirinas, em torno de 660 nm, possibilitando maior penetração no tecido. A eficiência da emprego do PDZ em lesões ulceradas de grande extensão é uma das aplicações relatadas na literatura. (28)

A Indocianina Verde (ICV) foi desenvolvida durante a segunda guerra mundial, embora tenha tido a primeira aprovação para uso clínico em humanos apenas em 1956. É um corante fluorescente amplamente utilizado em oftalmologia, e há mais de 30 anos é uma ferramenta para a visualização da vascularização na retina e coroide. Há alguns anos começou a ser explorada como FS para TFD. Há relatos de sua eficiência no tratamento de acne associada à irradiação por laser de diodo na pele. (29–32) Esta cianina possui uma alta absorção na região do infravermelho próximo, em torno de 780 nm e, por este fator, optou-se pela sua utilização neste trabalho, uma vez que há emissão de luz infravermelha pelo equipamento de LIP, gerando a possibilidade de excitação desta molécula com intuito de aprofundar a lesão no modelo animal. Além disso, esta é uma oportunidade de estudar a interação deste FS com LIP, dada a escassez de relatos desta combinação na literatura.

1.4 MODELO ANIMAL

Sus scropha domesticus, nome científico dos suínos, são animais altamente recomendados na literatura como opção para modelo de pele humana. (33) Há estudos *in vitro* que mostram resultados satisfatórios de similaridade ao utilizar orelha de suínos como modelo de pele humana. A pele de suínos também é considerada relevante como modelo de pele humana devido as semelhanças nas propriedades histológicas e bioquímicas. (34,35); além das semelhanças nas dimensões das camadas epiteliais, o arranjo das fibras de colágeno e a composição proteica do estrato córneo.(35)

Os trabalhos encontrados na literatura com aplicação de TFD com LIP apresentam resultados clínicos ou estudos experimentais em animais utilizando precursores de porfirinas de aplicação tópica como ALA e M-ALA. (15,36,37) Porém, são raros os estudos que apresentam análises histológicas que levam a um maior entendimento dos mecanismos de ação do LIP em profundidade no tecido e as alterações das estruturas da pele. Para este trabalho, optou-se estudar a TFD em suínos jovens, por possuírem características ópticas do tecido que mais se assemelham ao tecido humano. (38–40)

Na Figura 5, com o aumento original de 4 vezes de uma lâmina histológica de pele normal de suíno corada com Hematoxilina e Eosina (HE); é possível observar as três camadas da pele; epiderme, derme e a hipoderme, além de algumas estruturas como folículo piloso, papila dérmica e vaso sanguíneo.

Figura 5 – Pele normal de suíno corado com HE e aumento original de 4 vezes, sendo (a) derme papilar, (b) derme reticular e (c) hipoderme; (1) folículo piloso, (2) papila dérmica e (3) vaso sanguíneo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao realizar um aumento de 40 vezes da mesma lâmina, imagem da Figura 6A, camadas como o estrato córneo e epiderme da pele são mais visíveis, além da derme papilar. A última camada da epiderme também chamada de camada basal faz a integração entre a epiderme e derme papilar. As mesmas estruturas presentes na pele humana podem ser observadas na Figura 6B.

Figura 6 – Lâmina histológica de pelem normal humana e suína com HE e aumento original de 40 vezes, sendo (a) estrato córneo, (b) epiderme, (c) camada basal, e (d) derme papilar.

Fonte: (A) Adaptação de KHAVKIN (41). (B) Elaborada pela autora.

O processo de cicatrização pode ser dividido em três etapas: inflamação, proliferação e remodelação, este processo pode durar até aproximadamente 300 dias. Embora estas fases são separadas para simplificar, na verdade há uma sobreposição delas, uma vez que até áreas diferentes

de uma mesma lesão podem estar em diferentes fases de cicatrização. (42) Os tipos de células e mecanismos de reparo mais característicos de cada fase estão discriminados na Figura 7.

Figura 7 – Escala de tempo das fases de cicatrização da pele e alguns dos processos que ocorrem em cada fase.

Fonte: Adaptação de GANTWERKER. (42)

Uma observação importante para a interpretação dos dados obtidos neste trabalho é que durante o processo de cicatrização é possível observar a presença de infiltrados inflamatórios em quase todas as fases do processo, no entanto é mais evidente na fase de inflamação. Devido as fases de inflamação e proliferação estarem sobrepostas (de aproximadamente 1 a 10 dias), durante o processo cicatricial, pode haver a presença de características de ambas as fases simultaneamente. (42)

1.5 EXPLORAÇÃO DA LIP COMO FONTE DE LUZ PARA TFD

A LIP é amplamente difundida nos meio clínicos para aplicações estéticas, e apresenta potencial para ampliar as possibilidades de tratamento de lesões malignas em profundidade. Além disso, os relatos na literatura apresentando possibilidades terapêuticas da LIP para o câncer de pele são escassos. Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o uso da LIP como fonte de luz alternativa para TFD. Para isso, os estudos serão realizados em modelo de pele suína, avaliando parâmetros relativos tanto a métodos de entrega de FS como associações de precursores e FSs para análise do efeito fotodinâmico. Fazendo isso, as aplicações de TFD poderão receber um novo enfoque, direcionado para aplicações que aproveitem o potencial de ativação de múltiplas bandas

de absorção por uma dada fonte de luz, e da entrega de luz em regimes de pulsos curtos visando a entrega de grandes quantidades de energia com efeitos térmicos pouco relevantes para a homeostase tecidual, e com a possibilidade de buscar efeitos em profundidades maiores.

2 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo avaliar a interação da LIP com pele suína normal e fotossensibilizada, visando seu uso como fonte de luz para TFD no tratamento de lesões pré-malignas e cancerosas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o princípio da aplicação e/ou mistura de FSs (ou seus precursores) na forma de creme (aplicação tópica) e/ou na forma líquida utilizando-se injeção subcutânea de alta pressão sem agulhas, associados à LIP, para TFD;
- Avaliar a aplicabilidade de uma mistura de FSs com LIP visando a multiativação das bandas em TFD;
- Avaliar a formação e disponibilização dos FSs através da análise de imagens de fluorescência de campo amplo;
- Monitorar alterações térmicas causadas pela irradiação por LIP por meio de imagens termográficas;
- Avaliar as alterações histológicas na pele em suas diferentes camadas (epiderme e derme) após a aplicação de TFD com LIP.
- Padronizar os experimentos em TFD com LIP em pele de suínos normal;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O presente trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo de nº 019546/13, conforme comprovado no anexo.

Foram utilizados seis suínos, sendo dois animais sem raça definida (provindos do cruzamento entre *Large White* x *Landrace*; chamados de *F1*) e quatro animais provindos do cruzamento entre *F1* e *Terminador Agroceres*. Todos os animais possuíam dois meses de idade e massa corporal aproximada de 20 kg. Os animais foram alojados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal. As baias de 4 m², foram mantidas com cama de feno e com lotação de 1 a 3 animais/baia. O ambiente possuía exaustão de ar adequada e os animais receberam ração comercial e água ad libitum.

Os animais foram submetidos a jejum alimentar prévio de 12 horas. Para isso, foram mantidos em uma baia específica para o jejum, a qual não possuía cama de feno. Não foi feito jejum hídrico.

A contenção química dos animais foi feita com a aplicação intramuscular da associação de cetamina (12 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg), acepromazina (0,1 mg/kg) e atropina (0,02 mg/kg). Após 15 minutos, realizou-se a cateterização da veia auricular lateral com cateter 22G para posterior administração de fármacos e fluidoterapia. A indução anestésica foi feita com propofol (3 mg/kg) pela via intravenosa. Após a intubação orotraqueal com sonda Magill de tamanho adequado, a anestesia foi mantida com isoflurano diluído em oxigênio com concentração capaz de manter o animal em plano anestésico, sob ventilação espontânea. A artéria auricular medial foi cateterizada para a monitoração da pressão arterial invasiva. Para garantir a analgesia durante o procedimento, foi realizada a infusão contínua de morfina (10 mg), cetamina (30 mg) e lidocaína (150 mg), diluídos em 1 L de NaCl 0,9% e taxa de infusão de 10 mL/kg/h.

Enquanto o animal era mantido sob anestesia geral inalatória, foram realizados os procedimentos de TFD com LIP.

Após o fim do procedimento, a anestesia foi interrompida e os animais foram extubados. Ao término do procedimento foi administrado dipirona (25 mg/kg) e metadona (0,3 mg/kg), intramuscular. A aplicação destes fármacos foi feita três vezes ao dia durante dois dias após o término do procedimento. As regiões onde o tratamento com TFD foi realizado foram protegidas da luz ambiente, devido à fotossensibilização promovida pelo experimento.

Em cinco animais a eutanásia foi feita após 48 horas do procedimento de TFD, e em apenas um animal foi realizada após 24 horas. Para a eutanásia foi feita a contenção química do animal com a aplicação intramuscular da associação de cetamina (12 mg/kg), acepromazina (0,1 mg/kg) e midazolam (0,5 mg/kg). A indução anestésica foi feita com a aplicação de propofol intravenoso na dose suficiente para causar parada respiratória. Em seguida, foi feita a aplicação intravenosa do relaxante muscular a base de pancurônio (2 mg/kg).

Em estudos prévios, não apresentados neste trabalho, realizou-se o estudo da TFD em pele sadia de suínos durante 7 dias e, percebeu-se que após 48 horas o tecido já apresentava-se em processo de cicatrização macroscópico avançado. Estes dados sugeriram o tempo de 48 horas para avaliar o dano causado pela TFD, permitindo observar as alterações teciduais causadas pelos efeitos do tratamento.

Contudo, quando o dano é promovido pela TFD é pouco expressivo (no sentido de que é pequeno, e que não compromete porções relevantes de tecido), após 48 horas não era possível observar macroscopicamente o dano causado. Para conseguir avaliar a evolução temporal do dano até 48 horas, optou-se por realizar a eutanásia de um dos animais com 24 horas, na expectativa de observar eventuais danos pouco expressivos causados pela terapia antes que a completa recuperação macroscópica fosse estabelecida.

3.2 FONTE DE LUZ

Para este trabalho foi utilizado um equipamento comercial produzido na China (*Intense Pulse Light*, HKS801) com certificado para tratamentos na pele, representado na Figura 8.

Figura 8 – Equipamento comercial (Intense Pulse Light, HKS801).

Este sistema é composto por um manípulo de 15 x 50 mm que contém um cristal, uma lâmpada de xenônio com durabilidade de até 60.000 disparos e um sistema de refrigeração. Há possibilidade do acoplamento de filtros para a escolha de tratamentos específicos, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Manípulo com alojamento refrigerado para lâmpada, cristal e local para inserção de filtros ópticos.

Fonte: HKS801... (41)

O equipamento de LIP possui uma tela sensível ao toque e um programa que permite a seleção do tratamento desejado, com parâmetros pré-determinados e seleção do filtro óptico recomendado, sendo necessária a seleção pelo usuário do tipo de pele do paciente, pigmentação, espessura do pelo e energia desejada, que são informações protocoladas e contidas no próprio manual do equipamento. O programa também permite que o usuário selecione os parâmetros manualmente, conforme a Tabela 1. Para a realização dos experimentos, a configuração dos parâmetros foi feita manualmente.

Tabela 1 – Variação dos parâmetros que podem ser ajustados manualmente no programa do equipamento.

	(min–máx)
Número de pulsos	1 – 15
Largura do pulso (ms)	1 – 20
Atraso entre os pulsos (ms)	1 – 50
Período entre os disparos (s)	2 – 5
Energia (J)	15 – 50

Fonte: Elaborada pela autora.

No sistema de LIP utilizado, existe um conjunto de três filtros passa alta, para aplicações clínicas específicas segundo o fabricante. Há um filtro óptico de 560-1200 nm que pode ser utilizado para rejuvenescimento da pele; outro que compreende a faixa de 590-1200 nm que pode ser utilizado para o tratamento de lesões vasculares e um filtro indicado para remoção de pelos, na faixa de 640-

1200 nm. Existem alguns filtros que são opcionais, 430-1200 nm recomendado para acne; 480-1200 nm para manchas senis, manchas de sol e problemas de pigmentação; além de um filtro na faixa de 750-1200 nm para remoção de pelos em peles escuras.

O equipamento utilizado no estudo possui os seguintes filtros: 560-1200 nm, 590-1200 nm e 640-1200 nm; cujos espectros de transmitância foram coletados no espectrofotômetro ultravioleta-visível (Varian, modelo Cary 50) e podem ser observados na Figura 10.

Optou-se pelo uso dos filtros disponíveis pelo fabricante por questão de praticidade, uma vez que os equipamentos de LIP estão disponíveis no mercado. Assim, as conclusões obtidas a partir deste trabalho poderiam ser empregadas sem necessidade de aquisição de materiais customizados.

Figura 10 – Transmitância dos filtros do sistema de LIP. Legenda do gráfico

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível perceber que a transmissão de todos os filtros estão deslocados da faixa de comprimento de onda em que deveriam barrar a luz. No filtro de 560-1200 nm, a partir de aproximadamente 535 nm há transmitância; enquanto para o de 590-1200 nm isto ocorre a partir de 577 nm e para o filtro 640-1200 nm em torno de 610 nm. Este deslocamento varia de acordo com a fabricação.

Realizou-se a coleta do espectro de emissão da luz guia provinda da lâmpada de xenônio, através de um sistema montado no Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP, que consiste de um espectrofotômetro (USB2000, Ocean Optics Inc., EUA) acoplado a um computador. A coleta dos espectros foi realizada com e sem o acoplamento dos filtros disponíveis, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Espectro de emissão da luz guia do equipamento provindo da lâmpada de xenônio, sem filtro e com os filtros passa alta de 560-590-640 à 1200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para realização da calibração dos disparos provindos do sistema de irradiação, após fixados os parâmetros no programa, foi utilizado o medidor automático de potência e energia para equipamentos de LIP, Fit IPL – Laser Point, representado na Figura 12. Este equipamento faz a medida a partir de um detector que funciona na faixa de 400-1400 nm.

Figura 12 – Medidor de potência e energia para equipamentos de LIP, Fit IPL – Laserpoint.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos experimentos realizados, os valores de interesse da potência deveriam ser menores que 2 watts, valor mínimo perceptível pelo equipamento (ver Tabela 2), portanto, foram utilizadas apenas as medidas de energia para calibração dos disparos.

Tabela 2 – Medidas limites suportadas pelo medidor de potência e energia pelo Fit IPL – Laserpoint, de acordo com o respectivo manual.

Parâmetro	Potência (W)	Energia (J)
Medida máxima	100	350
Medida mínima	2	2

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a realização dos experimentos, o filtro passa alta de 560-1200 nm foi escolhido para que não houvesse a excitação da banda de Soret (na região do violeta ao azul) a fim de evitar o rápido consumo dos FSs e priorizar as possíveis interações com as bandas Q (na região entre o verde e o vermelho), em busca de uma maior ativação dos FSs em bandas de absorção com maior comprimento de onda, portanto, com penetração da luz no tecido.

Acreditava-se que ao realizar o disparo, o espectro de emissão seria como o espectro de emissão da luz guia, porém mais intenso. Para não danificar ou saturar a coleta pelo espectrofotômetro devido a intensidade do disparo, foi posicionada uma folha de papel a frente do manípulo e o espectro de emissão refletido por ela foi coletado. Ambos os espectros, podem ser observados na Figura 13. Há uma considerável emissão na região visível 400–800 nm do espectro, cerca de 80% da energia concentra-se nesta porção e há o aumento da intensidade nos picos do infravermelho próximo. Desta forma, os disparos provindos do sistema podem excitar tanto bandas de absorção no visível quanto no infravermelho, sendo promissor para o maior aproveitamento de diversos FSs.

Figura 13 – Espectros de intensidade de emissão da luz guia da lâmpada e durante um disparo.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

Nos experimentos realizados neste trabalho, estudou-se o efeito da LIP em TFD com a incorporação dos precursores da PpIX com ALA e M-ALA em uma emulsão óleo em água (O/A). (44–46) Quanto aos FSs exógenos, utilizou-se o PDZ, uma clorina comercial de origem russa – e a ICV, uma cianina de fabricação nacional. Sabendo das limitações da permeação de moléculas grandes através da pele, utilizou-se uma injeção de alta pressão sem agulhas para a aplicação da solução de FSs exógenos. Este tipo de aplicação também foi testada com a solução dos precursores da PpIX a fim de verificar a distribuição e se produção de PpIX era mais rápida comparada com a aplicação em creme.

Foram realizados experimentos *in vitro* em solução para análise da interação da luz com FSs a fim de elucidar questões relativas a degradação que apresentam relação direta com o dano fotodinâmico. Nestes testes foram utilizados: PpIX sintética, PDZ e ICV.

A PpIX sintética foi adquirida da empresa Sigma–Aldrich Brasil LTDA. (São Paulo – SP, Brasil). Sua fórmula molecular é $C_{34}H_{34}N_4O_4$, possui peso molecular de 562,66 g/mol, a estrutura química da molécula e seu espectro de absorbância normalizado estão ilustrados na Figura 14.

Figura 14 – (A) Estrutura química e (B) Espectro de absorbância normalizado da PpIX.

Fonte: (A) CENTRO ... (47); (B) Elaborada pela autora.

Utilizou-se o ALA em uma emulsão O/A para a aplicação tópica e solubilizado em solução fisiológica para a aplicação com a injeção de alta pressão, na concentração de 20%. O pó comercial do ALA foi obtido da empresa PDT–PHARMA (Cravinhos, SP – Brasil). Sua fórmula molecular é $C_5H_9NO_3$ e peso molecular de 131,13 g/mol, a estrutura química do composto está ilustrada na Figura 15.

Figura 15 – Estrutura química do ALA.

Fonte: CENTRO ... (48)

Utilizou-se o M-ALA nas mesmas condições especificadas para o ALA. O pó comercial do M-ALA também foi obtido da empresa PDT-PHARMA (Cravinhos, SP – Brasil). A fórmula molecular do M-ALA é $C_6H_{11}NO_3$, possui peso molecular de 145,16 g/mol e sua estrutura molecular está representada na Figura 16.

Figura 16 – Estrutura química do M-ALA.

Fonte: CENTRO... (49)

Em pH fisiológico, o ALA possui caráter hidrofílico, fator que limita a penetração da molécula na membrana celular. Porém quando comparado ao M-ALA, possui maior eficiência na produção de PpIX. O M-ALA, devido ao seu caráter lipofílico, pode ser transportados por aminoácidos apolares o que facilita a penetração pelas barreiras biológicas da pele o que implica que a produção é mais profunda no tecido.

Estudos em andamento no Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP, sugerem que a mistura entre ALA e M-ALA em proporções iguais, com a concentração de 20% em massa, é uma forma eficiente para obter alta produção de da PpIX em maior profundidade no tecido. Com esta motivação, optou-se para aplicar esta condição nos experimentos, para verificar qual o comportamento com a irradiação por LIP. (50)

Foi utilizado o composto de Mono-L-Aspartil Clorina e₆, com nome comercial de PDZ (VETA-GRAND, Moscou, Rússia). Sua fórmula molecular é $C_{38}H_{37}N_5Na_4O_9$, peso molecular de 799,69 g/mol, a estrutura química e o espectro de absorbância normalizado da molécula estão representados na Figura 17.

Figura 17 – (A) Estrutura química e (B) Espectro de absorbância normalizado do PDZ.

Fonte: CENTRO... (51); (B) Elaborada pela autora.

Foi utilizada a ICV da empresa OPHTHALMOS (São Paulo – SP, Brasil). A ICV é um corante hidrossolúvel pertencente ao grupo das tricarbocianinas, sua fórmula molecular é $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$, peso molecular de 774,96 g/mol, estrutura química e o espectro de absorbância normalizado da molécula estão ilustrados na Figura 18.

Figura 18 – Estrutura química e espectro de absorbância normalizado da ICV.

Fonte: CENTRO... (52); (B) Elaborada pela autora.

O propósito da aplicação de uma mistura de PDZ e ICV é disponibilizar simultaneamente no tecido a possibilidade de bandas de absorção no vermelho (aproximadamente 665 nm) e no infravermelho próximo (aproximadamente 800 nm) e, desta forma, tentar aumentar a eficiência da TFD em maiores profundidades. Para dispor da mesma proporção de moléculas na solução (uma

vez que o peso molecular é equivalente e a concentração das soluções foi a mesma), foi utilizada uma amostra com metade do volume composto pela solução de PDZ e a outra metade pela solução de ICV. O espectro de absorbância normalizado da solução resultante da mistura de ICV com PDZ está apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Espectro de absorbância normalizado da mistura entre PDZ e ICV.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.1 Métodos de administração

Dois métodos foram utilizados para administração dos FS e precursores: uma emulsão cremosa, para administração dos precursores do FS endógeno PpIX, ALA ou M-ALA, e uma seringa para injeção de alta pressão também utilizada para os FSs exógenos: PDZ e ICV.

O creme utilizado para a incorporação foi uma emulsão fabricada pela Farmácia Amazon (São Carlos, São Paulo – Brasil).

A injeção de alta pressão sem agulha utilizada nos experimentos é comercial de marca registrada da INJEX PHARMA AG. SAFE INJECT (Alemanha) e foi liberada para comercialização no Brasil pelo Hemocat Comércio e Importação Ltda com validação da ANVISA. No Brasil é comercializada como caneta SAFE INJECT para aplicação de insulina sem agulha; o kit está ilustrado na Figura 20.

Figura 20 – Kit da injeção sem agulha comercial (SAFE INJECT)

Fonte: ANESTESIA... (53)

O orifício criado pela injeção sem agulha é de 0,17 mm de diâmetro, enquanto nas injeções convencionais o diâmetro da agulha é de 0,39 mm. Para os experimentos, o volume de solução injetada foi de 10 UI, ou seja 0,1 mL. Houve a preocupação de sempre posicionar a injeção no tecido com a mesma angulação (seringa perpendicular à pele) e realizar a mesma pressão no momento da aplicação.

3.4 FOTODEGRADAÇÃO *IN VITRO*

A fotodegradação consiste na degradação de um composto por meio de luz. Para a eficiência do tratamento da TFD é importante que a molécula do FS tenha alta absorção no comprimento de onda da luz da irradiação, no caso deste estudo, em todo o espectro de emissão da lâmpada. Esta análise teve por objetivo prever a atividade fotodinâmica dos FSs *in vivo* utilizando para isso a avaliação da degradação *in vitro*. A avaliação do comportamento fotoquímico da molécula é um importante parâmetro na escolha de FS visto que está diretamente relacionado com a formação de oxigênio singlete e espécie reativas, que tem influência direta no efeito fotodinâmico no tecido.

Os FSs foram diluídos em solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês: *phosphate-buffered saline*). Em todas as soluções foi adicionado o surfactante BRIJ-35 (na concentração de 5 mM) para a desagregação das moléculas e consequente deslocamento do espectro absorção para o vermelho, de modo a mimetizar a conformação das moléculas de FSs quando presente no tecido.

(25)

No preparo das soluções de ICV e das de precursores da PpIX, foi necessária uma solubilização prévia com DMSO, na concentração aproximada de 0,1% em volume, antes da adição do PBS. Os valores de absorbância dos FSs foram medidos antes e depois da irradiação com LIP usando um espectrofotômetro de absorção ultravioleta-visível (Varian, modelo Cary 50) em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm.

Na Tabela 3, estão os valores utilizados para a calibração do sistema de LIP para a irradiação durante a fotodegradação e as concentrações das soluções utilizadas.

Tabela 3 – Parâmetros ajustados no equipamento para calibração da energia de cada disparo e a concentração de cada FS no experimento de fotodegradação.

Parâmetros ajustados no equipamento	
Número de disparos	150
Número de pulsos	10
Largura do pulso (ms)	30
Atraso entre os pulsos (ms)	5
Período entre os disparos (s)	4
Energia (J)	15
Fluência por disparo (J/cm ²)	3
Total de disparos	150
Concentração (µg/mL)	
PpIX	10
ICV	4
PDZ	10
ICV+PDZ	10

Fonte: Elaborada pela autora.

O ensaios *in vitro* realizados com as soluções de FSs foram importantes para fundamentar as hipóteses assumidas nos experimentos *in vivo*. O resultado destes testes forneceu evidências sobre a estabilidade e a taxa de consumo dos FS utilizados mediante aplicação da LIP, possibilitando a transposição para os estudos *in vivo*.

3.5 TERAPIA FOTODINÂMICA EM SUÍNOS

Foi realizada tricotomia no dorso do animal antes da realização do experimento para que não houvesse interferência da fluorescência dos pelos nas imagens coletadas. A raspagem foi realizada após aplicação, com gaze, de uma solução de água com creme para barbear para pele sensível (Creme de barbear, Gillette®) e remoção foi feita com aparelho de barbear descartável (Mach 3®, Gillette), como pode ser observado na Figura 21A. Após este procedimento, as regiões foram gentilmente limpas com gazes embebidas em soro fisiológico.

As áreas para os testes foram delimitadas com máscaras físicas, feitas com papel alumínio e fita dupla face, o posicionamento foi realizado com o cuidado de excluir partes pigmentadas ou com pequenos cortes (já pertencentes ao animal ou causados pela raspagem) que pudessem interferir nos resultados, como ilustrado na Figura 21B.

Figura 21 – (A) Tricotomia do dorso do animal com aplicação de creme de barbear e aparelho descartável; (B) Fixação das máscaras físicas para delimitação das condições experimentais.

(A)

(B)

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 4, estão os valores utilizados para a calibração do sistema de LIP para a irradiação durante os experimentos *in vivo* e as concentrações dos precursores e FSs utilizados.

Tabela 4 – Parâmetros ajustados no equipamento para calibração da energia de cada disparo e a concentração de cada FS nos experimentos *in vivo*

Parâmetros	
Número de pulsos	15
Largura do pulso (ms)	30
Atraso entre os pulsos (ms)	1
Período entre os disparos (s)	4
Energia (J)	49
Concentração	
ALA	20% em massa
M-ALA	20% em massa
ALA + M-ALA	50% de cada precursor: [ALA]=[M-ALA]=20% em massa
ICV	0,5 mg/mL
PDZ	1 mg/m
ICV+PDZ	50% de cada FS, [ICV]= 0,5 mg/mL e [PDZ] = 1 mg/mL

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos tratamentos clínicos convencionais com LIP a irradiação é feita em contato com a pele com o uso de um gel para acoplamento da luz e dissipação do calor. A posição do manípulo é alterada constantemente em busca de irradiar toda a região de interesse, sendo que em cada ponto são realizados poucos disparos. Por conta disso, tal manuseio mostra-se eficiente para estas aplicações.

Para a TFD em uma lesão, porém, uma mesma região deve receber diversos disparos e, portanto, há a preocupação com o possível aquecimento do tecido durante a irradiação. Como a aplicação de um gel introduz novas variáveis experimentais, uma vez que a mínima variação da quantidade aplicada ou mesmo a heterogeneidade na aplicação promoveria uma grande alteração na quantidade de luz entregue ao tecido, bem como dificultaria o posicionamento imóvel do manípulo, optou-se por fazer a irradiação há uma distância fixa do tecido e sem a aplicação de gel. Para que a distância do manípulo ao tecido sempre fosse a mesma e garantir a fluência de cada disparo, foram confeccionadas peças de *celeron* (material com baixa condutividade térmica) para o acoplamento.

Entre cada disparo padronizou-se um tempo de espera de 10 segundos, tanto para garantir que o capacitor que alimenta os pulsos estivesse sempre carregado para a realização do próximo disparo quanto para permitir a dissipação do calor gerado a cada sequência de pulsos, minimizando o aumento de temperatura tecidual.

Na Figura 22, estão representadas as peças de *celeron* que são posicionadas sobre máscaras físicas de papel alumínio com cavidades de 10 mm de diâmetro. Existe uma diferença na altura de cada peça, a de cavidade única possui 10 mm de altura e a com duas cavidades tem 7 mm de altura.

Figura 22 – Peças confeccionadas com *celeron* com cavidade única e dupla para acoplamento do manípulo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A calibração da fluência por disparo foi realizada para cada situação. Durante o experimento, cada condição experimental foi delimitada e o posicionamento do manípulo sobre a região foi realizado em cada irradiação, conforme a Figura 23.

Figura 23 – (A) Posicionamento do manipulador sobre a peça de *celeron* para realizar a irradiação; (B) Disparo com equipamento de LIP durante a TFD.

(A)

(B)

Fonte: Elaborada pela autora.

Entre o momento da fotossensibilização e o final do experimento, as regiões submetidas à Terapia eram protegidas da luz com uma máscara oclusiva de papel alumínio revestida de papel filme. Antes do animal ser levado para a baia, as máscaras físicas de papel alumínio eram coladas com cola de secagem rápida de cianoacrilato (Super Bonder®, Loctite) para garantir a demarcação de cada condição no momento da eutanásia. O dorso do animal era sempre revestido com plástico preto e o suíno era vestido com roupa cirúrgica convencional, para proteção do mesmo devido a fotossensibilidade proporcionada pelos FSs ainda presentes no tecido, evitando também que as regiões investigadas sofressem efeito fotodinâmico adicional por conta da luz ambiente.

3.5.1 Fluorescência de campo amplo

O sistema de imagem por campo amplo (montado no Laboratório de Biofotônica, Grupo de Óptica, IFSC/USP) é constituído por um dispositivo de irradiação à base de LEDs que emitem na região entre 400 e 450 nm, filtro passa-banda (390-460 nm, para determinar a região da fonte de luz para excitação), espelho dicróico (transmissão em 480-560 nm e reflexão nas bandas de 350-460 nm e 560-625 nm, para permitir que apenas a luz advinda da fluorescência seja transmitida), filtro passa-alta (a partir de 475 nm, para garantir que nenhuma luz residual da excitação vá para a ocular/câmera), e uma câmera fotográfica acoplada para aquisição de imagens, (54), conforme a Figura 24 ilustra.

Figura 24 – Esquema de arranjos utilizados para a detecção da fluorescência

FONTE: Adaptada de MARDOQUEU (54)

O filtro passa-banda tem a função de diminuir a largura de emissão dos LEDs usados para a excitação das moléculas; o espelho dicroico é posicionado para refletir a luz da fonte e transmitir apenas a fluorescência gerada pela amostra; o filtro passa-alta é utilizado para reter fótons de comprimentos de onda próximo aos de excitação, fazendo com que a câmera colete apenas fluorescência em comprimentos de onda da região entre o verde e o vermelho.

A câmera fotográfica acoplada ao sistema (SONY CyberShot®, modelo DSC-H50) é uma câmera semiprofissional com 9,1 megapixels de resolução, zoom óptico de 15 vezes e o acoplamento de uma lente macro (Carl Zeiss). Após a realização do experimento piloto, os parâmetros da câmera foram padronizados manualmente.

Antes da aplicação do FS ou precursor foi coletada a autofluorescência do tecido epitelial. Após as substâncias serem administradas na área delimitada, foi realizada a coleta de imagens de fluorescência de campo amplo antes da irradiação.

O intervalo entre a administração da medicação e a realização da TFD variou, sendo uma hora e meia após da aplicação por injeção (55) e três horas após a veiculação pelo creme (56,57).

Na Figura 25, é possível observar o equipamento utilizado para realização de imagens de campo amplo de fluorescência.

Figura 25 – Coleta de imagens de campo amplo de fluorescência com uma câmera fotográfica acoplada a um sistema de fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

A moléculas de PpIX e PDZ ao serem excitadas por comprimentos de onda próximo à 405 nm, como no sistema descrito, emitem fluorescência na região do vermelho. Enquanto a autofluorescência da pele do animal, na mesma condição, emite fluorescência na região do verde, como pode ser observado na Figura 26.

Figura 26 – Imagens de fluorescência de campo amplo da pele normal de suíno. (A) autofluorescência (pele não-fotossensibilizada), (B) fluorescência da PpIX produzida na pele após sensibilização por precursor.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi utilizado um algoritmo escrito em Matlab® (The MathWorks, EUA) que faz a separação dos canais RGB e soma as intensidades dos pixels vermelhos das imagens de fluorescência e autofluorescência. Estes dados para avaliar a fluorescência emitida pelo FS (F_{FS}) foram tratados de forma a minimizar a influência da autofluorescência e relacionar a quantidade de FS na superfície da pele, como demonstrado na equação (I), a partir da subtração nas imagens de fluorescência após o tempo de incubação (F_{total}) dos valores obtidos nas imagens de autofluorescência (AF_{pele}).

$$F_{FS} = F_{total} - AF_{pele} \quad (I)$$

3.5.2 Termografia

Uma vez que espera-se observar baixo aquecimento devido a irradiação por LIP, o monitoramento do aquecimento ao longo da irradiação foi realizado por meio de imagens termográficas.

A câmera termográfica utilizada nos experimento (Fluke, modelo Ti400) faz imagens de temperatura superficial, mede de -20 à 1200 °C com precisão na medição da temperatura de ± 2 °C, faixa espectral do infravermelho de 7,5 μm a 14 μm , possui foco automático e faz imagens simultâneas com luz visível para referência do monitoramento. A câmera está ilustrada na Figura 27.

Figura 27 – Coleta de imagens com a câmera termográfica (Fluke, Ti-400).

Fonte: Elaborada pela autora.

Coletou-se imagens a cada disparo em pele sem a presença de nenhuma substância, para verificar qual o aquecimento proporcionado exclusivamente pela fluência utilizada. As imagens foram coletadas também antes e depois da realização da TFD, a fim de mensurar se houve alguma diferença no aquecimento para cada condição estudada.

Utilizando o programa SmartView[®] (Fluke, EUA) foi possível extrair as intensidades de temperatura das imagens coletadas. O processamento dos dados gerados foi feito por meio de um algoritmo escrito em Matlab[®] (The MathWorks, EUA) no qual é calculada a temperatura média e desvio padrão a partir da delimitação de uma região. Com estes dados analisou-se a variação de temperatura nas regiões tratadas e nos controles, em cada condição experimental.

3.5.3 Histologia

Para a análise histológica foram coletadas biópsias do tecido após a eutanásia do animal. Os fragmentos da pele foram cortados em fatias e colocados em cassetes, sendo em seguida depositados em vasilhames contendo solução de formaldeído tamponado a 40% durante 48 horas para a fixação do material.

Após este período os cassetes contendo as peças foram submetidos à uma lavagem com água corrente por aproximadamente 10 horas. A seguir, iniciou-se o processo de desidratação, no qual os cassetes foram depositados em solução de álcool 70% por 24 horas, depois 1 hora em solução de álcool 80%, 1 hora em solução de álcool 90%, foram realizadas 4 trocas de 1 em 1 hora em álcool absoluto e 1 hora em uma solução de álcool e xilol. Posteriormente, os cassetes permaneceram por 3 horas no xilol com troca da solução a cada 1 hora.

Após o processo de desidratação, os cassetes foram depositados por 1 hora em solução de parafina (Histotec, Merck) que foi trocada 4 vezes. O material permaneceu na parafina overnight, no dia seguinte foram realizadas 2 trocas da parafina e foi feita a inclusão da peça na posição desejada para o corte. As trocas mencionadas são efetuadas para garantir que a desidratação no álcool e incorporação à parafina não sejam prejudicadas pela diluição dos mesmos.

Os cortes histológicos foram preparados em micrótomo (Leica Biosystems, RM2265) com 5 µm de espessura e as lâminas foram coradas com três corantes: HE, Tricrômico de Masson (TM) e Picro-Sirius Red (PSR).

A coloração com HE foi preparada com Hematoxilina de Harris e Eosina. Na pele, a HE permite a visualização da pele em toda a sua extensão (epiderme e derme), como também a visualização dos processos inflamatórios. O TM é uma combinação de soluções de corantes que é utilizada na pele para a identificação das fibras de colágeno, músculo, citoplasma e queratina são marcados em vermelho; os núcleos são corados em preto, enquanto as fibras de colágeno são coradas em azul. A coloração adquirida pela solução de PSR, preparada com ácido pícrico e Sirius Red, destina-se à marcação de colágeno, e pode ser utilizada também para a diferenciação de colágeno I e III com o uso de microscopia polarizada. Em microscopia de luz convencional, o colágeno é marcado com vermelho, as fibras musculares e citoplasma em amarelo. (58)

As imagens foram realizadas com diferentes aumentos, com o ajuste manual dos parâmetros do Microscópico (Eclipse Ti-S, Nikon, Japão).

Na Figura 28, com imagens de lâminas histológicas, estão ilustradas as etapas do processo de cicatrização.

Figura 28 – Etapas do processo cicatricial ilustradas com imagens de lâminas histológicas de pele de suínos coradas com TM. As legendas no canto esquerdo inferior de cada imagem identificam a fase de cicatrização em que a amostra se encontra, e o controle indica a condição natural. As setas brancas indicam características de inflamação e os retângulos brancos tracejados indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Fonte: Elaborada pela autora.

O tecido normal, chamado de controle, foi usado como referência para ponderar alterações observadas nas condições experimentais. Para evidenciar estas alterações relativas as modificações em relação ao controle, os resultados obtidos foram resumidos com o uso de tabelas. Foi feita uma pontuação de um à três, representada por símbolos (+): quanto mais símbolos, mais acentuada a presença da característica. Utilizou-se o símbolo (○) quando a característica era ausente na condição experimental.

Alguns aspectos foram ponderados, como a área do dano superficial, classificada pela análise macroscópica visual das imagens de campo amplo. Assim como características de inflamação observadas devido à presença acentuada de infiltrados inflamatórios (sinalizadas por uma seta) e sinais de edema (espaçamento das fibras de colágeno indicando a presença de água na pele). Aspectos característicos de fase proliferação, ainda com a presença de sinais de inflamação tecidual associados à reepitelização da epiderme (aumento de espessura da camada e da conexão com a derme a partir do aumento da quantidade de papilas dérmicas) e a fibroplasia (degradação observada pela mudança da conformação e direcionamento das fibras de colágeno). Também foi observado se havia indicativos de início de remodelação do tecido, fase na qual a conformação das fibras de colágeno está mais semelhantes ao controle, devido a substituição de colágeno III pelo colágeno I, com a presença menos significativa (em relação a fase de inflamação e proliferação) de infiltrados inflamatórios e sinais de edema.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FOTODEGRADAÇÃO *IN VITRO*

Para todas as medidas de fotodegradação, considerou-se como linha de base a solução com PBS e BRIJ-35. A

Figura 29 mostra os espectros de absorbância da solução de PpIX sintética coletados antes e após a irradiação por LIP.

Figura 29 – Espectros de absorbância da solução de PpIX antes e depois da irradiação.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível perceber que após a irradiação, o espectro de absorbância da PpIX diminuiu sua intensidade, principalmente na banda de Soret; além do surgimento de uma banda Q (aproximadamente em 670 nm).

Na Figura 30, estão apresentados os espectros de absorbância da solução de PDZ coletados antes e depois da irradiação por LIP. Neste caso, também observou-se que após a irradiação também houve a diminuição da intensidade de absorbância.

Figura 30 – Espectros de absorvância da solução de PDZ antes e depois da irradiação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros de absorvância da fotodegradação da solução de ICV estão na Figura 31.

Figura 31 – Espectros de absorvância da solução de ICV antes e depois da irradiação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como esperado, devido à alta absorção na região do infravermelho próximo, a ICV possuiu uma degradação mais acentuada quando comparada com a PpIX e PDZ, sendo observado uma maior diminuição da intensidade de absorvância na principal banda de absorção deste FS. A Figura 32 mostra o resultado da absorvância ao misturar a solução de PDZ e ICV, na mesma proporção, realizada com o intuito de obter aproximadamente a mesma quantidade de cada molécula na solução para realizar a fotodegradação, uma vez que o peso molecular de cada molécula é equivalente.

Figura 32 – Espectros de absorvância da solução da mistura de PDZ e ICV antes e depois da irradiação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se perceber que o espectro de absorvância da solução com a mistura de ICV e PDZ apresenta as características de absorção das duas moléculas. Para confirmar se houve a formação de algum produto devido a interação entre PDZ e ICV na solução, foi feita a média algébrica entre os espectros isolados de cada FS e verificou-se o quão próximo era do espectro coletado da solução em que os FSs foram misturados. Estes dados estão na

Figura 33.

Figura 33 – Espectros de absorvância das soluções de ICV, PDZ e ICV+PDZ e a média algébrica entre os espectros de ICV e PDZ.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da

Figura 33 mostra que não houve interação entre as moléculas na solução, uma vez que o espectro de absorção da mistura ICV+PDZ coincidiu com a média calculada entre os espectros isolados de ICV e PDZ. Este resultado é importante porque garante que a mistura das duas substâncias não provoca alteração no espectro de absorção de nenhuma delas.

A fim de quantificar o quanto houve de degradação em cada condição, optou-se por relacionar a área do espectro de absorbância com a concentração de FS presente na solução, uma vez que, em baixas concentrações, estes valores podem ser ditos diretamente proporcionais.

A Figura 34 mostra o valor numérico da integral da área sob a curva dos espectros de absorbância de cada um dos FSs utilizados e da mistura PDZ+ICV. As diferenças mais relevantes foram observadas nas soluções de ICV e PDZ+ICV, concordando com a observação dos espectros de absorbância antes e depois da fotodegradação.

Figura 34 – Áreas calculada para os espectros de absorbância dos FSs, no intervalo de 250-900 nm, antes e depois da fotodegradação por LIP.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da consideração de que em baixas concentrações, a concentração do FS é proporcional a intensidade de absorbância (19), utilizou-se os valores numéricos obtidos a partir da Figura para estimar a concentração do FS após a irradiação, $[FS]$, a partir da equação (II), que descreve o comportamento exponencial de decaimento da concentração do FS ao longo da irradiação.

$$[FS](D) = [FS_0] \cdot e^{-D/\delta} \quad (II)$$

Na equação (II), $[FS_0]$ representa o valor da concentração inicial do FS em solução, antes da degradação; D representa a fluência, e δ o parâmetro de decaimento da curva que descreve a variação da concentração. Ao substituir na equação (III) o valor da fluência final aplicada no experimento, D_0 , é possível calcular o parâmetro δ . Após determinado, é possível estimar a taxa de degradação do FS, uma vez que este parâmetro está diretamente relacionado ao tempo para uma irradiância fixa (equação (IV)), na qual I representa a irradiância utilizada e t o tempo de irradiação decorrido).

$$\delta = \frac{D_0}{\ln[FS_0] - \ln[FS]} \quad (III)$$

$$D_0 = I \cdot t \quad (IV)$$

O parâmetro δ representa o quão acentuado é o decaimento exponencial da concentração da solução quando irradiada; sendo expoente de uma exponencial negativa, quanto menor o valor de δ , mais rapidamente a solução será degradada. Na Tabela 5, estão discriminados os valores estimados com os dados da fotodegradação, para a $D_0 = 450$ J, sendo que foram feitos 150 disparos, com 3 J/disparo.

Tabela 5 – Valores aproximados para a concentração dos FSs após a fotodegradação e para o parâmetro δ .

	$[FS]$ ($\mu\text{g/mL}$)	δ (J)
PpIX	8,8	3.616
PDZ	9,9	44.774
ICV	2,7	1.092
PDZ+ICV	2,2	548

Fonte: Elaborada pela autora.

A solução que possui a maior taxa de degradação é a mistura de PDZ+ICV, seguida das soluções de ICV, PpIX e PDZ, respectivamente.

É interessante notar que, apesar da PDZ ter a menor taxa de degradação, ao ser combinada com ICV, torna a mistura mais eficiente do que qualquer um dos FSs isoladamente, apresentando o dobro da eficiência da degradação da ICV. Essa eficiência está relacionada com o aproveitamento que cada uma das moléculas faz da luz.

Apesar de não haver mudança nos espectros de absorbância da mistura PDZ+ICV é possível perceber que há um efeito de sinergia em termos da fotodegradação. É possível que a menor concentração de cada uma das moléculas na solução permita que haja um menor efeito de

“blindagem”, ou seja, que as moléculas fiquem mais expostas aos comprimentos de onda em que absorvem preferencialmente (que estão em regiões diferentes do espectro), havendo maior taxa de fotodegradação. Existe também a possibilidade que a emissão de fluorescência do PDZ possa ter ativado a banda da ICV, promovendo uma degradação adicional.

De acordo com a Figura 35, é possível visualizar as bandas de absorção dos FSs normalizadas pelo máximo de absorção no intervalo de 530-900 nm, intervalo no qual a emissão da lâmpada não é barrada pelo filtro utilizado nos experimentos. Todos os FSs possuem bandas de absorção na região de excitação utilizada nos experimentos, porém, pode-se afirmar que as soluções de ICV e da mistura de PDZ com ICV possuem as bandas mais largas de absorção e por isso tiveram a maior degradação pela LIP.

Figura 35 – Espectros de absorbância dos FSs; espectro de emissão do disparo do equipamento de LIP e espectro de transmitância do filtro utilizado nos experimentos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 35 é importante notar que, apesar do destaque que a normalização gera nas intensidades das bandas Q (para PDZ e PpIX), estas na verdade possuem absorbância menor em comparação à mesma região da ICV. Com os resultados obtidos neste experimento, fica comprovado que a LIP é capaz de interagir com as moléculas de fotossensíveis escolhidas para os experimentos em animais.

4.2 TFD EM SUÍNOS – PILOTO

A literatura apresenta estudos com LIP mais voltados para a área estética dermatológica, mas não relativos ao tratamento fotodinâmico do câncer de pele. (12,13,59) Este estudo pretende adequar ao uso de LIP alguns dos principais protocolos clínicos para TFD no tratamento de câncer, para avaliar sua viabilidade.

Os testes em animais são de extrema importância para adequar os parâmetros às melhores combinações de FSs com a fonte de luz escolhida para a TFD, tendo em vista, que a realização da terapia com LIP com os FSs exógenos escolhidos ainda não está completamente estabelecida na literatura.

O primeiro teste foi realizado em apenas um animal, cruzamento de *F1* e *Terminador Agroceres*, para verificar a viabilidade da aplicação de LIP com aplicação tópica de um precursor de PpIX (ALA) no modelo animal escolhido. Uma vez que seria necessário verificar a formação o FS em pele normal de suínos e os efeitos da TFD nestas condições.

Neste teste, foi utilizada a peça de *celeron* que possui uma cavidade e seu acoplamento faz com que o manípulo esteja a 10 mm da pele. Para verificar se havia algum dano tecidual causado pela luz ou pela TFD foram selecionadas três doses: aplicou-se 15 disparos (d1), 20 disparos (d2) e 25 disparos (d3); cada disparo foi calibrado com 5,7 J/cm² de fluência. Os valores da fluência total depositada nas condições escolhidas estão explícitas na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de fluência total aplicada com calibração de 5,7 J/cm² por disparo.

	Disparos	Fluência total (J/cm ²)
d1	15	85,5
d2	20	114
d3	25	142,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 36, estão as imagens de campo amplo dos danos superficiais com após 48 horas da realização do experimento e as imagens de fluorescência de campo amplo da formação da PpIX após 3 horas da aplicação de ALA em creme. Em todas as regiões em que foi aplicado ALA via creme, após 3 horas de incubação (tempo definido com base em protocolo clínico estabelecido) (57), foi possível perceber que houve a formação de PpIX de forma heterogênea, sendo perceptível algumas regiões com fluorescência mais intensa. Não houve efeito macroscópico no tecido após 48 horas da aplicação apenas LIP, independente das doses aplicadas. Contudo, ao realizar TFD com os

mesmo parâmetros, foi possível perceber que nas regiões de fluorescência mais intensa, ocorreu um dano no tecido, principalmente na fluência de 142,5 J/cm² (d3).

Figura 36 – Imagens dos danos superficiais após 48 horas da aplicação de apenas LIP; imagens de fluorescência da formação da PpIX após 3 h da aplicação de ALA em creme e imagens dos danos superficiais após 48 h da TFD, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram realizados experimentos em mais dois animais, provindos do cruzamento F1, no experimento do estudo piloto, a fim de explorar a viabilidade da aplicação com a injeção livre de agulhas. Neste segundo teste, foi utilizada a peça de *celeron* com duas cavidades e que permite uma distância de 7 mm do manípulo ao tecido, com o propósito de ter uma réplica da condição experimental e aumentar a fluência por disparo para diminuir o tempo de tratamento.

Para verificar a possibilidade de causar algum dano no tecido com aplicação apenas de LIP, optou-se aumentar a fluência por disparo para 6,4 J/cm², e a quantidade de disparos realizados. Determinou-se a aplicação de 15 disparos (D1), 25 disparos (D2) e 35 disparos (D3). Os valores da fluência total depositada nas condições escolhidas estão expressas na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de fluência total aplicada com calibração de 6,4 J/cm² por disparo.

	Disparos	Fluência total (J/cm ²)
D1	15	89,6
D2	25	160
D3	35	224

Fonte: Elaborada pela autora.

O tempo de incubação para formação de PpIX com uso da injeção foi baseado em um protocolo clínico experimental que usa o mesmo sistema com a mesma concentração de ALA em solução. (55) Na Figura 37, é possível observar a formação da PpIX após 3 horas da aplicação do creme e após 1,5 hora da injeção da solução de ALA; cada fluência determinada foi utilizada em duas regiões simultaneamente.

Figura 37 – Imagens de fluorescência de campo amplo da formação da PpIX após a aplicação de ALA em creme (3 horas de incubação) e com injeção livre de agulhas (1,5 hora de incubação); nas regiões de irradiação com D1=89,6 J/cm²; D2=160 J/cm² e D3=224 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como o teste realizado no primeiro animal, é visível que a formação da PpIX é dada de forma heterogênea na aplicação com creme. Ao utilizar-se a injeção livre de agulhas para a aplicação da solução via transdérmica, é possível verificar que a formação é dada de forma mais homogênea com a vantagem de necessitar apenas metade do tempo de incubação. Porém, em alguns casos, é notável que no local onde é feito o posicionamento para a injeção, não é possível visualizar a fluorescência superficial da PpIX quando esta metodologia foi utilizada. A causa mais provável para isto é o dano provocado pelo disparo da seringa; uma vez que as células tenham sido danificadas pelo disparo, é provável que não tenha havido condições de metabolização do precursor da PpIX.

A partir de um algoritmo executado no programa Matlab®, foi possível realizar a soma das intensidades dos pixels vermelhos das imagens de fluorescência de campo amplo da formação da PpIX em cada região.

Na Figura 38, estão apresentados estes dados, sendo que foi feita a média entre a formação de PpIX das duas regiões de cada condição e a barra de erro representa o desvio padrão entre elas. Pode-se observar que a produção de PpIX com aplicação de solução pela injeção livre de agulhas foi maior que aquela observada quando utilizou-se a veiculação pelo creme.

Figura 38 – Média da soma das intensidades dos pixels vermelhos após 3 horas da aplicação de ALA em creme 1,5 hora com injeção; nas regiões de irradiação com D1=89,6 J/cm²; D2=160 J/cm² e (C) D3=224 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

Após o tratamento destes dados, percebeu-se a necessidade do ajuste manual dos parâmetros da câmera digital para realizar a coleta das imagens de fluorescência, que passou a ser feita nos próximos experimentos.

Na Figura 39 estão as imagens de campo amplo realizadas após 48 horas dos experimentos, nas quais é possível observar o dano superficial com a aplicação de LIP e TFD com ALA em creme e em solução, nas três doses de luz determinadas.

Figura 39 – Imagens dos danos superficiais após 48 horas da aplicação de LIP, TFD com ALA em creme e injeção livre de agulhas; com irradiação de D1=89,6 J/cm²; D2=160 J/cm² e D3=224 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

No segundo teste, o manípulo ficou mais próximo à pele; uma vez que os parâmetros configurados no equipamento não foram alterados, a fluência por disparo aumentou em $0,7 \text{ J/cm}^2$. Com isso, a fluência total depositada no tecido em função do número de disparos aumentou com relação ao primeiro teste. É possível notar que a maior fluência depositada no primeiro teste não causou dano tecidual apenas com LIP, enquanto, a menor fluência utilizada no segundo teste promoveu dano.

Dado que nenhuma condição experimental foi modificada, exceto pelo cruzamento dos animais, este efeito pode ser associado à diferença entre eles, já que os animais são de cruzamentos semelhantes, embora não idênticos – fato que não se supôs relevante no início do estudo, e que foi a princípio tolerado por conta da disponibilidade dos animais para o estudo. Devido a esta constatação, a partir deste teste, determinou-se o uso de uma única variedade dos animais (o cruzamento entre *F1* e *Terminador Agrocere*s). Os resultados apresentados aqui para os animais de cruzamento *F1* foram mantidos a título de comparação e para apresentar a relevância que pequenas diferenças entre cruzamentos próximos podem apresentar quanto aos efeitos fotobiológicos causados pela TFD, ainda que macroscopicamente apresentem pele com características idênticas. Porém este fator é importante para o estudo da extrapolação de parâmetros para humanos, uma vez que existem diferenças de fototipos e de espessura da pele (modificada por fatores como a idade, o envelhecimento natural e o fotoenvelhecimento), por exemplo.

As imagens da Figura 39 mostram que houve um aumento do dano com o aumento da fluência depositada no tecido, como era esperado. Foi observado que o efeito fotodinâmico promoveu o dano maior que a aplicação da LIP sem fotossensibilização. Em alguns casos, na junção das regiões é possível observar um dano superficial, mesmo sem que tenha havido fotossensibilização direta do tecido por meio de aplicação do precursor. É possível que esse dano seja devido ao efeito da propagação da luz no tecido, cuja contribuição é somada entre as cavidades, sugestão ilustrada pela Figura 40. Ainda nesse sentido, pode também ter ocorrido fotossensibilização devido à difusão do creme no tecido entre as cavidades, de forma que o dano causado seja advindo de efeito fotodinâmico.

Figura 40 – Propagação do disparo da LIP com uso da peça de *celeron* com duas cavidades.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando um algoritmo processado em Matlab®, que a partir do método *K-means* separa a imagem em texturas, e possibilita a delimitação da região de dano superficial em relação à pele. Foi calculada a área do dano superficial de cada condição e, a partir de uma extrapolação dos dados experimentais, foi possível a construção das curvas da Figura 41.

Figura 41 – Dano superficial com aplicação de LIP e TFD com LIP com a aplicação de ALA em creme e injeção livre de agulhas, em função da energia.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com a extrapolação linear dos dados, foi possível estimar qual a dose mínima de fluência total entregue ao tecido necessária para causar dano na superfície após a aplicação de LIP, e na TFD com LIP por aplicação de creme e injeção. Estes valores estão na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de dose limiar extraídos pela extrapolação dos dados experimentais.

	Dose limiar (J/cm²)
Apenas LIP	60,6
ALA creme	50,5
ALA injeção	27,8

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, é necessária uma menor energia para causar um dano superficial ao se realizar TFD com aplicação de solução de ALA com injeção livre de agulhas, com aplicação de ALA em creme e com o grupo controle (apenas LIP), respectivamente. Este fator é uma motivação para o uso do sistema de injeção, uma vez que, além de diminuir o tempo de incubação, apresenta a necessidade

de menor dose limiar, diminuindo a quantidade de disparos necessários para a realização do tratamento.

O grupo piloto utilizou animais de raças diferentes. O cruzamento *F1* apresentou efeito muito mais intenso da TFD (com dano tecidual provocado por efeitos térmicos apenas por LIP) do que os animais provindos do cruzamento entre *F1* e *Terminador Agroceres*. Por isso, decidiu-se utilizar nos grupos experimentais os animais do cruzamento entre *F1* e *Terminador Agroceres*, para permitir maior liberdade na exploração dos parâmetros de tratamento.

4.3 TFD EM SUÍNOS – GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos grupos experimentais, a repetição das condições foi realizada em três animais, provindos do cruzamento de *F1* e *Terminador Agroceres*. Optou-se pela repetição das condições descritas na Tabela 9 com as duas peças de *celeron* utilizadas no grupo piloto, e as mesmas condições de calibração e parametrização do sistema.

Foram utilizadas as seguintes doses: $d1 = 85,5 \text{ J/cm}^2$ (máscara com cavidade única) e $D1 = 89,6 \text{ J/cm}^2$ (máscara com cavidade dupla). Assim, seria possível confirmar se o dano tecidual provocado ao usar a peça de cavidade dupla no experimento piloto poderia ser justificada pela aproximação do manípulo ao tecido, uma vez que a variação na fluência final entregue ao tecido teve uma variação que pode ser considerada desprezível ($\sim 4 \text{ J/cm}^2$). Por outro lado, demonstrar que a alteração das peças de acoplamento não promoveriam este tipo de dano, indicaria que o resultado diferente observado se deve a diferença na procedência dos animais.

Tabela 9 – Grupos experimentais realizados com as duas peças de *celeron* em triplicata de animais.

CONTROLE	PRECURSORES		FSs
Apenas LIP	Creme	Injeção	Injeção
	ALA	ALA	PDZ
	M-ALA	M-ALA	ICV
	ALA + M-ALA	ALA + M-ALA	PDZ + ICV

Fonte: Elaborada pela autora.

Para análise dos efeitos causados apenas pela fonte de luz, em duas regiões foi realizada apenas a irradiação com LIP, condição chamada de controle, sendo que em uma delas, foi feita a coleta de imagens termográficas antes e depois da irradiação e, na outra, foi feita a coleta de uma imagem termográfica a cada disparo da irradiação. O propósito destas medidas foi o monitoramento do aquecimento gerado pela fonte de luz.

Assim como em humanos, os porcos apresentam diferenças na espessura da pele dependendo das regiões avaliadas, da raça, idade e outros. (60) Ao verificar a existência destas variáveis e a fim

de minimizá-las, optou-se sempre por realizar as réplicas experimentais entre os animais na mesma região do dorso. Deste modo, a padronização foi realizada no posicionamento das condições experimentais para os três animais como ilustrado na Figura 42. No dorso do animal, foram posicionados os grupos controle e de aplicação dos FSs por injeção. Nas laterais, foi colocada a sequência dos precursores tanto em creme quanto com aplicação por injeção, sendo que em um dos lados do animal foram posicionadas as máscaras com duas cavidades e do outro com uma, obedecendo a mesma sequência de condições.

Figura 42 – Posicionamento das máscaras do grupo controle, precursores e FSs.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1 *Fluorescência de campo amplo*

Foram feitas imagens de fluorescência de campo amplo das regiões nas quais seriam realizadas TFD antes da irradiação. Em nenhuma imagem de autofluorescência foi verificada alguma interferência de algum corte resultante da tricotomia; em alguns casos, apenas a presença de algum pelo resultante do procedimento.

Na Figura 43, é possível observar a fluorescência da PpIX após 3 horas da aplicação de creme com ALA, M-ALA, ALA+M-ALA, e após 1,5 hora da injeção para as soluções com os mesmos compostos.

Assim como no experimento piloto, a formação da PpIX a partir da aplicação com creme deu-se de forma heterogênea. É importante salientar que, nos animais dos grupos experimentais, a produção com este tipo de aplicação foi menor que no grupo piloto. Em algumas regiões, como na aplicação dos cremes de M-ALA e ALA+M-ALA, a fluorescência praticamente não foi detectada. As imagens que compõem a Figura 43, são de um dos animais; nos outros animais, não foi detectada

a fluorescência expressiva em nenhum dos três cremes. Na aplicação por injeção livre de agulhas, por outro lado, a produção de PpIX deu-se de forma homogênea.

Figura 43 – Imagens de fluorescência de campo amplo da formação da PpIX após 3 horas da aplicação dos precursores em creme 1,5 hora após a aplicação por injeção.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 44, foi feita a soma das intensidades de pixels vermelhos das imagens de fluorescência entre os três animais, nas regiões com máscara de uma cavidade. As barras de erro remetem ao desvio padrão entre os dados.

Figura 44 – Média da soma das intensidades dos pixels vermelhos após 1,5 hora da aplicação com injeção; dos precursores ALA, M-ALA e ALA + M-ALA. * barras de erro discutidas no texto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em todas as condições, a produção de PpIX foi maior com o uso de injeção. Contudo, a aplicação de ALA em creme foi mais eficiente em relação a M-ALA e ALA+M-ALA. A barra de erro para o ALA creme foi maior, uma vez que a produção de PpIX ocorreu de maneira significativa no primeiro animal, enquanto nos outros dois, quase nenhuma fluorescência foi detectada. Quanto na aplicação de ALA por injeção, acredita-se que o aumento da barra de erro seja devido à variação da lesão formada na região em que foi posicionada a injeção, na qual não há formação de PpIX. O comportamento foi o mesmo nas regiões com o uso da máscara de duas cavidades.

Foram realizadas imagens de fluorescência após 1,5 hora da aplicação por injeção das soluções de PDZ e PDZ+ICV, ilustradas na Figura 45.

Figura 45 – Imagens de fluorescência de campo amplo após 1,5 hora da aplicação de PDZ e PDZ+ICV por injeção livre de agulhas.

Fonte: Elaborada pela autora.

É notável a homogeneidade da distribuição das soluções. Nestes casos, mesmo tendo a disponibilidade do FS desde o momento da aplicação da solução pela injeção, optou-se por esperar 1,5 hora da aplicação para realizar a TFD, a fim de padronizar o tempo de incubação determinado previamente no grupo piloto para os precursores. É importante mencionar o fato de que o sistema de coleta de fluorescência é montado com filtros específicos para a coleta da fluorescência da PpIX

e, por isso, o sinal de fluorescência é menos intenso quando se observa a fluorescência do PDZ, já que este apresenta pouca emissão no intervalo de fluorescência da PpIX. Além disso, no caso da Figura 45, onde foi aplicada a mistura entre PDZ e ICV, só há a contribuição de fluorescência do PDZ, uma vez que a ICV não é excitada (por 405 nm) de modo a gerar fluorescência no intervalo equivalente ao da PpIX.

A Figura 46 mostra a quantificação das intensidades dos pixels vermelhos observados nas imagens de fluorescência do PDZ e PDZ+ICV e as barras de erro referem-se ao desvio padrão entre os valores. Considerando as barras de erro, pode-se dizer que a distribuição superficial do FS foi similar entre as duas condições.

Figura 46 – Média da soma das intensidades dos pixels vermelhos das imagens de fluorescência de campo amplo após 1,5 hora da aplicação de PDZ e PDZ+ICV por injeção livre de agulhas.

FONTE: Elaborada pela autora.

Comparando com o resultado da produção da PpIX, é possível notar que o resultado das injeções dos seus precursores mostrou-se mais eficiente em termos da quantidade de FS disponível na superfície do tecido, quando avaliado pela intensidade da fluorescência, do que o que foi observado para o PDZ e PDZ+ICV. Contudo, é preciso lembrar que a quantidade de fluorescência observada para o PDZ não reflete a quantidade total de fluorescência emitida. Ainda assim, é possível perceber que a fluorescência do PDZ e PDZ+ICV por injeção tem aproximadamente a mesma ordem de grandeza da aplicação dos precursores da PpIX. A entrega por injeção parece garantir maior disponibilidade dos FSs na superfície da pele; a comparação de qualquer uma das injeções com os cremes parece tornar isto evidente.

Portanto, os resultados destes testes sugerem que o uso das injeção livre de agulhas é mais eficiente na disponibilização do FS para a TFD na pele normal de suínos.

4.3.2 Termografia

Foram realizados dois tipos de monitoramento termográfico: imagens termográficas para verificar o aquecimento da pele não-fotossensibilizada durante a irradiação e imagens após a TFD para verificar se há diferença no aquecimento entre as substâncias.

No grupo piloto, a aplicação da TFD foi realizada com o acoplamento por duas peças de *celeron* (uma com a cavidade única e 10 mm do manípulo em relação ao pele e outra com cavidade dupla e 7 mm de distância) e ao utilizar a peça com cavidade dupla foi observada uma significativa queimadura na pele mesmo ao aplicar apenas LIP na pele não-fotossensibilizada.

Para quantificar o aquecimento promovido em cada acoplamento, foi feito o monitoramento dos três animais, coletando uma imagem termográfica a cada disparo da irradiação. Como a temperatura inicial podia variar entre os animais, foi analisada a variação de temperatura proporcionada pelo disparo. Portanto, ao valor de temperatura calculado de cada disparo foi feita a subtração da temperatura inicial da região antes da irradiação.

Algumas imagens realizadas ao longo de 15 disparos de LIP na pele não-fotossensibilizada, com o acoplamento pela máscara de cavidade única, estão agrupadas na Figura 47. O propósito da coleta de imagens nesta condição deu-se para determinar quanto a fonte de luz proporcionou de aquecimento devido a sua interação apenas com o tecido.

Figura 47 – Imagens termográficas realizadas antes da irradiação, após 3, 6, 9, 12 e 15 disparo com LIP, escala fixada de 32 a 40 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como há emissão de luz na região do infravermelho até 1200 nm pela LIP, pode-se afirmar que esta energia é capaz de promover a agitação das moléculas do local irradiado, com consequente

aumento de temperatura. De acordo com a escala escolhida para demonstração da Figura 47, quanto mais vermelha a cavidade, maior a temperatura no local; este aumento de temperatura pode ser visualmente percebido nas imagens termográficas.

Em cada imagem, foi feita a seleção da região de interesse e calculada a temperatura média no local com o respectivo desvio padrão; seguida do cálculo da variação da temperatura, de acordo com a equação (V). As barras de erro foram calculadas a partir da propagação de erros relacionada ao desvio padrão das imagens de temperatura antes e após a irradiação. Nas imagens obtidas a partir da máscara de cavidade dupla, foi calculada a temperatura média das duas cavidades, sendo T_0 a temperatura inicial e T_i a temperatura de acordo com o tempo (i).

$$\Delta T = T_i - T_0 \quad (V)$$

As variações de temperatura para cada animal ao longo da irradiação, para as máscaras de cavidade única (Figura 48A) e dupla (Figura 48B). Em ambos os casos, é possível perceber que o comportamento da variação de temperatura com relação à temperatura inicial ao longo do tempo entre os animais apresenta curvas semelhantes, nas quais a variação de temperatura cresce continuamente.

Figura 48 – Variação de temperatura de cada animal na máscara de cavidade única e dupla com irradiação por LIP na pele não-fotossensibilizada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi feita a média da variação de temperatura entre os animais (Figura 49A) e uma normalização, a partir da equação (VI), resultando na Figura 49B.

$$\text{Normalização} = \frac{T_i - T_0}{T_i} \quad (VI)$$

Figura 49 – (A) Variação de temperatura média nas máscara de cavidade única e dupla com irradiação por LIP na pele não-fotossensibilizada e (B) Variação de temperatura normalizada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 49A, até quatro disparos o aumento da variação de temperatura foi bastante semelhante. A normalização da Figura 49B foi realizada porque a energia entregue por disparo na cavidade única e dupla era ligeiramente diferente e pode-se perceber que, com a normalização, o aumento da variação da temperatura nas duas aplicações foi equivalente, considerada a propagação de erros.

As imagens termográficas realizadas após o período de incubação dos FSs e precursores da PpIX e após a realização de TFD foram registradas. Na Figura 50, estão os dados referentes à variação de temperatura analisada com a aplicação de LIP e da TFD com a utilização de creme dos precursores da PpIX para a irradiação em ambas as cavidades.

Figura 50 – Variação de temperatura média nas máscara de cavidade única (A) e dupla (B) com TFD com aplicação dos precursores via creme.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 51, estão expressos os dados referentes a variação de temperatura analisada com a aplicação de LIP e da TFD com a utilização dos precursores da PpIX e os FSs aplicados por injeção, para a irradiação em ambas as cavidades.

Percebeu-se que as barras de erro foram maiores na cavidade dupla (Figura 51B), uma vez que para gerar estes dados, o erro foi propagado a partir dos valores da média de cada cavidade. Com base nos resultados obtidos, não se pode afirmar que existe uma relação de aumento de temperatura característico da molécula no tecido estimado com a análise de imagens. Não há argumentos para justificar, por exemplo, porque a aplicação de TFD com PDZ teve um aquecimento menor que quando se utilizou apenas LIP (gráfico da Figura 51A).

Figura 51 – Variação de temperatura média nas máscara de cavidade única (A) e dupla (B) com TFD com aplicação dos precursores via injeção.

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises termográficas foram realizadas com o intuito inicial de verificar se parte do dano causado ao tecido pela técnica seria devido a efeitos térmicos. Com o sistema utilizado, porém, pequenas variações no tempo de coleta pode ter influência direta nas informações contidas nas imagens e, portanto, o aumento do número de animais poderia possibilitar melhor entendimento do que pode ter ocorrido.

4.3.3 Histologia

Para a coleta das biópsias, dois animais foram eutanasiados 48 horas após a realização dos experimentos, e um animal após 24 horas. Em nenhuma das condições experimentais foi observada

alteração na camada basal e, portanto, em alguns casos, em 48 horas já foi possível observar o tecido em fase de remodelação.

Na Figura 52, estão organizadas imagens de uma lâmina de pele não-fotossensibilizada de um dos animais, corada com os três corantes e ilustrada com três aumentos.

Figura 52 – Imagens das lâminas histológicas com pele normal de suínos. Coloração: HE; TM e PSR; aumento original de 4, 10 e 40 vezes. A escala está ilustrada por uma reta branca na parte inferior a direita das imagens e possui dimensão de 100 μm .

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 52, com o aumento original de quatro vezes é possível visualizar a pele em toda a sua extensão e já se nota até mesmo a espessura da epiderme. Já no aumento original de dez vezes além de observar a espessura da epiderme é possível avaliar a interação da epiderme e derme através das conexões das papilas dérmicas (projeções da epiderme na derme). Ainda neste aumento, observa-se a conformação e direções das fibras de colágeno bem como presença de exsudado inflamatório, quando pertinente. No aumento original de quarenta vezes é possível observar a coesão das células na epiderme bem como as fibras de colágeno e elastina na derme papilar e reticular, além de possíveis infiltrados inflamatórios na interface epiderme e derme. Optou-se por expor os resultados com o aumento original de dez vezes para uma análise geral dos efeitos nas camadas da pele.

Na Figura 53, estão ilustradas as imagens registradas com o aumento original de dez vezes, com os três corantes utilizados, para a comparação da pele normal (controle) com a pele normal após 48 horas da irradiação com LIP.

Figura 53 – Imagens das lâminas histológicas com HE, TM e PSR; do grupo controle e da pele normal após 48 horas da irradiação com LIP; aumento original de 10 vezes. A escala está ilustrada por uma reta branca na parte inferior a direita das imagens e possui dimensão de 100 μ m. As setas brancas indicam características de inflamação e os retângulos brancos tracejados indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na pele, o colágeno I apresenta-se em maior quantidade e é responsável pela estruturação da pele devido a suas propriedades densas; enquanto o colágeno III apresenta-se em maior quantidade na pele envelhecida, bem como após o dano induzido na pele na fase de cicatrização sendo substituído posteriormente pelo colágeno I, na fase final de renovação e/ou remodelação da pele. (61)

É importante destacar que a aplicação de LIP no grupo experimental não produziu dano superficial macroscópico observável em nenhum dos animais. As principais diferenças microscópicas da pele do animal com o tecido que foi irradiado foram observadas em relação às conformações das fibras de colágeno. Com o corante HE foi possível verificar que as fibras ficam mais espaçadas (em termos de conformação e direcionamento) quando se aplica LIP, indicando a presença de edema. A partir da coloração do TM, verifica-se que a proporção de colágeno presente irradiada com LIP é menor que a observada no tecido que não foi irradiado. Além disso, o estriamento e espaçamento das fibras indica sinais de degradação das mesmas. Com a coloração por PSR também observa-se a modificação na forma e direcionamento das fibras de colágeno, caracterizando o tecido como em processo de cicatrização. Portanto, de acordo com as imagens histológicas, ficou evidente que a luz LIP promoveu alterações microscópicas no tecido.

Na Tabela 10, foram classificadas as alterações observadas entre a pele do animal e a pele após 48 horas da irradiação com LIP. Pode-se dizer que, de acordo com as modificações observadas com a aplicação de LIP, a pele teve alterações microscópicas não-significativas ao serem comparadas às condições experimentais em que houve a realização de TFD.

Tabela 10 – Modificações observadas nas lâminas histológicas do controle e de após 48 horas da irradiação com apenas LIP. Na tabela, ‘○’ indica ausência da característica, e o símbolo de ‘+’ indica a severidade na presença da característica comparada ao controle.

MODIFICAÇÕES NA PELE			CONTROLE	APENAS LIP
Área do dano superficial			○	○
Inflamação	↑ infiltrados inflamatórios + sinais de edema		○	+
Proliferação	Repitelização	↑ espessura da epiderme	○	○
		↑ papilas dérmicas	○	○
	Fibroplasia	degradação das fibras de colágeno	○	+
Remodelação	Substituição de colágeno III por colágeno I		○	○

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez que as principais alterações observadas envolveram mudanças na conformação e direcionamento das fibras de colágeno, optou-se pela discussão dos resultados da histologia principalmente com base na coloração de TM e PSR.

Após 48 horas da realização da TFD foram fotografadas as lesões superficiais resultantes das aplicações dos precursores de PpIX, veiculados com creme e injeção, estas imagens estão representadas na Figura 54.

Figura 54 – Imagens de campo amplo (com escala em centímetros) das lesões superficiais após 48 horas da TFD com ALA, M-ALA e a mistura entre eles; com aplicação em creme e por injeção.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como discutido na seção 4.3.1, a produção de PpIX foi baixa com a aplicação de creme, e como esperado, não houve a presença de dano superficial significativo. Com a aplicação de ALA, no entanto, é possível perceber que a região irradiada ficou avermelhada. Na aplicação de M-ALA, dois pontos se destacaram com um dano perceptível visualmente, que correspondem aos pontos de fluorescência mais intensos; na aplicação de ALA+M-ALA, por outro lado, não é possível perceber nenhuma alteração macroscópica. Com o uso da injeção, o dano mais extenso foi observado na aplicação de ALA isolado e M-ALA isolado, respectivamente, e de forma mais sutil na aplicação de ALA+M-ALA. A comparação destas condições em 24 horas e 48 horas foi feita na Figura 56, para relacionar o processo de cicatrização macroscópico desta aplicação.

A Figura 55 apresenta os resultados da aplicação em creme e injeção dos precursores após 48 horas dos experimentos. Comparadas ao controle, todas as condições experimentais apresentaram infiltrados inflamatórios e, portanto, estão em processo de cicatrização.

Figura 55 – Imagens das lâminas histológicas de TM após 48 horas da TFD com creme e por injeção de ALA, M-ALA e mistura entre eles; aumento original de 10 vezes. A escala está ilustrada por uma reta branca na parte inferior a direita das imagens e possui dimensão de 100 μ m. As setas brancas indicam características de inflamação e os retângulos brancos tracejados indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao observar as condições em que os precursores foram aplicados em creme, após 48 horas da TFD, a aplicação de ALA mostra que há sinais de inflamação (infiltrados inflamatórios, bem como espaçamento das fibras de colágeno) e características de proliferação (aumento do número de papilas dérmicas e de espessura da epiderme). Para o M-ALA e ALA+M-ALA, as características de cicatrização do tecido apresentam-se em proporções similares, principalmente em relação à degradação das fibras de colágeno e à presença de infiltrados inflamatórios.

Ao utilizar M-ALA e ALA+M-ALA administrados por injeção é possível observar que a conformação das fibras de colágeno foi mais semelhante à das fibras do controle, indicando que as primeiras estão em fase de remodelação, uma vez que ainda há a presença de infiltrados inflamatórios (em menor proporção quando comparados a aplicação de ALA por creme) em processo de substituição de colágeno do tipo III por colágeno do tipo I (devido ao maior preenchimento das fibras de colágeno). Na aplicação de ALA por injeção, ainda observa-se sinais de inflamação (espaçamento das fibras de colágeno e presença de infiltrados inflamatórios) e proliferação (fibroplasia).

As modificações da pele observadas na de pele após 48 horas da realização de TFD com LIP com aplicação dos precursores, tanto na veiculação com creme quanto com injeção observadas na Figura 55 e estão expressas na Tabela 11.

Tabela 11 – Modificações da pele observadas após 48 horas da realização de TFD com LIP com aplicação de ALA, M-ALA e da mistura entre eles, tanto na veiculação com creme quanto com injeção. Na tabela, ‘○’ indica ausência da característica, e o símbolo de ‘+’ indica a severidade na presença da característica comparada ao controle.

			CREME		INJEÇÃO			
MODIFICAÇÕES NA PELE			ALA		M-ALA		ALA + M-ALA	
Área do dano superficial			+	+++	++	++	○	+
Inflamação	↑ infiltrados inflamatórios + sinais de edema		+++	+++	++	+	+	+
	Repitelização	↑ espessura da epiderme	+	+	○	+	○	+
Proliferação		↑ papilas dérmicas	+	+	○	++	○	++
	Fibroplasia	degradação das fibras de colágeno	+	+++	+++	+	+++	○
Remodelação	Substituição de colágeno III por colágeno I		○	○	○	++	○	+++

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 56, estão representadas as imagens das lesões superficiais com aplicação por injeção livre de agulha de ALA, M-ALA e a mistura de 50% de ALA e M-ALA; após 24 e 48 horas da realização dos experimentos.

Figura 56 – Imagens de campo amplo (com escala em centímetros) das lesões superficiais após 24 e 48 horas da TFD; com aplicação por injeção de ALA, M-ALA e da mistura entre eles.

ALA

M-ALA

Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se afirmar que em todas as condições, a extensão das lesões superficiais era menor em 48 horas em relação à extensão em 24 horas, devido à evolução do processo de cicatrização. Macroscopicamente, a condição que apresentou processo de cicatrização mais rápido foi a da aplicação da mistura entre ALA e M-ALA, enquanto a mais lenta se deu para a aplicação de ALA.

As imagens das lâminas histológicas coradas com TM das biópsias realizadas após 24 e 48 horas da realização da TFD com o uso de injeção das soluções dos precursores, estão representadas na Figura 57.

Figura 57 – Imagens das lâminas histológicas de TM após 24 e 48 horas da TFD com creme e por injeção de ALA, M-ALA e mistura entre eles; aumento original de 10 vezes. A escala está ilustrada por uma reta branca na parte inferior a direita das imagens e possui dimensão de 100 μm . As setas brancas indicam características de inflamação e os retângulos brancos tracejados indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com a sequência de imagens da Figura 57 foi possível perceber a evolução do processo cicatricial dos precursores quando aplicados por injeção.

Em 24 horas, pode-se observar que a aplicação de ALA apresenta características de inflamação (elevada quantidade de infiltrados inflamatórios e sinais de edema devido ao

espaçamento das fibras de colágeno), enquanto o M-ALA e ALA+M-ALA apresentam sinais de proliferação, uma vez que as fibras mostram-se degradadas (de forma mais relevante para o M-ALA).

Como mencionado anteriormente, para a Figura 55, os tecidos tratados com M-ALA e ALA+M-ALA estão em fase de remodelação, enquanto para os tratados com ALA ainda observa-se sinais de inflamação e proliferação.

Portanto, de acordo com as observações histológicas, sugere-se que com a aplicação dos precursores por injeção, o processo de cicatrização para o M-ALA e para o M-ALA associado ao ALA apresentaram uma evolução mais rápida, comparados ao ALA isolado, no período de 48 horas.

Na Tabela 12 estão classificadas as modificações da pele observadas pela aplicação dos precursores de PpIX através de injeção, nos tempos de 24 e 48 horas após a realização de TFD.

Tabela 12 – Modificações observadas na pele após 24 e 48 horas da realização de TFD com LIP com aplicação de ALA, M-ALA e da mistura entre eles, veiculados por injeção. Na tabela, ‘○’ indica ausência da característica, e o símbolo de ‘+’ indica a severidade na presença da característica comparada ao controle.

		24 h		48 h			
MODIFICAÇÕES NA PELE		ALA		M-ALA		ALA + M-ALA	
Área do dano superficial		+++	+++	++	+	+++	+
Inflamação	↑ infiltrados inflamatórios + sinais de edema	+++	++	++	+	++	+
Proliferação	Repitelização	+	++	++	+++	+	+++
	↑ espessura da epiderme	○	+	○	++	○	+++
	Fibroplasia	++	+++	+++	+	++	○
Remodelação	degradação das fibras de colágeno						
	Substituição de colágeno III por colágeno I	○	○	○	++	+	+++

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 58, estão representadas as imagens das lesões superficiais com aplicação por injeção livre de agulha de PDZ, ICV e a mistura de 50% entre ele após 24 e 48 horas da realização dos experimentos.

Figura 58 – Imagens de campo amplo (com escala em centímetros) das lesões superficiais após 24 e 48 horas da TFD; com aplicação por injeção de PDZ, ICV e a mistura entre eles.

Fonte: Elaborada pela autora.

A área do foi menor com a aumentando para entre os FSs, Não há uma significativa entre tempos de 24 e 48 indicativo de que, avaliado, o cicatrização foi base na avaliação relação à injeção dos resultado condiz fotodegradação, observada uma

PDZ

ICV

PDZ+ICV

dano superficial aplicação do PDZ, a ICV e a mistura respectivamente. diferença visual as lesões nos horas, o que é um no período processo de mais lento (com macroscópica) em aplicação por precursores. Este com a análise da em que foi sinergia entre o

PDZ e ICV, a qual *in vivo* promoveu um dano mais extenso.

Na Figura 59, foi possível comparar microscopicamente as características do processo de cicatrização presentes em cada condição.

Figura 59 – Imagens das lâminas histológicas de TM após 24 e 48 horas da TFD com creme e por injeção de PDZ, ICV e mistura entre eles; aumento original de 10 vezes. A escala está ilustrada por uma reta branca na parte inferior a direita das imagens e possui dimensão de 100 μ m. As setas brancas indicam características de inflamação e os retângulos brancos tracejados indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 13 contém a análise das modificações observadas nas lâminas da pele após 24 e 48 horas da realização de TFD com LIP com aplicação de PDZ, ICV e da mistura entre eles, veiculados por injeção.

Pode-se dizer que os aspectos histológicos observados nas aplicações de PDZ, ICV e PDZ+ICV em 24 horas foram bastante semelhantes, em termos de processo inflamatório e proliferação. Com 48 horas, para o uso dos FSs isolados observa-se que a remodelação está em andamento (fibras de colágeno estão organizadas e estão mais adensadas e com menos infiltrados inflamatórios que em 24 horas); a aplicação dos FSs misturados após este tempo, porém, ainda

demonstra sinais de inflamação (infiltrados infamatórios tão presentes quanto em 24 horas) e proliferação (degradação das fibras de colágeno, estriamento maior do que em 24 horas).

Tabela 13 – Modificações observadas na pele após 24 e 48 horas da realização de TFD com LIP com aplicação de PDZ, ICV e da mistura entre eles, veiculados por injeção. Na tabela, ‘○’ indica ausência da característica, e o símbolo de ‘+’ indica a severidade na presença da característica comparada ao controle.

				24 h		48 h	
MODIFICAÇÕES NA PELE				PDZ		ICV	
Área do dano superficial				PDZ		PDZ + ICV	
Inflamação	↑ infiltrados inflamatórios + sinais de edema			+	+	++	++
				++	+	++	+
Proliferação	Repitelização	↑ espessura da epiderme ↑ papilas dérmicas		+	+	+	+
				+++	○	+++	++
	Fibroplasia	degradação das fibras de colágeno		+	○	++	+++
Remodelação	Substituição de colágeno III por colágeno I			○	++	○	○

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi realizada uma imagem do inferior da lesão proporcionada pela injeção de PDZ+ICV, no momento da coleta da biópsia no animal que foi eutanasiado 24 horas após o procedimento experimental. Esta imagem e a da lesão superficial estão ilustradas na Figura 60.

Figura 60 – Visão macroscópica do dano na superfície e na profundidade após 24 horas da realização de TFD com LIP na mistura de PDZ e ICV.

Fonte: Elaborada pela autora.

A amostra para a histologia da lesão mostrada na Figura 60B é apresentada tanto a partir da superfície (lado esquerdo) quanto da parte inferior (lado direito). A lesão da direita, mostra que o dano provocado atingiu uma porção maior do tecido do que sugere o dano observado superficialmente (Figura 60A). Este fato reflete a natureza da propagação da luz abaixo das camadas mais superficiais da pele. Comumente, não se observa este tipo de efeito em irradiações com fonte contínuas, o que sugere que a LIP, a injeção ou sua combinação, ao menos nesta condição (PDZ+ICV), teve papel relevante em promover dano em uma porção maior de tecido nas camadas mais profundas que na superfície (em comparação à lesão superficial visualizada no lado direito da Figura 60A).

Comparação de protocolo de injeção: LIP versus LED vermelho

Com base no que foi observado nos experimentos realizados neste estudo, é possível imaginar um panorama no qual a aplicação de ALA, uma das substância mais utilizadas em pesquisas de TFD (62), se aplicado em solução por injeção livre de agulhas pode se tornar viável no tratamento clínico no Brasil por diminuir o tempo de tratamento e, consequente, a diminuição da condição de dor que o paciente sofre frequentemente durante o procedimento.

Por conta disto, optou-se por um teste para a comparação com o protocolo clínico utilizado com a irradiação por LED vermelho (57) e com o protocolo estudado neste trabalho para a aplicação de LIP, de acordo com a Tabela 14. Neste teste foram comparados ambos os procedimentos utilizando veiculação da solução de ALA com a aplicação de injeção sem agulhas.

Tabela 14 – Parâmetros utilizados no protocolo clínico com LED e nos experimentos com LIP

	LIP	LED vermelho
Fluência (J/cm²)	85,5	150
Tempo (min)	~ 4	20
Energia (J)	109	118

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 61, ilustra o dano superficial observado após 24 horas da realização da TFD com as duas modalidades de irradiação.

Figura 61 – Imagens de campo amplo (com escala em centímetros) do dano superficial após 24 horas da realização da TFD, com aplicação de ALA por injeção e irradiação com LIP e LED vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 62, estão as imagens de fluorescência realizadas antes da irradiação. No local de aplicação da injeção, na região que foi irradiada posteriormente com LIP, em uma porção central maior que na de LED vermelho, não observou-se a formação superficial de PpIX (a partir das imagens de fluorescência), o que justifica a ausência de dano no centro da lesão da Figura 61.

Figura 62 – Imagens de fluorescência de campo amplo da formação da PpIX após a aplicação em creme (3 horas de incubação) de ALA, nas regiões a serem irradiadas com LIP e LED vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens realizadas nas lâminas histológicas dos dois tipos de irradiação na aplicação por injeção de ALA estão expostas na Figura 63.

Figura 63 – Imagens das lâminas histológicas com os três corantes; após irradiação por LIP e LED vermelho com aplicação de ALA por injeção após 24 e 48 horas da TFD com aumento original de 10 vezes. A escala está ilustrada por uma reta branca na parte inferior a direita das imagens e possui dimensão de 100 μm . As setas brancas indicam características de inflamação e os retângulos brancos tracejados indicam regiões de conformação e coesão das fibras de colágeno.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 15, agrupou-se a classificação das modificações da pele observadas para aplicação de TFD com LED e LIP, em regiões fotossensibilizadas com ALA por injeção.

Tabela 15 – Modificações observadas na pele após 24 horas da realização de TFD com LIP e LED vermelho, com aplicação de ALA por injeção. Na tabela, ‘○’ indica ausência da característica, e o símbolo de ‘+’ indica a severidade na presença da característica comparada ao controle.

MODIFICAÇÕES NA PELE			LIP	LED
Área do dano superficial			+	+++
Inflamação	↑ infiltrados inflamatórios + sinais de edema		++	+++
Proliferação	Repitelização	↑ espessura da epiderme	○	○
		↑ papilas dérmicas	○	○
	Fibroplasia	degradação das fibras de colágeno	+	+++
Remodelação	Substituição de colágeno III por colágeno I		+	○

Fonte: Elaborada pela autora.

Macroscopicamente, o dano estabelecido na superfície após 24 horas da irradiação com LED foi mais extenso e significativo que com o uso de LIP. Isto pode ser justificado por conta do uso de luz contínua, porque o tecido não tem tempo para dissipar a energia recebida constantemente durante a irradiação. No caso do LIP, o fracionamento dos disparos permite a dissipação do calor gerado pela absorção de luz no tecido, postergando o aumento de temperatura. Além disso, o estabelecimento do campo de luz durante a irradiação contínua modifica a disponibilidade de oxigênio, uma vez que interfere no aporte de sangue local, já que o campo de luz contínuo causa vasoconstrição. (63) No caso da LIP esse efeito poderia vir a ser observado, mas demoraria mais para ocorrer. Por conta disso, o estresse metabólico e, conseqüentemente, o processo inflamatório são menores.

A extensão de infiltrados inflamatórios em ambas as condições foi bastante similar. Contudo, com irradiação feita com LED é possível perceber que a epiderme ficou desestruturada, além da maior degradação das fibras de colágeno, o que implica dizer que houve maior dano. Este resultado condiz com as observações macroscópicas das lesões.

5 CONCLUSÃO

O estudo *in vitro* mostrou a viabilidade da ativação de diferentes FSs isolados e ao serem misturados, com o aparente efeito de sinergia para a combinação entre PDZ e ICV. Com os resultados obtidos neste experimento, contudo, fica comprovado que a LIP foi capaz de interagir com todos os FSs e levar a uma multiativação das bandas dos FSs quando associados.

Com relação aos estudos *in vivo* foram observados diferentes aspectos do uso da LIP para TFD. Na avaliação de fluorescência por imagem de campo amplo, a formação de PpIX a partir de seus precursores, na pele normal de suínos, deu-se de forma heterogênea quando foi utilizada a aplicação tópica via creme. Ao aplicar a solução intradérmica por injeção, observou-se maior homogeneidade na produção de PpIX superficial com metade do tempo de incubação. Com relação ao PDZ aplicado por injeção, a fluorescência mostrou que a distribuição também é homogênea, de forma semelhante ao observado para os precursores da PpIX, sugerindo a possibilidade de que os protocolos de TFD podem ter seus tempos ainda mais reduzidos. Uma redução do tempo de incubação, para o caso da PpIX quando aplicada com injeção livre de agulhas, reduziria praticamente pela metade o período de implementação do protocolo. No caso do PDZ, este tempo seria ainda mais reduzido, uma vez que neste caso o próprio FS já é administrado no tecido. Assumindo que a distribuição da ICV também seja uniforme, o que parece acontecer pelo formato observado na lesão superficial após a irradiação, este FS também seria candidato à aplicação de TFD em pele.

As informações da análise termográfica mostraram que não ocorre aquecimento relevante do tecido nas aplicações de LIP, com distância entre 7 e 10 mm da pele, mostrando que esta fonte de luz não causa danos térmicos relevantes em aplicações de TFD no protocolo utilizado. Ainda assim, o modelo animal utilizado apresentou divergência em termos de raças, o que deve ser levado em conta em aplicações futuras, com possíveis adaptações de protocolo.

Foram feitas as análises histológicas de todos os animais dos grupos experimentais. A avaliação foi feita nas primeiras 48 horas visando comparação entre danos observados macroscopicamente e microscopicamente. As observações das lâminas histológicas permitiram classificar cada condição experimental em termos das diferentes fases do processo cicatricial (inflamação, proliferação e remodelação, estabelecidas respectivamente com relação ao tempo decorrido) dentro do intervalo de 48 horas.

Com base na classificação adotada, observou-se que ao aplicar apenas LIP, mesmo não observando um dano superficial macroscópico na pele, a análise histológica mostrou alterações nas fibras de colágeno, apesar de um efeito pouco expressivo em relação às aplicações com TFD.

Ao comparar os precursores ao serem aplicados via creme e por injeção na TFD, em 48 horas, as fases do processo cicatricial ao utilizar o creme estavam defasadas em relação a aplicação por injeção. Para o ALA em creme, observou-se características de inflamação, enquanto para injeção o processo já apresentava características de proliferação. Para as aplicações de M-ALA e ALA+M-ALA, ao utilizar-se injeção, ambas as aplicações apresentaram características de remodelação, enquanto para a aplicação via creme ainda apresentavam características de proliferação.

Comparando a análise microscópica dos resultados da injeção para os precursores observamos que a evolução do processo cicatricial do M-ALA e da mistura entre ALA e M-ALA foi mais adiantada que a do ALA durante o intervalo observado, uma vez que enquanto a aplicação de ALA em 48 horas apresenta-se em fase de inflamação, o M-ALA e ALA+M-ALA apresentam características de proliferação.

Em relação a aplicação dos FSs (PDZ, ICV e PDZ+ICV) em 24 horas observou-se um comportamento bastante semelhante, com características de inflamação e proliferação. Após 48 horas da TFD, a mistura de PDZ+ ICV não apresentou-se na fase de remodelação, o que ocorreu para os FS isoladamente. Esta observação sugere que o dano promovido pela mistura destes FSs na pele foi mais expressivo, corroborando com a observação macroscópica.

Finalmente, com a relação às diferentes fontes de luz, após 24 horas da TFD, sugere-se que o dano estabelecido pela LIP foi menos expressivo quando comparado ao LED. Macroscopicamente, observa-se inflamação exacerbada do tecido irradiado com o LED, em comparação a uma inflamação muito mais discreta causada pela LIP. Microscopicamente, pela aplicação de LED o tecido já apresenta características de proliferação após 24 horas, enquanto pela aplicação de LIP a pele ainda apresenta-se em fase inflamatória após o mesmo período.

Observados todos estes aspectos, é possível afirmar que, com relação aos objetivos estabelecidos para este estudo, foi possível alcançar um maior entendimento sobre os efeitos da LIP em tecido biológico, especialmente em associação a protocolos de TFD.

Como perspectivas deste trabalho, pretende-se: quantificar as diferenças nas fibras de colágeno por meio de imagens de birrefringência por microscopia de luz polarizada das lâminas de PSR, a fim de complementar as conclusões – uma vez que esta medida permite a possibilidade de distinguir colágeno do tipo I de colágeno do tipo III. Além disso, como extensão natural do trabalho é possível avaliar o perfil de distribuição da PpIX na pele após a aplicação por injeção livre de agulhas e testar as combinações utilizadas em modelo tumoral.

Foi possível demonstrar que a LIP, tanto utilizando FSs isoladamente quanto suas combinações, apresentou possibilidades viáveis para a exploração da TFD utilizando esta fonte de luz, e mostrou que o princípio da multiativação das bandas de absorção dos FSs pode ser uma ferramenta relevante para o aperfeiçoamento da TFD como técnica terapêutica.

Além disso, pela primeira vez, foi possível estabelecer um modelo de protocolo para investigação do uso da LIP em modelo animal para TFD em pele, que pode ser extrapolado em futuros estudos para tratamentos oncológicos e dermatológicos.

REFERÊNCIAS

- 1 BAGNATO, V. S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. São Paulo: Livraria da Física, 2008.
- 2 PRATAVIEIRA, S. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema de imagem multiespectral para o diagnóstico óptico de lesões neoplásicas**. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 3 REQUENA, M. B. **Terapia fotodinâmica e luz branca**: aspectos analíticos e perspectivas da viabilidade do tratamento. 2012. 53 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Física) – Instituto de Geociencias e Ciencias Exatas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2012.
- 4 GRECCO, C. **Avaliação da resposta fotodinâmica em fígado normal de ratos utilizando luz pulsada no regime de femtossegundos**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 5 BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–11, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00202.
- 6 ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.
- 7 ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24–29, 2013
- 8 PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009.
- 9 MACHADO, A. E. H. Da terapia fotodinamica: principios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- 10 GRECCO, C.; VOLLET-FILHO, J. D.; CARVALHO, M. T.; BAGNATO, V. S. Physics of lasers and LEDs. **Lasers in Dentistry**. (Internet). 2015. p. 1–10. doi: 10.1002/9781118987742.ch1.
- 11 REQUENA, M. B.; MORIYAMA, L. T.; PRATAVIEIRA, S.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Analysis of the feasibility of the use of white LED and Photogem® in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 2, p. 198–199, 2011.
- 12 BABILAS, P. et al. Intense pulsed light (IPL): a review. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 93–104, 2010.
- 13 SANTOS, M. A. V. et al. Effectiveness of photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone in the treatment of acne vulgaris: comparative study. **Dermatologic surgery**: official publication for american society for dermatologic surgery, v. 31, n. 8, p. 910–915, 2005.
- 14 MEI, X.; SHI, W.; PIAO, Y. Effectiveness of photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light in Chinese acne vulgaris patients. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 29, n. 2, p. 90–96, 2013.

- 15 SHAABAN, D. et al. Photodynamic therapy with intralesional 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone in the treatment of acne vulgaris: a comparative study. **Dermatologic Therapy**, v. 25, n. 1, p. 86–91, 2012.
- 16 FRIEDMANN, D. P. et al. The effect of multiple sequential light sources to activate aminolevulinic Acid in the treatment of actinic keratoses: a retrospective study. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 7, n. 9, p. 20–25, 2014.
- 17 MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 43–48, 2004.
- 18 CLOVIS G. **Estudo comparativo da TFD utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda**. 2013. 110 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 19 GRECCO, C.; MORIYAMA, L. T.; COSCI, A.; PRATAVIEIRA, S.; BAGNATO, V.S.; KURACHI, C. Necrosis response to photodynamic therapy using light pulses in the femtosecond regime. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 4, p. 1177–1182, 2013.
- 20 STERENBORG, H. J.; VAN GEMERT, M. J. Photodynamic therapy with pulsed light sources: a theoretical analysis. **Physics in Medicine and Biology**, v. 41, n. 5, p. 835–849, 1996
- 21 POGUE, B. W.; LILGE, L.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C.; HASAN, T. The absorbed photodynamic dose examined from pulsed and cw light using tissue-simulating dosimeters. **Applied Optics**, v. 36, n. 28, p. 7257–7269, 1997.
- 22 STRASSWIMMER, J.; GRANDE, D. J. Do pulsed lasers produce an effective photodynamic therapy response? **Lasers Surgery in Medicine**, v. 38, n. 1, p. 22–25, 2006.
- 23 RAUSCH, P. C.; ROLFS, F.; WINKLER, M. R.; KOTTYSCH, A.; SCHAUER, A.; STEINER, W. Pulsed versus continuous wave excitation mechanisms in photodynamic therapy of differently graded squamous cell carcinomas in tumor-implanted nude mice. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 250, n. 2, p. 82–87, 1993.
- 24 COLUSSI, V. C.; NICOLA, E. M.; NICOLA, J. H. Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 229–236, 1996.
- 25 MENEZES, P. F. C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. 181p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 26 ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.
- 27 FERREIRA J. **Estudo e correlação de diferentes derivados de hematoporfirina e clorinas no processo de TFD**. 2007. 128p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- 28 PIRES L, BOSCO, S. M. G.; SILVA JUNIOR N. F.; KURACHI, C. Photodynamic therapy for pythiosis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013. doi: 10.1111/j.1365–3164.2012.01112.x.
- 29 GIRAUDEAU, C. et al. Indocyanine green: photosensitizer or chromophore ? still a debate. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 16, p. 1871–1897, 2013.

30 DESMETTRE, T.; DEVOISSELLE, J. M.; MORDON, S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 15–27, 2000.

31 URBANSKA, K.; ROMANOWSKA-DIXON, B.; MATUSZAK, Z.; OSZAJCA, J.; NOWAK-SLIWINSKA, P.; STOCHEL, G. Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, n.2, p. 387–391, 2002.

32 KIM, B. J. et al. Pilot study on photodynamic therapy for acne using indocyanine green and diode laser. **Journal of Dermatology**, v. 36, n. 1, p. 17–21, 2009.

33 SWINDLE, M. M.; MAKIN, A.; HERRON, A. J.; CLUBB, F. J.; FRAZIER, K. S. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 344–356, 2012.

34 JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. **Skin Research Technology**, v.13, n.1, p. 19–24, 2007.

35 GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1152–1161, 2007.

36 HADDAD, A. et al. The effect of increasing fluence on the treatment of actinic keratosis and photodamage by photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 6, p. 427–432, 2011.

37 HASEGAWA, T. et al. Efficacy of photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid using intense pulsed light for Bowen's disease. **Journal of Dermatology**, v. 37, n. 7, p. 623–628, 2010.

38 LIU, S. D. et al. Comparison of human, porcine and rodent wound healing with new miniature swine. n. 573, p. 65205. Disponível em: <<http://www.sinclairresearch.com/document/comparison-human-porcine-rodent-wound-healing-new-miniature-swine-study-data/>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

39 ZAMORA-ROJAS, E. et al. Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 343–349, 2013. doi:10.1016/j.ifset.2013.06.008.

40 LISTER, T. Optical properties of human skin. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 9, p. 090901, 2012.

41 KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

42 GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 1, p. 85–97, 2012.

43 HKS801: user&training manual. Disponível em: <<http://www.comfortequipment.com/download/HKS801.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

44 BLANCO, K. C. et al. Fluorescence guided PDT for optimization of the outcome of skin cancer treatment. **Frontiers in Physics**, v. 3, 2015. doi: 10.3389/fphy.2015.00030.

- 45 MENEZES, P. F. C. et al. Optimization of photodynamic therapy using negative pressure. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 5, p. 1–6, 2014.
- 46 SOUZA, C. S. et al. Optimized photodynamic therapy with systemic photosensitizer following debulking technique for nonmelanoma skin cancers. **Dermatologic Surgery**, v. 33, n. 2, p. 194–198, 2007.
- 47 CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. **Composto da base de dados PubChem CID=4971**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4971>>. Acesso em 8 maio 2015.
- 48 CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. **Composto da base de dados PubChem CID=137**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/137>>. Acesso em 8 maio 2015.
- 49 CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. **Composto da base de dados PubChem CID=15722**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15722>>. Acesso em 8 maio 2015.
- 50 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Física de São Carlos. Vanderlei Salvador Bagnato. Composições contendo o ácido 5–aminolevulínico (5–ALA) e seu derivado metil ALA e uso das composições. BR n. PI 10201401919, 12 maio 2015. Brasil.
- 51 CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. **Composto da base de dados PubChem CID=5488036**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5488036>>. Acesso em 8 maio 2015.
- 52 CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. **Composto da base de dados PubChem CID=5282412**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282412>>. Acesso em 8 maio 2015.
- 53 ANESTESIA infiltrativa, sem agulha. 2013. Disponível em: <http://www.citysurgical.com.br/odonto/produtos/safe_inject-citysurgical.pdf>. Acesso em 5 jun. 2015.
- 54 COSTA, M. M. **Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência ótica para uso médico e odontológico**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 55 LI, X. et al. Needle-free injection of 5–aminolevulinic acid in photodynamic therapy for the treatment of condylomata acuminata. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 1, p. 236–240, 2013.
- 56 BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L. G.; SIBATA, C. H.; ALLISON, R. R. PDT experience in Brazil: a regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 107–118, 2005.
- 57 RAMIREZ, D. P.; KURACHI, C.; INADA, N. M.; MORIYAMA, L. T.; SALVIO, A. G.; VOLLET FILHO, J. D. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL–PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. **Photodiagnosis Photodynamics Therapy**, v. 11, n. 1, p. 22–26, 2014.
- 58 KUMER, G. L.; KIERNAN, J. A. Connection Special Stains and HE, v. 14, 2010. Disponível em: <http://www.dako.com/28829_connection_14.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2015.

59 HAEDERSDAL, M.; TOGSVERD-BO, K.; WULF, H. C. Evidence-based review of lasers, light sources and photodynamic therapy in the treatment of acne vulgaris. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 22, n. 3, p. 267–278, 2008.

60 SANDBY-MØLLER, J.; POULSEN, T.; WULF, H. C. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 83, n. 6, p. 410–413, 2003.

61 ORIÁ, R. B. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **Anais Brasileiros em Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 425–34, 2003.

62 NOKES, B. et al. Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. **Journal of Surgery Research**, v. 181, n. 2, p. 262–271, 2013.

63 KURACHI, C.; MELO, C. S.; MARCASSA, L. G.; ZÍLIO, S.; BAGNATO, V. S.; CESTARI FILHO, G. A. Implantação clínica da TFD no Brasil: breve histórico e resultados alcançados. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v. 20, p. 33–41, 2002.

ANEXOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 019546/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Aplicação da luz intensa pulsada em terapia fotodinâmica"**, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Priscila Fernanda Campos de Menezes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de setembro de 2013.

Jaboticabal, 06 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

**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 12/2014

A Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos – CEUA/IFSC, em reunião realizada no dia 24.06.2014, **homologou** o projeto de pesquisa intitulado “Aplicação da luz intensa pulsada em terapia fotodinâmica”, submetido pela pesquisadora Michelle Barreto Requena.

São Carlos, 03 de julho de 2014.

Profa. Dra. Cristina Kurachi
Presidente da CEUA/IFSC