UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

HILDE HARB BUZZÁ

Avaliação do efeito vascular da terapia fotodinâmica empregando
derivados de porfirina e clorina na membrana corioalantóica

São Carlos
2012

HILDE HARB BUZZÁ

Avaliação do efeito vascular da terapia fotodinâmica empregando derivados de porfirina e clorina na membrana corioalantóica

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof^a Dr^a Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2012

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

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

Buzzá, Hilde Harb
Avaliação do efeito vascular da terapia
fotodinâmica empregando derivados de porfirina e
clorina na membrana corioalantóica / Hilde Harb
Buzzá; orientadora Cristina Kurachi - versão
corrigida -- São Carlos, 2012.
93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Efeito Vascular. 3.
Membrana Corioalantóica. 4. PDT. I. Kurachi,
Cristina, orient. II. Título.

Aos meus pais e irmão, por me fornecerem todas as ferramentas para pescar. Nunca o peixe.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Cristina Kurachi, muita mais que orientadora. Agradeço pelo exemplo constante na minha vida. Obrigada por me tornar uma pessoa melhor, todos os dias, a cada dia. Obrigada por me mostrar sempre o melhor caminho sem perder a doçura e encanto que só quem tem o prazer de conviver com ela pode receber. Obrigada por todo apoio e amizade. Obrigada por me ensinar cinema, teatro, me ensinar como ser ética, e mostrar que é possível ser competente e querida ao mesmo tempo. Meu agradecimento vem em forma da mais profunda admiração.

Ao Profº Drº Vanderlei Salvador Bagnato, pela paixão à ciência e ao ensino e pela competência sempre demonstrada em sua profissão. Como agente constante de transformação, obrigada por me fazer acreditar que é possível mudar o mundo, todos os dias.

À minha família, por ela ser grande, falante e unida. Obrigada pela confiança depositada, pelos conselhos e broncas, por todas as festas. Cada conquista da minha vida sempre estará atrelada a vocês porque, essencialmente, vocês são responsáveis por tudo que me tornei.

Aos meus pais, pela incrível felicidade que me transmitem. Por calçar meu caminho e garantir que sempre há uma mão para eu segurar, por mais impossível que tudo possa parecer. Amo vocês.

Ao Joseph, por honrar a palavra irmão a todo instante, seja nas críticas ou elogios. Pelo apoio incondicional nas minhas escolhas, por compartilhar todas as minhas alegrias, tristezas e, principalmente, por compartilhar comigo todos os sonhos. Obrigada!

Aos meus amigos de verdade! Aos amigos (de verdade) do lab, do teatro, do nosso (querido) grupo, de Araraquara, primos-amigos, amigos... Não consigo imaginar a minha vida sem vocês. O agradecimento aqui é por todos os momentos de felicidade! Pelos conselhos e choros compartilhados, pela torcida, pelos cafés e pelas bebedeiras e dias de ressaca e por me ensinarem sobre aquilo que chamamos de vida. Eu não poderia nomeá-los pela chance (mesmo que pequena) de esquecer algum nome. Então, fica aqui o meu muito obrigada aos melhores amigos que uma pessoa poderia ter: meus amigos!

À Nona, à Décima e à Morta ou Corpos de Cera, Frutas de Carne e à Linha que Separa, porque é no teatro que todos os sonhos podem se fazer real. Obrigada à arte, por me aliviar as tensões e por incentivar minha imaginação.

À professora Roberta Jonkhe e ao professor Claudio Sibata, da East Caroline University, por me ensinar mais do que uma técnica, me ensinou que é possível se sentir “em casa” mesmo em outro país.

Ao Nick, à Clara, ao professor Carlos e à Jenny pela recepção e amizade em tão pouco tempo na East Caroline University. Por me proporcionarem momentos inesquecíveis e pelo cookie mais gostoso que eu já comi.

À Leandra Watanabe e à Patrícia Moura, por me ensinarem no meu primeiro ano de graduação o que é trabalhar com competência na área da ciência. Obrigada por me ensinarem muito do que sei.

Ao pessoal do LAT, LIEPO, secretaria e colegas do laboratório, que sempre me ajudaram quando precisei, seja na montagem da bandeja de ovos ou na aquisição de LED's. Seria preciso mil bolos de café para agradecer! Especial agradecimento para Lili, Clovis, Didi, Layla, Nat, Alessandro, Tião e Lucas pela disposição em ajudar sempre (sempre) que precisei.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela infra-estrutura fornecida desde a graduação dando ferramentas fundamentais para meu aprendizado como pesquisadora, ao longo dos anos.

Às meninas da biblioteca do IFSC, em especial à Neuza e ao pessoal da pós-graduação (Silvio, Ricardo e Patrícia) por toda ajuda e simpatia, em todas as situações.

Ao pessoal da gráfica, por todos os pôsteres, capas e impressões, mesmo fora de época!

Aos órgãos de fomento: FAPESP, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro durante a realização do projeto.

À Globo Aves, por acreditarem na nossa pesquisa.

Nunca se pode concordar em rastejar, quando se sente o
ímpeto de voar.

Helen Keller

RESUMO

Buzzá, H. H. *Avaliação do efeito vascular da terapia fotodinâmica empregando derivados de porfirina e clorina na membrana corioalantóica*. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* - PDT) é uma técnica indicada para o tratamento local de câncer que vem tendo grandes avanços ao longo dos anos. A PDT consiste na interação entre luz e uma substância fotossensibilizadora, resultando na transformação do oxigênio molecular em oxigênio singlete, altamente reativo e tóxico para a célula, levando à destruição do tecido. Nesse contexto, o uso do modelo de Membrana Corioalantóica (CAM) é uma opção para o estudo dos efeitos vasculares envolvidos nessa terapia, além de permitir o estudo na variação de diversos parâmetros associados com a PDT e seus efeitos. Nesse estudo foram investigados um composto derivado de porfirina e um derivado de clorina. Esses fotossensibilizadores foram administrados topicamente e por via intravenosa, sendo variados diversos parâmetros. No primeiro caso, o tempo de incubação foi variado entre 20 e 80 minutos e a concentração de área da droga foi variada entre 0,1 e 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Quanto à dose de luz, o intervalo foi entre 4,8 e 60 J/cm^2 , empregando lasers de diodo em 635 nm para Photogem[®] e 660 nm para Photodithazine[®]. Depois de estabelecido 30 J/cm^2 para a aplicação tópica, foi usada a aplicação intravenosa com essa dose, a fim de comparar os resultados. Após iluminação, foram feitas imagens da membrana imediatamente após a iluminação até 300 minutos pós-terapia. Com ajuda de softwares de processamento de imagem, foi feita a transformação da imagem: os *pixels* referentes aos vasos sanguíneos foram transformados em preto e o restante (clara, gema e embrião) em branco. Esse processo levou à obtenção de um valor relacionado à área de vasos sanguíneos em função do tempo pós-terapia, quantificando e mostrando o comportamento do efeito vascular da PDT. A comparação entre os dois fotossensibilizadores mostrou que o uso da mesma concentração (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pode levar à destruição da rede vascular tratada para a porfirina e à dilatação dos vasos periféricos com destruição dos vasos mais calibrosos, para a clorina. Entretanto, variando as concentrações de ambos, obtemos respostas contrárias. A análise dos resultados obtidos, observando a diferença de ação dos fotossensibilizadores, permitiu a obtenção de uma relação quantitativa do comportamento vascular além do estudo individualizado do efeito da terapia fotodinâmica para análise do dano tecidual induzido.

Palavras-Chaves: Terapia fotodinâmica. Efeito vascular. Membrana corioalantóica, PDT.

ABSTRACT

Buzzá, H. H. *Evaluation of vascular effect of photodynamic therapy using porphyrin and chlorin derivatives in the chorioallantoic membrane*. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Photodynamic Therapy is a local treatment of cancer that has great advances over the years. To obtain an efficient process that leads to tissue destruction, a dynamic interaction of three factors is required: photosensitizing agent, light, and molecular oxygen. When there is the appropriate illumination of tissue with photosensitizer, this molecule is excited and produces singlet oxygen. This product is reactive and cytotoxic, and it results in cell death. In this context, the CAM model allows studies with variation in many parameters linked with PDT and its effects and it is an option to study of vascular effects. A compound of porphyrin (Photogem®) and a compound of chlorine (Photodithazine®) were investigated in this study. These fotosensitizers were topically administrated and the parameters were ranged between 20-80 minutes for incubation, and 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for concentration. About light dose, the range was between 4.8-60 J/cm^2 , with diode laser at 635 nm (Photogem®) and 660 nm (Photodithazine®). After established that light dose of 30 J/cm^2 as ideal for topical application, intravenous application was used with that dose in order to compare the results. After illumination, the membrane images were made from zero to 300 minutes. At image processing, the pixels corresponding to vessels were defined as black and the remaining structures as white pixels. Calculating the percentage area of the black pixels as a function of the treatment time, it is possible to quantify the vascular effect of this therapy. The comparison between two fotosensitizers (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) can lead to vascular network destruction to porphyrin and can lead to dilation of peripheral vessels with destruction to larger vessels, for chlorine. However, increasing the porphyrin concentration and decreasing the chlorine concentration, we have opposite responses. With varying PDT parameters, it was possible to obtain the best assay for PDT. The results obtained by observing the difference of action of photosensitizers, allows obtaining a quantitative relationship of vascular behavior in addition to individual study of the effect of photodynamic therapy for analysis of tissue damage induced.

Keywords: *Photodynamic therap. Vascular effect. Chorioallantoic membrane, PDT.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação do fotossensibilizador e com a luz e possíveis caminhos – diagrama de Jablonski modificado.	28
Figura 2 - Espectro de absorbância dos diferentes fotossensibilizadores com especificação dos comprimentos de onda nos picos. a) Clorina. b) Porfirina.	30
Figura 3 - Representação da rotação do ovo de galinha durante ED1 e ED2. a) Esquema de como foi montada a bandeja. b) Foto da bandeja de ovos na estufa. c) Direção de rotação dos ovos. d) Local onde é feito o orifício, no ovo.....	33
Figura 4 - Abertura da janela no ovo. a) ED3- Retirada da albumina. b) ED4- Uso de motor de alta rotação para abertura. c) ED4- vedação da janela com fita adesiva. d) Janela aberta.	34
Figura 5 - Colocada do Anel de Teflon na CAM para delimitação de área conhecida. a) Dimensões do anel. b) Foto do anel na CAM.	36
Figura 6 – a) Injeção do fotossensibilizador no vaso sanguíneo, durante a iluminação. b) Esquema do ovo ligeiramente girado para aplicação intravenosa do fotossensibilizador.	37
Figura 7 - a) Esquema experimental de iluminação para aplicação da Terapia Fotodinâmica em CAM. b) Foto do experimento - dentro da capela.	40
Figura 8 - Esquema experimental para obtenção das imagens ao longo do tempo: Câmera USB + Ovo + Computador.	40
Figura 9 - Cálculo do aumento e redução da rede vascular a partir do gráfico com a média entre a razão de pixels pretos por pixels totais calculado para determinado parâmetro.	42
Figura 10 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Porfirina em concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 30 J/cm^2	44
Figura 11 - Imagens processadas referentes a terapia fotodinâmica usando 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.	45
Figura 12 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de porfirina.....	46

Figura 13 - Imagens processadas, retirando o anel, referentes a terapia fotodinâmica usando 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.....	47
Figura 14 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de porfirina, retirando o anel da imagem.	47
Figura 15 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Porfirina em concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	48
Figura 16 - Imagens processadas referentes a terapia fotodinâmica usando 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.....	49
Figura 17 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.....	49
Figura 18 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina – média entre 3 ovos.....	50
Figura 19 - Vaso sanguíneo escolhido para análise individual.	51
Figura 20 - Vaso sanguíneo sobreposto mostrado ao longo do tempo pós-terapia.....	51
Figura 21 - Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso sobre a largura do anel (fixa), ao longo do tempo pós-terapia – 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de porfirina.	52
Figura 22 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Clorina em concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A área tracejada indica a região de dilatação dos vasos sanguíneos.	53
Figura 23 - Imagens processadas referentes a terapia fotodinâmica usando 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Clorina.	54
Figura 24 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Clorina – média entre 3 ovos.....	54
Figura 25 - Destruição do vaso sanguíneo de maior calibre.	55
Figura 26 - Vaso sanguíneo sobreposto mostrado ao longo do tempo pós-terapia.....	55
Figura 27 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Clorina em concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	56
Figura 28 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa)	57

Figura 29 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa).....	57
Figura 30 - Imagens obtidas 0, 30, 60, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Porfirina em concentração de área de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	59
Figura 31 - Imagens processadas referentes a terapia fotodinâmica usando 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.	60
Figura 32 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de porfirina – média entre 3 ovos	61
Figura 33 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Clorina em concentração de área de 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	62
Figura 34 - Imagens processadas referentes a terapia fotodinâmica usando 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Clorina.....	63
Figura 35 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Clorina – média entre 3 ovos.	64
Figura 36 - Correspondência de efeito nas diferentes concentrações dos fotossensibilizadores.	64
Figura 37 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia em concentração 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 30J/cm ² com iluminação fracionada (1 minuto de iluminação e 1 minuto de escuro).	66
Figura 38 - Imagens processadas referentes a terapia fotodinâmica usando 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina com iluminação fracionada.	67
Figura 39 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e iluminação fracionada.	67
Figura 40 - Imagens obtidas pós iluminação do grupo controle (somente luz).....	68
Figura 41 - Imagens processadas referentes ao grupo controle (somente luz).	69
Figura 42 - Gráfico mostrando o comportamento vascular do grupo controle (somente luz)..	69
Figura 43 - Grupo controle - Clorina: Imagens obtidas após incubação do fotossensibilizador.	70

Figura 44 - Imagens processadas referentes ao grupo controle – somente fotossensibilizador - clorina.	71
Figura 45 - Gráfico mostrando o comportamento do grupo controle – somente fotossensibilizador - clorina.	71
Figura 46 - Grupo controle - Porphirina: Imagens obtidas após incubação do fotossensibilizador	72
Figura 47 - Imagens processadas referentes ao grupo controle só com o fotossensibilizador - Porphirina.....	73
Figura 48- Gráfico mostrando o comportamento do grupo controle - somente Porphirina.	73
Figura 49 - Grupo controle com injeção intravenosa de soro fisiológico.....	75
Figura 50 - Imagem processada da região comum entre as imagens do grupo controle com soro fisiológico intravenoso.	75
Figura 51 - Gráfico mostrando o comportamento do grupo controle intravenoso usando apenas soro fisiológico.	76
Figura 52- Porphirina Intravenoso - Imagens pós-terapia com injeção de 500 µL de Porphirina à 0,2mg/mL	77
Figura 53 - Imagens processadas, retirando o anel, referentes a terapia fotodinâmica usando 500µL de Porphirina à 0,2mg/mL com aplicação intravenosa.	78
Figura 54 - Gráfico mostrando o comportamento vascular com processamento de imagens e retirada do anel, usando porfirina com aplicação intravenosa – média entre 3 ovos.	78
Figura 55 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com aplicação intravenosa de porfirina. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa).....	79
Figura 56 - Clorina Intravenoso - Imagens pós-terapia com injeção de 500 µL de Clorina à 0,2mg/mL.	80
Figura 57 - Imagens processadas, retirando o anel, referentes a terapia fotodinâmica usando 500µL de Clorina à 0,2mg/mL com aplicação intravenosa.....	81
Figura 58 - Gráfico mostrando o comportamento vascular com processamento de imagens e retirada do anel, usando clorina com aplicação intravenosa.	81

Figura 59 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com aplicação intravenosa de clorina. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa). 82

Figura 60 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com aplicação intravenosa de clorina. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa). 82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Câncer	23
1.2	Vasos Sanguíneos: Nutrição do Tumor.....	23
1.3	Modelo de Membrana Corioalantóica.....	24
1.4	Tratamentos Convencionais para Câncer	25
1.5	Terapia Fotodinâmica.....	26
1.5.1	Mecanismos de Ação da Terapia Fotodinâmica.....	27
1.7	Fotossensibilizadores	28
2	OBJETIVOS.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Obtenção do Modelo de Membrana Corioalantóica (CAM).....	33
3.2	Terapia Fotodinâmica.....	35
3.2.1	Administração do Fotossensibilizador	35
3.2.2	Iluminação da CAM Fotossensibilizada.....	37
3.3	Análise da Resposta Fotodinâmica	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Aplicação Tópica.....	43
4.1.1	Porfirina – Concentração de área: 1 µg/cm ²	44
4.1.2	Clorina – Concentração de área: 1 µg/cm ²	52
4.1.3	Porfirina – Concentração de área: 100 µg/cm ²	58
4.1.4	Clorina – Concentração de área: 0,1 µg/cm ²	61
4.1.5	Iluminação Fracionada	65
4.1.6	Grupo Controle – Só Luz	68
4.1.7	Grupo Controle – Só Clorina	70
4.1.8	Grupo Controle – Só Porfirina	72
4.2	Aplicação Intravenosa	74

4.2.1	Grupo Controle – Só Soro Fisiológico	74
4.2.2	Porfirina – Aplicação Intravenosa	76
4.2.3	Clorina – Aplicação Intravenosa	79
5	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o termo usado para caracterizar mais de cem tipos de doenças, incluindo tumores malignos, que podem atingir várias partes do corpo humano. A incapacidade de diferenciação celular e o crescimento desordenado de células são características em comum das doenças assim classificadas, determinando a formação de tumores malignos ou neoplasias por essas células serem agressivas e difíceis de controlar (1).

As células tumorais se proliferam localmente, porém, possuem a capacidade de formar metástase, ou seja, elas podem atravessar as barreiras teciduais, vasos sanguíneos e sistema linfático e se instalar em outros lugares do corpo, recomeçando o processo de multiplicação celular e proliferação (2-3).

Os vários tipos de célula do corpo, a velocidade de proliferação e multiplicação das células, além da capacidade de invadir outras regiões (metástase) são parâmetros que permitem distinguir os diferentes tipos de câncer.

O câncer constitui a segunda causa de morte na população brasileira, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida. Vários fatores influenciam na origem do câncer, entre eles, predisposição genética, hábitos de vida e fatores ambientais, como por exemplo, exposição excessiva ao sol e uso abusivo de cigarro (4-5).

Entre os mais importantes desafios da atualidade (científicos e de saúde pública) estão prevenção e controle dessas neoplasias, incluindo o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

1.2 VASOS SANGUÍNEOS: NUTRIÇÃO DO TUMOR

O fenômeno caracterizado pela formação de novos vasos sanguíneos é chamado de angiogênese e está intrinsecamente ligado a várias doenças, como, por exemplo, câncer, artrite reumatóide e psoríase (1,6).

O interesse clínico de técnicas que, potencialmente, são bloqueadoras da neovascularização ou que induzam a regressão de uma vascularização relacionada a patologias está intrinsecamente ligado à inibição do crescimento de tumor (7). Em 1971, Folkman descreveu a relação entre esse fenômeno e o câncer, mostrando que, na ausência de vascularização, há o fenômeno de dormência do tumor. O processo de angiogênese, quando descontrolado, torna crítico o crescimento de tumores sólidos e a formação de metástase (8).

Sem vasos sanguíneos, o tumor não cresce mais do que poucos milímetros. O crescimento do tumor depende do desenvolvimento de uma rede vascular para nutrir a massa tumoral (9). A possibilidade dos tumores formarem lesões sólidas e posterior metástase é resultado da sua capacidade em produzir substâncias que induzam o fenômeno de angiogênese e, portanto, a elucidação das propriedades biológicas desse fenômeno envolve os processos relacionados com o crescimento tumoral (10-13).

O entendimento de como acontece a destruição ou o crescimento dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, a via de nutrição dos tumores, pode ser um passo relevante na descoberta de tratamentos mais eficazes para doenças como o câncer (14-15).

1.3 MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTÓICA

As pesquisas com métodos alternativos ao uso de animais vêm sendo cada vez mais incentivadas. O chamado método *in ovo* pode ser considerado um método alternativo e, a partir do ovo de galinha, pode-se obter um modelo *in vivo* muito eficaz no estudo de efeitos relacionados a vasos sanguíneos (16-17).

O conjunto responsável pela troca gasosa, no ovo de galinha, é constituído por uma casca rígida e porosa e pelas membranas externa e interna permeáveis a oxigênio, gás carbônico e vapor de água (18-19). Com o crescimento do embrião e da necessidade de mais oxigênio, existe a formação da membrana corioalantóica para suprir essa demanda, sendo ela a fusão do alantóide - responsável pela respiração - e do cório - membrana que envolve o embrião e suas estruturas. Essa membrana se posiciona embaixo da casca porosa e, por ser muito vascularizada, permite uma maior troca gasosa (20-22).

A membrana corioalantóica de ovos de galinha, conhecida como CAM (do inglês, *chorioallantoic membrane*) é, provavelmente, o modelo *in vivo* mais utilizado para estudos de angiogênese e de atividade de compostos no endotélio vascular. É um modelo muito bem

estabelecido, que tem um acesso facilitado aos vasos sanguíneos e ao embrião, além de ser um método simples, barato e de fácil uso em ambiente laboratorial (23-25).

Esse modelo tem a grande vantagem de não induzir dor, uma vez que os receptores de dor do embrião só são desenvolvidos a partir do seu 14º dia de desenvolvimento. Portanto, os estudos são feitos entre os dias 11 e 14 de desenvolvimento, período em que os vasos sanguíneos estão em tamanho adequado, sem causar qualquer sofrimento ao embrião (26).

1.4 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS PARA CÂNCER

A remoção cirúrgica do tumor, quimioterapia e radioterapia são algumas das principais terapias usadas no tratamento do câncer. Apesar da eficiência obtida com os tratamentos convencionais, todos eles possuem uma série de efeitos colaterais graves além de efeitos psicológicos relacionados à auto-estima que são extremamente prejudiciais aos pacientes (4).

O uso de cirurgia, além de grandes taxas de recidiva pela não-retirada de toda a região contendo células cancerígenas, pode ocasionar um impacto emocional muito grande devido à mutilação do paciente. A retirada de tumores na região da face ou, especificamente para a mulher, a retirada da mama, pode levar a sérios problemas de auto-estima e autoconfiança (3).

A quimioterapia traz consigo sérias reações adversas, incluindo náusea, perda de apetite, queda de cabelo e menor resistência a infecções. Como a ação dos quimioterápicos está na inibição da síntese do DNA, essas drogas inibem o crescimento celular e, portanto, afetam células que se multiplicam rapidamente. Por isso, essa terapia tem a capacidade de atingir as células malignas em todo o corpo e obter uma resposta satisfatória, mas há agressão tanto das células tumorais quanto das células normais, deixando o paciente debilitado (27-28).

A radioterapia utiliza raio-X, nêutrons e outras fontes de alta energia para matar células tumorais. A radiação ionizante interage com o tecido e cria efeitos químicos na célula, podendo levá-la a morte por vários caminhos. Um dos efeitos da radioterapia, por exemplo, é o bloqueio da divisão celular atingindo células com alta taxa de proliferação. A dose de radiação não pode ultrapassar a tolerância dos tecidos normais e, por isso, é normalmente fracionada em doses diárias (levando o paciente todos os dias para o hospital). Essa terapia pode apresentar efeitos colaterais nos tecidos que apresentam maior capacidade proliferativa, por exemplo, náusea e vômito devido a sensibilidade das células da mucosa gástrica (4).

O tecido tumoral é bastante complexo e diverso, tornando impossível o tratamento com uma única metodologia para todos os tipos de câncer. Nesse sentido, não existe um tratamento universal e, portanto, faz-se necessário ter opções de técnicas para o médico escolher a melhor alternativa para o paciente. Uma opção aos tratamentos convencionais, que traz um efeito mais localizado e menos reações adversas, é a Terapia Fotodinâmica (29).

1.5 TERAPIA FOTODINÂMICA

A comunidade científica vem buscando, ao longo dos anos, técnicas alternativas de tratamento oncológico, quando os tratamentos tradicionais se mostram ineficientes ou limitados. Uma dessas alternativas é denominada Terapia Fotodinâmica (ou PDT, do inglês, *Photodynamic Therapy*) (30-31).

A PDT é uma técnica de tratamento de várias doenças, como artrite reumatóide, psoríase e infecções causadas por *Human Papilloma Viruses* (HPV), incluindo tratamento de tumores, que envolve luz em um comprimento de onda adequado, uma substância fotossensibilizadora e oxigênio molecular. O fotossensibilizador nas células tumorais é ativado na presença de luz e interage com o oxigênio da célula, transformando-o em oxigênio singlete, altamente reativo e responsável pela morte celular (29, 32-33).

O aperfeiçoamento dessa técnica envolve, sem dúvida, o entendimento dos mecanismos de angiogênese e de destruição dos vasos sanguíneos (34). Por isso, o uso do modelo de CAM permite o estudo individualizado do efeito vascular da PDT, auxiliando na análise do dano tecidual induzido em função da variação de parâmetros de emprego do fotossensibilizador e da iluminação. Com esse modelo, é possível variar muitos parâmetros associados a essa terapia e seus efeitos como dose da droga, dose de luz, intensidade, farmacocinética, tipos de vasos envolvidos e idade do embrião (35-36).

A variação desses parâmetros e o entendimento dos processos físicos, químicos e biológicos que envolvem a PDT permitem aprimorá-la e torná-la cada vez mais aplicada na clínica. Sendo essa uma técnica interessante pela sua alta seletividade devido à alta concentração do fotossensibilizador nas células tumorais e ativação apenas do local iluminado, é possível estabelecer uma completa restauração do tecido (37).

Pode-se, então, aprimorar o tratamento de câncer e explorar usos e limitações da CAM como um modelo de estudos da angiogênese e anti-angiogênese relacionado com a resposta fotodinâmica (38-40).

1.5.1 MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

A PDT envolve a interação entre luz, fotossensibilizador e oxigênio, que vai resultar em espécies reativas e levar a célula à morte. Esse processo acontece devido à excitação eletrônica do fotossensibilizador que, a partir do estado excitado, pode retornar ao estado fundamental, por meio de emissão de energia na forma de fluorescência, ou dar origem a dois mecanismos principais de reação, através de um estado tripleto metaestável (representados pelo diagrama de Jablonski modificado da figura 1):

- ✓ **Mecanismo tipo I:** Há a interação direta do fotossensibilizador excitado com o substrato (componentes do sistema), gerando íons-radicais. Esses radicais livres vão interagir quase que instantaneamente com o oxigênio no estado fundamental e formar intermediários de oxigênio altamente reativos que podem oxidar uma série de biomoléculas.
- ✓ **Mecanismo tipo II:** Há transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singleto. O oxigênio singleto é uma forma reativa do oxigênio e é altamente citotóxico, sendo o principal mediador do dano celular causado pela PDT (41-42).

Figura 1 - Interação do fotossensibilizador e com a luz e possíveis caminhos – diagrama de Jablonski modificado.

Os dois tipos de reação podem acontecer simultaneamente e a razão entre as reações e, portanto, entre os produtos formados é influenciada pelas características do fotossensibilizador, pela concentração de oxigênio e pelos substratos intracelulares. A morte celular causada pela PDT tem como principais mecanismos de ação a produção do oxigênio singleto e a indução da morte celular por apoptose (36).

A reação fotodinâmica pode causar a morte do tumor e a destruição de pequenos vasos sanguíneos. A destruição das células endoteliais dos vasos envolve o suprimento de sangue no tumor e, conseqüentemente, o suprimento de oxigênio (hipóxia celular). Na ausência de oxigênio, o efeito da PDT é praticamente inexistente, uma vez que ele é elemento fundamental para a causa da morte celular. Por isso, é preciso entender claramente como se dá a destruição dos vasos sanguíneos pela PDT e associar esse efeito ao aperfeiçoamento do tratamento de câncer, de modo a não permitir que esse efeito se torne prejudicial para a eficácia da terapia (32).

1.6 FOTOSSENSIBILIZADORES

A PDT vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada por vários grupos de pesquisa de todo mundo, ampliando suas aplicações e resultados. Com isso, há uma busca por fotossensibilizadores mais eficientes, com características mais específicas, tais como menor

toxicidade, maior eficiência na geração de oxigênio singleto, maior capacidade de penetração na membrana celular e maior velocidade de eliminação pelo organismo após o tratamento. Estas características são fundamentais quando se tem em vista um novo fotossensibilizador (37, 43).

Atualmente, compostos de porfirina, clorina, bacterioclorina, ftalocianina dentre outros, estão sendo aplicados com eficácia no uso da terapia fotodinâmica, mas ainda é preciso elucidar alguns mecanismos de atuação. Esses compostos são classificados como agentes de primeira e segunda geração, sendo estes últimos mais eficientes em relação à dose e absortividade molar (44).

Nos compostos de primeira geração, destacam-se os derivados porfirínicos enquanto as clorinas e ftalocianinas são classificadas como segunda geração. Os fotossensibilizadores utilizados nesse estudo são o Photogem[®] (derivado de hemato-porfirina - HpD) o Photodithazine[®] (derivado de clorina), ambos de origem russa. (3, 37, 45).

Os espectros de absorção de ambos os fotossensibilizadores estão mostrados na figura 2. O uso do comprimento de onda de 660 nm para clorina e 630 nm para a porfirina, apesar de a maior banda de absorção estar deslocada para a região do UV-violeta, é explicado pela aplicação clínica da luz vermelha em vista da maior penetração desses comprimentos de onda nos tecidos (46). É preciso usar um comprimento de onda que seja absorvido pelo fotossensibilizador, mas é fundamental que um volume tecidual mínimo possa ser uniformemente iluminado (47-48).

Essa maior penetração na região do vermelho é explicada pela menor absorção das moléculas biológicas nessa região, uma vez que seu pico de absorção, incluindo das moléculas do ovo de galinha (como proteínas da clara e da gema), é na região entre 300 e 400 nm (49).

Apesar de, no uso do modelo de CAM, haver acesso direto aos vasos sanguíneos e não haver limitação decorrente de penetração no tecido, o uso da luz vermelha foi mantido para o entendimento da ação fotodinâmica com parâmetros empregados na aplicação clínica.

Figura 2 - Espectro de absorvância dos diferentes fotossensibilizadores com especificação dos comprimentos de onda nos picos. a) Clorina. b) Porfirina.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito vascular da Terapia Fotodinâmica (PDT) com o modelo de membrana corioalantóica, usando dois tipos diferentes de fotossensibilizadores, sendo um deles derivado de hemato-porfirina - HpD (Photogem[®]) e o outro derivado de clorina (Photodithazine[®]).

Objetivos Específicos:

- Avaliação do efeito vascular da PDT empregando um derivado de hemato-porfirina (HpD) em diferentes concentrações e modos de administração e para diferentes doses de luz.
- Avaliação do efeito vascular da PDT empregando um derivado de clorina em diferentes concentrações e modos de administração e para diferentes doses de luz.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.2 OBTENÇÃO DO MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM)

Os ovos utilizados (aproximadamente seiscentos) foram fornecidos pela Globoaves São Paulo Agroavícola Ltda (São Carlos, SP). Os ovos embrionados no primeiro dia de fecundação devem ser limpos com álcool 70% e, na sequência, colocados na estufa úmida a 37,7°C. Durante o primeiro e segundo dias de desenvolvimento (ED) do embrião (ED1 e ED2, respectivamente), os ovos ficam em um suporte com rotação lenta - meio ciclo a cada 30 min (figura 3). No terceiro dia (ED3), a rotação é interrompida e é feito um orifício com aproximadamente 1 mm de diâmetro na casca da parte mais fina do ovo, como mostra a figura 3-d.

Figura 3 - Representação da rotação do ovo de galinha durante ED1 e ED2. a) Esquema de como foi montada a bandeja. b) Foto da bandeja de ovos na estufa. c) Direção de rotação dos ovos. d) Local onde é feito o orifício, no ovo.

O orifício deve ser obtido delicadamente com um escareador montado em uma peça de alta rotação - mini-retífica tipo Dremel[®] (BOSCH, EUA) sem atravessar a casca do ovo. Para obtenção do furo, pode também ser usada uma tesoura de ponta fina, furando delicadamente a casca.

O orifício pode ser fechado com parafina líquida ou fita adesiva. Se a janela for aberta na parte lateral do ovo de galinha, é preciso retirar de 3 a 4 mL de albumina com uma agulha de 26G e seringa de 5mL, criando uma câmara de ar entre a casca do ovo e a membrana. No quarto dia (ED4), então, é aberta uma janela de cerca de 2 cm² com o motor de alta rotação (Dremel[®]) e o escareador (que pode variar o diâmetro de 0,8 mm a 1,6 mm). Após aberta a janela, é preciso passar delicadamente um lenço umedecido com álcool 70% no ovo e, por fim, vedá-lo com fita adesiva e deixá-lo na estufa até o ED11, quando os vasos estarão no tamanho ideal para estudo. A figura 4 mostra alguns desses procedimentos.

Figura 4 - Abertura da janela no ovo. a) ED3- Retirada da albumina. b) ED4- Uso de motor de alta rotação para abertura. c) ED4- vedação da janela com fita adesiva. d) Janela aberta.

Se a janela for aberta na extremidade mais fina do ovo, não é preciso retirar a albumina. Com uma pinça, a partir do furo inicial, é aberta a janela de cerca de 2 cm² e vedada com fita adesiva até o ED11.

Todos os procedimentos devem ser realizados com instrumentos esterilizados e em capela para minimizar os riscos de contaminação. Com a abertura da janela, a verificação da fertilização e vitalidade do embrião é realizada pela observação da pulsação existente, já nessa fase do desenvolvimento, daquele conjunto de células que dará origem ao coração. Entre os ED4 e ED11, a verificação da vitalidade do embrião é feita a cada 2 dias pela análise da cor observada através da fita adesiva e pelo cheiro característico na estufa. Se for verificado um amarelo opaco, o ovo é levado até a capela e aberto com cuidado. No caso de morte do embrião, o meio estará esbranquiçado e a vascularização será quase inexistente e, portanto, esse ovo pode ser levado congelado para descarte. No caso de viabilidade, ele é vedado

novamente e retornado à estufa. No ED11, a fita é retirada e a viabilidade do ovo é novamente verificada, considerando a qualidade da membrana e da rede vascular.

Qualquer manipulação do ovo deve ser feita minimizando tanto quanto possível o tempo fora da estufa, uma vez que a temperatura é um fator de suma importância na manutenção da vida do embrião.

É preciso ressaltar o fato que os receptores de dor do embrião começam a se desenvolver a partir do ED14 e, portanto, é possível trabalhar com eles apenas entre os dias 11 e 14 do seu desenvolvimento, de modo a coincidir tamanho ideal do vaso e ausência de dor.

Esta metodologia foi implementada no Laboratório de Biofotônica após realização de treinamento no “The Brody School of Medicine”, (East Caroline University, Greenville, Carolina do Norte, Estados Unidos), durante o mês de fevereiro de 2010, sob supervisão da pesquisadora Roberta Johnke (PhD, Associate Professor) e do aluno de doutorado Nicholas T. Bakken.

3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

3.3.1 Administração do Fotossensibilizador

Os ovos foram removidos individualmente da estufa e apenas imediatamente antes do início do tratamento. Os testes foram feitos com dois tipos de fotossensibilizadores, um composto de primeira geração (derivado porfirínico) e um de segunda geração (derivado de clorina). Foi usado o composto porfirínico Photogem[®] (Photogem, Rússia) e o Photodithazine[®] (Photoditazine, Rússia) como derivado de clorina.

A aplicação ocorreu de forma tópica e intravenosa e as concentrações foram variadas entre 0,1-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para determinação do melhor ensaio, com diluição em água destilada. A literatura é rica em testes com Photofrin[®] (Photofrin, EUA) e Foscan[®] (Foscan, Irlanda), derivados de porfirina e clorina respectivamente. As concentrações inicialmente testadas de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foram baseadas nas concentrações encontradas nessa literatura (39).

Na aplicação tópica, foi colocado um anel de Teflon[®] para delimitação de uma área conhecida (1,76 cm^2), com o intuito de deixar a solução fotossensibilizadora retida. Nesse

anel, foram colocados 200 μ L de uma solução de fotossensibilizador, com variação de concentração dependendo da concentração final desejada (figura 5).

Figura 5 - Colocada do Anel de Teflon na CAM para delimitação de área conhecida. a) Dimensões do anel. b) Foto do anel na CAM.

O tempo de incubação da droga foi variado em 20, 40, 60 e 80 minutos, com o objetivo de escolher o menor tempo que obtivesse o melhor resultado. Na aplicação tópica, antes de iluminar, é necessário retirar a solução remanescente de fotossensibilizador com uma pipeta de 1000 mL, colocando uma solução de soro fisiológico e retirando em seguida, com a mesma pipeta, para lavagem do local. Com o tempo de incubação foram variados irradiância, tempo de iluminação, dose de luz e concentração da droga. As variações estão explicitadas na tabela 1 para a porfirina e na tabela 2 para a clorina.

Na aplicação intravenosa, utilizaram-se seringas de insulina com agulha de 29 G. O ovo foi ligeiramente girado para que o vaso sanguíneo central ficasse levemente salientado, facilitando o acesso, mostrado na figura 6. A injeção foi feita, então, com um ângulo de 45° com a bancada e o anel de Teflon® foi colocado para delimitar a área iluminada.

Figura 6 – a) Injeção do fotossensibilizador no vaso sanguíneo, durante a iluminação. b) Esquema do ovo ligeiramente girado para aplicação intravenosa do fotossensibilizador.

3.3.2 Iluminação da CAM fotossensibilizada

A iluminação foi feita variando parâmetros para observação da ação vascular da PDT, tais como período de incubação da droga, concentração e dose de luz. O intuito foi iluminar durante o menor tempo possível, com uma dose que não destruísse ou alterasse os anexos embrionários (clara, gema e embrião), mas que tivesse uma boa resposta vascular. A variação da dose de luz, então, ocorreu entre 4,8 e 40 J/cm² e a irradiância foi variada entre 80 e 100 mW/cm². As variações de irradiância, tempo de iluminação, dose de luz, tempo de incubação e concentração da droga são apresentadas na tabela 1 para a porfirina. A partir dos resultados obtidos com os testes com o Photogem[®], foi fixado um valor para a irradiância de 100 mW/cm² para aplicação com a clorina e a tabela 2 mostra o intervalo de variação do tempo de incubação, tempo de iluminação, dose total de luz e concentração do Photodithazine[®].

De acordo com os espectros de absorção dos diferentes compostos, usamos um laser de comprimento de onda de 635 nm para Photogem[®] e de 660 nm para o Photodithazine[®].

O tipo de iluminação também foi variado nos testes, determinando o melhor ensaio. A iluminação foi de dois tipos: contínua e fracionada - sendo 1 minuto de iluminação e 1 minuto de escuro (também mostrados nas tabelas 1 e 2). Na aplicação intravenosa, a iluminação foi feita de diferentes formas: durante a aplicação, imediatamente após, 1 minuto e 5 minutos após aplicação. Os parâmetros da PDT variados na aplicação intravenosa foram os mesmos para as soluções de clorina e porfirina e são mostrados na tabela 3.

Tabela 1 - Parâmetros variados nos testes com o fotossensibilizador derivado de Porfirina – aplicação tópica.

Concentração de área	Irradiância (mW/cm ²)	Tempo de iluminação		Dose total de luz	Tempo de Incubação (minutos)			
0,5 µg/cm ²	100	1min20s	Contínua	8J	40			
		5min	Contínua	30J	40			
	60	1min20s	Contínua	4,8J	20	40	60	80
		5min	Contínua	18J	20	40	60	80
1 µg/cm ²	100	1min20s	Contínua	8J	20	40	60	80
		5min	Fracionada	30J	40			
	120	1min20s	Contínua		20	40	60	80
		5min	Contínua	36J	20	40	60	80
10 µg/cm ²	60	1min20s	Contínua	4,8J	40 60			
		5min	Contínua	18J	40 60			
	100	1min20s	Contínua	8J	40 60			
		5min	Contínua	30J	40 60			
100 µg/cm ²	60	1min20s	Contínua	4,8J	40 60			
		5min	Contínua	18J	40 60			
	100	1min20s	Contínua	8J	40 60			
		5min	Contínua	30J	40 60			

Tabela 2 - Parâmetros variados nos testes com o fotossensibilizador derivado de Clorina – aplicação tópica.

Irradiância (mW/cm ²)	Tempo de Incubação (minutos)	Tempo de iluminação		Dose total de luz	Concentração de área
100	20	5min	Contínua	30J	1 µg/cm ²
		10min	Contínua	60J	1 µg/cm ²
	40	5min	Contínua	30J	0,17 µg/cm ²
					0,52 µg/cm ²
					1 µg/cm ²
					2,1 µg/cm ²
					8,8 µg/cm ²
					17,75 µg/cm ²
	60	10min	Fracionada	30J	1 µg/cm ²
		10min	Contínua	30J	1 µg/cm ²
		5min	Contínua	30J	1 µg/cm ²
		10min	Contínua	60J	1 µg/cm ²

Tabela 3 - Parâmetros variados nos testes com Clorina e Porfirina – aplicação intravenosa.

Irradiância	Tempo de iluminação	Dose total de luz	Tipo de iluminação em relação à injeção	Concentração da solução	Volume injetado	
100	5 min	30J	Durante	2 µg/mL	200 µL	500 µL
				0,2 mg/mL	200 µL	500 µL
				0,5 mg/mL	200 µL	500 µL
			Imediatamente após	2 µg/mL	500 µL	
				0,2 mg/mL	500 µL	
				0,5 mg/mL	500 µL	
			1 minuto após	2 µg/mL	500 µL	
				0,2 mg/mL	500 µL	
			5 minutos após	2 µg/mL	500 µL	
				0,2 mg/mL	500 µL	

Para cada irradiação, foi utilizado um laser de diodo EagleEaron® (Quantum Tech, São Carlos – Brasil), no respectivo comprimento de onda (635 nm e 660 nm) e uma fibra óptica com uma lente acoplada à extremidade de irradiação, de modo que se obtivesse um perfil uniforme de irradiação.

O ovo foi posicionado dentro da capela, com a janela da casca voltada para cima e a fibra de iluminação foi afixada (também dentro da capela) em um suporte que permitia fixar a distância entre a fibra e a membrana, de modo a obter uma área de iluminação fixa e igual à área do anel. O cálculo da intensidade foi feito usando um medidor de potência posicionada na saída da fibra, numa distância equivalente à que o anel e o tecido irradiado ficariam durante a iluminação. A intensidade foi calculada de acordo com a área do anel (1,76 cm²). A figura 7 mostra um esquema de como foi montado esse aparato experimental para afixação da fibra. Após iluminação e aquisição da imagem (descrita a seguir, na seção 3.3), os ovos eram imediatamente retornados à estufa.

Figura 7 - a) Esquema experimental de iluminação para aplicação da Terapia Fotodinâmica em CAM. b) Foto do experimento - dentro da capela.

3.4 ANÁLISE DA RESPOSTA FOTODINÂMICA

Com uma câmera USB Digital Microscope[®] (AVANTGARDE, China) foi feita a aquisição das imagens a cada 30 minutos, partindo do tempo zero até 300 minutos pós-terapia. No intervalo de 30 minutos entre uma imagem e outra, o ovo foi mantido na estufa e vedado para manter a temperatura interna do ovo e, portanto, dar manutenção à sobrevivência do embrião.

A câmera foi fixada dentro da capela para minimizar os riscos de contaminação, uma vez que as imagens são feitas com a janela aberta, sem vedação. Essa câmera é posicionada em frente à janela com ajuste de *zoom* para melhor foco das imagens dos vasos sanguíneos. O computador de aquisição de imagens ao qual a câmera está ligada pôde ser posicionado fora da capela (o aparato experimental está mostrado na figura 8), sem prejuízo do arranjo.

Figura 8 - Esquema experimental para obtenção das imagens ao longo do tempo: Câmera USB + Ovo + Computador.

As imagens foram feitas para verificação do efeito vascular da terapia fotodinâmica ao longo do tempo pós-terapia. Essas imagens foram tratadas com programas de edição de imagem Photoshop® (ADOBE PHOTOSHOP CS4, versão 11, EUA) a fim de transformar a imagem colorida em uma imagem preta e branca, na qual os *pixels* em preto são referentes a vasos sanguíneos e os *pixels* em branco ao restante da imagem (incluindo gema, clara e embrião). Usando o software ImageJ® (National Institutes of Health, EUA, domínio público) fez-se a contagem e a razão entre o número de *pixels* pretos e o número total de *pixels*, obtendo-se um número diretamente proporcional à área ocupada pelos vasos sanguíneos na imagem. Isso é feito com o objetivo de uma análise quantitativa do efeito da terapia na rede vascular e para observação direta do comportamento dos vasos sanguíneos.

Com a razão de várias imagens ao longo do tempo pós-terapia, foi feita uma relação de porcentagem, onde o número referente ao tempo inicial (zero minuto) é considerado 100% e os outros valores são normalizados a partir dessa relação. A partir dessa razão de *pixels* pretos encontrada, é possível estabelecer uma relação quantitativa com o tempo pós-terapia e analisar numericamente o comportamento da rede vascular.

Todos os parâmetros do fotossensibilizador e de irradiação foram investigados em, pelo menos, 3 ovos. Devido a variação inerente da vascularização em cada membrana, a comparação entre os ovos foi feita baseada na taxa de redução em função do tempo, obtida para cada rede vascular. Ou seja, na análise quantitativa foram comparadas as porcentagens de redução e não a quantidade de vasos sanguíneos.

Com o software OriginPro® 8.1 SR3 (*OriginLab Corporation*, EUA) é calculado a curva que melhor se ajusta ao gráfico e, a partir do valor de intersecção dessa curva com o eixo y, é calculado o aumento máximo e mínimo obtido, como mostrado na figura 9.

Figura 9 - Cálculo do aumento e redução da rede vascular a partir do gráfico com a média entre a razão de pixels pretos por pixels totais calculado para determinado parâmetro.

Além disso, para obtenção da medida do diâmetro dos vasos sanguíneos (análise comumente encontrada na literatura) é feita a sobreposição das imagens obtidas pós-terapia a partir de um vaso selecionado. O diâmetro desse vaso comum é medido em relação ao diâmetro do anel (que é fixo e igual a 1 mm) para determinação do efeito local da PDT em vasos sanguíneos escolhidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Usando a membrana corioalantóica como modelo para o estudo do efeito vascular da terapia fotodinâmica, diversos parâmetros foram variados a fim de avaliar a influência da concentração, modo de administração e tipo de fotossensibilizador, do tempo de incubação, da intensidade e dose de luz no efeito fotodinâmico.

A membrana é formada por várias camadas contendo vasos sanguíneos de diferentes calibres. Como a albumina do ovo é transparente, a imagem da membrana permite a visualização das camadas mais profundas. É preciso considerar essa profundidade, uma vez que as camadas alteram a velocidade de entrega da droga, por difusão e, conseqüentemente, alteram a resposta pós-iluminação.

4.1 APLICAÇÃO TÓPICA

A aplicação tópica foi realizada usando um anel de Teflon[®], inerte ao tecido, para delimitar a área de ação do fotossensibilizador e a área de iluminação.

Explorando os parâmetros individualmente, o tempo de incubação escolhido para os testes foi de 40 minutos, uma vez que usando tempos menores de incubação (20 ou 30 minutos) não foram observadas grandes alterações na rede vascular. Em contrapartida, os testes com tempos maiores (50, 60 ou 80 minutos) mostraram resposta semelhante aos 40 minutos, e, portanto, a escolha foi baseada no uso do menor tempo de incubação com o melhor ou igual resultado.

A partir do tempo de incubação estabelecido, foram variadas as doses de luz a partir da intensidade e tempo de exposição. Nos testes acerca desse parâmetro, a prioridade mais uma vez foi encontrar o menor tempo de irradiação com um evidente efeito vascular. O tempo de exposição à luz, então, foi de 5 minutos com potência de 100 mW/cm², resultando em uma dose total de 30 J/cm².

Como o objetivo do presente trabalho era estudar o efeito da terapia fotodinâmica especificamente em vasos sanguíneos, a escolha da dose total de luz foi feita com base nos resultados que mostraram melhor efeito vascular sem destruir ou danificar a membrana corioalantóica ou os anexos embrionários do ovo de galinha.

4.1.1 PORFIRINA – CONCENTRAÇÃO DE ÁREA: $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

Usando um anel de $1,76 \text{ cm}^2$, foram colocados $200 \mu\text{L}$ de uma solução de Photogem[®] a $8,8 \mu\text{g}/\text{mL}$, totalizando $1,76 \mu\text{g}$ na área delimitada pelo anel e resultando em $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Iluminando por 5 minutos a $100 \text{ mW}/\text{cm}^2$, usando o comprimento de onda de 635 nm e obtendo imagens a cada 30 minutos, obtivemos o resultado mostrado na figura 10.

Figura 10 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Porfirina em concentração de área de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $30 \text{ J}/\text{cm}^2$.

É visível a redução da rede vascular da CAM (há tanto o desaparecimento de alguns vasos quanto a redução do diâmetro dos mais calibrosos). A partir de uma análise qualitativa e direta, podemos notar que os parâmetros escolhidos para aplicação da terapia fotodinâmica foram efetivos na destruição completa de alguns vasos.

Com o software ImageJ[®] pode-se calcular que vasos com diâmetro menor que $144 \mu\text{m}$ são completamente destruídos. No entanto, vasos mais calibrosos (com diâmetro maior que $144 \mu\text{m}$) e aqueles presentes em camadas mais profundas, apesar de sofrerem alterações, não

desaparecem por completo. Esse efeito diminuído ocorreu, provavelmente, por menor absorção de porfirina pelas células endoteliais, resultando em uma quantidade insuficiente de produção de espécies reativas de oxigênio para levar à morte celular.

Processando as imagens com a ajuda do software Photoshop[®], obtemos a sequência de imagens da figura 11.

Figura 11 - Imagens processadas referentes à terapia fotodinâmica usando $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.

A partir dessas imagens, foi feita a razão entre o número de *pixels* preto (e, portanto, referente à área de vasos sanguíneos) por número de *pixels* totais. Esse valor foi normalizado em porcentagem, considerando a imagem do tempo zero igual a 100%. Os valores para todas as imagens de zero a 300 minutos podem ser visualizadas na figura 12.

Figura 12 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 1 µg/cm² de porfirina.

O gráfico, como esperado pela análise qualitativa, mostra uma redução da área ocupada pelos vasos sanguíneos. Para verificar a interferência do anel na análise realizada, ele foi retirado da imagem usando o próprio software de edição de imagens e a contagem dos *pixels* foi refeita (juntamente com a porcentagem), resultando nas figuras 13 e 14.

Figura 13 - Imagens processadas, retirando o anel, referentes à terapia fotodinâmica usando $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.

Figura 14 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de porfirina, retirando o anel da imagem.

É possível obter as imagens considerando apenas a área de dentro do anel (para evitar o efeito da borda). Os experimentos foram repetidos utilizando os mesmos parâmetros, mudando o foco da imagem para o interior do anel. Esse tipo de análise, entretanto, não torna possível a análise individual do vaso (uma vez que é perdida a medida do diâmetro do anel). Vejamos os resultados na figura 15.

Figura 15 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Porphirina em concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Nessa sequência de imagens, é possível visualizar a redução dos vasos sanguíneos em uma análise qualitativa (tal como a figura 10). Realizando o mesmo procedimento de processamento de imagens, é possível obter a sequência de imagens da figura 16.

Figura 16 - Imagens processadas referentes à terapia fotodinâmica usando $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.

O gráfico em porcentagem dos *pixels* pretos por número total de *pixels* é dado na figura 17.

Figura 17 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina.

Comparando esse gráfico com o da figura 14, e fazendo a média entre os valores encontrados para, no mínimo, 3 ovos testando os mesmos parâmetros é possível ver uma redução média de $66\% \pm 17\%$ e o aumento máximo de $9\% \pm 6\%$. Devem-se levar em conta os diferentes comportamentos, uma vez que cada rede vascular é resultado das particularidades de cada ovo e a análise deve acontecer individualmente. Porém, o valor médio obtido mostra claramente que há uma redução significativa, como mostrada no gráfico da figura 18 com os valores obtidos pela média entre a porcentagem de vasos sanguíneos de 3 ovos.

Figura 18 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina – média entre 3 ovos.

É preciso ressaltar também que o embrião está vivo e, por isso, há um movimento da malha vascular, bem como o movimento do embrião. Isso não permite uma homogeneidade com o passar do tempo, podendo haver influência direta na imagem e no processamento dela.

No ovo da figura 10, usando o dado que o diâmetro do anel é constante com o passar do tempo, é possível fazer a análise de um vaso específico, a partir da sobreposição das imagens a partir desse vaso. Fazendo a razão entre diâmetro do vaso e o diâmetro do anel, a cada imagem, tem-se, ao longo do tempo, o comportamento pós-terapia.

A figura 19 mostra o vaso analisado comparando com o diâmetro do anel, constante. Essa medida foi feita a cada imagem.

Figura 19 - Vaso sanguíneo escolhido para análise individual.

A redução desse vaso é evidenciada pela sequência de imagens mostrada na figura 20, que mostra o vaso específico ao longo do tempo juntamente com os valores do diâmetro do vaso em micrometros (μm).

Figura 20 - Vaso sanguíneo sobreposto mostrado ao longo do tempo pós-terapia.

A figura 21 mostra a razão entre o diâmetro do vaso e a medida do anel de cada imagem, relacionando ao seu respectivo tempo pós-terapia. Como podemos observar, a redução do vaso é significativa. Apesar de ele ser calibroso e não desaparecer em toda a sequência de imagens, a redução do vaso é de cerca de 30% do seu diâmetro inicial.

Figura 21 - Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso sobre a largura do anel (fixa), ao longo do tempo pós-terapia – 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de porfirina.

Esse procedimento foi realizado com vasos de diferentes diâmetros entre (3 μm e 360 μm) e em diferentes ovos testando os mesmos parâmetros. Foi verificado que para vasos de maior calibre (acima de 151 μm) existe uma redução entre 30 e 70 % do diâmetro, mas o vaso não desaparece. Já para vasos de calibre menor que 144 μm , a destruição completa é observada.

4.1.2 CLORINA – CONCENTRAÇÃO DE ÁREA: 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

O primeiro teste com a clorina foi realizado estabelecendo os mesmos parâmetros usados com a porfirina e isso permitiu a comparação direta dos efeitos entre os dois fotossensibilizadores.

Sendo então, 40 minutos de incubação, 5 minutos de iluminação com 100mW/cm², porém usando um laser no comprimento de onda de 660 nm. Sendo a mesma concentração, usou-se 200 μL de uma solução a 8,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no anel de Teflon de 1,76 cm², resultando em 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Com esses parâmetros e obtendo imagens a cada 30 minutos, foi obtido a sequencia de imagens mostrada na figura 22.

Figura 22 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Clorina em concentração de área de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A área tracejada indica a região de dilatação dos vasos sanguíneos.

Fazendo a análise qualitativa, é possível ver um aumento da rede vascular, decorrente da visualização de vasos de pequeno calibre não evidentes no tempo zero (área tracejada). A possibilidade do processo angiogênico foi descartada devido ao período de obtenção das imagens. A partir disso, olhando mais precisamente a primeira imagem, pode-se notar que os vasos novos, na verdade, são vasos já existentes que sofreram dilatação em decorrência do maior aporte sanguíneo.

O dano vascular induzido em vasos de maior calibre resultou no colapso de algumas regiões e o sangue presente no seu interior teve o fluxo desviado para microcirculação em regiões proximais ou distais. Por ser uma rede vascular, o sangue irá percorrer pequenos vasos que, anteriormente, não estavam sendo perfundidos.

A figura 23 mostra a imagem binária.

Figura 23 - Imagens processadas referentes à terapia fotodinâmica usando $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Clorina.

Fazendo a média entre 3 ovos testados com os mesmos parâmetros, tem-se uma redução de $15\% \pm 5\%$ e um aumento máximo de $15\% \pm 2\%$, mostrando uma tendência linear constante entre o valor inicial, como mostrado no gráfico da figura 24.

Figura 24 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Clorina – média entre 3 ovos.

O que há, é a destruição de vasos mais calibrosos, forçando os vasos de menor calibre a se dilatarem para manter um fluxo sanguíneo constante. Um exemplo dessa resposta é a região indicada na figura 25, correspondente a 300 minutos pós terapia, é possível ver uma destruição de um dos vasos principais.

Figura 25 - Destruição do vaso sanguíneo de maior calibre.

Esse comportamento, então, sugere uma ação mais rápida do composto de clorina nos vasos mais calibrosos em comparação ao de porfirina. Esse efeito é, provavelmente observado porque a molécula do composto de clorina é menor em comparação com o Photogem[®], que é uma mistura de oligômeros de diversos tamanhos. Como resultado, a molécula de clorina penetra mais rapidamente e em maior quantidade pela CAM e, conseqüentemente, maior quantidade estará presente nas células endoteliais (parede do vaso) e no sangue.

Analisando todas as imagens a partir do vaso dilatado, é possível visualizar a dilatação local na sequência de imagens da figura 26.

Figura 26 - Vaso sanguíneo sobreposto mostrado ao longo do tempo pós-terapia.

Para a análise de vasos específicos comparando com a referência da largura do anel (fixa), foram repetidos os testes com os mesmos parâmetros, incluindo o anel na imagem. Com isso, tem-se a sequência de imagens mostrada na figura 27.

A rede vascular está menos densa que na imagem 16, porém, ainda é possível visualizar a dilatação dos vasos periféricos. Sobrepondo as imagens a partir desse vaso dilatado, foi possível fazer a medida e razão do diâmetro do vaso pela largura do anel. A figura 28 mostra o vaso analisado (com 83 μm de diâmetro) e o gráfico com a razão em função do tempo pós-terapia.

Figura 27 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Clorina em concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Figura 28 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com 1 µg/cm². b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa)

Se então mudarmos o vaso em questão e analisarmos o vaso principal (com 450 µm de diâmetro), indicado na figura 29, obtemos um comportamento completamente distinto do gráfico anterior.

Figura 29 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com 1 µg/cm². b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa)

A partir das medidas dos diâmetros dos vasos, pode-se notar que vasos menores que 230 µm desaparecem completamente ao longo do tempo pós-terapia. Vasos entre 230 µm e 402 µm tem seu diâmetro reduzido entre 30% e 70% mas não desaparecem completamente. Já vasos com diâmetro maior que 402 µm quase sofrem reduções menores que 30%. Como, neste caso, foi observado o aumento de alguns vasos, pode-se constatar que vasos até 49 µm sofreram esse efeito de preenchimento sanguíneo e dilatação.

Analisando os gráficos e os valores, pode-se constatar que enquanto há dilatação dos vasos periféricos, antes muito pequenos e inativos, há uma diminuição significativa dos vasos de maior calibre, chegando inclusive à destruição de alguns.

Esse comportamento pode ser crítico se extrapolarmos o efeito para um tecido tumoral. Se a PDT induzir a necrose tumoral apenas na superfície e não na totalidade do tumor, células malignas ficarão remanescentes e pequenos vasos anteriormente pouco recrutados, poderão se tornar focos de angiogênese e de manutenção da nutrição dessas células. O entendimento desse fenômeno, assim como a evolução da resposta vascular em modelos tumorais, deve ser melhor investigado.

A partir disso, variamos a concentração dos fotossensibilizadores para analisar e comparar os efeitos.

4.1.3 PORFIRINA – CONCENTRAÇÃO DE ÁREA: 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Considerando que o objetivo de aumentar a concentração é comparar o efeito causado, foram mantidos os outros parâmetros, ou seja, tempo de incubação de 40 minutos e dose de luz de 30 J/cm².

O volume colocado no anel se manteve em 200 μL , porém de uma solução de 880 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As imagens feitas a cada 30 minutos pós-terapia é mostrada na figura 30.

Figura 30 - Imagens obtidas 0, 30, 60, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Porfirina em concentração de área de $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

Interessante notar que houve, nesse caso, dilatação dos vasos periféricos. Uma análise qualitativa nos permite afirmar que o efeito da porfirina, nessa concentração de área, tem um comportamento muito semelhante à Clorina em concentrações de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Fazendo o processamento das imagens, buscamos comparar, de forma quantitativa, essa semelhança de efeitos, mostrados na figura 31.

Figura 31 - Imagens processadas referentes à terapia fotodinâmica usando 100 µg/cm² de Porfirina.

A partir da média entre a razão do número de *pixels* pretos por número de *pixels* totais de 3 ovos, foi obtido o gráfico da figura 32. Esse gráfico mostra um comportamento, a princípio, bem parecido com o gráfico da figura 24 referente à clorina com 1 µg/cm², mantendo um gráfico com uma redução de 10% $\pm$ 3% e valor máximo de 20% $\pm$ 10%.

Medindo a espessura de vasos que sofreram diferentes efeitos tem-se que vasos acima de 143 µm diminuem o diâmetro em cerca de 30%. Vasos com diâmetro acima de 447 µm quase não sofrem alterações. Vasos acima de 150 µm que se encontram em camadas mais profundas também não sofrem grandes alterações e os vasos que sofrem dilatação são aqueles que, inicialmente, tinham até 52 µm.

Figura 32 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 100 µg/cm² de porfirina – média entre 3 ovos

Esse comportamento induziu aos testes com baixas concentrações de clorina. Se, altas concentrações de porfirina foi equivalente a 1 µg/cm² de clorina, é preciso testar se baixas concentrações de clorina equivalem a 1 µg/cm² de porfirina.

4.1.4 CLORINA – CONCENTRAÇÃO DE ÁREA: 0,1 µg/cm²

Considerando os mesmos parâmetros com uma baixa concentração de Clorina, os testes foram realizados para verificar se há equivalência de efeito com outras concentrações de porfirina. Iluminando com laser de 660 nm, as imagens feitas após a iluminação e estão mostradas na figura 33.

Figura 33 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia usando Clorina em concentração de área de $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

Uma análise qualitativa mostra claramente que há redução de toda área tratada. Esse efeito também é observado nas figuras 10 e 15, correspondente à concentração de área de porfirina de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Fez-se, então, o processamento das imagens para a análise quantitativa, na figura 34.

Figura 34 - Imagens processadas referentes à terapia fotodinâmica usando $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Clorina.

Vale ressaltar que o embrião, ao se movimentar, influencia diretamente nas imagens ao ser mais aparente na região do anel em 300 minutos que em zero minutos, por exemplo. O gráfico da figura 35 mostra um comportamento semelhante ao gráfico referente a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de porfirina, na figura 18. A média entre 3 ovos testados com os mesmos parâmetros resulta em uma redução de $43\% \pm 9\%$ e um aumento máximo de $10\% \pm 4\%$, mostrando que a redução é predominante, confirmando nossa hipótese.

Figura 35 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com 0,1 µg/cm² de Clorina – média entre 3 ovos.

A análise de vasos individuais mostra que os vasos até 156 µm foram destruídos completamente e vasos com diâmetro acima desse valor tem o diâmetro reduzido entre 30% e 60% sem desaparecer completamente.

Desses resultados, pode-se concluir que há uma equivalência de efeitos para as diferentes concentrações dos fotossensibilizadores (relação mostrada no diagrama da figura 36).

Figura 36 - Correspondência de efeito nas diferentes concentrações dos fotossensibilizadores.

Com os valores de redução e aumento vascular obtidos em cada caso, é possível comparar esses efeitos numericamente como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Panorama quantitativo dos efeitos observados e calculados para aplicação tópica.

Fotossensibilizador	Concentração de área	Redução (em %)	Aumento (em %)	Efeito observado
Porfirina	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	66 ± 17	9 ± 6	Redução da rede vascular
Clorina	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	15 ± 5	15 ± 2	Rede vascular constante
Porfirina	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 ± 3	20 ± 10	Rede vascular constante
Clorina	0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	43 ± 9	10 ± 4	Redução da rede vascular

As linhas de mesma cor, na tabela 4, indicam os mesmos efeitos. Portanto, a equivalência de efeitos (também mostrada na figura 36) se dá não só qualitativamente, como quantitativamente. Considerando o erro, podemos dizer que os comportamentos de redução e de aumento da rede vascular são semelhantes nessas diferentes concentrações.

4.1.5 ILUMINAÇÃO FRACIONADA

A iluminação alternada em 1 minuto de iluminação e 1 minuto de escuro até completar 5 minutos de iluminação total foi testada para ambos fotossensibilizadores com a concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, irradiância de 100 mW/cm^2 e dose total de luz de 30J/ cm^2 .

As imagens obtidas para a porfirina com esses parâmetros estão na figura 37. A análise qualitativa mostra um efeito mais lento de destruição dos vasos sanguíneos quando comparado a imagem 10, por exemplo, que foi testada a mesma concentração de área de porfirina (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e a mesma dose final de luz (30J/ cm^2).

Figura 37 - Imagens obtidas 0, 30, 90, 150, 240 e 300 minutos pós-terapia em concentração $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $30\text{J}/\text{cm}^2$ com iluminação fracionada (1 minuto de iluminação e 1 minuto de escuro).

O processamento da imagem seguido do gráfico estão nas figuras 38 e 39, respectivamente.

Com essas imagens e respectiva análise, pode-se notar que a redução da malha sanguínea foi muito menor para a iluminação fracionada que para a iluminação contínua. Como esse tipo de iluminação utiliza o dobro do tempo de exposição do ovo em ambiente externo à estufa, pode-se concluir que a iluminação contínua é mais eficiente para destruição da rede vascular.

Figura 38 - Imagens processadas referentes à terapia fotodinâmica usando $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Porfirina com iluminação fracionada.

Figura 39 - Gráfico com o comportamento do efeito vascular pós-terapia com $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e iluminação fracionada.

4.1.6 GRUPO CONTROLE – SÓ LUZ

Um grupo foi iluminado sem fotossensibilizador com o intuito de verificar se o efeito observado não era causado apenas pela luz. Usando a irradiância de 100 mW/cm² e tempo de iluminação de 5 minutos, fez-se os testes do grupo controle. A figura 40 mostra uma certa homogeneidade das imagens.

Figura 40 - Imagens obtidas pós-iluminação do grupo controle (somente luz).

Como pode-se notar, quase não há alterações ao longo do tempo pós-iluminação. O processamento das imagens aconteceu para comprovar o comportamento constante do grupo controle, evidenciando que o efeito notado com o uso do fotossensibilizador é exclusivo da terapia fotodinâmica. O comportamento é mostrado na figura 41 e no gráfico da figura 42. O comportamento do gráfico é, de forma geral, constante e em torno dos 100%.

Figura 41 - Imagens processadas referentes ao grupo controle (somente luz).

Figura 42 - Gráfico mostrando o comportamento vascular do grupo controle (somente luz).

4.1.7 GRUPO CONTROLE – SÓ CLORINA

Os grupos controles contendo apenas o fotossensibilizador foram planejados para verificar se a própria droga causava algum efeito vascular na membrana corioalantóica. O tempo de incubação foi mantido em 40 minutos para efeito comparativo do protocolo da terapia. As imagens do teste contendo apenas clorina em concentração de área de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ estão na figura 43.

Figura 43 - Grupo controle - Clorina: Imagens obtidas após incubação do fotossensibilizador.

A observação das imagens permite uma análise qualitativa imediata de que não houve grandes alterações na malha sanguínea, principalmente quando comparada às imagens referentes a aplicação da terapia fotodinâmica. Aos 300 minutos é observado uma pequena hemorragia que pode ter sido causada por algum choque mecânico do anel ou da instrumentação durante a obtenção das imagens ou retirada do fotossensibilizador.

Fazendo o processamento dessas imagens, e a contagem dos *pixels*, é possível perceber uma certa constância do gráfico, com uma pequena redução da área total de vasos sanguíneos

ao final dos 300 minutos. Provavelmente essa redução foi causada pela hemorragia aparente, já que ela pode levar à uma pequena constrição dos vasos. Esses resultados são mostrados na figura 44 e no gráfico da figura 45, respectivamente.

Figura 44 - Imagens processadas referentes ao grupo controle – somente fotossensibilizador - clorina.

Figura 45 - Gráfico mostrando o comportamento do grupo controle – somente fotossensibilizador - clorina.

4.1.8 GRUPO CONTROLE – SOMENTE PORFIRINA

Com o mesmo intuito de verificar se o fotossensibilizador tem efeito nos vasos sanguíneos, foram mantidos os 40 minutos de incubação do grupo controle contendo apenas aplicação tópica da solução de porfirina. A figura 46 mostra que o fotossensibilizador não causou grandes alterações para as imagens, sendo o efeito bem semelhante ao grupo controle apenas com clorina, como esperado.

Figura 46 - Grupo controle - Porfirina: Imagens obtidas após incubação do fotossensibilizador

O processamento das imagens junto com o gráfico estão mostrados nas figuras 47 e 48, respectivamente.

Figura 47 - Imagens processadas referentes ao grupo controle só com o fotossensibilizador - Porfirina.

Figura 48- Gráfico mostrando o comportamento do grupo controle - somente Porfirina.

A homogeneidade da sequência de imagens dos grupos-controles, bem como o resultado dos gráficos, foi fundamental para validação do protocolo estabelecido. São eles que indicam que, de fato, é a interação desse fotossensibilizador com a luz que causa o dano vascular e não apenas a droga ou a luz, individualmente.

4.2 APLICAÇÃO INTRAVENOSA

A aplicação intravenosa dos fotossensibilizadores foi realizada com uma seringa de insulina e uma pequena inclinação do ovo para salientar o vaso sanguíneo.

A dose de luz foi a mesma usada para a aplicação tópica: 100 mW/cm^2 com dose final de 30 J/cm^2 . Os testes foram feitos com uma iluminação durante a aplicação, imediatamente após, 1 minuto e 5 minutos após. Observamos que nos ovos com iluminação imediatamente após, 1 minuto e 5 minutos após a injeção, ocorreu pouca alteração vascular. Isso demonstra que o fotossensibilizador é carregado pelo fluxo sanguíneo não sendo absorvido pelas células endoteliais e, portanto, sem efeito fotodinâmico. Desta forma, os resultados apresentados na sequência são so dos ovos com iluminação concomitante à injeção.

É válido ressaltar que a injeção intravenosa sempre causa uma hemorragia quando a agulha é retirada. Essa hemorragia, quando intensa, pode causar grandes alterações nos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica e para tanto, foram considerados os grupos que tiveram uma hemorragia controlada, tanto nos grupos controle quanto nos grupos em que foram aplicados a Terapia Fotodinâmica.

4.2.1 GRUPO CONTROLE – SÓ SORO FISIOLÓGICO

O primeiro teste foi feito com um grupo controle, injetando apenas soro fisiológico para verificar se a injeção em si causava algum dano à rede vascular. As imagens seguiram os mesmos passos de análise qualitativa e quantitativa, mostradas nas figuras 49 e 50, respectivamente, seguidas do gráfico na figura 51, mostrando o comportamento referente à área dos vasos sanguíneos ao longo do tempo pós-injeção. Como um pedaço da casca de ovo

apareceu em algumas imagens, foi feita a sobreposição das imagens a partir de um vaso principal e o processamento das imagens ocorreu na área comum entre elas.

Figura 49 - Grupo controle com injeção intravenosa de soro fisiológico.

Figura 50 - Imagem processada da região comum entre as imagens do grupo controle com soro fisiológico intravenoso.

Figura 51 - Gráfico mostrando o comportamento do grupo controle intravenoso usando apenas soro fisiológico.

As imagens não mostram grandes alterações e o gráfico mostra uma constância da área total de vasos analisada. A partir desses resultados, então, foi possível prosseguir utilizando o fotossensibilizador e a iluminação.

4.2.2 PORFIRINA – APLICAÇÃO INTRAVENOSA

A injeção foi realizada utilizando uma seringa de insulina e agulha de 29 G com um volume total de 500 μ L de uma solução 0,2 mg/mL. Os resultados pós-terapia estão mostrados na figura 52.

Figura 52- Porfirina Intravenosa - Imagens pós-terapia com injeção de 500 μ L de Porfirina a 0,2mg/mL

Houve uma diminuição da malha vascular média de $(73 \pm 20)\%$ e um aumento máximo de $(10 \pm 10)\%$, mas é preciso notar que no tempo inicial pós-terapia, existe um ponto hemorrágico. Isso pode interferir no processamento da imagem, como podemos ver na figura 53 e, principalmente, nos pontos iniciais do gráfico da figura 54, que mostra um aumento inicial da porcentagem da rede vascular identificada por nosso modo de análise, que influenciou diretamente na média obtida com os 3 ovos. Esse ponto de aumento pode ser tanto em relação ao sangue da hemorragia encontrado na imagem ou uma resposta da rede vascular no preenchimento de vasos antes inativos.

Figura 53 - Imagens processadas, retirando o anel, referentes à terapia fotodinâmica usando 500 μ L de Porfirina a 0,2mg/mL com aplicação intravenosa.

Figura 54 - Gráfico mostrando o comportamento vascular com processamento de imagens e retirada do anel, usando porfirina com aplicação intravenosa – média entre 3 ovos.

A escolha do vaso individual a ser analisado, nesse caso, foi feita a partir de um vaso que permaneceu durante toda a sequencia de imagens, com diâmetro de 186 μm (figura 55).

Figura 55 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com aplicação intravenosa de porfirina. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa).

Interessante que o comportamento do vaso mostrado no gráfico da figura 55-b) é semelhante ao gráfico da figura 54, mostrando que o sangramento pode ter influenciado, inclusive, os vasos mais distantes da hemorragia.

Com os valores de redução e a análise qualitativa, podemos notar maior eficiência da aplicação intravenosa.

4.2.3 CLORINA – APLICAÇÃO INTRAVENOSA

Repetindo os parâmetros aplicados para a porfirina, porém, usando um laser com comprimento de onda de 660 nm, foi feita a aplicação de 500 μL de uma solução de 0,2 mg/mL de Photogem. A iluminação por 5 minutos com uma irradiância de 100 mW/cm² foi feita durante a aplicação da droga e, assim, as imagens pós-terapia estão reunidas na figura 56.

Figura 56 - Clorina Intravenoso - Imagens pós-terapia com injeção de 500 μ L de Clorina a 0,2mg/mL.

A redução nesse caso foi claramente visível. Os vasos sanguíneos periféricos desapareceram ficando apenas o vaso de maior calibre presente nas camadas mais profundas do ovo. O processamento das imagens mostrado na figura 57 foi feito para comparação com os efeitos observados na aplicação tópica com o uso da mesma droga. O comportamento quantitativo, então, é mostrado com a média entre os valores obtidos em 3 ovos, no gráfico da figura 58.

Figura 57 - Imagens processadas, retirando o anel, referentes à terapia fotodinâmica usando 500 μ L de Clorina a 0,2mg/mL com aplicação intravenosa.

Figura 58 - Gráfico mostrando o comportamento vascular com processamento de imagens e retirada do anel, usando clorina com aplicação intravenosa.

Os resultados encontrados com a aplicação intravenosa foram mais efetivos que os de aplicação tópica. O motivo disso é que a injeção da droga direta no vaso, seguida de iluminação, facilita a incorporação do fotossensibilizador e a destruição vascular, uma vez que uma maior quantidade do fotossensibilizador está dentro do vaso. A média de redução entre os 3 ovos testados foi de $(59 \pm 13)\%$ e o aumento máximo foi de $(3 \pm 2)\%$, valores maiores que os encontrados para a Clorina em qualquer uma das concentrações testadas.

A análise de um vaso individual foi feita com a razão entre a medida do diâmetro do vaso e a largura do anel (fixa). Dois vasos distintos foram escolhidos: o primeiro, que colapsa completamente, possui um calibre menor, de aproximadamente 130 μm (figura 59); o segundo, que permanece em toda a sequência de imagens pós-terapia, possui um calibre maior, em torno de 350 μm além de estar em camadas inferiores da CAM (figura 60). Mesmo assim, é possível verificar uma diminuição significativa (50%) do seu diâmetro.

Figura 59 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com aplicação intravenosa de clorina. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa).

Figura 60 - a) Vaso sanguíneo escolhido para análise individual com aplicação intravenosa de clorina. b) Gráfico representativo da razão entre o diâmetro do vaso escolhido sobre a largura do anel (fixa).

Na aplicação intravenosa é possível notar uma destruição mais acentuada dos vasos quando comparada à aplicação tópica, inclusive atingindo vasos nas camadas mais profundas da membrana. Mesmo nos vasos que não são destruídos, é observada a redução do seu diâmetro e, por isso, considera-se como efeito global a redução acentuada da rede vascular.

A Tabela 5 reúne os resultados numéricos obtidos com as médias dos ovos usando aplicação intravenosa.

Tabela 5 - Panorama quantitativo dos efeitos observados e calculados para aplicação intravenosa.

Fotossensibilizador	Concentração da solução injetada	Redução (em %)	Aumento (em %)	Efeito observado
Porfirina	0,2 mg/mL	59 ± 13	3 ± 2	Redução acentuada da rede vascular
Clorina	0,2 mg/mL	73 ± 20	10 ± 10	

A otimização do tratamento do câncer, então, envolve o entendimento dos mecanismos de angiogênese e anti-angiogênese, uma vez que os vasos sanguíneos possuem o papel fundamental de alimentar o tumor.

Nos grupos controles testados usando só luz, só clorina ou só porfirina topicamente, não houve alteração da rede vascular, mostrando a ausência de toxicidade no emprego de parâmetros de fotossensibilização e iluminação isolados.

Comparando os diâmetros dos vasos e o comportamento global da rede vascular, foi feita uma tabela com todos os parâmetros testados a partir da mesma dose de iluminação, considerando o tipo de vaso sanguíneo em relação ao diâmetro, seu comportamento pós-terapia e os valores finais, em porcentagem, da redução e/ou aumento da rede (tabela 6).

Estabelecendo uma concentração de área de $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para os dois fotossensibilizadores, foi possível visualizar uma destruição de cerca de 66% da rede vascular com o uso da porfirina. Já com o uso da clorina, obteve-se uma destruição de 15% e aumento de 15%, mostrando uma constância da área total de vasos sanguíneos. Isso ocorreu devido à dilatação dos vasos periféricos (anteriormente não requisitados) e destruição de regiões de vasos sanguíneos mais calibrosos (com diâmetro de cerca de $230\mu\text{m}$). Com a destruição imediata de vasos principais, há a dilatação de vasos antes não usados, sugerindo uma ação mais rápida da clorina.

Testando altas concentrações de porfirina ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), foi encontrado um efeito semelhante ao da clorina à $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, com dilatação dos vasos periféricos e redução de cerca

de 10% e aumento de 20% da rede de vasos. Esse resultado incentivou o estudo de baixas concentrações de clorina e, para a aplicação de $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, foi observada uma redução homogênea de cerca de 43% da área total de vasos sanguíneos. Tem-se, então, equivalência de efeitos para as diferentes concentrações de fotossensibilizadores, na aplicação tópica.

Na aplicação intravenosa, o controle foi feito com injeção de soro fisiológico, para verificar se a injeção juntamente com a hemorragia causada na retirada da agulha eram suficientes para causar o efeito vascular. Nesse grupo controle foi observado uma constância na quantidade total de vasos. A partir desse resultado, foram injetados os fotossensibilizadores e a iluminação foi feita simultaneamente à aplicação. A dose de luz usada foi a mesma estabelecida na aplicação tópica ($30 \text{ J}/\text{cm}^2$) para comparação dos resultados.

Em ambos os fotossensibilizadores, a redução foi visivelmente maior, chegando a mais de 70% da área total. Isso aconteceu porque a aplicação intravenosa permite uma maior quantidade da droga no interior dos vasos sanguíneos, com uma interação mais intensa e permitindo chegar rapidamente às camadas mais profundas da CAM.

Tabela 6- Panorama geral do comportamento vascular com os valores testados em concentração e tipo de aplicação para compostos de porfirina e clorina a partir da mesma dose de luz aplicada (30J/cm²).

Aplicação	FS	Concentração	Redução total (em %)	Aumento total (em %)	Comportamento do vaso pós-terapia	Diâmetro do vaso
Tópica	Porfirina	1 µg/cm²	66 ± 17	9 ± 6	Destruição total	<151 µm
					Redução entre 30-70%	>151 µm
					Redução de até 30% - camadas mais profundas	>153 µm
	Clorina	1 µg/cm²	15 ± 5	15 ± 2	Destruição total	Ausente*
					Redução entre 30-70%	>230 µm
					Redução de até 30%	>402 µm
					Redução de até 30% – camadas mais profundas	>333 µm
					Dilatação	<49 µm
	Porfirina	100 µg/cm²	10 ± 3	20 ± 10	Destruição Total	Ausente*
					Redução entre 30-70%	>143 µm
					Redução de até 30%	>447 µm
	Clorina	0,1 µg/cm²	43 ± 9	10 ± 4	Redução de até 30% – camadas mais profundas	>150 µm
					Dilatação	<52 µm
Intravenosa	Porfirina	0,2 mg/mL	59 ± 13	3 ± 2	Destruição total	< 186 µm
					Redução de até 30% – camadas mais profundas	>186 µm
					Redução entre 30-70%	>186 µm
	Clorina	0,2 mg/mL	73 ± 20	10 ± 10	Destruição total	<351 µm
					Redução de até 30% – camadas mais profundas	>351 µm

*A ausência da destruição total foi devido à destruição de pedaços do vaso e não dele por completo

5 CONCLUSÕES

Na aplicação tópica, com a concentração de área de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para ambos os fotossensibilizadores, foi possível observar uma redução acentuada da rede vascular com o uso de porfirina (cerca de 66%). Em contrapartida, o uso da clorina na mesma concentração mostrou uma certa constância da área total de vasos sanguíneos dada pelo colapso de algumas regiões do vaso tendo o fluxo desviado para a microcirculação em outras regiões. Essa diferença de efeito provavelmente ocorreu por uma maior quantidade de moléculas de clorina distribuídas na parede ou no interior do vaso, uma vez que a molécula do Photodithazine[®] é menor que a molécula do Photogem[®], facilitando o processo de difusão nas camadas da membrana corioalontóica e interação com o endotélio vascular.

Testando altas concentrações de porfirina e, com isso, disponibilizando mais droga para as células da parede do vaso, foi encontrado um efeito semelhante ao da clorina à 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Esse resultado incentivou os testes com baixa concentração de clorina (a 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) que mostrou uma equivalência de efeito à porfirina com 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, com redução homogênea de 43% da malha vascular.

A aplicação intravenosa se mostrou mais eficiente quando comparada à aplicação intravenosa, com cerca de 70% de redução de toda rede vascular em ambos fotossensibilizadores. Isso acontece devido a interação mais intensa entre droga e vaso sanguíneo possibilitada por esse tipo de aplicação, atingindo camadas mais profundas da CAM e disponibilizando maior quantidade de fotossensibilizador no interior dos vasos. Assim, a clorina com aplicação intravenosa se mostrou a forma mais eficiente na destruição de vasos sanguíneos.

Esse estudo pode contribuir para a escolha do fotossensibilizador mais adequado, considerando a resposta vascular, para diferentes tipos de lesões, uma vez que hoje tem-se um protocolo padrão para todo tipo de lesão tratada com terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

- 1 REDDY, K. B.; NABHA, S. M.; ATANASKOVA, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Reviews*, v. 22, n. 4, p. 395-403, 2003.

- 2 BRYAN, G. T. Histórias Naturais dos Canceres. In: LOVE, R. R. (Ed.). *Manual de Oncologia Clínica*. São Paulo: Fundação Oncocentro, 1999. p. 28-31.

- 3 CORRÊA, J. C. *Fotodegradação do Photoditazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser*. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado - Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.

- 4 INCA. Instituto Nacional do Câncer. Cancer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 21 Nov 2011.

- 5 SURESH, S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, v. 3, n. 4, p. 413-438, 2007.

- 6 FINGAR, V. H. Vascular effects of photodynamic therapy. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 14, n. 5, p. 323-328, 1996.

- 7 BALKE, M. *et al.* Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Research Notes*, v. 3, n. 58, p. 1-8, 2010.

- 8 FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

- 9 KANDEL, J. *et al.* Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, v.66, n. 6, p. 1905-1104, 1991.

- 10 HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, v. 86, n. 3, p. 353-364, 1996.

- 11 NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvascular Research*, v. 47, n. 1, p. 31-40, 1994.

- 12 QUAN, G. M. Y.; CHOONG, P. F. M. Anti-angiogenic therapy for osteosarcoma. *Cancer Metastasis Review*, v. 25, n. 4, p. 707-713, 2006.

13 DIAS, P. F. et al. Na formação dos vasos sanguíneos: fronteiras entre saúde e doença. *Ciência Hoje*, v. 32, n. 190, p. 22-27, 2003.

14 DIAS, P.F. *Modulação da vasculogênese, angiogênese e do desenvolvimento tumoral por derivados de Sargassum stenophyllum (PHAEOPHYCEAE)*. 2005. 162 p. Tese (Doutorado - Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

15 PETRUZZELLI, G. J. et al. Angiogenesis induced by head and neck squamous cells carcinoma xenografts in the chick embryo chorioallantoic membrane model. *Annals Otolaryngology & Laryngology*, v. 102, n.3, p. 215-221, 1993.

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

17 STATION, C. A. et al. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 85, n. 5, p. 233-248, 2004.

18 SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia Animal: adaptação e meio ambiente*. 5a ed. São Paulo : Livraria Santos Editora, 2002. 611 p.

19 RIBATTI, D. et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. *The Anatomical Record*, v. 264, n. 4, p. 317-324, 2001.

20 HICKMAN JR., C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. *Princípios Integrados de Zoologia*. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 846 p.

21 SILVA, H. S. et al. *Anatomia funcional das aves domésticas*. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/artigos/anatomia-funcional-das-aves-domesticas/67044/#ixzz1Vm9QMxbi>>. Acesso em : 15 Nov. 2011.

22 GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p. 1-12, 2010. DOI:10.1155/2010/940741.

23 LANGE, N., et al. A new drug-screening procedure for photosensitizing agents used in photodynamic therapy for CNV. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 42, n. 1, p. 38-46, 2001.

- 24 DANI, S. U.; ESPINDOLA, R. A model system for testing gene vector using murine tumor cells on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Genetics and Molecular Research*, v. 1, n. 2, p. 167-175, 2002.
- 25 SAW, C. L. L. et al. Transport of hypericin across chick chorioallantoic membrane and photodynamic therapy vasculature assessment. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 6, p. 1054-1060, 2005.
- 26 JONES, T. A.; JONES, S. M.; PAGGETT, K. C. Emergence of hearing in the chicken embryo. *Journal Neurophysiology*, v. 96, n. 1, p. 128-141, 2006.
- 27 JOESTEN, M. D.; WOOD, J. L. *World of Chemistry*. Fort Worth: Saunders College, 1996. 731 p.
- 28 GRINGAUZ, A. *Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why*. New York : VCH, 1997. 520 p.
- 29 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, v. 53, n. 9, p. 61-109, 2008.
- 30 ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- 31 DOUGHERTY, T. J. An update on photodynamic therapy applications. *Journal of Clinical LaserMedicine & Surgery*, v. 20, n. 1, p. 3-7, 2002.
- 32 TRIESSCHEIJN, M. et al. Photodynamic Therapy in Oncology. *The Oncologist*, v. 11, n.9, p. 1034-1044, 2007.
- 33 DOUGHERTY, T. J. et al. Review - photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- 34 NOWAK-SLIWINSKA, P. et al. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis*, v. 13, n. 4, p. 281-292, 2010.
- 35 STORGARD, C. et al. Angiogenesis assays in the chick CAM. In: GUAN, J-L (Ed.). *Cell migration: developmental methods and protocols*. New Jersey: Humana Press, 2005. p. 123-136. (Methods in molecular biology, 294).
- 36 NOWIS, D. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

37 MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

38 GOTTFRIED, V.; LINDENBAUM, E. S.; KIMEL, S. Vascular damage during PDT as monitored in the chick chorioallantoic membrane. *International Journal Radiation Biology*, v. 60, n. 1-2, p. 349-354, 1991.

39 HAMMER-WILSON, M. J. et al. Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for photosensitizers administered intraperitoneally (IP) into the chick embryo. *Photochemical & Photobiological Science*, v. 1, n. 9, p. 721-728, 2002.

40 HAMMER-WILSON, M. J. et al. Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 53, n. 1, p. 44-52, 1999.

41 ROBERTS, D. J. H.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *British Journal of Plastic Surgery*, v. 48, n. 6, p. 360-370, 1995.

42 FERREIRA, J. *Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica* - estudo in vivo. 2003. 108p. Dissertação (Mestrado - Ciências Médicas) - Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

43 COLUSSI, V. C.; NICOLA, E. M.D.; NICOLA, J. H.I. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 42, n. 4, p. 229-236, 1996.

44 SZURKO, A. et al. Spectroscopic and biological studies of a novel synthetic chlorin derivative with prospects for use in PDT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 24, p. 8197-8205, 2009.

45 JORI, G. Novel Therapeutic modalities based on photosensitized processes. *EPA Newsletter*, v. 60, p. 12-18, 1997.

46 PANDEY, R. K. et al. Nature: a rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 38, n. 5, p. 445-467, 2006.

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

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

- 49 NEVIN, A.N. et al. Analysis of protein-based binding media found in paintings using laser induced fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, p. 341-346, 2006. DOI: 10.1016/j.aca.2006.01.027.