UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JOSÉ DIRCEU VOLLET FILHO

Correlação de fluorescência superficial e profundidade de necrose em
terapia fotodinâmica: possibilidade de dosimetria em tempo real

São Carlos
2011

JOSÉ DIRCEU VOLLET FILHO

Correlação de fluorescência superficial e profundidade de necrose
em terapia fotodinâmica: possibilidade de dosimetria em tempo real

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

Área de Concentração: Física
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei
Salvador Bagnato

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

São Carlos
2011

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)

Vollet Filho, José Dirceu

Correlação de fluorescência superficial e
profundidade de necrose em terapia fotodinâmica:
possibilidade de dosimetria em tempo real / José
Dirceu Vollet Filho; orientador Vanderlei Salvador
Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2011.
127 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2011.

1. Terapia Fotodinâmica.. 2. Fluorescência.. 3.
Fotodegradação.. 4. Modelo.. 5. Dosimetria.. I.
Bagnato, Vanderlei Salvador, orient. II. Título.

À minha família, por me fazer uma pessoa feliz, por me fornecer as condições físicas, emocionais e morais para desenvolver meu trabalho e – acima de tudo – para buscar me tornar uma pessoa cada vez melhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte de tudo o que é bom, que me concedeu a vida, e sem o qual nada disso seria possível.

À minha família, e em especial aos meus pais José Dirceu e Sandra e à minha irmã Aline, que me amaram e apoiaram desde sempre, me deram ânimo, toleraram minha ausência e meus momentos ruins, me deram amor e paciência, e me incentivaram desde o início dessa jornada. Amo vocês, obrigado por tudo!

Aos meus amigos, muitos graças a Deus: seria muito difícil enumerá-los a todos sem correr o risco de ser injusto esquecendo alguém... Vocês sabem quem são e o quanto são especiais para mim! Sua alegria, seus puxões de orelha e sua presença constante, alguns mesmo à distância, sempre fizeram o fardo mais leve. Obrigado por estarem sempre lá!

Aos Prof. Vanderlei Salvador Bagnato e Cristina Kurachi, por toda a orientação e confiança, pela amizade, pela paciência com meus momentos de teimosia, por me aceitarem em sua equipe e por me darem oportunidades de crescer junto deles. Muito obrigado!

Aos amigos do Laboratório de Biofotônica, do grupo de Óptica, os que nele estão e os que nele estiveram, por fazerem parte da minha vida acadêmica e pessoal, por me sustentarem nas dificuldades, por me ajudarem nas diferentes etapas do meu trabalho... e por toda a diversão! Obrigado por melhorarem meus dias e noites de trabalho!

Aos amigos e colegas do LIEPO, do LAT e da Atômica, do grupo de Óptica, por me ajudarem a realizar este trabalho, e pela convivência sempre prazerosa!

Aos funcionários e docentes do Instituto de Física de São Carlos, sem cujo trabalho (que nem sempre vemos) seria impossível realizar essa tese. Em especial, agradeço às secretárias do grupo de Óptica Isabel, Benê e Cristiane, ao técnico Evaldo, e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IFSC e do Serviço de Biblioteca e Informação "Prof. Bernhard Gross" (IFSC) pela eficiência e boa vontade de sempre em contribuir com o trabalho de todos.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, na pessoa do Dr. Orlando Castro-e-Silva Jr., pela disponibilização dos animais para experimentação e por aceitar e aprovar o projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal local.

À equipe UNIVESP e aos alunos do curso de Licenciatura em Ciências, pelo apoio, compreensão e torcida durante a fase final do trabalho. Obrigado!

Alguns agradecimentos especiais:

A Clóvis Grecco, Dayanne Rosa, Denise Bliesener, Profa Juliana Ferreira, Lilian Moriyama e Priscila Menezes, pela ajuda na execução dos experimentos com os animais. Obrigado!

A Larissa Marila, Maristela Dutra-Correa, Wilma Barrionuevo, pela realização das lâminas histológicas, e à Cristina Kurachi e Juliana Ferreira pelo auxílio na análise histológica. Obrigado!

Ao professor Frederico Dias Nunes, da UFPE, pela ajuda inestimável em meu processo de qualificação. Muito obrigado, Fred!

A Alessandro Cosci, Prof. Emery Lins, Lilian Moriyama, Mardoqueu da Costa, Paulino Villas-Boas e Sérgio Muniz pelas muitas contribuições para a elaboração e melhoria do programa para os cálculos do modelo. Obrigado!

A Alessandro Cosci, Profa. Cristina Kurachi, Natalia Inada e Prof. Vanderlei Bagnato pelas longas discussões, sugestões de modificação e reflexões sobre o conteúdo e a forma do texto. Obrigado!

Aos professores membros da banca: Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas, Prof. Dr. Leandro Martinez, Prof. Dr. Luciano Bachmann e Profa. Dra. Rosângela Itri, pelas valiosas contribuições e discussões durante a defesa. Obrigado!

Finalmente, agradeço aos órgãos de fomento:

- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento na forma de bolsa de doutorado;

- à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela manutenção do grupo de pesquisa através do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF - programa CePID/FAPESP) e Instituto Nacional de Óptica e Fotônica (INOF - programa INCT/CNPq).

RESUMO

VOLLET-FILHO, J. D. *Correlação de fluorescência superficial e profundidade de necrose em terapia fotodinâmica: possibilidade de dosimetria em tempo real*. 2011. 127 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

O tratamento do câncer e de lesões pré-malignas é uma importante aplicação da terapia fotodinâmica. A base da técnica é o uso da luz associada a um fotossensibilizador, na presença de oxigênio, de forma a promover a formação de espécies reativas de oxigênio que culminam na morte celular. Esta técnica é altamente seletiva, e apresenta poucos efeitos colaterais. A efetividade da terapia pode ser avaliada com base na emissão de fluorescência do fotossensibilizador, uma vez que o grau de fotodegradação deste indica uma terapia mais ou menos efetiva. No caso de tumores, a reincidência de lesões, causada por células malignas remanescentes, é um problema importante e que pode piorar as condições clínicas de um paciente. Este estudo propõe, portanto, um modelo matemático baseado na aferição da fluorescência do fotossensibilizador *in situ* para previsão da extensão do dano promovido pela terapia fotodinâmica em tempo real. Esta aferição é feita em comparação com o parâmetro experimental de profundidade de necrose, de modo a avaliar se uma lesão pode ser completamente eliminada numa dada aplicação. O estudo utilizou fígados de ratos Wistar machos, saudáveis, como modelo inicial dada sua relativa homogeneidade óptica com relação a lesões tumorais, visando minimizar variáveis. Os fígados foram irradiados com diferentes intensidades (150, 250 e 350 mW/cm²) e com diferentes fluências (50-450 J/cm²) de luz com comprimento de onda de 630 nm, CW, para avaliação das necroses e da fluorescência (avaliada usando 532 nm para excitação). A primeira versão do modelo utilizou o conjunto de dados de 250 mW/cm² para obtenção de um modelo inicial baseado na fotodegradação avaliada por fluorescência. Este modelo foi alterado com base em modificações biológicas observadas na literatura durante a terapia. Tais alterações estão relacionadas à modificação de aporte de oxigênio causada por vasoconstricção, pela farmacocinética do fotossensibilizador e pelas modificações nas propriedades ópticas intrínsecas ao tecido. Foi possível encontrar equivalência entre modelo e experimentação ao final das modificações propostas ao modelo inicial, embora tenha sido evidente o efeito da variação no fracionamento da fluência entregue sobre os resultados da previsão. Como forma de mostrar a capacidade do modelo não apenas para previsão da profundidade de necrose (e, portanto, da extensão do dano), mas também para avaliações de dosimetria, foi proposta uma situação hipotética onde se entrega a mesma fluência de luz com intensidades diferentes (variando linearmente). Este teste mostrou o potencial do modelo não apenas para avaliar a extensão do dano causado pela terapia em tempo real, mas também para estimar os resultados de protocolos clínicos não-testados e, portanto, para a proposta de melhorias a protocolos de terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Fluorescência. Fotodegradação. Modelo. Dosimetria. Profundidade de necrose.

ABSTRACT

VOLLET-FILHO, J. D. *Correlation of surface fluorescence and depth of necrosis in photodynamic therapy: possibility for real-time dosimetry*. 2011. 127 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Malignant and pre-malignant cancer lesions treatment is an important application of photodynamic therapy. It is based on the use of light associated to a photosensitizer, in the presence of oxygen, so that reactive oxygen species may be formed, resulting in cell death. This is a highly selective technique, and few side effects are reported. The therapy efficacy may be evaluated through the photosensitizer fluorescence emission, since its level of bleaching indicates a more or less effective therapy application. Concerning cancer, recurrent lesions, caused by remaining malignant cells, is an important problem which may cause the worsening of patient's clinical condition. Therefore, this study proposes a mathematical model based on the assessment of photosensitizer fluorescence *in situ* for prediction of the damage extent caused by photodynamic therapy. This evaluation is performed by comparison with the experimental parameter of depth of necrosis, as to evaluate if a lesion can be completely eliminated during an application. This study used male Wistar rats healthy livers as an initial model due to its relative optical homogeneity when compared to tumor lesions, hence minimizing variables. Livers were irradiated using different light fluence rates (150, 250 and 350 mW/cm²) and fluences (50-450 J/cm²) with 630 nm wavelength, CW, to perform evaluation of fluorescence (with 532 nm excitation) and depth of necrosis. A first model was obtained from the 250 mW/cm² dataset, based on fluorescence-assessed photobleaching. Such model was modified according to literature observations on biological changes during therapy. Those changes are related to the oxygen arrival, promoted by vessels shutdown, by the photosensitizer pharmacokinetics and by the changes in the intrinsic optical properties of liver tissue. Correspondence between model and experimentation was achieved after the changes proposed to the initial model, although the effect of different fractioning of light fluences on prediction has become evident. To show the model ability not only to predict depth of necrosis (and, hence, damage extent), but also for dosimetry studies, an hypothetical situation in which the same fluence has been delivered in different (linearly varying) fluence rates. This test result showed the potential of the model not only to evaluate the damage extension by the therapy in real-time, but also to investigate untested clinical protocols results and, therefore, to allow proposals of improvement to photodynamic therapy protocols.

Keywords: Photodynamic therapy. Fluorescence. Photobleaching. Model. Dosimetry. Depth of necrosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama de Jablonski modificado. Nele, observa-se a excitação da molécula de FS do estado fundamental singlete S_0 para o estado excitado singlete S_1 . É possível ver então as possibilidades de transições vibracionais (processo de *relaxação vibracional*) para o nível fundamental do estado excitado singlete S_1 , ou de *cruzamento intersistema* (csi) pra o estado excitado tripleto T_1 (transição proibida, de menor ocorrência). Do estado S_1 , a molécula emite fluorescência (voltando ao estado singlete S_0 fundamental). Do estado T_1 , ela pode fosforescer para o estado fundamental S_0 (transição proibida e, portanto, demorada), ou interagir com o oxigênio molecular (3O_2), transferindo-lhe energia e levando-o de um estado fundamental tripleto T_0 para um estado excitado tripleto T_1 . Este T_1 pode, dependendo do FS e das condições locais, gerar radicais livres (reação tipo I) ou gerar oxigênio singlete (reação tipo II), ambas desencadeando danos celulares. 23
- Figura 2 - Alvos celulares principais da TFD (adaptado de Henderson e Gollnick, *Biomedical Photonics Handbook*⁸). 24
- Figura 3 - A figura ilustra os três principais alvos teciduais da TFD: células tumorais poder sofrer dano e morrer por causa dos efeitos diretos da formação do oxigênio singlete, perecer pelo efeito da depleção de nutrientes e oxigênio causada pelo dano vascular, ou sofrerem o efeito dos ataques do sistema imune/inflamatório ativados pela TFD (adaptado de Henderson e Gollnick, *Biomedical Photonics Handbook*⁸). 26
- Figura 4 - Diagrama esquematizando efeitos biológicos associados com o processo fotodinâmico. É possível apreciar a complexidade e a interdependência dos fatores associados ao dano promovido pela terapia. 26
- Figura 5 - Representação gráfica para demonstrar o motivo da escolha da janela terapêutica, apresentando diferentes componentes teciduais que interferem na propagação da luz em tecidos biológicos. Vale notar que a janela representada na figura é ainda mais restrita que a região citada no texto, dependendo dos elementos presentes no tecido de interesse (adaptado de Mobley e Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook*³⁸). 28
- Figura 6 - *Acima*: Espectro típico de absorção para o FS Photogem[®]; as linhas verticais indicam a região usadas para irradiação (630 nm, cheia) e excitação de fluorescência (532 nm, tracejada). *Abaixo*: Espectros típicos de fluorescência de tecido hepático sem o FS (autofluorescência, linha tracejada) e 30 min após administração do mesmo (linha sólida), depois de normalizados. Para o espectro do tecido sensibilizado, a autofluorescência foi subtraída. Cada espectro é a média de 5 medidas realizadas aleatoriamente na região de interesse no tecido. 42

Figura 7 - Fluxograma apresentando as etapas principais da rotina em MATLAB® utilizada para os cálculos do modelo.	51
Figura 8 - Dados de degradação do FS para os três grupos experimentais. A ordenação da legenda apresenta-se seguindo a variação de intensidades (de 150 a 350 mW/cm ²), enquanto os grupos foram nomeados em ordem cronológica de execução (inicialmente o grupo de 250 mW/cm ² , posteriormente os grupos de 150 e 350 mW/cm ²).	53
Figura 9 - Profundidades de necrose coletadas para os três grupos experimentais. A ordenação da legenda apresenta-se seguindo a variação de intensidades (de 150 a 350 mW/cm ²), enquanto os grupos foram nomeados em ordem cronológica de execução (inicialmente o grupo de 250 mW/cm ² , posteriormente os grupos de 150 e 350 mW/cm ²).	55
Figura 10 - Imagens das lâminas histológicas de necrose, obtidas dos tecidos irradiados. É possível ver que uma linha bem definida que separa tecido saudável e necrótico (indicada por setas brancas em "a" e "b"). É possível ainda notar a presença de infiltrado neutrofílico (estruturas nodulares azuis, indicadas por setas pretas nas fotos em "c" e "e" e nos destaques em "d" e "f") e do espaçamento entre as células, os quais evidenciam inflamação e edema, respectivamente, e são indicativos de dano térmico.	56
Figura 11 - Profundidade de necrose experimental para Photogem® (círculos sólidos), como função das fluências (0–450 J/cm ²) com intensidade constante de 250 mW/cm ² , durante diferentes períodos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, descrito no capítulo 2.	60
Figura 12 - Amplitude de fluorescência (degradação) normalizada para Photogem®, <i>in vivo</i> (círculos sólidos), como função das fluências (0–450 J/cm ²) com intensidade constante de 250 mW/cm ² , durante diferentes períodos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, descrito no capítulo 2.	61
Figura 13 - Razão da fluorescência experimental (degradação) para Photogem® <i>in vivo</i> multiplicada pela profundidade de necrose (parâmetro de correlação Ψ) como função da fluência (0–450 J/cm ²) com intensidade constante de 250 mW/cm ² , durante diferentes períodos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir das curvas apresentadas para a primeira etapa de construção do modelo, descrito no capítulo 2.	62
Figura 14 - Curvas de concentração teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 250 mW/cm ² , ao longo da profundidade no tecido. A seta	

indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um passo de tempo no modelo.....	65
Figura 15 - Curvas de fluência de luz teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 250 mW/cm ² , ao longo da profundidade no tecido. A seta indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um passo de tempo no modelo. A linha tracejada indica a região onde se atinge o limiar de fluência dentro do tecido para ocorrência do efeito fotodinâmico.	66
Figura 16 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem [®] , <i>in vivo</i> , como função das fluências (0–250 J/cm ²) para intensidade constante de 150 mW/cm ² , durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, com modificação dos parâmetros.	68
Figura 17 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem [®] , <i>in vivo</i> , como função das fluências (0–250 J/cm ²) para intensidade constante de 350 mW/cm ² , durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, com modificação dos parâmetros.	69
Figura 18 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem [®] , <i>in vivo</i> , como função das fluências (0–250 J/cm ²) para intensidade constante de 250 mW/cm ² , durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, com modificação dos parâmetros.	70
Figura 19 - Exemplo da diferença entre uso de valores de degradação considerando medidas dentro e fora da área de iluminação. Levar em conta a fluorescência coletada fora, mas próximo à região irradiada torna muito difícil ter uma idéia clara do decaimento da fluorescência.	72
Figura 20 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem [®] , <i>in vivo</i> , como função das fluências (0–250 J/cm ²) para intensidade constante de 150 mW/cm ² , durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética.	74

Figura 21 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 350 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética. 75

Figura 22 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética. 77

Figura 23 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 150 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido. 80

Figura 24 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 350 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido. 83

Figura 25 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 350 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido. 84

- Figura 26 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido, com parâmetros modificados para considerar o fracionamento diferenciado..... 86
- Figura 27 - Parâmetros de correlação Ψ para 150, 250 e 350 mW/cm², respectivamente, de cima para baixo, com o modelo modificado pela adição do efeito da farmacocinética, da modificação na atenuação e, para o grupo G1, com os parâmetros ajustados (conforme discussão sobre fracionamento). 87
- Figura 28 - Curvas de concentração teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 150 mW/cm² (G2, acima) e 350 mW/cm² (G3, abaixo), ao longo da profundidade no tecido. A seta indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um determinado passo de tempo no modelo..... 89
- Figura 29 - Curvas de fluência de luz teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 150 mW/cm² (G2, acima) e 350 mW/cm² (G3, abaixo), ao longo da profundidade no tecido. A seta indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um determinado passo de tempo no modelo..... 90
- Figura 30 - Penetração da luz versus informação da fluorescência (camadas de profundidade definidas como C1-C6, com C1 a mais superficial). Em (a), uma representação da penetração da luz de excitação da fluorescência, chegando até uma camada arbitrária C3, é apresentada. Em (b), representa-se a penetração da luz de ativação do FS (630 nm), em quantidade mínima de fluência para causar necrose até uma profundidade equivalente a C5. A região hachurada (camadas C4-C5) representam a maior penetração da luz vermelha do que a verde e, portanto, a perda de informação com relação à degradação do FS (e com isso, do dano promovido) ocorrida nas camadas mais profundas do tecido irradiado. 93
- Figura 31 - Simulação da contribuição de intensidades superficiais, propostas para investigação de possibilidades de protocolo em TFD versus tempo de irradiação, em segundo. O passo aplicado às intensidades variáveis é de 0,1 mW/cm².s. 94
- Figura 32 - Integral das curvas que representam a contribuição de intensidade superficial, na forma de fluência versus tempo de irradiação, em diferentes regimes de taxa de intensidade. Apesar da variação na intensidade seguir a mesma taxa, em módulo, a taxa de entrega de fluência não a segue..... 95

Figura 33 - Profundidades de necrose estimadas com base no modelo, para diferentes regimes de taxa de intensidade. É possível notar que a necrose final atingida depende de qual dos três regimes é usado, ou seja, não é idêntica entre eles, apesar da fluência final ser a mesma (400 J/cm ²).	95
Figura 34 - Esquema da disposição comumente observada dos spins nos orbitais moleculares para um estado fundamental, um singleto excitado e um tripleto excitado.	121
Figura 35 - Diagramas das curvas de energia potencial de dois estados eletrônicos, mostrando transições de absorção e emissão entre os estados, bem como uma distribuição comum dos espectros correspondentes (adaptado de Vo-Dinh (Ed.), <i>Biomedical Photonics Handbook</i> ¹⁰²).	123

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Câncer	20
1.1.1	<i>Tratamento</i>	21
1.2	Terapia Fotodinâmica – TFD.....	22
1.2.1	<i>A técnica e suas vantagens</i>	22
1.2.2	<i>Dificuldades relacionadas à TFD</i>	27
1.3	A espectroscopia de fluorescência e a TFD	33
1.3.1	<i>Cinética e degradação do FS</i>	34
1.4	Objetivos.....	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Animais	37
2.2	Sistema de espectroscopia de fluorescência.....	37
2.3	Procedimento TFD	38
2.3.1	<i>Fotossensibilizador</i>	38
2.3.2	<i>Fonte de Luz</i>	39
2.3.3	<i>Irradiação</i>	39
2.3.4	<i>Coleta de fluorescência</i>	41
2.3.5	<i>Recuperação pós-tratamento e análise histológica</i>	43
2.3.6	<i>Análise da taxa de degradação</i>	43
2.3.7	<i>Monitoramento dos efeitos térmicos no procedimento da TFD</i>	44
2.3.8	<i>Estatística</i>	44
2.4	Modelo – elaboração e aperfeiçoamento	45
2.5	Predição de resultados da terapia utilizando o modelo e a fluorescência	49
2.6	Possibilidades de exploração de novos parâmetros de irradiação – avaliação da resposta pelo modelo	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1	Resultado da experimentação animal	53
3.2	Primeira etapa – elaboração do modelo.....	59
3.3	Segunda etapa – aperfeiçoamento com novos dados experimentais	66
3.3.1	<i>Primeira alteração efetiva: termo de farmacocinética</i>	72
3.3.2	<i>Segunda alteração efetiva: modificação na atenuação total da luz</i>	78
3.4	Pós-análise das modificações: comentários gerais sobre a predição	91
3.5	Possibilidades de exploração de parâmetros e protocolos	94
3.6	Perspectivas	96
4	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101

APÊNDICE A – Diagramas de fluxo - rotinas	113
APÊNDICE B – Breve descrição das técnicas de monitoramento tecidual.....	119
ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética.....	126

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de câncer e de lesões pré-malignas utilizando a técnica da Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma aplicação bem conhecida da mesma, e talvez a de maior notoriedade e interesse desde que se iniciaram os estudos sobre ela, dado o aumento cada vez mais relevante dos casos de câncer no Brasil e no mundo.

A TFD apresenta três elementos básicos, sendo eles o fotossensibilizador (FS), a luz em comprimentos de onda que sejam absorvidos pelo FS, e o oxigênio molecular, responsável por, junto das moléculas excitadas de FS, promover a formação de espécies reativas que causam danos às estruturas celulares – levando as células à morte quando este dano se torna irreversível. De maneira geral, a técnica apresenta várias vantagens, como a ausência de necessidade de internação ou procedimento cirúrgico (para a maioria dos casos), do uso de radiação ionizante ou de medicamentos que apresentam alta toxicidade para células saudáveis. Contudo, apesar das vantagens que apresenta, o efeito fotodinâmico é ainda alvo de estudos, pois nem todos os mecanismos envolvidos são bem compreendidos. De fato, os avanços científicos no ramo da bioquímica têm permitido compreender cada vez melhor estes mecanismos, permitindo um conhecimento mais aprofundado da TFD.

Apesar disso, existem processos fotofísicos e fotoquímicos envolvidos que são cruciais no entendimento da terapia, de seus protocolos de aplicação e de seu monitoramento. Estes processos envolvem: a propagação da luz dentro de meios biológicos; as alterações fotoquímicas e fotofísicas das biomoléculas envolvidas (FS, moléculas do tecido/célula em questão), e as modificações nas propriedades ópticas decorrentes destas mudanças (absorção e espalhamento de luz, geometrias teciduais que se modificam ao longo do tratamento etc.); a dinâmica tecidual das substâncias envolvidas, endógenas e exógenas (FS, oxigênio etc.); e os efeitos biológicos associados ao resultado do tratamento, mas que podem modificá-lo, como edema tecidual, dano térmico e alterações vasculares que modificam a distribuição e a dinâmica do FS, bem como a absorção tecidual devida à hemoglobina.

O entendimento e monitoramento destas mudanças são complexos e, por vezes, impraticáveis – ou passíveis de aplicação com detrimento de determinadas informações, ou da preservação da integridade do tecido alvo (ou seja, fazendo uso de procedimentos invasivos). Isto acontece porque as diferentes modificações sofridas pelo tecido são interdependentes, sendo muito difícil individualizá-las por afetarem umas às outras – como exemplo, a destruição de um vaso afeta a dinâmica de FS e oxigênio, assim como a

absorção tecidual, e estes fatores modificam a quantidade de luz depositada no tecido, o que por sua vez afeta a eficiência da terapia, modificando o estabelecimento de dano adicional. Se há necessidade de se preservar o tecido alvo de procedimentos invasivos, a tarefa se torna ainda mais desafiadora, pois exige que o tecido seja investigado usando técnicas que só avaliam o que acontece com ele pelas informações obtidas em sua superfície – ou além dela.

Este é um estudo que surge neste contexto. Ao longo deste trabalho, será apresentada uma proposta para o uso da correlação entre a fluorescência do FS, um derivado de hematoporfirinas, coletada na superfície do tecido e o dano promovido pela TFD (usando o parâmetro de profundidade de necrose como elemento de avaliação da resposta tecidual) para uma dosimetria implícita da TFD, realizada em tempo real e com capacidade razoável de predição dos resultados obtidos ao se aplicar a terapia.

A proposta aqui apresentada tem suas limitações, e não leva em conta todos os elementos que podem ser considerados na TFD. Visto que este estudo é uma tentativa de se obter uma técnica tão completa quanto possível, mas ainda assim simples o suficiente para não interferir na praticidade que um monitoramento clínico necessita, foi preciso partir de pontos básicos, buscando complementações conforme a necessidade se apresentou.

Colocado o foco fundamental deste estudo, passa-se a apresentar com mais detalhes a situação atual das patologias que a TFD se propõe a tratar, a técnica em si e as motivações, limitações e considerações necessárias para tornar a proposta deste trabalho factível.

1.1 Câncer

A denominação “câncer” engloba mais de 100 doenças que apresentam em comum proliferação celular desordenada que invadem órgãos e tecidos, podendo se espalhar para outros locais do corpo (processo conhecido como metástase). Devido à rápida divisão celular, tais células tendem a ser muito agressivas, e podem formar tumores (acúmulo de células cancerosas) malignos ou neoplasias. Por outro lado, é possível que haja com estas células um crescimento mais lento, com pouca alteração com relação às células originais, o que gera o chamado tumor benigno, com baixo risco de vida.

A diferença entre os tipos de câncer advém dos vários tipos de células corporais. Os carcinomas, por exemplo, são tipos de câncer com surgimento nas células do epitélio (como as de pele ou mucosas), enquanto sarcomas são oriundos de tecidos conjuntivos como o

dos ossos, músculos ou cartilagens. A velocidade de multiplicação celular e a capacidade de invadir tecidos, adjacentes ou não (característica de malignidade), também caracterizam os variados tipos de câncer.

As causas do câncer são variadas, estando associadas tanto a elementos ambientais, culturais, profissionais e comportamentais (poluição, exposição a elementos carcinógenos como toxinas, vírus e radiação, ou hábitos como o fumo e a ingestão de álcool, por exemplo), exógenos ao paciente, quanto a alterações celulares promovidas naturalmente por predisposições genéticas e pelas alterações decorrentes do envelhecimento. São mais raros os casos de predisposição genética, muito embora ela exerça um papel importante no estabelecimento de alterações promovidas por fatores ambientais¹. É importante ressaltar ainda que a ocorrência do câncer pode acontecer devido à associação de dois ou mais destes fatores.

No Brasil e no mundo, a maior incidência de câncer é em pele, do tipo não-melanoma (principalmente carcinomas basocelulares e de células escamosas), para ambos os sexos. Apesar da baixa letalidade deste tipo de lesão, o diagnóstico tardio costuma levar a ulcerações e graves deformidades físicas, com alterações estéticas e perdas funcionais e anatômicas dos tecidos comprometidos¹. Por isso, é importante que estas lesões sejam identificadas e tratadas tão precocemente quanto possível, pois assim a morbidade e a complexidade relacionadas ao tratamento em estágios iniciais são inferiores.

1.1.1 Tratamento

Dentre as técnicas tradicionais de tratamento do câncer, podemos destacar a radioterapia, a quimioterapia, e a ressecção cirúrgica. Contudo, estas técnicas possuem desvantagens que podem limitar seu uso.

A quimioterapia e a radioterapia possuem os inconvenientes de destruírem tecidos saudáveis que a elas sejam expostos (de maneira geral: no caso da quimioterapia, todas as células em certas fases do ciclo mitótico; no caso da radioterapia, todas as células irradiadas durante o tratamento). Assim, a não-seletividade dos tecidos envolvidos é um importante efeito colateral destas técnicas. No caso da radioterapia, existe ainda a possibilidade de a radiação utilizada, altamente ionizante, causar danos no ADN (adenina dinucleotídeo) de células saudáveis e promover, por si só, o surgimento de novas alterações celulares. A remoção cirúrgica, por sua vez, muitas vezes é mutiladora, e nem sempre se aplica, dependendo das condições clínicas do paciente (idade, fragilidade orgânica, localização da lesão etc.).

Um problema bastante grave que também diz respeito a todas elas é a questão da determinação de margens: todos estes tratamentos afetam regiões determinadas por uma estimativa de margem de segurança – o que leva ao comprometimento desnecessário de regiões sadias ou – pior – à permanência de células tumorais junto ao antigo sítio da lesão, o que muitas vezes leva, por sua vez, à recorrência ou recrescimento tumoral.

Além disso, é necessário pensar nas questões logísticas de tratamento – os custos e a estrutura para a aplicação de certos recursos, como a radioterapia e a ressecção cirúrgica – as quais muitas vezes inviabilizam o atendimento rápido e eficaz do paciente.

No cenário apresentado, uma técnica bastante promissora no tratamento local de doenças que envolvem a proliferação rápida de células toma vulto: a terapia fotodinâmica (TFD), na qual é baseado este estudo e da qual trataremos a seguir.

1.2 Terapia Fotodinâmica – TFD

1.2.1 A técnica e suas vantagens

A luz, como fonte da vida e ferramenta fundamental de sobrevivência e adaptação, foi utilizada pelo homem desde a Antiguidade para os mais variados fins. Suas propriedades terapêuticas, em especial as da luz advinda do Sol, são reconhecidas pelo senso comum, com relatos que se perdem ao longo da história. Entre as inúmeras aplicações da luz, estudadas desde a ciência mais remota, observou-se a capacidade que certas moléculas (conhecidas coletivamente como “cromóforos”) têm de absorver a energia luminosa e, assim, induzir ou mediar certas reações fotoquímicas.

Contudo, apenas no final do século XIX a luz passou a ser olhada como ferramenta para a destruição de células e micro-organismos, com a observação de Raab². Em 1890, ele pôde observar a morte de micro-organismos, na presença de certos corantes, quando estes foram expostos à luz e ao ar. Aquela observação era o princípio do que viria a ser conhecido como *terapia fotodinâmica*, onde um fotossensibilizador (FS), uma molécula de alta eficiência de absorção de luz em determinados comprimentos de onda, absorve a luz sobre ela incidente e desencadeia uma série de reações (Figura 1). Estas reações culminam com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Por meio delas, chega-se à destruição de estruturas celulares e, portanto, à morte das células (Figura 2). Estas reações envolvem a presença de oxigênio molecular, e podem ocorrer por dois mecanismos: *transferência de*

elétrons (reações tipo-I), com a formação de radicais livres; e *transferência de energia* (reações tipo-II), com a formação de oxigênio singlete.

Figura 1 - Diagrama de Jablonski modificado. Nele, observa-se a excitação da molécula de FS do estado fundamental singlete S_0 para o estado excitado singlete S_1 . É possível ver então as possibilidades de transições vibracionais (processo de *relaxação vibracional*) para o nível fundamental do estado excitado singlete S_1 , ou de *cruzamento intersistema* (csi) para o estado excitado tripleto T_1 (transição proibida, de menor ocorrência). Do estado S_1 , a molécula emite fluorescência (voltando ao estado singlete S_0 fundamental). Do estado T_1 , ela pode fosforescer para o estado fundamental S_0 (transição proibida e, portanto, demorada), ou interagir com o oxigênio molecular (3O_2), transferindo-lhe energia e levando-o de um estado fundamental tripleto T_0 para um estado excitado tripleto T_1 . Este T_1 pode, dependendo do FS e das condições locais, gerar radicais livres (reação tipo I) ou gerar oxigênio singlete (reação tipo II), ambas desencadeando danos celulares.

Em 1903, Tappenier e Jesionek³ realizaram os primeiros testes do efeito fotodinâmico no combate a tumores em humanos, utilizando a eosina como fotossensibilizador. Em 1924, Policard⁴ verificou que era possível encontrar elevadas concentrações de porfirinas em tumores malignos. Essas porfirinas, totalmente inofensivas, tornam-se altamente tóxicas quando na presença de luz e de oxigênio molecular, o que faz delas ótimos fotossensibilizadores. Muitos anos depois, já na década de 1960, Lipson⁵ relata na literatura um tratamento bem-sucedido de câncer de mama utilizando derivados de hematoporfirinas com iluminação somente do tumor com luz visível. Mais tarde, em 1976, Weishaupt, Gomer e Dougherty apresentam a hipótese⁶ de que o oxigênio singlete, formado pela transferência de energia do estado excitado tripleto do FS para o fundamental do oxigênio molecular durante a irradiação, seria o responsável pela destruição das células tumorais. Já ao final da mesma década, os trabalhos de Dougherty e colaboradores consolidam a técnica como uma alternativa no tratamento de tumores, bem como de outras condições clínicas⁷.

Figura 2 - Alvos celulares principais da TFD (adaptado de Henderson e Gollnick, *Biomedical Photonics Handbook*⁸).

A técnica apresenta vantagens que a tornam uma aplicação viável – e mesmo a primeira opção – para alguns tipos de tratamento. Uma das vantagens, talvez a mais importante, é a *seletividade*. Os fotossensibilizadores, de maneira geral, acumulam-se preferencialmente em células alteradas, devido às diferenças estruturais, metabólicas e bioquímicas entre elas como, por exemplo, diferenças de permeabilidade das membranas e no pH citoplasmático, e mais especificamente pela afinidade com certas biomoléculas como, no caso dos derivados de hematoporfirina, a afinidade com receptores de lipoproteínas de baixa densidade⁹. Além disso, devido à alta atividade metabólica de células alteradas, como tumores, em geral há grande disponibilidade de oxigênio. Como a dose de luz utilizada na terapia depende especificamente da quantidade de FS e de oxigênio disponível, células que acumulem ou apresentem maior disponibilidade de ambos sofrerão maior quantidade de dano ao serem irradiadas, e por consequência sofrerão morte antecipadamente. Assim, utilizando quantidades adequadas de FS e de luz, é possível destruir apenas as células-alvo, preservando seletivamente as células saudáveis adjacentes.

Outra vantagem é o uso de radiação na *região do espectro visível da radiação eletromagnética*. Em especial quando considerada a radioterapia, que é uma das mais bem estabelecidas e utilizadas técnicas no combate de lesões cancerosas, esta é uma grande vantagem, pois permite utilizar como ferramenta para o tratamento uma *radiação não-ionizante*, com claras vantagens tanto para o paciente (que não se expõe a uma nova fonte exógena de lesões), quanto com relação às necessidades de instalações clínicas e profissionais relacionadas (além de não haver exposição contínua do profissional à radiação

ionizante, as necessidades de estrutura e de treinamento de pessoal são muito mais simples que as exigidas para uma técnica como a radioterapia).

Também nesse sentido, é importante ressaltar a vantagem, com relação às técnicas existentes, de que esta é uma técnica *ambulatorial* – o que significa que ela pode ser realizada com mínima infra-estrutura e não requer anestesia ou internação na maioria dos procedimentos.

Além disso, a única exigência em termos de infra-estrutura para a terapia são equipamentos para serem usados como fontes de luz, e estas fontes podem ser elaboradas de forma a serem portáteis (em especial com a ampliação recente do uso de dispositivos baseados em *diodos emissores de luz* – LED – em praticamente todas as regiões do espectro visível). Com isso, é possível realizar o tratamento em locais de difícil acesso como, por exemplo, em comunidades distantes dos centros urbanos.

Tal vantagem leva a outra, de grande importância nas questões de logística de tratamento de coletividades: o *custo reduzido*. Desde que não há necessidade de manter uma estrutura complexa para o tratamento, o custo da aplicação da técnica torna-se bastante reduzido quando comparado ao tratamento de uma lesão equivalente usando alguma das outras técnicas. Além disso, levando em conta o contexto brasileiro, os medicamentos têm sido paulatinamente barateados por começarem a ser produzidos nacionalmente (até recentemente, os medicamentos eram exclusivamente importados e, portanto, acabavam custando mais para o usuário final).

Pode-se ainda ressaltar os *resultados clínicos satisfatórios* da aplicação. A morte celular pode ser induzida tanto por meio de necrose (promovida por dano direto extensivo às estruturas celulares, resultando em instabilidade e ruptura da membrana) quanto por apoptose (induzida devido à destruição de estruturas essenciais à manutenção da vida celular, como as mitocôndrias) – a Figura 3 e o diagrama da Figura 4 esquematizam a ocorrência do dano. Contudo, ambos são processos de morte naturais, com os quais o organismo é capaz de lidar de maneira satisfatória. Por isso, em geral não há trauma tecidual e, portanto, cicatrizes e mutilações causadas pela terapia são evitadas, uma vez que o tecido regenerado é composto de células próprias da constituição do local de tratamento. Isto leva a resultados estéticos melhores, que contribuem muito para a qualidade de vida do paciente, e a preservação total ou parcial das funções anatômicas das regiões tratadas que, de outra forma, seriam muitas vezes removidas cirurgicamente, com prejuízo estético e anátomo-funcional.

Figura 3 - A figura ilustra os três principais alvos teciduais da TFD: células tumorais poder sofrer dano e morrer por causa dos efeitos diretos da formação do oxigênio singlete, perecer pelo efeito da depleção de nutrientes e oxigênio causada pelo dano vascular, ou sofrerem o efeito dos ataques do sistema imune/inflamatório ativados pela TFD (adaptado de Henderson e Gollnick, *Biomedical Photonics Handbook*⁸).

Figura 4 - Diagrama esquematizando efeitos biológicos associados com o processo fotodinâmico. É possível apreciar a complexidade e a interdependência dos fatores associados ao dano promovido pela terapia.

Por estas razões, a TFD tem se mostrado bastante bem-sucedida no tratamento de um grande número de lesões de pele¹⁰⁻¹⁶, esôfago¹⁷⁻¹⁹, bexiga²⁰⁻²¹, pulmão²²⁻²⁴ e muitos estudos têm sido realizados para viabilizar seu uso em aplicações como cérebro²⁵⁻²⁶ e próstata²⁷⁻²⁹. Há possibilidades de uso também para outras aplicações, não-oncológicas, dentre as quais podem ser citadas o controle microbológico³⁰⁻³⁵, a eliminação de lesões pré-

malignas como a queratose actínica^{13, 36}, o condiloma induzido por HPV³⁷ e ainda em aplicações estéticas, como *peeling* (remoção de camadas superficiais de pele).

1.2.2 Dificuldades relacionadas à TFD

Apesar do grande número de vantagens, a técnica apresenta algumas desvantagens que, em certos casos, impedem ou dificultam seu bom desempenho.

Uma delas é a *limitação de penetração da luz visível*. As biomoléculas possuem em geral absorção elevada nas regiões do visível que estão mais próximas ao ultravioleta (UV). Contudo, existem dois limitantes para o uso desta região: a limitação de penetração dos comprimentos de onda menores, no visível, e a ionização de moléculas quando se avança em direção ao UV. Por outro lado, o avanço na direção do infravermelho é barrado pela absorção destes comprimentos de onda pela água (principal componente dos organismos vivos), na região acima de 1000 nm. Assim, é necessário utilizar comprimentos de onda dentro do que se chama de “janela biológica”, ou seja, no intervalo em que há absorção relativamente baixa da radiação incidente. Esta janela está aproximadamente entre 450-1100 nm (veja Figura 5), variando conforme o sítio específico de aplicação, e dependendo do FS escolhido.

Um segundo limitante é o *tipo de célula tumoral*. Dependendo de sua origem e tipo de alteração, a sensibilidade da célula à terapia pode ser diferente, uma vez que a farmacocinética do FS utilizado e o aporte de oxigênio não são necessariamente os mesmos para células de diferentes origens, com diferentes estruturas e funções. Além disso, mecanismos de reparo de dano celular, de supressão de moléculas de FS excitadas e/ou de EROs podem existir ou não e, em caso afirmativo, serem diferentes de célula para célula, apresentando eficácia diferenciada da terapia com relação à resposta tecidual.

O *modo de entrega da luz para o tratamento* também pode ser um elemento desfavorável em determinadas aplicações. Uma vez que o sucesso da terapia depende da quantidade de luz entregue ao tecido a ser tratado, é preciso que haja formas de irradiar apropriadamente a região de interesse. Se para lesões de pele é simples resolver este problema, para lesões internas este pode ser um obstáculo difícil de transpor.

Figura 5 - Representação gráfica para demonstrar o motivo da escolha da janela terapêutica, apresentando diferentes componentes teciduais que interferem na propagação da luz em tecidos biológicos. Vale notar que a janela representada na figura é ainda mais restrita que a região citada no texto, dependendo dos elementos presentes no tecido de interesse (adaptado de Mobley e Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook*³⁸).

Atualmente, as aplicações mais simples são as de lesões do epitélio, pois em geral é possível atingir a região a ser tratada por meio do uso de lasers associados a fibras ópticas, levando a luz para o interior de cavidades. Em outros casos, é necessária uma intervenção cirúrgica, o que exige outros recursos que reduzem a característica ambulatorial da técnica. Contudo, ainda assim há estudos que demonstram que a técnica, mesmo associada à cirurgia, pode se apresentar como uma solução favorável – e até preferível – conforme apresentado em estudos recentes de aplicação da TFD em tumores de cérebro²⁵⁻²⁶. Nestes casos, a vantagem vem da alta vascularização das regiões neoplásicas, em contraste às regiões saudáveis, significando um grande aporte de oxigênio e de FS no tumor, em detrimento das células saudáveis, o que leva a um baixíssimo aporte do medicamento nestas últimas. Assim, preserva-se sobremaneira o tecido saudável – o que é indiscutivelmente essencial para o caso de lesões cerebrais, considerando a preservação de funções motoras e cognitivas do paciente após o tratamento. Portanto, nestes casos, passa a ser aceitável a relação custo-benefício de um procedimento cirúrgico para TFD, visto que outras soluções para o tratamento da lesão poderiam acarretar na realização do mesmo, com menor benefício do paciente.

Outro problema importante, decorrente dos anteriores, é a *sobrevivência de células alteradas nas regiões de tratamento*, em especial para lesões volumosas. Este problema pode ter várias causas: ausência de concentração suficiente do FS nas células, diminuição do oxigênio disponível para níveis inferiores aos necessários, quantidade insuficiente de luz

que chega às células (promovidas pela própria terapia ou com causas anteriores a ela, como atenuação da luz no tecido), ou ainda resistência diferenciada das células presentes na lesão à terapia⁸. Sejam elas causas únicas ou associadas, resulta de sua ocorrência uma eventual sobrevivência de células tumorais viáveis. Isso pode, muitas vezes, levar a um recrescimento do tumor, o que em geral piora as condições clínicas do paciente. Adicionalmente, a sobrevivência de células que porventura sejam minimamente mais resistentes à terapia resultará numa espécie de seleção, que poderá levar a lesões mais resistentes a futuras aplicações da técnica – possibilidade esta que vem sendo estudada recentemente³⁹.

Em decorrência das muitas variáveis que interferem na resposta fotodinâmica, e conseqüentemente, no resultado do tratamento, o protocolo de aplicação – que envolve tanto a fotossensibilização quanto a dosimetria – não pode ser padronizado considerando-se apenas o tipo tumoral, seu volume e localização.

Um protocolo idealizado para TFD incluiria uma caracterização óptica do tumor (envolvendo as características de absorção e espalhamento de luz, bem como sua geometria externa e interna, de modo a determinar a distribuição da luz na lesão), bem como o monitoramento da distribuição de FS, da própria luz e da resposta tecidual em tempo real. Esta dosimetria personalizada para cada lesão permitiria que o protocolo fosse ajustado assim que uma mudança acontecesse no tecido tratado. Com tal capacidade de monitoramento, passariam a ser possíveis o controle sobre a extensão do dano, o aperfeiçoamento da capacidade de eliminação de células malignas ou pré-malignas e o gerenciamento adequado dos parâmetros de tratamento (estendendo um tratamento, ou evitando prolongamento desnecessário, por exemplo) conforme a necessidade. A busca por essa personalização da dosimetria, portanto, é fundamental para o aperfeiçoamento da técnica da TFD como tratamento de tumores e lesões pré-malignas.

Com vista a estas características e dificuldades, um dos principais focos dos estudos sobre TFD nos últimos anos está na elaboração de estratégias para contornar, minimizar ou eliminar as dificuldades relacionadas à dosimetria da terapia, tanto com questão às aplicações conhecidas quanto na busca de novas aplicações.

Dentre estas estratégias, uma das mais presentes na literatura é a busca por novos FS, que possam ser excitados com comprimentos de onda mais próximos da região do infravermelho do espectro eletromagnético (desde que ainda dentro da janela biológica, dada a maior penetração dessas radiações no tecido), ou alterações daqueles já existentes para melhorar a eficiência de absorção de luz ou da entrega do FS às células-alvo³⁸. Aumentando a absorção de luz, seria possível melhorar a eficiência de entrega da luz, principalmente para lesões mais volumosas ou mais internas e, portanto, de acesso mais dificultado. Por outro lado, melhorar a entrega do FS permitiria facilitar a obtenção da

concentração ótima do mesmo na lesão, ou viabilizar seu uso para lesões cujas células possuam mecanismos de proteção quanto à sua penetração.

Além disso, técnicas de monitoramento têm sido buscadas, tanto para entender o processo fotodinâmico quanto para buscar formas de acompanhar e melhorar as aplicações da terapia. Nesse sentido, técnicas como a microscopia confocal⁴⁰⁻⁴¹, a tomografia de coerência óptica (mais conhecida pela sigla “OCT”, do inglês *optical coherence tomography*)⁴²⁻⁴³, a tomografia fotoacústica⁴⁴⁻⁴⁵, as técnicas de espalhamento elástico (ou refletância difusa)⁴⁶⁻⁴⁸ e a espectroscopia de fluorescência⁴⁹⁻⁶⁰ têm dado sua contribuição (o Apêndice B trata brevemente dos fundamentos e limitações das técnicas mencionadas).

Com relação às aplicações em TFD, a microscopia confocal tem sido empregada, por exemplo, na observação de imagens de fluorescência como método de identificar os sítios de ação e a toxicidade dos FS⁶¹ e como método de avaliação de apoptose e de peroxidação lipídica celular na TFD^{40, 62}, entre outras aplicações. A técnica de OCT apresenta atualmente um grande número de aplicações, e em TFD tem sido de grande valia na investigação e diagnóstico de lesões como degeneração macular e lesões tumorais/pré-malignas na oftalmologia⁶³⁻⁶⁴, bem como em monitoramento de TFD⁶⁵⁻⁶⁶. Estas técnicas apresentam boa resolução lateral, mas falham em alguns outros pontos, como profundidade bastante reduzida (confocal) ou por necessitarem equipamentos com alta sensibilidade de detecção para meios altamente espalhadores, como os meios biológicos (OCT). Além disso, há relatos na literatura de que a microscopia confocal poderia causar injúria ou morte celular em alguns casos⁶⁷.

A tomografia fotoacústica, por sua vez, tem sido aplicada, por exemplo, no diagnóstico de lesões e no monitoramento de dano vascular durante o tratamento de tumores com a TFD^{43, 68-69}. A limitação da tomografia fotoacústica está na dependência de transdutores fotoacústicos de banda ultralarga, e na velocidade de detecção dos transdutores. Já o uso de refletância difusa está relacionado com várias aplicações em TFD para monitoramento de propriedades ópticas com diversas aplicações^{46-48, 70-72}, muitas vezes conjugadas com técnicas de fluorescência ou com métodos numéricos, como Monte Carlo

73-76

Tais técnicas, de modo geral, são limitadas pela própria falta de compreensão aprofundada dos fenômenos que regem as interações de espalhamento para diferentes tamanhos e estruturas de partículas. Isto é especialmente válido para meios como os tecidos biológicos, onde um grande número de partículas de tamanhos e propriedades muito variados está disposto em arranjos únicos e, por vezes, heterogêneos. Isto torna difícil determinar com clareza o quanto cada um dos diferentes tipos de espalhamento é determinante em um dado material.

No caso das simulações de Monte Carlo, os resultados são bastante satisfatórios, mas demandam potencial computacional e tempos longos para obtenção dos resultados desejados. Além disso, é requerido um grau razoável de conhecimento prévio sobre quais fenômenos ou tipos de partículas (incluindo suas propriedades ópticas) se trata em cada situação. Tais características são cruciais na escolha da técnica para uso em tempo real, uma vez que o conhecimento prévio sobre as componentes teciduais nem sempre é possível, e que o tempo requerido para obtenção do resultado pode ser longo.

Por isso, visando um tratamento simplificado das condições de tratamento – dada a necessidade de monitoramento factível e em tempo real do FS durante a TFD – neste trabalho foi escolhida a espectroscopia de fluorescência como ferramenta de investigação e monitoramento tecidual durante a terapia (pode-se encontrar, no Apêndice B, os fundamentos da técnica apresentados de forma mais detalhada).

Como técnica, a espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta com grande potencial para aplicação clínica, uma vez que torna possível identificar estruturas fluorescentes por meio das características de emissão espectral da molécula. Para meios de baixa turbidez, é possível mesmo quantificar a concentração de uma substância específica, pois nesses casos pode-se estabelecer uma relação direta de proporcionalidade entre a quantidade do composto analisado e a fluorescência emitida – desde que não haja saturação (formação de precipitados ou agregados) do sistema.

Além disso, a emissão de fluorescência pode ser gerada com luz laser, facilitando o uso de fibras ópticas para condução da luz de excitação até o tecido-alvo, bem como para coletar a fluorescência gerada. Associando-se isso ao uso de espectrofotômetros comerciais atuais, é possível obter dispositivos compactos e de alta qualidade para investigação de fluorescência, o que viabiliza os custos e a disponibilização da técnica clinicamente.

Esse tipo de instrumentação, utilizada em investigações feitas na superfície do tecido de interesse, viabiliza uma técnica minimamente (em alguns casos, totalmente) não-invasiva, o que é extremamente desejável considerando as consequências de procedimentos invasivos em determinadas lesões, como os diferentes tipos de câncer. Todas estas características tornam a espectroscopia de fluorescência uma poderosa ferramenta de investigação tecidual.

Apesar deste potencial, ela apresenta uma série de limitações e desafios que devem ser considerados para um monitoramento adequado de procedimentos terapêuticos para diagnóstico ou tratamento. Em meios túrbidos (que é o caso da maioria dos tecidos biológicos), tanto a luz de excitação quanto a da emissão sofrem influência de efeitos físicos variados, causados pela própria organização, estrutura e pelos constituintes destes tecidos. Em lesões tumorais, em especial, a presença de tecidos com diferentes composições, em diferentes fases de desenvolvimento, e com angiogênese exacerbada, cria interfaces e

diferenciações de composição que tornam o uso da espectroscopia em sistemas biológicos (em geral de alta turbidez) uma tarefa com um grau de complexidade muito maior^{54, 56, 77-81}.

Entre os efeitos acima citados, a turbidez tecidual faz com que a intensidade da luz de excitação seja diminuída pelos elementos absorvedores, e com que tome direções de propagação difíceis de serem previstas, devido ao espalhamento associado a esta turbidez. A luz emitida por um fluoróforo no meio também passa por tais obstáculos antes de abandonar o meio e chegar à superfície, para ser seja finalmente capturada por um detector. Em meios de turbidez elevada, a luz da fluorescência é espalhada pelos compostos espalhadores, moléculas e estruturas de tamanhos variados, que modificam a direção original dos fótons incidentes, de modo similar ao ocorrido com a excitação. Parte da fluorescência pode ser absorvida por cromóforos (absorvedores) presentes no meio – a principal delas a hemoglobina, em tecidos biológicos – e isto modifica a intensidade de fluorescência obtida para os comprimentos de onda absorvidos, podendo mesmo mascarar a existência de uma resposta de fluorescência em dadas regiões do espectro – cuja evidência pode se detectar por depressões ou vales no espectro. Devido a estas interferências, a fluorescência coletada é a porção desta capaz de chegar à superfície do tecido, tendo sofrido as distorções causadas por estes efeitos em seu caminho. Isto faz com que a investigação da presença e da quantificação da concentração de compostos específicos em meios túrbidos, através de técnicas ópticas, seja complexa e de resultados com precisão variável^{78-79, 81-83}.

Para considerar apropriadamente esta complexidade, além da turbidez é preciso ainda levar em conta que as propriedades ópticas de um mesmo cromóforo podem variar apenas com a mudança no comprimento de onda de excitação, e com a própria estrutura do cromóforo; portanto, estas propriedades são diferenciadas de acordo a composição do tecido investigado. Isto nem sempre é um problema, pois o fato de se obter emissões diferentes do mesmo cromóforo de acordo com a excitação permite tanto uma melhor caracterização do mesmo quanto expande o potencial diagnóstico e terapêutico, mas é preciso ser levado em conta. Neste sentido, o uso de dispositivos adequados, com filtros ópticos apropriados para a detecção dos comprimentos de onda de interesse, é fundamental para o sucesso da técnica nestas aplicações. O metabolismo tecidual também pode interferir com tais propriedades, pois os cromóforos e a sua interação com a luz sofrem influência dos meios nos quais estão inseridos e de suas modificações^{56, 84}.

Outra limitação possível para a técnica, de acordo com a aplicação, é o comprimento de onda utilizado. Como a espectroscopia de fluorescência em tecidos biológicos usa para excitação comprimentos de onda na região do visível e do começo do UV próximo (raramente menores que 350 nm), a penetração da luz é bastante limitada pela absorção tecidual. Nestes meios, a luz visível tem penetração cuja ordem varia de milímetros a

centímetros (de acordo com as propriedades ópticas), podendo ser ainda menor no início do UV. Isso limita a penetração da luz e, portanto, a profundidade de investigação permitida pela técnica.

Mesmo frente aos desafios envolvidos com a detecção apropriada da fluorescência, a possibilidade de investigar os tecidos de maneira não-invasiva, para monitorar uma substância com alta eficiência de emissão fluorescente como os FS em geral, torna a técnica atraente para o monitoramento da TFD.

1.3 A espectroscopia de fluorescência e a TFD

Nas aplicações de TFD, a espectroscopia de fluorescência é comumente utilizada no monitoramento dos FS *in vivo* devido ao alto rendimento quântico que estes últimos freqüentemente apresentam (o que quer dizer que o valor da razão entre fótons emitidos *via* fluorescência e absorvidos pela molécula fluorescente é, em geral, alto).

O uso desta técnica para verificar a presença de FS tecidual, assim como buscar uma quantificação do mesmo, apresenta grandes vantagens. Uma delas é a de que esta é uma técnica *não-invasiva* – o que quer dizer que não se induz nenhum tipo de injúria ou alteração no tecido investigado, e não exige, por exemplo, coleta de amostra tecidual ou os procedimentos associados a uma análise química. Além disso, ela permite obter uma resposta em *tempo real*, devido à resposta rápida da fluorescência à excitação, tornando mais rápidos e seguros os procedimentos clínicos, por ser possível identificar imediatamente a presença ou ausência do espectro do FS no tecido. Isto faz com que não seja necessário esperar por análises laboratoriais, as quais demandam tempo e que poderiam impossibilitar a identificação do momento em que ocorre máxima presença do FS no tecido⁸⁵.

A turbidez do meio é sempre uma grande dificuldade a ser superada nestas medidas. Embora a luz da fluorescência sofra variadas interações em seu caminho até sair do tecido devido à turbidez, determinar a concentração do FS dentro dele dificilmente poderia ser feita de uma maneira diferente da quantificação da intensidade de fluorescência observada em sua superfície, de forma não-invasiva. Outras técnicas certamente exigiriam a remoção de tecidos ou outros recursos, o que provocaria danos ou prejuízos à aplicação da terapia, ou mesmo ao paciente.

1.3.1

Cinética e degradação do FS

Ao avaliar a alteração da fluorescência do FS durante a terapia fotodinâmica, é preciso levar em conta duas importantes características do processo: a *cinética* do FS e a *fotodegradação* do mesmo.

Por cinética do FS, entende-se a dinâmica de entrega, acúmulo e eliminação do FS no organismo/tecido a ser estudado ou tratado. Já o termo fotodegradação implica na alteração da molécula promovida pela irradiação, de maneira direta (*photobleaching*, ou degradação pela absorção de um dado número de fótons com energia suficiente para tal) ou indireta (por conta dos processos fotofísicos desencadeados pela irradiação, como a formação de espécies reativas que destroem as moléculas do FS).

Estas características merecem destaques entre outros fenômenos que ocorrem durante a irradiação porque ambos os processos interferem diretamente na avaliação do FS por fluorescência, uma vez que a fluorescência do FS depende diretamente de sua concentração.

No caso da fotodegradação, este problema reflete-se no fato de que a destruição ou alteração das moléculas faz com que se alterem os níveis de energia das mesmas. Destes níveis de energia dependem tanto a formação das EROs quanto a emissão de fluorescência e, portanto, a degradação da molécula reflete em sua perda de função para a TFD – e, conseqüentemente, de emissão de fluorescência.

Já no caso da cinética do FS, a explicação é mais simples: formado no organismo através da administração de um precursor, ou administrado em sua forma final ao tecido alvo, as moléculas do FS levam um período de tempo para se acumular no tecido alvo; além disso, ocasionalmente essas moléculas serão eliminadas do mesmo. Para que haja uma concentração suficiente do FS no tecido de modo a obter o resultado desejado na aplicação da TFD, é necessário levar em conta esta dinâmica, de modo a trabalhar nas condições mais próximas do máximo de acúmulo do FS no tecido. É importante ainda destacar que a heterogeneidade de distribuição de FS no tecido, em especial no que diz respeito a tumores (devido principalmente à angiogênese tumoral), interfere de maneira importante nessa cinética e na capacidade de monitoramento do FS. Por isso o monitoramento em tempo real das lesões tem papel importante na avaliação da resposta fotodinâmica do tecido⁸⁶⁻⁸⁷.

Por estas razões, qualquer monitoramento que se pretenda fazer do FS utilizando a fluorescência do FS deve levar em conta ambos os processos.

1.4 Objetivos

Considerados os pontos levantados nesta discussão inicial, o objetivo principal deste trabalho foi o de *elaborar um modelo matemático que seja tão completo quanto o conhecimento sobre a TFD atual permite, mas simples o suficiente para ser aplicado em um monitoramento não-invasivo e de tempo real durante aplicações clínicas da terapia, para permitir a previsão da profundidade de necrose e, portanto, da extensão do dano causado – ou seja, da efetividade da TFD.*

Adicionalmente, com o desenvolvimento deste modelo, pretendeu-se *utilizar o modelo desenvolvido para, dentro de suas possibilidades de previsão, ampliar o entendimento sobre os resultados da TFD, explorando possibilidades de modificações de protocolos de dosimetria para orientar novos estudos pré-clínicos e clínicos de TFD.*

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais e o modelo teórico nos quais este trabalho foi embasado e através dos quais foi realizado, bem como o processo computacional utilizado para a obtenção dos dados das previsões pelo modelo, para comparação com a experimentação.

2.1 Animais

O estudo utilizou experimentação com modelo animal de ratos Wistar, machos, de peso entre 200 g e 250 g, para aplicação da TFD em tecido hepático saudável, de forma a obter resultados de morte tecidual para comparação com o modelo teórico proposto. Estes animais foram mantidos durante todo o processo experimental em concordância com as orientações do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP, Ribeirão Preto, Brasil – Protocolo n° 096/2008, Anexo A).

2.2 Sistema de espectroscopia de fluorescência

Para avaliação da presença do FS no tecido, *in vivo*, foi utilizado um sistema de coleta de fluorescência por espectroscopia. Sua utilização tornou possível identificar as bandas específicas de emissão das porfirinas (em aproximadamente 620 nm e 680 nm, utilizando excitação em 532 nm), evidenciando sua presença no tecido, e avaliar a quantidade de FS presente, através da intensidade de fluorescência observada na região espectral destas bandas.

O sistema utilizado foi o “Spectral-Fluorescence System for Diagnosis of Malignant Tumors, ‘Spectr-Cluster’”, v. 2.05m (Cluster Ltd., Moscou, Rússia). Ele é composto por um laser de Nd³⁺:YAG emitindo em 532 nm (emissão de segundo harmônico) como fonte de excitação e um espectrômetro para coleta de fluorescência na região entre o visível e o infravermelho próximo (540–850 nm). O laser de excitação foi acoplado a uma fibra óptica

tipo “Y”, parte integrante do sistema Spectr-Cluster. Esta fibra entrega a luz de excitação por meio de uma fibra óptica central (diâmetro: 130 μm) e coleta a fluorescência emitida na superfície do tecido através de outras seis fibras ópticas (diâmetro 100 μm), dispostas simetricamente em torno da fibra central de entrega. A potência de saída na ponta da fibra foi de cerca de 7 mW, de forma a minimizar efeitos térmicos ou de degradação, devido à incidência da luz de excitação durante a coleta de fluorescência. O tempo de coleta para um espectro (média de 5 espectros pontuais) de fluorescência foi sempre de, no máximo, 10 s.

Um detalhe da coleta deve ser mencionado: a luz retroespalhada pelo tecido é cerca de mil vezes mais intensa que o restante do sinal, oriundo da fluorescência. Para permitir a análise desta, o espectrômetro utiliza filtros ópticos acoplados, centrados no comprimento de onda de excitação (nesse caso, um filtro que permite a passagem de comprimentos de onda maiores que 540 nm; vide próxima seção). Assim, reduz-se a intensidade da luz retroespalhada coletada. A luz vinda de retroespalhamento pode ser observada nos espectros como um sinal que, depois de atenuado, é de magnitude comparável ao restante do espectro de luz observado. Contudo, embora o detalhe seja digno de nota, a atenção neste estudo deve-se concentrar na informação fornecida pelos picos de emissão de fluorescência relacionados ao FS e na autofluorescência, obtida previamente à administração do FS.

2.3 Procedimento TFD

2.3.1 *Fotossensibilizador*

Os estudos desenvolvidos nesta tese foram realizados usando um derivado de hematoporfirina, Photogem[®] (PG; Photogem[®] LLC Co., Moscou, Rússia). Esta substância é em geral descrita como sendo quimicamente similar ao Photofrin[®]. Tanto o Photogem[®] quanto o Photofrin[®] são misturas de monômeros, dímeros e oligômeros de derivados de hematoporfirina, e fotossensibilizadores de primeira geração. As particularidades de cada um não são relevantes para este estudo.

As soluções de estoque (5 mg.ml⁻¹) de Photogem[®], tamponadas em solução salina de tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, foram armazenadas no escuro a 4 °C.

2.3.2 Fonte de Luz

A fonte de luz para os diferentes procedimentos de irradiação na TFD foi um laser de diodo, operando em 630 nm (Ceralas®, Ceramoptec, Alemanha). O comprimento de onda foi escolhido com base no compromisso ativação do FS *versus* penetração no tecido (janela biológica). A Figura 6 apresenta um espectro de absorção do Photogem®, mostrando que 630 nm é uma das regiões de maior comprimentos de onda dentro da janela de absorção do FS, o que justifica sua escolha.

Para conduzir a luz à região de iluminação, uma fibra ótica de 300 μm foi utilizada. Acoplado à saída da fibra, um dispositivo formado por um conjunto de lentes permitiu uniformizar a emissão de luz (com perfil inicialmente Gaussiano) na saída da fibra, de forma a produzir uma região circular com área de irradiação de intensidade uniformemente distribuída.

O tamanho desta região foi obtido controlando a distância entre a ponta da fibra e a superfície do tecido alvo. A região de irradiação foi ajustada para 1 cm^2 para todos os experimentos.

2.3.3 Irradiação

Fígados normais de rato foram utilizados como modelo para o estudo do parâmetro de profundidade de necrose como função da fluência. Para experimentos de indução de necrose de fígado e fotodegradação *in vivo*, 57 ratos machos Wistar foram utilizados, sendo 27 no primeiro grupo, 15 no segundo grupo e 15 no terceiro grupo (Tabela 1). Antes da manipulação, os animais foram anestesiados usando quetamina 5% (Vetanarcol®, Konig), dose 0,08 mL por 100 g de massa corporal, e xilazina 2 g (Coopazine®, Coopers), em dose de 0,04 mL por 100 g de massa corporal. Uma solução estoque de concentração 5 mg.mL^{-1} (0,9% de NaCl) de FS foi preparada e administrada em concentração 1,5 mg/kg de massa corporal por meio da veia cava inferior, acessada por meio de cirurgia⁸⁸. Trinta minutos após o FS ser injetado⁸⁹, verificou-se o máximo de concentração no fígado por meio da espectroscopia de fluorescência (assumindo que a máxima emissão representa a máxima concentração). O lobo direito de cada fígado, na posição central, foi então irradiado.

Os experimentos foram realizados utilizando diferentes fluências e intensidades de luz. As intensidades foram mantidas constantes para cada sequência de experimentos, e o tempo de irradiação foi variado de forma a obter o valor final de fluência total de luz aplicada

(0-1800 s). Em cada grupo, os animais foram divididos em subgrupos de três elementos, para que houvesse reprodutibilidade dos dados experimentais e obtenção de valores médios para as profundidades de necrose.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais

Fluências\Grupos	G1 (250 mW/cm²)	G2 (150 mW/cm²)	G3 (350 mW/cm²)
50 J/cm²	3	3	3
100 J/cm²	3	3	3
150 J/cm²	3	3	3
200 J/cm²	3	3	3
250 J/cm²	3	3	3
300 J/cm²	3	-	-
350 J/cm²	3	-	-
400 J/cm²	3	-	-
450 J/cm²	3	-	-

No primeiro grupo (G1), utilizado para estabelecer o modelo teórico, foi utilizada intensidade de 250 mW/cm² e doses entre 0-450 J/cm² (intervalos de 50 J/cm²). Os animais foram subdivididos em nove subgrupos para as diferentes fluências totais, com três animais em cada subgrupo. Devido às observações realizadas no grupo experimental G1 com relação ao comportamento das profundidades de necrose obtidas para as fluências estudadas, o número de subgrupos nos grupos G2 e G3 foi reduzido de nove para cinco, para evitar as maiores fluências (mais detalhes no capítulo de Resultados e Discussão). Por isso, nos outros dois grupos, os quais foram utilizados para avaliação do modelo e de adequações do mesmo a diferentes condições experimentais, escolheram-se as intensidades de 150 mW/cm² (G2) e 350 mW/cm² (G3). Em cada um dos grupos G2 e G3, portanto, os animais foram divididos em cinco subgrupos para as diferentes fluências totais (0-250 J/cm², com intervalos de 50 J/cm²), tendo cada subgrupo três animais, a título de reprodutibilidade.

É importante mencionar que, para que a luz utilizada na terapia não interferisse na coleta de fluorescência – visto que ambas estão na mesma região do espectro luminoso e que não é possível, portanto, filtrar a luz de tratamento – a irradiação foi interrompida por curtos intervalos de tempo para que a coleta de fluorescência fosse realizada.

2.3.4

Coleta de fluorescência

Realizou-se a quantificação da porção ativa do FS por meio da espectroscopia de fluorescência na região irradiada, imediatamente antes e durante o procedimento da TFD. Os espectros de fluorescência coletados foram obtidos através do posicionamento da fibra em contato com o tecido, perpendicularmente. O tempo de exposição total à luz de excitação de fluorescência para cada etapa de medida (que inclui a coleta de 5 espectros) foi de até 10 s, de forma a minimizar a degradação desnecessária das moléculas do FS devido à exposição à luz de excitação. Além disso, curtos períodos de medida devem minimizar o fracionamento da entrega de luz ao tecido, o que modifica a resposta fotodinâmica (conforme mencionado no último parágrafo da seção anterior)¹⁵.

Para os grupos G2 e G3, pretendeu-se utilizar medidas de fluorescência da região adjacente à tratada para levar em conta a eliminação do efeito da farmacocinética do FS – isto é, levar em conta a fluorescência da região não-iluminada para associar às previsões do modelo apenas o decréscimo de fluorescência devido à TFD. Por isso, a cada interrupção da iluminação, foram coletados nestes grupos 10 espectros: 5 na região de irradiação e 5 fora dela, na vizinhança. Isto aumentou o tempo de coleta para aproximadamente 15-18 s por interrupção (esta é uma informação importante, que será relevante ao longo da discussão deste estudo).

Foi observada a degradação *in vivo* do FS por fluorescência ao longo da irradiação. Os espectros de fluorescência (entre 540-850 nm) foram registrados em diferentes momentos. O primeiro deles foi antes da sensibilização dos animais com Photogem® (quando se coleta a chamada autofluorescência, ou seja, a fluorescência própria do tecido). Trinta minutos depois da injeção do FS, foram coletados espectros pré-irradiação (imediatamente antes), durante a irradiação (em intervalos a cada 60 s) e ao término da irradiação.

A cada intervalo, durante a irradiação, a luz de tratamento foi interrompida para a aquisição dos espectros de fluorescência. Cinco espectros de fluorescência foram coletados de diferentes regiões dentro da área irradiada. O espectro de autofluorescência obtido antes da fotossensibilização foi subtraído dos espectros após a sensibilização. O que resulta deste tratamento é um espectro com duas bandas que estão relacionadas fundamentalmente ao FS presente no tecido. Na figura 6, um espectro típico de autofluorescência e da fluorescência do FS dentro do tecido são apresentados.

Figura 6 - *Acima*: Espectro típico de absorção para o FS Photogem®; as linhas verticais indicam a região usada para irradiação (630 nm, cheia) e excitação de fluorescência (532 nm, tracejada). *Abaixo*: Espectros típicos de fluorescência de tecido hepático sem o FS (autofluorescência, linha tracejada) e 30 min após administração do mesmo (linha sólida), depois de normalizados. Para o espectro do tecido sensibilizado, a autofluorescência foi subtraída. Cada espectro é a média de 5 medidas realizadas aleatoriamente na região de interesse no tecido.

Foram coletados espectros de fluorescência para avaliar a variação da emissão durante o tratamento. Esses espectros foram coletados tanto dentro da região irradiada quanto da região adjacente a ela (que não foi iluminada). A variação de fluorescência observada na região não iluminada (após a subtração da autofluorescência) representa a variação relacionada à farmacocinética natural do FS. Estes espectros iniciais foram subtraídos dos espectros de emissão do FS coletados na região de tratamento – é importante ressaltar que, nos grupos G2 e G3, posteriores ao grupo inicial, esse procedimento foi feito a cada etapa de medida, e não apenas no início (com aumento de

tempo total de coleta de, no máximo, 5 segundos). Como resultado disso, foi possível obter a variação relacionada apenas às fototransformações do FS.

Importa notar que a escolha do comprimento de onda de excitação da fluorescência (532 nm) difere da utilizada para excitação (630 nm). Como explicado na seção 2.3.2., a escolha de 630 nm está relacionada com a janela biológica e a absorção do FS. Contudo, a coleta de fluorescência com excitação nessa região fica comprometida, visto que a absorção do FS nessa região, embora suficiente para promover o efeito fotodinâmico, não permite uma coleta eficiente de fluorescência. O gráfico da Figura 6 apresenta um espectro de fluorescência gerado com excitação em 532 nm; nele, é possível perceber que pouco da banda de emissão restaria para ser observada se a excitação ocorresse em 630 nm. Por isso, como existe uma melhor eficiência de fluorescência com excitação em 532 nm, escolheu-se esse comprimento de onda para obtenção da fluorescência.

A necessidade da interrupção na iluminação do tecido para coleta de fluorescência também é explicada por essa escolha, uma vez que os filtros de coleta de fluorescência barram a luz até aproximadamente 540 nm, deixando passar a luz de tratamento. Portanto, se a irradiação continuasse, seria impossível coletar a fluorescência, uma vez que o sinal da luz de tratamento é muitas ordens de grandeza superior ao da fluorescência.

2.3.5 *Recuperação pós-tratamento e análise histológica*

Após a irradiação, os animais foram suturados para recuperação. Trinta horas após o fim da irradiação, foram eutanasiados por meio de *overdose* anestésica, e os fígados foram removidos⁹⁰. A região irradiada do fígado foi analisada macroscopicamente e amostras foram preparadas para análise histológica, com enfoque principal nos aspectos de necrose e na extensão da profundidade de necrose (d_{nec}).

2.3.6 *Análise da taxa de degradação*

Os espectros típicos de fluorescência para o fígado (autofluorescência) e para o Photogem[®] em fígado antes, durante e depois da irradiação foram obtidos. A subtração de autofluorescência foi realizada para que se obtivesse apenas a contribuição do FS (isto é, o espectro da intensidade de fluorescência correspondente apenas ao FS) como função do tempo de iluminação. Os espectros do FS em cada animal foram normalizados pela

amplitude (nos máximos de emissão, em 620 nm) do espectro coletado previamente ao início da iluminação – que corresponde ao máximo de FS presente no tecido. Desta forma, obteve-se a razão da fluorescência (RF) coletada ao longo da irradiação, com base no início da aplicação da TFD. Conforme descrito, cinco espectros foram coletados de cada região de iluminação a cada intervalo de coleta, em cada condição e animal, e os dados apresentados para cada situação neste estudo foram gerados pela média das amplitudes destes cinco espectros. As barras de erro apresentadas representam o desvio padrão, relacionado à obtenção destas médias.

Convém mencionar que as normalizações pela área e pelo segundo máximo, em 680 nm, também foram realizadas para simples conferência, não demonstrando desvio dos resultados obtidos pelo máximo em 620 nm.

2.3.7 *Monitoramento dos efeitos térmicos no procedimento da TFD*

Os possíveis efeitos térmicos durante a aplicação da TFD foram monitorados no fígado em função do tempo de iluminação, usando um termistor (Modelo 120–202 EAJ, Fenwal Electronic, Milford, MA, EUA), conectado a um dispositivo de aquisição de dados, para irradiação utilizando o parâmetro de 250 mW/cm². Um software específico foi desenvolvido em LabView[®] para permitir a visualização em tempo real dos resultados. Os valores de temperatura foram medidos em intervalos de 1 s.

Os resultados obtidos mostraram que a temperatura durante a iluminação atingiu valores entre 40 °C e 42 °C, compatíveis com observações já reportadas na literatura⁹¹. Esta temperatura final pode ser vista como um indicativo de ocorrência de uma leve hipertermia, principalmente para períodos prolongados de iluminação.

2.3.8 *Estatística*

Os valores de fluorescência medida e de profundidade de necrose no fígado, para o grupo experimental G1, foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), combinada com testes de Student-Newman-Keuls. Para todos os testes, um valor de P menor do que 0.05 foi considerado como estatisticamente relevante.

2.4 Modelo – elaboração e aperfeiçoamento

Para investigar a correlação entre a concentração de FS monitorada pela fluorescência e a profundidade de necrose, obtidas devido à TFD, foi elaborado um modelo teórico simplificado para avaliar um parâmetro de correlação, que recebeu a designação de “parâmetro de correlação entre fluorescência e dano”, e para o qual foi adotado o símbolo ψ .

Neste modelo, os parâmetros envolvidos na TFD foram trabalhados tão completamente quanto as condições experimentais disponíveis permitiram. Ainda assim, procurou-se obter um modelo tão simplificado quanto possível, de forma a tornar o processo de monitoramento da TFD passível de ser realizado com simplicidade em eventuais aplicações clínicas.

Em aproximação simples, mas razoável, pode-se considerar que a distribuição da intensidade de luz varia durante a TFD devido à degradação do FS, o que leva a uma mudança no coeficiente de absorção do mesmo e, portanto, no coeficiente de atenuação do tecido no qual este se encontra inserido. A degradação do FS depende de sua concentração e da intensidade de luz locais, bem como da quantidade de oxigênio disponível.

Numa primeira aproximação, a variação da concentração do FS, $C(x,t)$, pode ser descrita pela seguinte equação

$$\frac{d}{dt} C(x,t) = -\beta \cdot [O_2] \cdot I(x,t) \cdot C(x,t), \quad (1)$$

onde β é o coeficiente que determina a taxa de fotodegradação do FS, x é a profundidade ou a coordenada de propagação de luz, tal que $x = 0$ corresponde à superfície, aumentando com a profundidade no tecido e $I(x,t)$ a intensidade de luz. Na equação (1), a concentração de oxigênio é dada por $[O_2]$. O decréscimo de oxigênio presente no tecido durante a TFD foi considerado, como sendo dependente do tempo decorrido, de modo representado por

$$[O_2] = [O_2]_0 \cdot [\exp(-t/\tau_1) + \exp(-t/\tau_2)], \quad (2)$$

com τ_1 e τ_2 ajustáveis e $[O_2]_0$ tomado como 1, ou 100% (tal que o parâmetro β é determinado de forma a incluir o valor de estimativa inicial da concentração de oxigênio). Esta soma de exponenciais pode ser considerada como representando diferentes contribuições para a variação na concentração de oxigênio durante a iluminação, tais quais a dinâmica natural do

oxigênio tecidual e o consumo fotodinâmico de oxigênio molecular (promovido pela vasoconstrição e pelos danos vasculares).

A concentração do FS no tempo $t+\Delta t$ é calculada com a equação (3), onde a concentração de O_2 é dada pela equação (2).

$$C(x, t + \Delta t) = C(x, t) + \frac{d}{dt} C(x, t) \cdot \Delta t \quad (3)$$

Modificações nas propriedades ópticas do tecido, induzidas pela TFD, não foram consideradas inicialmente (ou seja, na primeira versão, gerada usando os dados do grupo G1). Neste caso, a intensidade $I(x, t)$ depende da concentração local do FS e das propriedades ópticas intrínsecas do tecido, consideradas nesta etapa como independentes do tempo.

A variação temporal da intensidade luminosa pode ser descrita como

$$\frac{d}{dt} I(x, t) = -[\alpha_T] \cdot I(x, t) \quad (4)$$

com

$$\alpha_T = \sigma \cdot C(x, t) + \alpha, \quad (5)$$

na qual α_T é o coeficiente de atenuação total, σ representa a seção de choque de absorção da luz para o FS em 630 nm, e α representa o coeficiente de atenuação intrínseco do fígado para 630 nm, o qual é influenciado por absorção e espalhamento de luz.

No momento $t+\Delta t$, a intensidade pode ser calculada a cada passo de profundidade $x+\Delta x$ utilizando a expressão (6)

$$I(x + \Delta x, t) = I(x, t) + \frac{d}{dx} I(x, t) \cdot \Delta x. \quad (6)$$

Para a simulação numérica deste modelo, um algoritmo foi computado em MATLAB® (a figura Figura 7 e o Apêndice A apresentam um fluxograma da rotina). Foi utilizado um conjunto de condições iniciais para representar um tecido de fígado típico. Os valores de σ e α utilizados foram, respectivamente, $1,4 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^2$ e $0,163 \text{ cm}^{-1}$. Tais valores estão em concordância com aqueles reportados na literatura⁹²⁻⁹³. O valor obtido para β ($0,00058 \text{ J}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{cm}^5$, ver capítulo *Resultados e Discussão*) corresponde ao melhor ajuste da curva aos dados experimentais, e não há fonte disponível para comparação. Os intervalos para iteração, na rotina, foram de 10 s (tempo) e 0,01 mm (profundidade).

Os valores para profundidade de necrose (d_{nec}) foram determinados a partir das curvas de fluência como função da profundidade (x), considerando um limiar de dose ou fluência de 20 J/cm² (valor aceitável dentro do intervalo previsto na literatura⁹⁴). Este valor é obtido com base na suposição de uma iluminação superficial assumida como um valor de fluência D_0 e um decaimento exponencial simples, o qual permite escrever (como aproximação) a expressão $d_{nec} = \delta \cdot \ln(D_0 / D_{th})$, na qual δ é a penetração efetiva da luz para um dado tecido e num dado comprimento de onda e D_{th} o limiar de fluência. Os experimentos convencionais envolvendo as medidas de d_{nec} versus D_0 mostram que esta aproximação⁹⁴ é aceitável.

No modelo, os valores de τ_1 e τ_2 foram ajustados como sendo, respectivamente, 290 s e 310 s. Tais valores foram ajustados para obter a melhor concordância entre experimentação e predição do modelo durante a primeira etapa do trabalho (usando dados do grupo G1), onde este último foi estabelecido.

A fluência local D de luz para cada posição foi obtida através da integração da intensidade local pelo tempo ($D = \int I \cdot dt$) para o período completo de iluminação. O cruzamento de $D(x,t)$ com a dose limiar D_{th} (considerado como 20 J/cm²) determina a profundidade de necrose para cada tempo de iluminação.

Os perfis de concentração para o FS, obtidos pelo modelo, foram elaborados para diferentes tempos de iluminação. Um valor de 1 mg/kg (equivalente à normalização da concentração do FS injetado no animal) foi assumido como o valor inicial de concentração. Fazer essa consideração permite levar em conta que parte do FS que é injetado não é entregue ao tecido alvo – consideração especialmente importante neste caso, onde se trata tecido normal e, portanto, o acúmulo não é seletivo. Além disso, usar o valor de “1” equivale a assumir esse valor como 100% do FS presente, o que facilita a extrapolação dos resultados do modelo na forma de percentual de consumo/eliminação do medicamento durante a irradiação.

Quanto a assumir tal condição, é preciso enfatizar o desafio que ainda precisa ser vencido no que diz respeito ao uso da espectroscopia de fluorescência como ferramenta para extrair concentrações precisas de FS de um meio turbido⁸⁹, devido às propriedades ópticas destes meios. Por conta disso, não é verdadeiro afirmar que uma razão de “um-para-um” entre concentração e fluorescência é válida. Contudo, levando em conta uma relação de proporcionalidade tal que a fluorescência decresça proporcionalmente à fotodegradação ocorrida, torna razoáveis as escolhas acima descritas.

A profundidade de necrose obtida pelo modelo foi dada pela profundidade em que D_{th} é atingido. A partir da d_{nec} calculada e da concentração de FS superficial, Ψ pode ser calculado teoricamente, como

$$\Psi = RF \cdot d_{nec} \quad (7)$$

(onde RF é a “razão de fluorescência”, variando entre 0 e 1, ou entre 0% e 100% do FS presente na região de irradiação).

Conforme descrito acima, a primeira parte do trabalho foi realizada com um dos conjuntos de dados (G1). Esta primeira versão do modelo foi utilizada nos conjuntos de dados G2 e G3, que representam os resultados experimentais para diferentes intensidades.

Para satisfazer aos três conjuntos de dados, os parâmetros τ_1 e τ_2 deixaram de ser ajustados. Eles foram tomados com base em observações feitas na literatura quanto ao comportamento do oxigênio durante a TFD, devido ao estabelecimento do campo de luz⁹⁵, e à relação que os dados de Aveline *et al.*⁹⁶ sugere entre a taxa de decaimento do estado excitado do FS e a concentração de oxigênio. Com isso, os novos valores para τ_1 e τ_2 passaram a ser assumidos como, respectivamente, 600 s (aproximação para o tempo médio de estabelecimento das mudanças de oxigenação devido à microvasculatura tecidual durante a TFD⁹⁵) e 3000 s (tempo da ordem do parâmetro de eliminação do fotossensibilizador, determinado a partir do trabalho desenvolvido por Melo *et al.*⁸⁹, de modo a relacionar oxigenação e concentração de FS). Além disso, o parâmetro β foi modificado ($\beta = 0,005 \text{ J}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{cm}^5$), em busca da melhor correspondência com os três conjuntos de dados.

Contudo, apesar destas modificações houve dificuldade em obter respostas que fossem equivalentes entre modelo e experimentação para os diferentes conjuntos de dados (conforme será discutido no capítulo 3, “Resultados e Discussão”). Por isso, modificações foram feitas no modelo, as quais serão discutidas a seguir.

A primeira modificação foi uma aproximação para simular o efeito da farmacocinética natural do fotossensibilizador (ou seja, a eliminação do mesmo pelo tecido, diferente de sua diminuição por conta da degradação), conforme a equação (8), que é uma modificação da equação (1).

$$\frac{d}{dt} C(x, t) = -\beta \cdot [O_2] \cdot I(x, t) \cdot C(x, t) - \frac{1}{\tau_{clear}} \cdot C(x, t) \quad (8)$$

Nesta nova expressão, o trecho destacado em vermelho é o termo equivalente à farmacocinética do FS a partir do início da irradiação. No modelo, a partir da introdução desta modificação, considera-se que o máximo de acúmulo do FS foi atingido, e que a partir deste momento temos apenas sua eliminação do tecido. O parâmetro τ_{clear} é o parâmetro de eliminação (*clearance*) do fotossensibilizador, determinado a partir do trabalho desenvolvido por Melo *et al.*⁸⁹, conforme mencionado acima.

A segunda modificação feita foi no termo α , que representa a atenuação da luz no tecido. Inicialmente foi considerado que esta não variava com o tempo, contudo, com a dificuldade em aproximar o modelo dos resultados experimentais obtidos, resolveu-se passar a levar em conta tal modificação, observável tanto a olho nu quanto com base em valores de atenuação de tecido na literatura⁹⁷. A modificação é descrita a seguir, pelas equações (9) e (10).

$$\frac{d}{dt}\alpha(x, t) = G \cdot \beta \cdot C(x, t) \cdot I(x, t) \cdot [O_2] \quad (9)$$

$$\alpha(x + \Delta x, t) = \alpha(x, t) + \frac{d}{dt}\alpha(x, t) \cdot \Delta t \quad (10)$$

Na equação (9), é sugerida uma modificação da atenuação levando em conta os elementos da TFD capazes de promover alterações teciduais. Nesta etapa do desenvolvimento do modelo, considera-se que este incremento depende do parâmetro de fotodegradação β , da concentração de medicamento $C(x, t)$, da intensidade de luz que chega a profundidade de interesse $I(x, t)$, da concentração de oxigênio $[O_2]$ e de um parâmetro adimensional G , que neste estudo será arbitrário e dependerá do tecido em consideração, incorporando as informações relacionadas às modificações nas propriedades ópticas intrínsecas de suas biomoléculas. A escolha dos parâmetros tomados como relevantes na alteração de α foi feita com base nos parâmetros terapêuticos passíveis de serem considerados neste modelo (mais detalhes na seção 3.3.2 dos Resultados e Discussão). Em tempo, é necessário ainda chamar a atenção para o fato de que estas modificações estão sendo consideradas apenas para o comprimento de onda de ativação do FS, 630 nm.

2.5 Predição de resultados da terapia utilizando o modelo e a fluorescência

Uma vez que haja uma correlação observada entre a fluorescência do FS no tecido irradiado e a d_{nec} obtida, o objetivo final de aplicação deste modelo é o de se obter, para determinadas condições conhecidas de parâmetros de irradiação e teciduais, a função de correlação $\Psi(RF)$ equivalente. Desde que se conheça a função de correlação $\Psi(RF)$ para condições conhecidas de irradiação, seria possível utilizar a RF medida durante a irradiação para prever a d_{nec} a ser obtida no respectivo tratamento.

A capacidade de fazê-lo dependerá de um modelo que permita fazer considerações razoáveis da função $\Psi(RF)$, de forma a determinar margens de erro aceitáveis para a d_{nec} .

Se isso for possível, então o modelo tornaria factível a predição em tempo real do resultado do tratamento por TFD, permitindo melhorias imediatas nos protocolos adotados para tratar uma lesão específica, ou mesmo a predição da ineficácia de um dado protocolo para uma lesão – permitindo que se busque a alternativa de melhor resultado clínico, sem necessidade de esperar a morte tecidual por mecanismos fotodinâmicos.

2.6 Possibilidades de exploração de novos parâmetros de irradiação – avaliação da resposta pelo modelo

Como benefício adicional, o modelo empírico desenvolvido pode permitir, apesar de levar um número relativamente pequeno de variáveis em consideração, a exploração de novos parâmetros da terapia. Se o modelo pode permitir que se realize uma predição razoável do resultado do tratamento, então se pode esperar que, ao introduzir parâmetros de irradiação cujos resultados sejam desconhecidos em testes clínicos e pré-clínicos, tenha-se uma estimativa razoável destes mesmos resultados através da resposta do modelo. Assim, seria possível evitar alternativas inviáveis de antemão, ou direcionar novos protocolos para resultados mais favoráveis. Mesmo em casos nos quais o modelo divirja drasticamente dos resultados experimentais, confrontar ambos pode permitir que se entendam melhor mecanismos desconhecidos ou pouco compreendidos da terapia, contribuindo não apenas com o desenvolvimento da dosimetria, mas também com os estudos de aspectos mais fundamentais da técnica.

Para exemplificar esta possível aplicação, foram realizados alguns testes do modelo utilizando parâmetros de protocolos clínicos inexistentes no uso atual da terapia. O objetivo foi verificar se os resultados obtidos são razoáveis dentro do conhecimento atual da terapia e se podem ser utilizados para orientar novos protocolos clínicos. Estes protocolos foram: testes de intensidade de irradiação superficial variável (entre 100 mW/cm² e 300 mW/cm², com intensidade crescente e decrescente).

Para esclarecer, de maneira simples, a idéia geral de processamento dos dados executada pela rotina do MATLAB®, segue abaixo um diagrama de blocos que indica como o processamento é feito (figura 7 – no Apêndice A, se encontram diagramas das rotinas de cada etapa do modelamento, e uma versão geral da rotina final).

Figura 7 – Diagrama de fluxo apresentando as etapas principais da rotina em MATLAB® utilizada para cálculos do modelo, considerando a versão inicial (mais detalhes no Apêndice A).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos para o estudo utilizando o modelo animal (experimentação), o modelo teórico (simulações) e os desdobramentos de ambos, bem como a discussão sobre tais resultados.

3.1 Resultado da experimentação animal

Nesta seção, apresentamos os resultados obtidos para os três grupos animais realizados: G1, G2 e G3. A figura 8 apresenta os valores obtidos para a degradação do medicamento nos três grupos.

Figura 8 - Dados de degradação do FS para os três grupos experimentais. A ordenação da legenda apresenta-se seguindo a variação de intensidades (de 150 a 350 mW/cm²), enquanto os grupos foram nomeados em ordem cronológica de execução (inicialmente o grupo de 250 mW/cm², posteriormente os grupos de 150 e 350 mW/cm²).

A intensidade escolhida inicialmente (250 mW/cm²) foi baseada em parâmetros clínicos/pré-clínicos existentes para TFD⁹⁷. Uma vez observados os resultados iniciais,

pretendeu-se levar a efeito extrapolações para mais e para menos, e por isso escolheu-se um valor de intensidade próximo do mínimo para obtenção de necrose em fígado sadio usando fluências intermediárias (150 mW/cm^2)⁹⁴, e um valor bastante mais alto que o utilizado no G1, de modo a definir um intervalo regular (100 mW/cm^2) entre as intensidades.

Nota-se que o resultado avaliado na degradação difere bastante entre o grupo G1 e os grupos posteriores. Duas explicações poderiam ser dadas para esta diferença notória. A primeira está relacionada a um possível efeito fotodinâmico diferenciado com relação à intensidade de 250 mW/cm^2 , a qual apresenta em geral resultados de necrose mais profunda dentre as três intensidades utilizadas nesse estudo (ver Figura 9).

Outra causa provável poderia ser a diferença nos intervalos de tempo para coleta de fluorescência. Conforme descrito na seção 2.3.4, houve um pequeno aumento no tempo de coleta de fluorescência para os grupos G2 e G3, uma vez que foram coletados espectros das regiões adjacentes do tecido a cada etapa. Para entender porque esse intervalo pode interferir na degradação do medicamento, é preciso recordar a menção às interrupções na irradiação, feita ao final da seção 2.3.3.

É conhecido que a irradiação de luz visível na região do vermelho promove vasoconstrição, modificando o aporte de sangue e, portanto, de oxigênio para o tecido⁹⁵. Este efeito interfere na dinâmica do oxigênio durante a terapia, diminuindo a quantidade de oxigênio molecular disponível no tecido para a TFD. Por isso, a interrupção da iluminação, ainda que por poucos segundos, poderia ser suficiente para que a vasoconstrição se modificasse, de modo que o aporte de sangue (e, portanto, de oxigênio molecular) aumentasse na região de interesse. Isso poderia fazer com que tanto a quantidade de sangue venoso (composto majoritariamente por desoxihemoglobina, cuja absorção na região do vermelho é maior que a da oxihemoglobina – efeito que será discutido mais adiante) diminuísse na região, quanto a disponibilidade de oxigênio singleto gerada fosse maior – pela maior disponibilidade de oxigênio molecular – e, portanto, uma maior fonte de degradação do FS estivesse presente nos tecidos dos grupos G2 e G3.

A razão para que só tenham sido coletados os dados para fluências até 250 J/cm^2 nos grupos G2 e G3 está ligada à observação dos primeiros resultados (grupo G1) de profundidade de necrose, os quais são apresentados na figura 9.

Figura 9 - Profundidades de necrose coletadas para os três grupos experimentais. A ordenação da legenda apresenta-se seguindo a variação de intensidades (de 150 a 350 mW/cm²), enquanto os grupos foram nomeados em ordem cronológica de execução (inicialmente o grupo de 250 mW/cm², posteriormente os grupos de 150 e 350 mW/cm²).

A figura 9 permite ver que, como mencionado acima, obteve-se resultados de profundidade de necrose maior para o grupo G1, utilizando 250 mW/cm² (com exceção dos subgrupos com fluências de 50 J/cm² e 100 J/cm², onde há um leve desvio na média para o grupo G3, de 350 mW/cm²). O resultado para as fluências iguais ou superiores a 300 J/cm², para o grupo G1, mostrou que o comportamento da profundidade de necrose passou a ser muito diferente do observado nas fluências de luz anteriores. Este comportamento foi associado a efeitos térmicos ocorridos durante a irradiação, e mesmo às próprias alterações de resposta que ocorrem no tecido. O presente estudo pretende buscar um modelo para avaliar exclusivamente o dano promovido pela TFD, e não o dano térmico associado à entrega de grandes quantidades de luz ao tecido. Além disso, fluências tão grandes sob regimes de altas intensidades (como é o caso da região de fluências mencionadas para 250 mW/cm²) não são comumente usadas em TFD clínica, onde os regimes mais altos em geral não ultrapassam a ordem de 150-200 mW/cm² de intensidade⁹⁸. Estes regimes foram utilizados aqui apenas a título de investigação dos efeitos teciduais, uma vez que raramente há relato do que acontece nestas condições na literatura.

Por isso, tomou-se a decisão de, nos grupos G2 e G3, eliminar os subgrupos com fluências acima de 300 J/cm², devido a dois motivos principais: o primeiro é o de evitar regiões onde o efeito térmico se evidencia com clareza, dificultando a predição por um

modelo que prevê apenas o efeito fotodinâmico (como será discutido mais adiante); o segundo é, uma vez que estes grupos não seriam fundamentais para o estudo desejado, a diminuição no número já extenso de animais utilizados, visando o melhor interesse da ética de experimentação animal.

Como evidência dos efeitos térmicos observados nas diferentes condições de irradiação, a figura 10 apresenta algumas avaliações histológicas dos tecidos irradiados⁵⁹.

Figura 10- Imagens das lâminas histológicas de necrose, obtidas dos tecidos irradiados. É possível ver que uma linha bem definida que separa tecido saudável e necrótico (indicada por setas brancas em "a" e "b"). É possível ainda notar a presença de infiltrado neutrofílico (estruturas nodulares azuis, indicadas por setas pretas nas fotos em "c" e "e" e nos destaques em "d" e "f") e do espaçamento entre as células, os quais evidenciam inflamação e edema, respectivamente, e são indicativos de dano térmico.

Na figura, são apresentadas imagens das lâminas histológicas de necrose, obtidas dos tecidos irradiados para alguns dos animais do grupo G1. Uma linha bem definida que separa tecido saudável e necrótico (indicada por setas brancas em "a" e "b") pode ser observada - esta é a chamada "linha de necrose", e a média das profundidades medidas da superfície irradiada até esta linha é o parâmetro que se denominou "profundidade de necrose". É possível notar estruturas nodulares azuis, indicadas por setas pretas nas fotos da figura "10c" e "10e" (e nos destaques em "10d" e "10f"). Estes corpúsculos são chamados

neutrófilos (grupo de células que funcionam como sinalizadores teciduais), e a presença de infiltrado neutrofílico (ou seja, aglomerações destes neutrófilos) é evidência de inflamação. Pode-se observar, também, que o espaçamento entre as células é irregular e cada vez mais evidente para maiores fluências de luz, o que indica edema tecidual com o aumento da fluência. A presença de infiltrado neutrofílico e de edema tecidual são sinais claros de inflamação tecidual, e indicativos de que estes tecidos sofreram dano térmico.

Ainda com relação a dano térmico, Tromberg e colaboradores⁹⁹ observaram que, durante a TFD com altas intensidades, o efeito fotodinâmico poderia ser afetado pelo aumento de temperatura devido à ocorrência de depleção de oxigênio. Neste estudo, eles concluíram que se houver sinergia entre o efeito terapêutico da TFD e efeitos térmicos, o dano ocorrido pode ser aumentado. Durante o estudo feito com o grupo G1, foi feita uma avaliação de temperatura para iluminação com 250 mW/cm², que mostrou que a temperatura não superou 42 °C, o que pode ser considerado como uma hipertermia leve (o que vem a corroborar com o que já foi apresentado na literatura⁹¹). Embora este teste não tenha sido realizado para as outras condições de intensidade, pode-se estimar que não tenha havido grande aumento de temperatura para a maioria das condições experimentais realizadas, com exceção talvez das maiores fluências, onde ocorreu grande período de exposição à luz.

Ao observar novamente o resultado obtido para os experimentos dos grupos G2 e G3, é notável a semelhança de comportamento entre os resultados de profundidade de necrose. A ausência de necrose para o grupo de 150 mW/cm² aplicando 50 J/cm² de fluência é notória, mas pode ser explicada pelo fato de que esta é a menor quantidade de luz utilizada neste estudo para uma aplicação de TFD, o que nos leva a pressupor que o limiar de dose ou fluência para ocorrência da necrose não foi atingido para os animais deste subgrupo. Isso não quer dizer que não tenha ocorrido dano tecidual, mas que o dano causado foi reparado durante o período de 30 horas de espera entre o procedimento e a eutanásia dos animais.

O motivo para a reduzida expressão de necrose observada para as maiores fluências de luz nos grupos G2 e G3 não fica evidente a partir das condições experimentais em si, quando se esperava que houvesse um resultado mais expressivo de necrose para os valores maiores de fluência de luz. Contudo, a única condição que muda entre um regime (G1) e outro (G2 e G3) é a duração, em média pouco maior, dos intervalos de iluminação. Tal diferença explica bem o resultado da degradação, mas não fica claro como esse fator influencia o dano tecidual de forma a obter-se uma menor profundidade média de necrose.

Entre motivos prováveis para estes resultados, um pode ser destacado. Ao se comparar os resultados para as três intensidades, é perceptível que, para menores fluências, a necrose tende a aumentar rapidamente entre 150 e 250 mW/cm²; este aumento

é, no entanto, sutil entre 250 e 350 mW/cm² – tão sutil que só não é desprezível por conta do comportamento das barras de erros, que também acompanha esse aumento. Próximo às fluências de 200 J/cm² é possível perceber que tanto as intensidades do G1 quanto do G2 tendem a se “estabilizar”, ou seja, em média, não mais aumentam, tendendo a um valor constante – o que não acontece para os valores de profundidade de necrose do G3. Esta tendência em G1 e G2 é esperada, pois para uma dada intensidade de luz espera-se uma penetração média dos fótons no tecido, já que todos os fótons incidentes serão, em um dado momento, absorvidos ou espalhados para fora do volume avaliado.

Podemos imaginar uma possibilidade para este comportamento: experimentalmente, observa-se um escurecimento (avaliado visualmente, e que pode ser observado por reflectância) do tecido hepático durante a terapia, o qual é mais intenso para maiores intensidades de luz. Conforme mencionado anteriormente, este escurecimento deve-se a dois motivos principais, que estão conjugados: a vasoconstricção promovida pela incidência de luz e a represa de um grande volume de sangue que se torna cada vez mais pobre em oxigênio. Esse sangue, rico em desoxihemoglobina, apresenta uma absorção mais intensa para a região do vermelho do espectro eletromagnético que o sangue mais rico em disponibilidade de oxigênio (pela presença de maior concentração de oxihemoglobina).

Estes fatores, aliados, podem indicar o motivo de uma interação tão diferente da irradiação em intensidades mais altas do que o observado em intensidades mais baixas. Podemos supor que as modificações induzidas no tecido ocorrem mais rapidamente quando uma maior taxa de fótons por área/volume incide no tecido. Esta rápida modificação fotoinduzida associada ao eventual dano térmico promovido pela mesma irradiação de alta intensidade, após determinado período de tempo, poderia desencadear uma série de mecanismos de reparo, acelerando o processo de reprodução celular e regenerando mais rapidamente o tecido. Tal ocorrência poderia também explicar o resultado diferenciado observado. Apesar da possibilidade de tal, este estudo pretende apenas investigar a possibilidade de se usar a informação da fluorescência como método de avaliação da necrose tecidual induzida por TFD e, portanto, não se ateve aos detalhes biomoleculares que poderiam explicar melhor este fenômeno. Um estudo dirigido para avaliar especificamente os efeitos de altas intensidades, com suporte de análise bioquímica adequada, deve ser realizado para esclarecer estes mecanismos.

Observados os principais resultados experimentais, serão apresentados na seqüência os resultados da primeira versão do modelo teórico, que usa como base o conjunto de dados obtidos para o grupo experimental G1.

3.2 Primeira etapa – elaboração do modelo

Seguindo a ordem cronológica do estudo realizado, são apresentados a seguir os resultados obtidos para a versão inicial do modelo (comparada à experimentação), conforme descrita na sessão 2.4.

A figura 11 apresenta os resultados de profundidade de necrose experimental *versus* o determinado pelo modelo para o grupo G1. Esta curva teórica foi obtida a partir de ajuste do modelo aos dados experimentais. A figura 12, por sua vez, também apresenta o resultado do ajuste da curva obtida do modelo teórico para os resultados experimentais obtidos do grupo G1. Em ambas as figuras, os pontos ou círculos sólidos representam os dados experimentais, enquanto as linhas são a representação do resultado obtido a partir do modelo.

A observação no decréscimo do sinal fluorescência que é observado na figura 12 representa uma resposta geral da produção de oxigênio singlete, a qual pode ser relacionada com o efeito fotodinâmico geral promovido no tecido. Esta explicação está evidentemente baseada no fato de que a depleção de oxigênio molecular se estabelece muito rapidamente quando comparada com o tempo de irradiação – neste sentido, Henderson e colaboradores¹⁰⁰ relatam que uma condição estacionária de oxigenação se estabelece após poucos segundos do início da iluminação. Portanto, leva pouco tempo para que a oxigenação tecidual reflita as condições de irradiação, o que valida os intervalos de 60 s de investigação utilizados.

A análise desta primeira etapa deve receber especial atenção. Nela, é possível observar que ocorre um ajuste bastante satisfatório do modelo teórico aos dados obtidos experimentalmente para a intensidade de 250 mW/cm². Tal proximidade entre os resultados experimentais e o modelo teórico se deve ao fato de que o conjunto de dados referente ao G1 foi aquele que permitiu a obtenção dos parâmetros inicialmente determinados empiricamente neste estudo: β , τ_1 e τ_2 . Estes parâmetros são parte da inovação proposta nesta abordagem de utilização da relação entre a degradação do FS e o monitoramento do efeito fotodinâmico – conforme mencionado na seção 2.4 do capítulo de Material e Métodos. Por isso, tais parâmetros não puderam ser encontrados na literatura, e precisaram ser encontrados empiricamente.

Figura 11 - Profundidade de necrose experimental para Photogem® (círculos sólidos), como função das fluências (0–450 J/cm²) com intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, descrito no capítulo 2.

Os resultados apresentados nas figuras 9 e 10 mostram que há uma clara correlação entre as quantidades medidas para o grupo G1, indicando que há maior profundidade de necrose para um maior decréscimo na fluorescência superficial do FS tecidual. Um estudo anterior foi publicado por Cheung e colaboradores⁵², apresentando correlação entre a fluorescência do FS e a profundidade de necrose. Contudo, tal estudo se diferencia do estudo presente porque naquele a coleta de fluorescência era realizada apenas previamente à irradiação, como uma forma de estimar a quantidade de FS presente no tecido, sem acompanhamento da degradação. Este estudo demonstrou que existe uma correlação entre a fluorescência observada e a profundidade de necrose, bem como entre a profundidade de necrose e a quantidade injetada de FS. No caso do estudo apresentado nesta tese, a fluorescência também é mensurada durante a aplicação da luz, e a variação relativa observada é essencialmente atribuída à intensidade do processo fotodinâmico induzido, ou seja, à quantidade de reações fotodinâmicas que ocorrem no tecido.

Na figura 11, fica evidente também que o modelo não se aproxima de descrever o comportamento dos regimes de maior fluência de luz para o G1. Conforme descrito anteriormente, a diferença foi associada aos diferentes processos que ocorrem em tecidos irradiados com grandes quantidades de energia, a altas taxas. Por isso, considerou-se que

esta região não deveria ser enfatizada na análise do ajuste da curva obtida pelo modelo para o estabelecimento do mesmo.

É importante deixar clara a importância do conjunto de dados do grupo G1 para a determinação do modelo teórico desenvolvido neste estudo e para a evolução do mesmo. Sem um conjunto inicial de dados experimentais nos quais se pudesse basear a obtenção deste modelo (no caso, os parâmetros acima referidos), não seria possível esta abordagem. Contudo é evidente que, ao fazê-lo, submete-se a validade de predição do modelo às condições deste conjunto específico de dados. Isso foi o que tornou necessário estender a avaliação a partir deste modelo a conjuntos de dados submetidos a diferentes condições (as quais, no caso, refletem-se na mudança do regime de irradiação, utilizando diferentes intensidades). Ao fazê-lo, tornou-se possível testar a capacidade de predição do modelo utilizando um conjunto de dados que independesse das condições e técnicas usadas para determinar os parâmetros de degradação e as estimativas de consumo/perda de oxigênio.

Figura 12 - Amplitude de fluorescência (degradação) normalizada para Photogem®, *in vivo* (círculos sólidos), como função das fluências (0–450 J/cm²) com intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, descrito no capítulo 2.

Para esclarecer a idéia fundamental do estudo, na qual se baseia a proposição de uma técnica de monitoramento baseada em fluorescência superficial, é apresentado na

figura 13 o resultado dos valores experimentais obtidos para o fator de correlação Ψ (cuja definição e obtenção são descritas na seção 2.4 de Material e Métodos e na equação (7)), bem como a estimativa do mesmo utilizando as curvas obtidas pelos ajustes iniciais do modelo.

Figura 13 - Razão da fluorescência experimental (degradação) para Photogem® *in vivo* multiplicada pela profundidade de necrose (parâmetro de correlação Ψ) como função da fluência (0–450 J/cm²) com intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir das curvas apresentadas para a primeira etapa de construção do modelo, descrito no capítulo 2.

O gráfico da figura 13 mostra, para os experimentos do grupo G1, o que se veio a chamar neste estudo de “parâmetro de correlação entre fluorescência e dano”, denominado como Ψ para simplificação da nomenclatura. Este parâmetro foi inferido a partir da observação da correlação entre os dados de fluorescência e profundidade de necrose, obtidos experimentalmente e verificados na literatura⁵². É válido chamar atenção para o fato de que a concordância bastante satisfatória entre o resultado obtido para fluências mais baixas e a predição era esperada, bem como a tendência à discordância para os valores maiores. Desde que os dados experimentais de Ψ representam o produto da razão da fluorescência pela profundidade de necrose medida, e os dados “modelados” representam o produto das curvas apresentadas, fica evidente que, se houve ajuste próximo entre experimento e modelo para ambos nas regiões de menor fluência, o ajuste deveria ser

igualmente próximo para este produto. Além disso, é preciso observar que Ψ só faz sentido se aplicado para valores de fluência maiores que o valor de limiar de fluência ($D > D_{th}$), uma vez que, se $D \geq D_{th}$, não haverá dano permanente ao tecido e, portanto, não haverá necrose (ou seja, $d_{nec} = 0$) para que se busque correlação com a fluorescência.

Com base no conjunto de valores de Ψ apresentados na figura 13, é possível perceber que Ψ é, aproximadamente, constante (sendo o valor médio em torno de $0,8 \pm 0,2$ mm). A unidade é dada em mm, seguindo a unidade de d_{nec} , uma vez que a informação de fluorescência é normalizada antes de ser introduzida nos cálculos, sendo RF, portanto, adimensional (vide equação (7)). A interpretação disso é a de que Ψ representa a profundidade equivalente a um decréscimo inversamente proporcional do sinal de fluorescência (em outras palavras: para condições de irradiação tais que $\Psi = 0,8$ mm, se houvesse um decréscimo de 60% na fluorescência, então $RF = 0,4$, e esperar-se-ia uma necrose de cerca de 2 mm, por exemplo). Assim, para qualquer momento da aplicação, *seria possível estimar a profundidade de necrose a ser induzida se a iluminação terminasse ali apenas por multiplicar o Ψ equivalente pelo inverso da RF naquele momento, ou seja, avaliando a razão entre Ψ e RF*. Encontrar um modelo que permita realizar tal avaliação permitiria ajustar o tempo de irradiação, evitando prolongar o protocolo quando a profundidade desejada tiver sido atingida (com benefícios em termos de aproveitamento do tempo clínico, dos custos, de material humano e com relação ao conforto do paciente, entre outros), ou evitando que uma lesão seja eliminada apenas parcialmente (com benefícios para a situação clínica do paciente, que em geral piora em casos de recidivas).

As observações quanto a este resultado estão de acordo também com as explicações apresentadas por Tromberg e colaboradores⁹⁹, uma vez que no estágio de promoção de dano da TFD, uma interrupção súbita na entrega de oxigênio e nutrientes acontece devido à ocorrência de dano vascular, o qual induz morte por necrose (por conta do estágio isquêmico irreversível), de forma que a necrose induzida assim se estabeleceria e, portanto, seria possível monitorá-la por este método.

A correlação foi avaliada como o coeficiente Ψ e o inverso da razão de amplitude de fluorescência (RF) normalizada pelo valor inicial de emissão ($d_{nec} = \Psi / RF$), utilizando análise de variância (ANOVA) combinada com testes de Student-Newman-Keuls, usando uma regressão linear e um modelo de correlação¹⁰¹. O coeficiente de correlação (r^2) foi avaliado e o valor $r^2 = 0,97$ foi obtido. Este coeficiente r^2 representa uma medida de quão bem os valores preditos tendem aos valores reais iterados anteriormente. Assim, esta é uma forma de avaliar quão bem os valores preditos por um modelo se ajustam aos valores reais. Um coeficiente de correlação próximo de "1" expressa uma forte correlação entre os valores preditos e os valores reais. O valor de 0,97 é, portanto, uma boa indicação de uma

correlação direta, como expresso na Eq. (7), apresentada na seção 2.4 do capítulo de Material e Métodos.

Desde que a correlação entre a fluorescência e a profundidade de necrose mostrou-se forte o suficiente para permitir as inferências feitas quanto à possibilidade de estimar a última com base na primeira, então é possível entender como uma função da correlação Ψ pode ser utilizada para a predição da profundidade de necrose.

A idéia é que, se for possível estabelecer experimentalmente (ou mesmo através do próprio aperfeiçoamento do modelo obtido) os valores obtidos para a degradação e a profundidade de necrose para dadas condições e parâmetros de irradiação, então se poderia estabelecer uma função de correlação tal que $\Psi = \Psi(RF)$. Em outras palavras, passaria a ser possível estabelecer uma função para a qual, conhecendo-se as propriedades ópticas de um tecido de interesse e do FS utilizado, a geometria da lesão (nos casos em que esta interfira na entrega de luz – caso de maior complexidade que o tratado neste estudo), e o protocolo aplicado (a irradiância e a fluência, bem como a distribuição de ambas no tempo), bastariam duas coletas de fluorescência, antes e após o intervalo de tratamento para o qual se espera resposta adequada, para estabelecer a taxa de degradação (RF). Ao aplicar RF na função, seria possível obter a profundidade de necrose estimada. Portanto, associando um conjunto destas funções a um *software* de computador vinculado à coleta de fluorescência, seria possível monitorar, em tempo real, o andamento da aplicação da TFD.

Apenas este resultado seria de grande valia para os avanços clínicos da TFD, quando se levam em conta os numerosos casos clínicos de recidivas de lesões oncológicas, que em geral agravam o quadro inicial, pré-TFD, do paciente. Contudo, como já discutido, este primeiro estágio do modelo ainda precisa ser testado em condições diferentes de protocolo, para avaliar quanto os parâmetros obtidos dos ajustes experimentais são aceitáveis para outras condições, ou mesmo se o modelo é capaz de prever condições diferentes de tratamento.

Antes de passar à avaliação de quanto o modelo inicial foi capaz de se ajustar aos experimentos realizados para diferentes intensidades (G2 e G3), e como este modelo foi aperfeiçoado a partir destas avaliações, serão apresentadas as curvas da simulação do comportamento de concentração e intensidade, usando ainda esta versão inicial do modelo (figuras 11 e 12).

As curvas da figura 14 mostram que a concentração do FS diminui cada vez mais ao longo da irradiação. Pode-se observar esse decréscimo em todos os pontos, mas principalmente nos valores de concentração para as profundidades menores, ou seja, mais próximos à superfície. Quanto mais profundamente se avalia a estimativa do modelo para o tecido, menor é o decréscimo de concentração do FS. De maneira similar, na figura 15, o

aumento gradual da fluência de luz depositada, ao longo da irradiação, a cada ponto da profundidade é cada vez mais evidente, salientando-se na superfície.

Esses resultados são esperados, com base no conhecimento existente sobre as propriedades ópticas de tecidos biológicos, do FS envolvido e dos comprimentos de onda utilizados, nas condições assumidas pelo modelo. Ainda assim, é importante chamar a atenção para eles, pois eles são evidência de que existe uma base sólida para o ajuste experimental bastante satisfatório obtido junto aos pontos experimentais. Em outras palavras, a primeira versão do modelo não apenas correspondeu aos pontos experimentais utilizados para a determinação de seus parâmetros livres, mas é capaz de gerar curvas cujo comportamento condiz com o que se conhece até o momento, tendo por base os parâmetros assumidos. Portanto, estas curvas consolidam os parâmetros e variações assumidas inicialmente como sendo, em linhas gerais, aqueles que devem orientar a busca por uma predição da resposta clínica da TFD.

Figura 14 - Curvas de concentração teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 250 mW/cm², ao longo da profundidade no tecido. A seta indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um passo de tempo no modelo.

Figura 15 - Curvas de fluência de luz teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 250 mW/cm², ao longo da profundidade no tecido. A seta indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um passo de tempo no modelo. A linha tracejada indica a região onde se atinge o limiar de fluência dentro do tecido para ocorrência do efeito fotodinâmico.

Comentados os resultados obtidos para a primeira tentativa de obtenção de um modelo que permita prever os resultados da terapia, passa-se agora a discutir a aplicação de melhorias ao mesmo, com base nas observações feitas durante o estabelecimento da primeira versão e em resultados independentes para outros regimes de intensidade (grupos G2 e G3), já apresentados na seção 3.1.

3.3 Segunda etapa – aperfeiçoamento com novos dados experimentais

Para satisfazer aos três conjuntos de dados, os parâmetros τ_1 e τ_2 não mais foram ajustados com base nas curvas. Conforme descrito na seção 2.4, para que as previsões dos diferentes grupos fosse menos empírica, foram tomados valores com base em observações feitas na literatura quanto ao comportamento do oxigênio durante a TFD, devido ao estabelecimento do campo de luz⁹⁵, e à relação que os dados de Aveline *et al.*⁹⁶ sugere entre a taxa de decaimento do estado excitado do FS e a concentração de oxigênio. Os novos valores para τ_1 e τ_2 , portanto, foram assumidos como sendo, respectivamente, 600 s (uma aproximação para o tempo médio de estabelecimento das mudanças de oxigenação

devidas à microvasculatura tecidual durante a TFD⁹⁵) e 3000 s (que é um tempo da ordem do parâmetro de eliminação do fotossensibilizador, determinado no trabalho desenvolvido por Melo *et al.*⁸⁹, levando em conta uma possível relação entre oxigenação e concentração de FS). O parâmetro β foi também modificado ($\beta = 0,005 \text{ J}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{cm}^5$), em busca da melhor correspondência com os três conjuntos de dados.

Os dados da figura 16 apresentam as curvas para as profundidades de necrose e degradação (ou fluorescência) para o grupo G2, usando no modelo os valores baseados na literatura, para buscar uma condição adequada para os diferentes conjuntos experimentais ($\tau_1 = 600 \text{ s}$, $\tau_2 = 3000 \text{ s}$), bem como o novo valor ajustado de β ($0,005 \text{ J}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{cm}^5$). A figura 17, por sua vez, apresenta os mesmos resultados para o grupo G3, nas mesmas condições. Para comparação, a figura 18 permite avaliar os resultados deste mesmo conjunto de parâmetros para o grupo G1.

É interessante notar que os dados do modelo para profundidade de necrose partem sempre do zero em aproximadamente 20 J/cm^2 , que é o valor de limiar de fluência assumido. No caso de 50 J/cm^2 para o grupo G2, observa-se que o valor previsto para necrose é positivo, ou seja, deveria haver alguma necrose para os animais tratados sob estas condições, como comentado na seção 3.1. Contudo, esta discrepância pode ser justificada por fatores alheios ao controle possível, como a recuperação tecidual (o que só poderia ser melhor avaliado se os grupos experimentais fossem maiores em número de animais). Além disso, a ausência de necrose também poderia estar dentro das barras de erros, mas como nenhum dos animais deste subgrupo apresentou necrose, não houve como estimar um desvio para a fluência de 50 J/cm^2 no grupo G1.

Os resultados com relação à necrose dos grupos apresentaram comportamento dentro do esperado, mas ainda longe da fidelidade entre experimento e modelamento. Os resultados de degradação, por sua vez, demonstram concordância razoável entre o modelo e a degradação do FS avaliada pela fluorescência, com exceção das maiores fluências, onde um desvio é observado – a medida experimental é menor que a previsão do modelo. Um das prováveis causas para este desvio observado para os maiores valores de fluência é que, quanto mais tempo se passa, mais FS é eliminado naturalmente devido à farmacocinética, ou seja, à dinâmica natural de acúmulo e eliminação do FS no tecido. Assim, nos menores tempos (equivalente a menores fluências, para intensidade constante), pouca diferença é observada, mas a medida que se aproximam os tempos maiores, maior divergência é observada.

É interessante notar que, nos grupos experimentais, como observado no início deste capítulo, há uma tendência para a profundidade de necrose atingir um valor limite. Esse valor limite não só é esperado como é compreensível, uma vez que há um limite para a penetração de luz em meios altamente túrbidos, como é o caso do tecido hepático e de

meios biológicos em geral¹⁰². Portanto, a necrose induzida por TFD deveria parar de progredir numa dada profundidade.

Figura 16 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem®, *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 150 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, com modificação dos parâmetros.

Figura 17 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem®, *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 350 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, com modificação dos parâmetros.

Figura 18 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem®, *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira etapa de construção do modelo, com modificação dos parâmetros.

De fato, ao realizar os cálculos do modelo, é mesmo preciso introduzir uma condição de contorno, tal que se a necrose para uma fluência de um dado valor for mais superficial que a necrose para uma fluência de valor menor, então a necrose *não pode regressir*. A

regressão da necrose, em termos do tecido, só poderia significar regeneração, o que segundo o conceito adotado de *limiar de fluência (ou dose)* não seria possível nesse caso, pois se presume que a necrose observada pelo modelo é o ponto que atingiu o limiar de fluência, ou seja, a fluência mínima para que não haja reversão da condição de dano do tecido.

No caso dos resultados para o grupo G1, as curvas seguem a tendência dos experimentos, mas a generalização dos parâmetros desviou a previsão do resultado experimental. Esta observação também acontece nos resultados apresentados para as modificações a seguir, e pode ser relacionada à diferença no fracionamento da terapia promovido para o grupo G1 e os grupos G2 e G3.

Com relação ao modelo não ser capaz de representar os dados experimentais sem alterações, cabe observar o fato de que, como mencionado no capítulo anterior, pretendeu-se realizar com os grupos G2 e G3 uma medida que levasse em conta, de maneira apropriada, a eliminação do FS através da farmacocinética natural do mesmo no tecido animal, através do desconto da fluorescência coletada no tecido adjacente ao irradiado. Isto não se mostrou, contudo, factível, pois uma grande flutuação nas medidas coletadas na região externa à de irradiação tornou a subtração dos sinais impraticável – muito provavelmente devido à impossibilidade de se separar o sinal advindo de porções de tecido carregando sangue com diferentes concentrações de FS, devido à degradação na região adjacente (figura 19).

Apesar disso, o regime de aplicação já havia sido levemente modificado para satisfazer às necessidades desta tentativa. Fazer isso, portanto, estendeu cada uma das interrupções necessárias para a coleta de fluorescência. Estas interrupções, conforme discutido na seção 3.1, afetam a dinâmica tecidual durante a terapia, promovendo o fracionamento da fluência total aplicada ao tecido. Este fracionamento interfere diretamente no resultado da terapia, uma vez que o tempo de interrupção da luz muda a dinâmica de oxigênio, conforme relatado por Henderson e colaboradores¹⁰⁰. Assim, o aporte de sangue e, portanto, de oxigênio, se modifica rapidamente com a presença ou ausência do perfil de irradiação, e o fato de ter intervalos diferentes para o grupo G1 e para os grupos G2 e G3 explica a dificuldade em comparar os conjuntos experimentais.

Como as técnicas experimentais utilizadas nesse estudo não permitiram o monitoramento do oxigênio *in situ*, o modelo aqui estudado apenas estima a quantidade de oxigênio presente localmente, e por causa disso não se levou inicialmente em conta esse efeito na modelagem do efeito fotodinâmico aqui apresentada. Esta é a razão de, ao longo deste estudo ter se utilizado e analisado o conjunto de dados de 250 mW/cm² de maneira independente dos conjuntos de dados dos grupos G2 e G3, cuja irradiação seguiu o mesmo protocolo, à exceção das intensidades de luz.

Figura 19 - Exemplo da diferença entre uso de valores de degradação considerando medidas dentro e fora da área de iluminação. Levar em conta a fluorescência coletada fora, mas próximo à região irradiada torna muito difícil ter uma idéia clara do decaimento da fluorescência.

Completando a avaliação dos dados para o modelo sem correções, as figuras 16, 17 e 18 deixam claro que o modelo, nesta configuração, não foi capaz de representar, de modo imediato – ou seja, sem alterações em suas considerações – os dados obtidos para parâmetros de irradiação diferentes dos utilizados na modelagem inicial.

Como observado, não foi possível aplicar o desconto de fluorescência (experimental) que seria relacionado à eliminação do FS pela farmacocinética natural do tecido. Sendo este um importante elemento na avaliação de fluorescência tecidual *in vivo*, corroborado pelas evidências dos desvios dos resultados de degradação das figuras 16 e 17, o próximo passo de melhoria para o modelo foi introduzir essa correção nas contas efetuadas pelo próprio modelo, substituindo as medidas que levariam em conta a farmacocinética. Esta modificação será discutida na próxima seção.

3.3.1 *Primeira alteração efetiva: termo de farmacocinética*

Ao observar que os valores do modelo para a degradação divergem dos experimentais para altos tempos, considerou-se que o efeito da eliminação natural do FS pela farmacocinética poderia interferir com este ajuste. Como não foi possível levar em

conta as medidas nas adjacências da região irradiada, então se passou adicionar este efeito de farmacocinética nas considerações do modelo.

Além das evidências apresentadas junto aos dados de degradação da seção anterior, existem pontos importantes a serem colocados com relação ao estabelecimento desta correção no modelo. A realização da correção que leva em conta a perda de FS pela farmacocinética está baseada em dois pontos fundamentais, observados por Melo e colaboradores⁸⁹:

- assume-se que o máximo de FS presente no tecido ocorre quando se observa o máximo sinal de fluorescência (para fígado de ratos Wistar, com injeção pela cava, após 30 minutos da injeção), uma vez que a concentração do mesmo em tecido é proporcional ao sinal de fluorescência.

- como o protocolo utilizado parte do momento assumido como máximo de FS no tecido, a quantidade deste só pode diminuir a partir daí, seja por eliminação natural do tecido ou por consumo via TFD.

Com base ainda no mesmo trabalho de Melo *et al.*, é possível determinar os tempos típicos de acúmulo e eliminação do medicamento. É daí que foi obtido o tempo de eliminação do FS Photogem[®] para gerar o parâmetro τ_{clear} , introduzido no modelo ($\tau_{clear} = 46 \text{ min} = 2760 \text{ s}$).

Para levar em conta esta alteração no modelo, o parâmetro τ_{clear} foi introduzido ao termo que altera a concentração do medicamento, juntamente da informação relacionada à concentração atual. Assim, esta modificação permite que o modelo passe a considerar tanto a eliminação do FS devida à degradação promovida pela TFD quanto o decréscimo naturalmente observado no tecido, independente da terapia, como mostra a equação (8).

Esta correção permitiu uma concordância bastante razoável entre os dados de degradação do modelo e os obtidos experimentalmente para os grupos de G2 e G3 (figuras 20 e 21). Esta concordância indica que a modificação que leva em conta a farmacocinética do FS no modelo não só faz sentido, mas é uma parte importante das considerações a serem feitas nesse tipo de modelamento para TFD.

Apesar disso, fazer esta mesma consideração não permitiu que se obtivesse uma boa comparação entre o modelo e os diferentes resultados de profundidade de necrose obtidos para cada intensidade. A diminuição na fração restante de medicamento faz com que o modelo considere que a atenuação da luz no tecido diminui, uma vez que, de acordo com a Eq. (5), a atenuação de luz depende da concentração do FS no tecido. Com isso, uma profundidade de necrose maior deveria ser atingida, pois a luz deveria chegar mais fundo no tecido – e é isso que se observa na figura 20: um modelo com necrose bastante superior à experimental.

Figura 20 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem®, *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 150 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética.

Figura 21 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 350 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética.

Ao observar a curva de necrose da figura 21, por outro lado, a concordância com os primeiros valores de necrose experimental poderiam sugerir que a análise anterior não é válida. Contudo, uma observação deve ser feita ao fazer essa comparação: se os valores de

necrose para 150 mW/cm^2 tendem a não aumentar com o aumento da fluência, isto não é observado para os valores de necrose de altas fluências em 350 mW/cm^2 . Entretanto, levando em conta o conceito bem estabelecido em TFD de limiar de fluência, já discutido no início da seção 3.3, não faz sentido pensar que uma necrose (induzida por TFD) maior possa ter surgido com uma dose menor uma vez que, se o limiar de morte já havia sido atingido anteriormente, mais luz não poderia fazê-lo “retroceder”. Por isso, outra explicação faz mais sentido: a de que outros fatores alheios ao efeito fotodinâmico em si tenham contribuído sinergicamente para uma maior profundidade de necrose nos regimes de fluência final até 150 J/cm^2 (possibilidade corroborada pelo trabalho de Tromberg *et al.*⁹⁹, em especial para altas intensidades, conforme discutido na seção 3.1). Assim, o modelo deveria ser capaz de justificar as necroses menos profundas obtidas para as maiores fluências. Pensando, portanto, neste sentido, a previsão para o grupo 350 mW/cm^2 também é maior que a esperada experimentalmente.

As divergências do grupo G3 podem ainda estar relacionadas com o fato de que neste grupo opera-se com um regime de alta intensidade (350 mW/cm^2). Na literatura, poucos estudos fazem relatos sistematizados sobre os reais efeitos de regimes de alta intensidade sobre o tecido e o efeito fotodinâmico, mas Henderson e colaboradores, em diferentes estudos^{100, 103}, relatam incertezas quanto aos efeitos biológicos observados para TFD sob regimes de alta intensidade, por motivos ligados ao efeito da luz na depleção de oxigênio (aqui reconhecida e considerada possível, apesar da incapacidade em monitorá-lo).

Quando os resultados do grupo G1, por sua vez (Figura 22), são confrontados com os dos grupos G2 e G3, percebemos que a adição da farmacocinética parece implicar em uma modificação para G1 que toma rumo diverso do observado para G2 e G3. O aumento nos valores obtido para profundidade de necrose do modelo aproximam a curva dos valores experimentais, o que representa uma melhoria com relação à curva obtida para os parâmetros generalizados de τ_1 , τ_2 e β . A degradação, entretanto, fica ainda mais distante dos valores experimentais quando comparada com o modelo sem esta modificação.

Apesar das disparidades, é importante notar que o modelo fez progresso com esta modificação, com relação à predição da degradação/consumo de FS. O modelo não modificado apresentava menos semelhança com o resultado experimental obtido para o sinal de fluorescência coletado. Levando em conta a farmacocinética do FS, no entanto, nota-se que o comportamento esperado para o sinal de fluorescência é bastante semelhante ao observado experimentalmente para os grupos G2 e G3, ainda que ainda haja uma discreta diferença entre os valores para maiores fluências. Por isso, considerando que esta é uma inclusão importante na predição do resultado da TFD, a modificação foi acrescentada ao modelo. Uma segunda alteração foi proposta, buscando por sua vez considerar algumas das transformações nas propriedades ópticas de atenuação da luz nos componentes

teciduais, induzidas pela terapia, para avaliar como elas contribuem com a profundidade de necrose.

Figura 22 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem®, *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética.

3.3.2 Segunda alteração efetiva: modificação na atenuação total da luz

Observando que as modificações na farmacocinética melhoravam a capacidade de previsão do modelo com relação à degradação, mas não com relação à necrose, foi considerada a possibilidade de que a atenuação da luz no tecido, a qual é mesmo visível a olho nu em tecido hepático, pudesse estar associada diretamente ao modo como a luz atinge determinadas profundidades teciduais, modificando a profundidade de necrose atingida.

A escolha dos parâmetros tomados como relevantes na alteração de α para esta modificação do modelo foi feita com base nos parâmetros terapêuticos passíveis de serem considerados neste estudo. Trabalhos como o de Thomas Farrell e colaboradores⁵³ apresentam mudanças no coeficiente de absorção da luz para o fotossensibilizador levando-se em conta modificações semelhantes. Uma vez que as alterações promovidas no tecido advêm da constrição dos vasos sanguíneos (promovida, por sua vez, pela irradiação⁹⁵), dos eventuais fotoprodutos de reação fotodinâmica, e da destruição das estruturas celulares presentes devida ao dano promovido, considerou-se que os fatores que influenciam mais fortemente alteração das propriedades ópticas do FS deveriam influenciar também, de modo geral, a alteração das propriedades ópticas das biomoléculas presentes nos sítios irradiados, afetando a atenuação total de luz do tecido. Por conta disso, assume-se que a concentração, o parâmetro de fotodegradação, a concentração estimada de oxigênio e a intensidade de luz local interferem na atenuação como uma medida do efeito fotodinâmico promovido sobre as biomoléculas e estruturas do tecido-alvo.

As modificações estruturais, de espalhamento e de absorção, incluídas no parâmetro G , serão tais que G é positivo ($G > 0$) se a atenuação do tecido aumenta, o que o torna mais “opaco”, ou seja, se as modificações do tecido fazem com que o espalhamento e/ou a absorção aumentem, diminuindo a penetração da luz no tecido. Se G for negativo ($G < 0$), então a atenuação total composta dos efeitos somados de absorção e espalhamento diminuirá, deixando o tecido mais “transparente”, e permitindo que a luz vá mais longe numa dada direção dentro dele. Se G for igual a zero ($G = 0$), então esta modificação não é relevante para o modelo, indicando que a atenuação modifica de modo desprezível a profundidade de necrose obtida. O efeito de modificação na direção de propagação da luz justifica o fato de G ter unidade de parâmetro de seção de choque efetivo.

Uma vez que este estudo não pretende elaborar de forma sistemática sobre o monitoramento das alterações na propagação de luz em meios túrbidos – sendo este tema de tese de doutorado recentemente defendida por Moriyama¹⁰⁴ em nosso grupo – a

alteração nas propriedades ópticas foi considerada sobre a atenuação total de maneira geral através do parâmetro G , sem definir claramente quais elementos se modificam durante a irradiação (o que demandaria outras formas de análise, fugindo do escopo apresentado – a busca por uma técnica de simples monitoramento).

Discutida a motivação para a modificação, é possível apreciá-la na resposta do modelo, observando a comparação de dados simulados *versus* experimento nos gráficos das figuras 23 e 24 – respectivamente, os resultados do grupo G2 e G3 para a adição da modificação na atenuação total da luz, com valor de $G = 5$ foi adotado. É interessante observar que não houve modificação nas curvas de degradação ao adicionar a modificação para a atenuação tanto no grupo G2 quanto no G3. O modelo, como foi concebido, não prevê o efeito das modificações da atenuação da luz na fluorescência, embora a modificação da atenuação afete também a luz de excitação. Portanto, uma vez que o modelo capaz de apreciar como a atenuação afeta diretamente a chegada de uma dada fluência a determinada profundidade do tecido, mas não o quanto a concentração é afetada por este efeito, é compreensível que se veja uma modificação no resultado de profundidade de necrose e não para a avaliação do sinal de fluorescência correlacionado à depleção do FS.

Para este estudo, consideramos a informação da concentração do FS dada pelo modelo como diretamente equivalente ao sinal de fluorescência coletada, normalizado pelo sinal no momento de máxima concentração. Segundo Nilsson e colaboradores, as mudanças nos coeficientes de espalhamento e absorção em tecido hepático para comprimentos de onda como o utilizado para excitação da fluorescência são pelo menos tão importantes quanto as que ocorrem na região do vermelho, onde temos tanto a fluorescência do FS quanto a luz de tratamento¹⁰⁵. Por isso, novos estudos visando melhor entendimento sobre como se dá a modificação da atenuação da luz nos tecidos de interesse poderia permitir uma melhoria importante no modelo e na compreensão dos mecanismos da TFD visando sua dosimetria.

Ao fazer a modificação da atenuação, os resultados de previsão para a profundidade de necrose passaram a ser razoavelmente semelhantes aos obtidos experimentalmente, tanto no grupo de 150 mW/cm² quanto no grupo de 350 mW/cm². Houve uma melhoria considerável na predição da profundidade de necrose com relação ao que foi obtido para a modificação do modelo com relação apenas à farmacocinética. Na seção anterior, os resultados modelados para profundidade de necrose eram extremamente divergentes dos pontos experimentais, e com esta mudança obtém-se um resultado previsto que condiz com o conhecimento que se têm sobre o processo fotodinâmico e seus efeitos biológicos.

Os resultados de profundidade de necrose para 350 mW/cm² levaram, na seção anterior e na seção 3.1, à discussão sobre a possibilidade de as necroses mais profundas

Figura 23 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem®, *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 150 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido.

em fluências menores serem resultado de efeito sinérgico de outras fontes de dano. O resultado obtido parece corroborar essa hipótese, visto que o modelo foi capaz de prever dano por efeito fotodinâmico para as necroses das fluências mais altas, sendo as necroses das fluências menores superiores ao previsto.

Com relação à expectativa de uma técnica que permita previsão do resultado da TFD, no que diz respeito a evitar recidivas, alguns aspectos relacionados às divergências ainda observadas nos resultados de necrose devem ser discutidos.

Quando consideramos o uso do modelo para evitar o surgimento de recidivas, a idéia no caso ideal é que, conhecendo de antemão a profundidade de uma lesão, possa-se monitorar um protocolo clínico de forma que seja obtida uma profundidade de necrose mínima, tal que todas as células da lesão sejam eliminadas pelo tratamento. Nesse caso, se uma dada quantidade de células sadias for eliminada dentro da “margem de segurança”, não se perde mais do que se perderia numa remoção cirúrgica, e ainda assim com benefícios na preservação de tecido sadio do paciente. Assim, é mais interessante que o modelo estime um resultado de necrose menor que o real, tal que as necroses obtidas sejam mais profundas que aquelas estimadas pelo modelo.

Nesse contexto, o resultado de profundidade de necrose para o grupo G3, que é muito superior à necrose estimada para as fluências menores, não é problemático, uma vez que as necroses obtidas experimentalmente que superam a estimativa podem ter resultado isso por sinergia de efeitos térmicos ou outros efeitos secundários associados à terapia, como necrose promovida por danos vasculares extensos (por exemplo, ao destruir um vaso mais importante na região de tratamento). Nesse sentido, a estimativa da figura 24 para o grupo de 350 mW/cm² seria um resultado positivo.

Por outro lado, o mesmo contexto mostra que pode haver um problema quando observados os resultados para maiores fluências junto ao grupo G2, ainda na figura 23. Embora, como comentado acima, a estimativa da profundidade de necrose tenha sofrido uma melhoria considerável com relação à configuração anterior do modelo, pode-se observar que ocorre uma estimativa de necrose maior que a observada experimentalmente. Numa situação clínica como a proposta para evitar recidivas, tal estimativa seria enganosa, e permitiria a possibilidade de sobrevivência de células da lesão na região mais profunda do tecido, abrindo margem para um ocasional ressurgimento da lesão.

Ante tais dificuldades, é preciso recordar também alguns detalhes sobre a técnica utilizada na avaliação da profundidade de necrose. Neste estudo, a profundidade de necrose foi avaliada utilizando-se o preparo de lâminas histológicas para microscopia com coloração H-E (hematoxilina-eosina). O procedimento de coloração das lâminas envolve desidratação das peças removidas dos animais, o que pode promover cerca de 10% a 15% de redução nas mesmas. Com isso, a avaliação da necrose pode estar sujeita a pequenas modificações

que, se levadas em conta, talvez levassem o desvio das medidas experimentais a incluir a previsão.

Contudo, esta infelizmente é uma imprecisão inerente à técnica, e difícil de ser levada em conta, em especial porque a fração de redução pode diferir de peça para peça. Como assumir variações arbitrárias, sem critério adequado, para as necroses poderia levar a conclusões errôneas sobre o comportamento tecidual, é preferível aceitar o erro intrínseco como artifício da medida.

Com relação ao valor de G , cujo sinal representa a relevância e o comportamento da variação na atenuação da luz, o valor adotado de 5 indica que a atenuação da luz aumenta no tecido. Este incremento positivo no valor da atenuação indica que ocorre uma diminuição da penetração da luz no decorrer da irradiação. A escolha deste valor positivo e sua boa concordância com o resultado experimental pode ser justificada pela observação, que mesmo a olho nu pode ser feita, do escurecimento do tecido durante a irradiação, em comparação aos tecidos adjacentes, e também por estudos anteriores^{53, 105}. Este escurecimento pode ser associado ao dano vascular e à vasoconstrição, os quais também modificam as propriedades ópticas do tecido (através, por exemplo, do acúmulo de exsudato ou da depleção de oxigênio locais – esta última aumentando a quantidade de desoxihemoglobina, mais absorvedora no visível).

Para discutir, entretanto, adequadamente, este resultado, é necessário lembrar que o valor de G utilizado foi adotado de modo a se obter a melhor concordância com os diferentes grupos G2 e G3. Ao se observar a figura 25, fica evidente que esta modificação, com os mesmo parâmetros, também não melhorou a predição dos valores de degradação e de profundidade de necrose para o grupo G1.

Na previsão usando a cinética do FS e a atenuação variável da luz no tecido, há uma aparente contradição no contraste entre a previsão para os conjuntos de dados G2 e G3, que é razoavelmente boa, e a observada para o conjunto G1, que fica bastante longe do esperado. Neste ponto, é necessário que a discussão retome mais uma vez a questão sobre o fracionamento da luz aplicada nos diferentes grupos experimentais ter seguido um regime levemente diferente.

Ao levar em conta o ajuste dos parâmetros para os três grupos de dados, buscou-se na literatura informações sobre os tempos relacionados às modificações assumidas no tecido. Segundo os dados de Woodhams *et al.*⁹⁵, pode-se inferir que, para intensidades acima de 100 mW/cm², o tempo de depleção de oxigênio devido às modificações na microvasculatura é de aproximadamente 8 min – valor que foi arredondado para aproximadamente 10 min (= 600 s) e usado como um dos parâmetros de depleção de oxigênio, pela correlação possível com a vasoconstrição. Do mesmo modo, com base nos dados de Aveline *et al.*⁹⁶, é possível inferir que a taxa de decaimento do estado excitado do

Figura 24 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 350 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido.

FS e a concentração de oxigênio estão relacionadas, e por isso estimou-se um valor para o segundo parâmetro (= 3000 s) próximo do tempo de eliminação do FS pela farmacocinética (aproximadamente 46 min = 2760 s; a ausência de FS impede que haja espécies excitadas

de FS e, portanto, efeito fotodinâmico). Além disso, os valores alocados para o parâmetro de fotodegradação β ($= 0,005 \text{ J}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{cm}^5$) e para G ($= 5$), foram escolhidos tal que concordassem tão bem quanto possível para os conjuntos G2 e G3.

Figura 25 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 350 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido.

Com relação às medidas experimentais, porém, parâmetros como β podem diferir por causa do fracionamento. Se o fracionamento é maior, há mais tempo para re-oxigenação do tecido e mesmo para que o FS na corrente sanguínea chegue, o que aumentaria a taxa de fotodegradação (e, portanto, β) – afinal, há mais efeito fotodinâmico. Por outro lado, se o fracionamento é menor, o parâmetro β é menor, porque o consumo de FS e oxigênio é mais rápido.

Da mesma forma, outros parâmetros como τ_1 e G podem ser diferentes ao modificar o fracionamento: τ_1 representa o efeito que a luz provoca nos vasos, e as interrupções mais longas mudam a dinâmica deste efeito; assim, é razoável pensar que levaria um tempo maior para que os vasos alcançassem a condição de máxima constrição, por exemplo. Para um fracionamento menor (intervalos mais curtos), portanto, τ_1 poderia ser menor, pois o efeito do campo é menos intermitente que quando o fracionamento é maior (intervalos mais longos). No caso de G , por outro lado, acaba sendo difícil determinar como o fracionamento modifica este parâmetro, pois ele é consequência de toda a atividade fotodinâmica no procedimento da terapia, e também depende do tecido-alvo.

Ao considerar como este fracionamento pode modificar os parâmetros envolvidos neste modelo, não é difícil entender porque os dados do grupo G1 são dificilmente associados aos parâmetros dos grupos G2 e G3. Contudo, como mostra a figura 26, modificando apenas o parâmetro β para metade (dado que o fracionamento é de aproximadamente metade daquele dos outros grupos) do valor usado nos grupos G2 e G3 (0,0025), a curva de degradação do grupo G1 praticamente se equipara aos dados experimentais. Ajustar a necrose é mais difícil, dado que as modificações biológicas podem ser tantas que não se pode supor uma razão de um para dois para G . Contudo, um valor arbitrário bem menor, mas ainda positivo ($G=0,3$) mostra que, para um fracionamento menor, o efeito da atenuação foi menos importante, provavelmente devido ao menor efeito fotodinâmico induzido.

A possibilidade de se ajustar estes parâmetros não deve ser entendida como uma solução para as divergências do modelo. O ponto chave da discussão apresentada para esta alteração é a questão de que a predição da resposta fotodinâmica é uma tarefa complexa, com aspectos diferenciados, altamente interativos e de difícil monitoramento ou controle direto. Além disso, ao que tudo indica e conforme a discussão já desenvolvida neste texto, o monitoramento do oxigênio tecidual tem papel fundamental numa melhoria plena dos resultados obtidos, uma vez que tanto o parâmetro de degradação (β) quanto a estimativa da função de oxigênio são elementos fundamentais deste processo – mas dificilmente monitoráveis *in vivo*. Isto impede que uma clareza maior seja atribuída às explicações encontradas para os ajustes de estimativas, aqui realizados.

Figura 26 - Profundidade de necrose (acima) e amplitude de fluorescência normalizada (degradação, abaixo) para Photogem[®], *in vivo*, como função das fluências (0–250 J/cm²) para intensidade constante de 250 mW/cm², durante diferentes períodos de irradiação. Os círculos sólidos representam o resultado experimental. As barras de erro representam o desvio padrão das médias dos animais independentes. A linha corresponde ao resultado obtido a partir da primeira modificação efetiva do modelo, com a introdução do efeito da farmacocinética e da modificação empregada para a atenuação total do tecido, com parâmetros modificados para considerar o fracionamento diferenciado.

Figura 27 - Parâmetros de correlação Ψ para 150, 250 e 350 mW/cm^2 , respectivamente, de cima para baixo, com o modelo modificado pela adição do efeito da farmacocinética, da modificação na atenuação e, para o grupo G1, com os parâmetros ajustados (conforme discussão sobre fracionamento).

Ainda tratando dos resultados obtidos para esta última modificação, convém observar o resultado da função de correlação obtido em oposição à experimentação (figura 27).

Dadas as muitas variações pontuais encontradas entre o modelo e os resultados experimentais, não houve boa concordância entre o Ψ calculado e o resultante das medidas. Uma vez que Ψ é o produto da razão de fluorescência e da necrose atingida, quando um dos pontos experimentais não coincide com a curva modelada, Ψ também não coincide.

No grupo G1, os dados para maiores fluências não se ajustam aos pontos porque a previsão de necrose é relativamente superior à necrose obtida. No caso de G3, é preciso destacar que o fato de a função estimada ficar abaixo dos valores experimentais deve-se, muito provavelmente, ao efeito observado na necrose experimental, cujos valores de d_{nec} medidos apresentam-se muito acima do esperado com base no modelo. Como Ψ representa o produto de d_{nec} e RF , é esperado que para um valor acima do normal de profundidade de necrose obtenha-se um valor acima do esperado para Ψ numa dada fluência. No caso de G1 (apresentado apenas a título de comparação), a previsão é ligeiramente inferior aos dados obtidos a partir da experimentação, seguindo a tendência da previsão da necrose na figura 26.

As dificuldades relatadas devido à impossibilidade técnica de monitorar alguns parâmetros tornam mais difícil continuar a fazer melhorias no modelo, enquanto não se consiga encontrar uma forma de estimar ou monitorar (*in vivo*, ainda que seja apenas em condições pré-clínicas) as alterações locais do tecido tratado. Além disso, explorar possibilidades de modificação dos parâmetros β , τ_1 , τ_2 , τ_{eff} , G (como por exemplo não assumir que sejam constantes, mas sim dependentes de fatores como a intensidade, o tecido ou o FS utilizado), ou ainda o uso do modelo em tecidos alterados, com acumulação espacial local do FS bem definida. A continuidade dos estudos em dosimetria para TFD explorando estas possibilidades pode, enfim, vir a tornar essa proposta uma possibilidade real, em especial para melhorias clínicas. Até lá, obter a previsão de uma necrose obtida numa lesão clínica usando o princípio de correlação aqui proposto ainda é um desafio a ser superado.

Como complemento das observações concernentes às modificações promovidas no comportamento das grandezas com as quais o modelo se relaciona, as figuras 28 e 29 apresentam exemplos das curvas de concentração e fluência, respectivamente, ao longo da profundidade, para os grupos G2 e G3.

Figura 28 - Curvas de concentração teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 150 mW/cm^2 (G2, acima) e 350 mW/cm^2 (G3, abaixo), ao longo da profundidade no tecido. A seta indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um determinado passo de tempo no modelo.

Figura 29 - Curvas de fluência de luz teórica (como obtidas do modelo) durante a iluminação, para 150 mW/cm^2 (G2, acima) e 350 mW/cm^2 (G3, abaixo), ao longo da profundidade no tecido. A seta indica a direção da evolução, sendo cada uma das curvas equivalente a um determinado passo de tempo no modelo.

Ao comparar as curvas das figuras 28 e 29 com aquelas apresentadas inicialmente para o conjunto de dados G1, é possível notar um comportamento semelhante ao observado no modelo inicial para o comportamento tanto da luz quanto na quantidade de FS que se avalia estar distribuída em profundidade no tecido, ao longo do tempo. Esta observação

deixa claro que, apesar das considerações feitas no modelo, a idéia geral de comportamento esperada quanto ao que se entende dos eventos que ocorrem durante a TFD não se modifica, o que evidencia consistência.

3.4 Pós-análise das modificações: comentários gerais sobre a predição

A proposição inicial deste estudo era desenvolver um modelo simples e eficiente para prever o resultado da TFD em tempo real, e que permitisse explorar possibilidades para melhoria do entendimento da dosimetria da terapia. Apesar das dificuldades encontradas na execução de um monitoramento da resposta da TFD que permitisse imediatamente a obtenção de uma função de $\Psi = \Psi(RF)$, tal que se pudesse, conhecidas as condições, prever corretamente o resultado da terapia, os resultados encontrados neste estudo não foram infrutíferos. As inferências feitas com o uso da espectroscopia de fluorescência permitiram um sucesso parcial da técnica proposta para o monitoramento da TFD *in vivo*, utilizando um método que, na forma apresentada, não foi relatado anteriormente na literatura, na qual não são apresentadas muitas técnicas semelhantes com a mesma simplicidade de parâmetros monitoráveis (pois neste estudo a única medida realmente realizada é a de fluorescência).

Além disso, uma vez que sejam melhor compreendidas as relações entre os parâmetros implícitos e explícitos da dosimetria da TFD, esta proposta apresentará um potencial clínico muito grande, pois permitirá uma avaliação em tempo real da resposta da terapia, contribuindo verdadeiramente para a melhoria das condições clínicas dos pacientes pós-terapia, e mesmo possibilitando que se evitem situações clínicas indesejáveis, como uma aplicação falha, através de estimativas prévias do tratamento usando o modelo aqui proposto, adequadamente melhorado.

Foram consideradas neste estudo as melhorias e os possíveis problemas do uso do modelo e das técnicas empregadas para estimativa do resultado da terapia (e, com isso, uma posterior determinação da função de correlação Ψ). Nesse sentido, e tendo em mente a proposta de simplicidade da técnica, tal que esta se faça factível e prática nas aplicações clínicas, encontra-se ainda uma barreira limitante na capacidade de avaliação da necrose por TFD: a oxigenação.

É preciso dar ênfase à questão da oxigenação na TFD, uma vez que o oxigênio é o mediador de todas as reações químicas no processo, quer seja ele tipo I ou tipo II, ou ainda conjugado. O ideal seria monitorar a produção de oxigênio singlete durante a TFD, e para que isso fosse factível *in vivo* seria preciso realizar a detecção da emissão do oxigênio

singleto em 1270 nm¹⁰⁶, uma técnica que exige instrumental de alta sensibilidade, e de difícil aplicação nas condições experimentais deste estudo.

Com respeito às distorções que a informação dada pela fluorescência pode sofrer pela superficialidade da coleta, a idéia de tentar “corrigir” a informação da fluorescência que é introduzida no modelo surgiu do fato de que a coleta de fluorescência é superficial, ou seja, de que a penetração de luz para a excitação (que é feita com luz verde, em 532 nm) é limitada a aproximadamente 2 mm no tecido hepático. Por causa desta limitação, o incremento no sinal de fluorescência que está relacionado ao FS misturado a uma dada porção de tecido é linear apenas até um limite, que é o limite de penetração da luz verde de excitação da fluorescência. Além dele, a ausência de excitação (já que os fótons de 532 nm não chegam ali) impossibilita a geração de um sinal de fluorescência detectável e, portanto, da avaliação da degradação do FS que venha a ocorrer em profundidades maiores que a da penetração da excitação, mas que ainda estejam dentro da penetração da luz de ativação do FS (vermelha, 630 nm). Isso acontece porque os comprimentos de onda da luz vermelha, envolvidos com a ativação do FS, apresentam maior penetração que os da excitação (vide esquema da figura 30).

Para simular esse efeito, uma avaliação simples do sinal de fluorescência utilizando sangue de um rato Wistar, misturado com Photogem® a 1,5 mg/ml (figura 31) foi realizada. Nesse teste, diferentes quantidades de sangue com FS (à concentração de 1,5 mg/kg de sangue) e heparina (para evitar a coagulação do sangue) foram colocadas num poço plástico de cultura de células, de modo que se pudesse avaliar a fluorescência para diferentes profundidades de um material com atenuação razoável.

O resultado deste teste (figura 31) demonstra que há um limite de profundidade para o qual se pode detectar alterações de fluorescência, como esperado, mas não dá suporte para uma correção efetiva. É perceptível que entre 2 e 4 mm de profundidade de sangue, não se observa mais variação no sinal, embora mais FS, a princípio, pudesse ser detectado no sangue das novas “camadas”. O resultado, contudo, é muito grosseiro para estimar uma profundidade adequada até onde se possa considerar a coleta de fluorescência.

De qualquer forma, tal correção poderia perfeitamente depender do tempo de irradiação, e/ou de outros fatores que se modificam durante o tratamento – e, de fato, muito provavelmente o faz, considerando as alterações teciduais de propagação de luz levadas em conta no modelo. Além disso, as propriedades ópticas do tecido em processo de necrose/apoptose podem induzir outras alterações, e o monitoramento de suas propriedades ópticas seria de grande valia para a melhoria da qualidade de previsão do modelo aqui desenvolvido. O monitoramento destas propriedades, contudo, embora seja de interesse para a aplicação em vista não é o enfoque deste estudo, o qual pode se beneficiar de estudos neste sentido no futuro.

Figura 30 - Penetração da luz versus informação da fluorescência (camadas de profundidade definidas como C1-C6, com C1 a mais superficial). Em (a), uma representação da penetração da luz de excitação da fluorescência, chegando até uma camada arbitrária C3, é apresentada. Em (b), representa-se a penetração da luz de ativação do FS (630 nm), em quantidade mínima de fluência para causar necrose até uma profundidade equivalente a C5. A região hachurada (camadas C4-C5) representam a maior penetração da luz vermelha do que a verde e, portanto, a perda de informação com relação à degradação do FS (e com isso, do dano promovido) ocorrida nas camadas mais profundas do tecido irradiado.

Figura 31 - Teste para exemplificação da perda de fluorescência. À esquerda: Representação da medida: um poço plástico de cultura com sangue misturado com FS teve sua fluorescência avaliada para diferentes volumes (profundidades) de material. À direita: gráfico mostrando o resultado, que evidencia o efeito de “saturação” ou “perda” de coleta a partir de, aproximadamente, entre 2 e 4 mm.

3.5 Possibilidades de exploração de parâmetros e protocolos

Em adição às possibilidades já apresentadas, é possível utilizar o modelo associado ao conhecimento constantemente adquirido dos ensaios pré-clínicos e clínicos sobre a TFD, sua dosimetria e FSs, para estudar novas possibilidades de protocolos clínicos, ou testar estimativas de efeito fotodinâmico para protocolos sem precedente experimental.

Como exemplo disso, um pequeno exercício desta simulação de protocolo foi realizado, em caráter ilustrativo. Imaginou-se a possibilidade de realizar protocolos de irradiação em TFD utilizando condições semelhantes às utilizadas neste estudo, mas com modificações especiais quanto à intensidade: foi, assim, proposta a irradiação com intensidade variando uniformemente no tempo.

Para esta proposição, aplicou-se o modelo a três diferentes condições de irradiação: a) uma constante, utilizando intensidade de 200 mW/cm²; b) uma decrescente, com intensidade variando uniformemente de 300 mW/cm² para 100 mW/cm²; e c) uma crescente, com intensidade variando uniformemente de 100 mW/cm² para 300 mW/cm², com passo de variação de 0,1 mW/cm².s (figura 32).

Figura 31 - Simulação da contribuição de intensidades superficiais, propostas para investigação de possibilidades de protocolo em TFD versus tempo de irradiação, em segundo. O passo aplicado às intensidades variáveis é de 0,1 mW/cm².s.

Ao integrar as curvas que representam a contribuição de intensidade superficial, é interessante notar que, apesar da variação na intensidade seguir a mesma taxa, em módulo,

a taxa de entrega de fluência não é a mesma, como pode ser visto na figura 33. Nela, como é possível observar, estão apresentadas as fluências entregues como função do tempo, o que indica que, apesar da energia total ao final de 2000 s ser a mesma (equivalente à uma fluência de 400 J/cm²), a forma como ela é entregue difere em cada regime.

Figura 32 - Integral das curvas que representam a contribuição de intensidade superficial, na forma de fluência versus tempo de irradiação, em diferentes regimes de taxa de intensidade. Apesar da variação na intensidade seguir a mesma taxa, em módulo, a taxa de entrega de fluência não a segue.

Figura 33 - Profundidades de necrose estimadas com base no modelo, para diferentes regimes de taxa de intensidade. É possível notar que a necrose final atingida depende de qual dos três regimes é usado, ou seja, não é idêntica entre eles, apesar da fluência final ser a mesma (400 J/cm²).

A evidência de que este modelo pode ser utilizado para avaliar a resposta de determinados protocolos para TFD são os gráficos da figura 33. Como é possível observar, as respostas para profundidade de necrose diferem umas das outras usando estes protocolos com regimes de taxa de intensidade variando no tempo. É interessante notar que o menor resultado final de profundidade de necrose em 400 J/cm^2 , com a mesma energia entregue, é para o regime que começa com uma alta intensidade que é paulatinamente reduzida, seguido daquele de intensidade constante e, finalmente, a maior profundidade de necrose para uma dose final de 400 J/cm^2 é aquela cujo regime de irradiação segue do menor para o maior valor de intensidade.

Certamente, uma evidência baseada num único teste feito com um modelo que tem suas falhas e dificuldades a serem superadas não pode ser tomado como a palavra final sobre a fenomenologia. Contudo, este exercício permite avaliar o potencial que um modelo como esse apresenta, não só como ferramenta de monitoramento da TFD, mas como instrumento de investigação e de aprendizado sobre a dosimetria. Sua aplicação, em especial quando for possível desvendar mais seguramente os mecanismos de ação e depleção do oxigênio no tecido, bem como a propagação do dano *in situ*, poderá se mostrar de grande valia no estabelecimento de protocolos mais seguros e bem fundamentados para a TFD.

3.6 Perspectivas

Considerada a discussão elaborada sobre o modelo aqui apresentado, é possível vislumbrar perspectivas para trabalhos futuros envolvendo o modelo e a proposta de aplicação aqui apresentadas.

Uma das possibilidades é a de incluir nos cálculos do modelo um aspecto tridimensional, uma vez que este aqui utilizado é unidimensional em profundidade, e por isso também sujeito às falhas ligas à ausência da contribuição da luz espalhada vinda de outras porções do tecido.

O uso de parâmetros específicos para melhoria da contribuição das modificações na propagação da luz também pode melhorar o resultado da metodologia. Técnicas de monitoramento de refletância difusa podem, a exemplo da literatura¹⁰⁷, permitir uma adaptação do método que permita incluir um monitoramento da alteração das propriedades ópticas com pouca complicação para o aparato experimental e para a técnica em si, que também pode ser utilizada *via* fibra óptica.

Considerar a contribuição das alterações nas propriedades de propagação da luz para vários comprimentos de onda é outra importante contribuição que pode ser feita a este trabalho, de forma a considerar também as distorções na coleta de fluorescência, e não apenas na da luz de tratamento.

Além disso, podem ser feitos testes em diferentes tecidos, FS, geometrias e mesmo em tecidos alterados, buscando validação do modelo e da técnica para condições cada vez mais abrangentes e complexas. Estes testes também permitiriam avaliar como a função de correlação Ψ se modifica dependendo dos parâmetros de dosimetria envolvidos, e aproximaria este trabalho do seu objetivo inicial.

4 CONCLUSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi o de elaborar um modelo matemático que fosse simultaneamente completo o suficiente para ser satisfatório, e simples o suficiente para permitir sua fácil aplicação na clínica em um monitoramento não-invasivo e de tempo real durante aplicações clínicas da TFD. Tal modelo seria utilizado para permitir a previsão da profundidade de necrose e, portanto, da extensão do dano causado – ou seja, da efetividade da terapia. Este objetivo foi parcialmente atingido, uma vez que se conseguiu um modelo capaz de previsões razoáveis dos resultados experimentais. Contudo, dificuldades inerentes à técnica e à ausência de capacidade técnica para monitorar determinados parâmetros da TFD – em especial o oxigênio – mostraram-se um empecilho para a completa conquista do objetivo proposto. Apesar disso, concluiu-se que os avanços alcançados neste estudo são motivação suficiente para que haja desdobramento em outros trabalhos, de forma a aproximar a dosimetria da TFD de um de seus objetivos mais desafiadores: o monitoramento preciso e em tempo real dos procedimentos de tratamento.

Pretendeu-se também, como um objetivo secundário, utilizar o modelo desenvolvido para, dentro de suas possibilidades de previsão, ampliar o entendimento sobre os resultados da TFD e explorar as possibilidades de modificações de protocolos de dosimetria, visando orientar novos estudos pré-clínicos e clínicos de TFD. Este objetivo também foi atingido parcialmente, visto que, se o modelo por um lado mostrou-se perfeitamente viável para investigação de explorações de protocolos, tais investigações também estão sujeitas às limitações encontradas no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer - INCA. *Estimativa/2010 – incidência de câncer no Brasil. Brasília, 2010.*

- 2 RAAB, O. Effect of fluorescent substances on Infusoria. *Zeitschrift fur Biologie*, v. 39, n. 2, p. 524-6, 1900.

- 3 TAPPENIER, H.J., A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *MUENCHEN MEDIZINISCH WOCHENSCHRIFT*, v. 1, 1903.

- 4 POLICARD, A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumikre de Wood. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, v. 91, p.1423-24, 1924.

- 5 LIPSON, R. G. et al. *Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer.* In: *INTERNATIONAL CANCER CONGRESS*, 9., 1966. Tokyo. *Proceedings ...Tokyo:* Springer, 1967

- 6 WEISHAUPT, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Research*, v. 36, n. 7 pt 1, p. 2326-9, 1976.

- 7 DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUPT, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research*, v. 38, n. 8, p. 2628-35, 1978.

- 8 HENDERSON, B.; GOLLNICK, S. Mechanistic principles of photodynamic therapy. In: VO-DINH, T. *Biomedical photonics handbook*, Boca Raton: CRC Press., 2003. p.27.

- 9 MACHADO, A. E. D. Photodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. *Quimica Nova*, v. 23, n, 2, p. 237-243, 2000.

- 10 SIBATA, C. H.; ALLISON, R. R.; SHENG, C.; CUENCA, R.; BAGNATO, V. S.; AUSTERLITZ, C. Photodynamic therapy for anal cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, n, 2, p. 115-119, 2010.

- 11 WANG, X. L.; WANG, H. W.; GUO, M. X.; XU, S. Z. Treatment of skin cancer and pre-cancer using topical ALA-PDT - A single hospital experience. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 5, n. 2, p. 127-133, 2008.

12 SOUZA, C. S.; FELICIO, L. B. A.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BENTLEY, M. V. B.; TEDESCO, A. C.; BAGNATO, V. S. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 6, n. 3-4, p. 207-213, 2009.

13 LEHMANN, P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*, v. 156, n. 5, p. 793-801, 2007.

14 ALLISON, R. R.; SIBATA, C.; MANG, T. S.; BAGNATO, V. S.; DOWNIE, G. H.; HU, X. H.; CUENCA, R. Photodynamic therapy for chest wall recurrence from breast cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, p. 157-171, 2004. DOI:10.1016/S1572-1000(04)00039-0

15 DE HAAS, E. R. M.; DE VIJLDER, H. C.; STERENBORG, H.; NEUMANN, H. A. M.; ROBINSON, D. J. Fractionated aminolevulinic acid-photodynamic therapy provides additional evidence for the use of PDT for non melanoma skin cancer. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 22, n. 4, p. 426-30, 2008.

16 CHRISTENSEN, E.; WARLOE, T.; KROON, S.; FUNK, J.; HELSING, P.; SOLER, A. M.; STANG, H. J.; VATNE, O.; MORK, C. Guidelines for practical use of MAL-PDT in non-melanoma skin cancer. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 24, n. 5, p. 505-512, 2010.

17 OVERHOLT, B.F.; PANJEHPOUR, M.; HAYDEK, J. M. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus: follow-up in 100 patients. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 49, n. 1, p. 1-7, 1999.

18 PANJEHPOUR, M.; OVERHOLT, B. F.; HAYDEK, J. M.; LEE, S. G. Results of photodynamic therapy for ablation of dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus and effect of oral steroids on stricture formation. *American Journal of Gastroenterology*, v. 95, n. 9, p. 2177-2184, 2000.

19 FOROULIS, C. N.; THORPE, J. A. C. Photodynamic therapy (PDT) in Barrett's esophagus with dysplasia or early cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, v. 29, n. 1, p. 30-34, 2006.

20 MARTI, A.; JICHLINSKI, P.; LANGE, N.; BALLINI, J. P.; GUILLOU, L.; LEISINGER, H. J.; KUCERA, P. Comparison of aminolevulinic acid and hexylester aminolevulinate induced protoporphyrin IX distribution in human bladder cancer. *Journal of Urology*, v. 170, n. 2, p. 428-432, 2003.

21 KAMUHABWA, A.; AGOSTINIS, P.; AHMED, B.; LANDUYT, W.; VAN CLEYNENBREUGEL, B.; VAN POPPEL, H.; DE WITTE, P. Hypericin as a potential phototherapeutic agent in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 3, n. 8, p. 772-780, 2004.

- 22 MOGHISSI, K.; DIXON, K. Photodynamic therapy (PDT) of central type lung cancer: current indications based on 15 years experience and literature review. *Lasers in Surgery and Medicine*, p. 61-61, 2005.
- 23 KATO, H.; HARADA, M.; ICHINOSE, S.; USUDA, J.; TSUCHIDA, T.; OKUNAKA, T. Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 1, p. 49-55, 2004.
- 24 MOGHISSI, K.; DIXON, K.; THORPE, J. A. C.; STRINGER, M.; OXTOBY, C. Photodynamic therapy (PDT) in early central lung cancer: a treatment option for patients ineligible for surgical resection. *Thorax*, v. 62, n. 5, p. 391-395, 2007.
- 25 SCHMIDT, M. H.; MEYER, G. A.; REICHERT, K. W.; CHENG, J.; KROUWER, H. G.; OZKER, K.; WHELAN, H. T. Evaluation of photodynamic therapy near functional brain tissue in patients with recurrent brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 67, n. 1-2, p. 201-207, 2004.
- 26 WILSON, B. C.; MULLER, P. J.; YANCH, J. C. Instrumentation and light dosimetry for intra-operative photodynamic therapy (PDT) of malignant brain tumours. *Physics in Medicine and Biology* v. 31, n. 2, p. 125-33, 1986.
- 27 WEERSINK, R. A.; BOGAARDS, A.; GERTNER, M.; DAVIDSON, S. R. H.; ZHANG, K.; NETCHEV, G.; TRACHTENBERG, J.; WILSON, B. C. Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: clinical experience and practicalities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, v. 79, n. 3, p. 211-222, 2005.
- 28 ZAAK, D.; SROKA, R.; STOCKER, S.; BISE, K.; LEIN, M.; HOPPNER, M.; FRIMBERGER, D.; SCHNEEDE, P.; REICH, O.; KRIEGMAIR, M.; KNUCHEL, R.; BAUMGARTNER, R.; HOFSTETTER, A. Photodynamic therapy of prostate cancer by means of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX - In vivo experiments on the dunning rat tumor model. *Urologia Internationalis*, v. 72, n. 3, p. 196-202, 2004.
- 29 HAHN, S. M.; DU, K. L.; MICK, R.; BUSCH, T.; ZHU, T. C.; FINLAY, J. C.; YU, G.; YODH, A. G.; MALKOWICZ, S. B.; SMITH, D.; WHITTINGTON, R.; STRIPP, D. Preliminary results of interstitial motexafin lutetium-mediated PDT for prostate cancer. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 38, n. 5, p. 427-434, 2006.
- 30 PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N.; MIMA, E. G. D.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E.; BAGNATO, V. S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*, v. 54, n. 2, p. 123-130, 2011.
- 31 PAVARINA, A. C.; MIMA, E. G. D.; DOVIGO, L. N.; VERGANI, C. E.; COSTA, C.A.D.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, v. 109, n. 3, p. 392-401, 2010.

32 GIUSTI, J. S. M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A. C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 26, n. 4, p. 281-287, 2008.

33 ION, R. M.; CALIN, M. A. The efficacy of photodynamic inactivation of the microorganisms using laser sources and methylene blue as sensitizer. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, v. 12, n. 1, p. 141-145, 2010.

34 MAISCH, T.; GONZALES, F. P. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, v. 145, n. 4, p. 477-489, 2010.

35 PERUSSI, J. R. Photodynamic inactivation of microorganisms. *Quimica Nova*, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

36 DIRSCHKA, T.; RADNY, P.; DOMINICUS, R.; MENSING, H.; BRUENING, H.; JENNE, L.; KARL, L.; SEBASTIAN, M.; OSTER-SCHMIDT, C.; KLOEVEKORN, W.; REINHOLD, U.; TANNER, M.; GROENE, D.; DEICHMANN, M.; SIMON, M.; HUEBINGER, F.; HOFBAUER, G.; KRAEHN-SENFTLEBEN, G.; BORROSCH, F.; REICH, K.; BERKING, C.; WOLF, P.; LEHMANN, P.; MOERS-CARPI, M.; HOENIGSMANN, H.; WERNICKE-PANTEN, K.; HELWIG, C.; FOGUET, M.; LUEBBERT, H.; SZEIMIES, R. M. Efficacy and safety comparison of photodynamic therapy with BF-200 ALA versus Metvix (R) for the treatment of actinic keratosis: a prospective, randomized, placebo-controlled multinational, phase III study. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 9, p. 196-197, 2011.

37 ALLISON, R. R.; CUENCA, R.; DOWNIE, G.H.; RANDALL, M. E.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. PD/PDT for gynecological disease: a clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, n. 1, p. 51-63, 2005.

38 MOBLEY, J., VO-DINH, T. Optical properties of tissue. In: VO-DINH, T. *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.75.

39 SABINO, L. G.; DE NEGREIROS, L. M. V.; VOLLET-FILHO, J. D.; FERREIRA, J.; TIRAPELLI, D. P. C.; NOVAIS, P. C.; TIRAPELLI, L. F.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Experimental evidence and model explanation for cell population characteristics modification when applying sequential photodynamic therapy. *Laser Physics Letters*, v. 8, n. 3, p. 239-246, 2011.

40 WANG, Y. H.; CHEN, C. H.; CHIOU, J. F.; LIU, T. Z. To record and direct visualization of cellular lipid peroxidation and glutathione (GSH) depletion in HepG2 cells exposed to laser irradiation-induced photodynamic effects (PDT) of BPD-M.A using confocal microscopy. *Free Radical Research*, v. 40, p. S170-S170, 2006.

41 WILSON, T. Confocal microscopy. In: VO-DINH, T. (Ed.) *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.18.

42 FUJIMOTO, J.; BREZINSKI, M. Confocal microscopyoptical coherence tomography imaging. In: VO-DINH, T. (Ed.) *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.29.

43 HÜTTMANN, G. Optical coherence tomography (OCT) for early diagnosis of tumors and online-control of photodynamic therapy (PDT). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. v.8, n. 2, p. 152-152, 2011

44 XING, D.; XIANG, L. Z.; GU, H. M.; YANG, D. W.; YANG, S. H.; ZENG, L. M.; CHEN, W. R. Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor. *Journal of Biomedical Optics*, v. 12, n, 1, p. 014001, 2007.

45 ORAEVSKY, A.; KARABUTOV, A. Optoacoustic tomography. In: VO-DINH, T. (Ed.) *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 34.

46 MOURANT, J. Elastic-scattering spectroscopy and diffuse reflectance. In: VO-DINH, T. (Ed.) *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.22.

47 JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; IANI, V.; MOAN, J. Reflectance spectroscopy and fluorescein angiography applied to assess photodynamic response in healthy mouse skin treated with topical hexylaminolevulinat. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, p. 239-245, 2010.

48 WANG, H.W.; ZHU, T. C.; PUTT, M. E.; SOLONENKO, M.; METZ, J.; DIMOFTE, A.; MILES, J.; FRAKER, D. L.; GLATSTEIN, E.; HAHN, S. M.; YODH, A. G. Broadband reflectance measurements of light penetration, blood oxygenation, hemoglobin concentration, and drug concentration in human intraperitoneal tissues before and after photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics*, v. 10, n. 1, p. 14004, 2005.

49 VO-DINH, T. Fluorescence spectroscopy for biomedical diagnostics. In: VO-DINH, T. (Ed.) *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 50.

50 BOERE, I. A.; ROBINSON, D. J.; DE BRUIJN, H. S.; VAN DEN BOOGERT, J.; TILANUS, H. W.; STERENBORG, H. J. C. M.; DE BRUIN, R. W. F. Monitoring in Situ dosimetry and protoporphyrin IX fluorescence photobleaching in the normal rat esophagus during 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, n. 3, p. 271-277, 2003.

51 BRAICHOTTE, D. R.; SAVARY, J. F.; MONNIER, P.; VANDENBERGH, H. E. Optimizing light dosimetry in photodynamic therapy of early stage carcinomas of the esophagus using fluorescence spectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 19, n. 3, p. 340-346, 1996.

52 CHEUNG, R.; SOLONENKO, M.; BUSCH, T. M.; DEL PIERO, F.; PUTT, M. E.; HAHN, S. M.; YODH, A. G. Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic-therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model. *Journal of Biomedical Optics*, v. 8, n. 2, p. 248-252, 2003.

53 FARRELL, T. J.; HAWKES, R. P.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Modeling of photosensitizer fluorescence emission and photobleaching for photodynamic therapy dosimetry. *Applied Optics*, v. 37, n. 31, p. 7168-7183, 1998.

54 GEORGAKOUDI, I. The color of cancer. *Journal of Luminescence*, v. 119, n. 1, p. 75-83, 2006.

55 JARVI, M. T.; NIEDRE, M. J.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects. *Photochemistry and Photobiology*, v. 82, n. 5, p. 1198-1210, 2006.

56 RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy *in vivo*. In: MEYERS, R. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. p. 20-56.

57 ROBINSON, D. J.; DE BRUIJN, H. S.; VAN DER VEEN, N.; STRINGER, M. R.; BROWN, S. B.; STAR, W. M. Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochemistry and Photobiology*, v. 67, n. 1, p. 140-149, 1998.

58 VOLLET-FILHO, J. D.; GRECCO, C.; MENEZES, P.; MORIYAMA, L.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. Correlation between photosensitizer degradation and depth of necrosis in PDT: Possibility for real time dosimetry. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. S20, p. 9, 2008.

59 VOLLET-FILHO, J. D.; MENEZES, P.; MORIYAMA, L.; GRECCO, C.; SIBATA, C.; ALLISON, R.; CASTROESILVA, O.; BAGNATO, V. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. *Journal of Applied Physics*, v. 105, n. 10, p. 102038-1-102038-7, 2009.

60 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S.; LILGE, L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm. *Lasers in Medical Science*, v. 12, n. 3, p. 182-199, 1997.

61 MILLER, G. G.; BROWN, K.; MOORE, R. B.; DIWU, Z. J.; LIU, J.X.; HUANG, L.; LOWN, J.W.; BEGG, D. A.; CHLUMECKY, V.; TULIP, J.; MCPHEE, M. S. Uptake kinetics and intracellular-localization of hypocrellin photosensitizers for photodynamic therapy - a confocal microscopy study. *Photochemistry and Photobiology*, v. 61, n. 6, p. 632-638, 1995.

62 WU, Y. X.; XING, D.; CHEN, W. R. Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by photofrin-PDT. *Cell Cycle*, v. 5, n. 7, p. 729-734, 2006.

- 63 BASHSHUR, Z. F.; SCHAKAL, A.; HAMAM, R. N.; EL HAIBI, C. P.; JAAFAR, R.F.; NOUREDDIN, B. N. Intravitreal bevacizumab vs verteporfin photodynamic therapy for Neovascular age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology*, v. 125, n. 10, p. 1357-1361, 2007.
- 64 SAHNI, J.; STANGA, P.; WONG, D.; HARDING, S. Optical coherence tomography in photodynamic therapy for subfoveal choroidal neovascularisation secondary to age related macular degeneration: a cross sectional study. *British Journal of Ophthalmology*, v. 89, n. 3, p. 316-320, 2005.
- 65 HAMDOON, Z.; JERJES, W.; UPILE, T.; HOPPER, C. Optical coherence tomography-guided photodynamic therapy for skin cancer: case study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 8, n. 1, p. 49-52, 2011.
- 66 MAJOR, A.; KIMEL, S.; MEE, S.; MILNER, T. E.; SMITHIES, D. J.; SRINIVAS, S. M.; CHEN, Z. P.; NELSON, J. S. Microvascular photodynamic effects determined in vivo using optical Doppler tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 5, n. 4, p. 1168-1175, 1999.
- 67 KNIGHT, M. M.; ROBERTS, S. R.; LEE, D. A.; BADER, D. L. Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. *American Journal of Physiology-cell physiology*, v. 284, n. 4, p. C1083-C1089, 2003.
- 68 XIANG, L. Z.; XING, D.; GU, H. M.; YANG, D. W.; YANG, S. H.; ZENG, L. M.; CHEN, W. R. Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor. *Journal of Biomedical Optics*, v. 12, n. 1, p., 2007.
- 69 XIANG, L. Z.; ZHOU, F. Photoacoustic imaging application in tumor diagnosis and treatment monitoring. *Key Engineering Materials*, v. 364-366, p. 1100-1104, 2008. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.364-366.1100.
- 70 KOROL, M. M.; KHAIRULLINA, A. Y.; SLESAR', A.S.; PARKHOTS, M. V.; OL'SHANSKAYA, T.V. Determination of photosensitizer concentration in biological tissues from diffuse reflectance and fluorescence. *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 76, n. 2, p. 260-267, 2009.
- 71 FINLAY, J. C.; ZHU, T. C.; DIMOFTE, A.; FRIEDBERG, J. S.; CENGEL, K. A.; HAHN, S. M. Diffuse reflectance spectra measured in vivo in human tissues during photofrin-mediated pleural photodynamic therapy: updated results. In: KESSEL, D. H. (Ed.) *Optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy XVIII*, 2009. (Proceedings of SPIE, v. 7164). DOI: 10.1117/12.809076

72 FARRELL, T. J.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. A diffusion-theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical-properties In vivo. *Medical Physics*, v. 19, n. 4, p. 879-888, 1992.

73 WILSON, B. C.; ADAM, G. A Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue. *Medical Physics*, v. 10, n. 6, p. 824-30, 1983.

74 BARAJAS, O.; BALLANGRUD, A. M.; MILLER, G. G.; MOORE, R. B.; TULIP, J. Monte Carlo modelling of angular radiance in tissue phantoms and human prostate: PDT light dosimetry. *Physics in Medicine and Biology*, v. 42, n. 9, p. 1675-1687, 1997.

75 WANG, S. P.; XU, L. Q.; LI, H.; XIE, S. S. Monte Carlo simulation of the diffusely scattered polarized light in turbid media. In: OPTICS IN HEALTH CARE AND BIOMEDICAL OPTICS: diagnostics and Treatment II.2004, Beijing. *Proceedings ...* Beijing: SPIE, 2005. DOI:10.1117/12.576972

76 VALENTINE, R. M.; BROWN, C. T. A.; MOSELEY, H.; IBBOTSON, S.; WOOD, K. Monte Carlo modeling of in vivo protoporphyrin IX fluorescence and singlet oxygen production during photodynamic therapy for patients presenting with superficial basal cell carcinomas. *Journal of Biomedical Optics*, v. 16, n. 4, 2011. DOI:10.1117/1.3562540

77 WU, J.; FELD, M. S.; RAVA, R. P. Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media. *Applied Optics*, v. 32, n. 19, p. 3585-3595, 1993.

78 ISHIMARU, A. Diffusion of light in turbid material. *Applied Optics*, v. 28, n. 12, p. 2210-2215, 1989.

79 MULLER, M. G.; GEORGAKOUDI, I.; ZHANG, Q. G.; WU, J.; FELD, M. S. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. *Applied Optics*, v. 40, n. 25, p. 4633-4646, 2001.

80 BISWAL, N. C.; GUPTA, S.; GHOSH, N.; PRADHAN, A. Recovery of turbidity free fluorescence from measured fluorescence: an experimental approach. *Optics Express*, v. 11, n. 24, p. 3320-3331, 2003.

81 ZHANG, Q. G.; MULLER, M. G.; WU, J.; FELD, M. S. Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissue. *Optics Letters*, v. 25, n. 19, p. 1451-1453, 2000.

82 WAGNIERES, G.; CHENG, S. G.; ZELLWEGER, M.; UTKE, N.; BRAICHOTTE, D.; BALLINI, J. P.; VANDENBERGH, H. An optical phantom with tissue-like properties in the visible for use in PDT and fluorescence spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, v. 42, n. 7, p. 1415-1426, 1997.

83 WELCH, A. J.; GARDNER, C.; RICHARDSKORTUM, R.; CHAN, E.; CRISWELL, G.; PFEFER, J.; WARREN, S. Propagation of fluorescent light. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 21, n. 2, p. 166-178, 1997.

84 GEORGAKOUDI, I.; FELD, M.; MÜLLER, M. Intrinsic fluorescence spectroscopy of biological tissue. In: MYCEKB, M-A.; POGUE, 'B. W. (Ed.) *Handbook of biomedical fluorescence*. New York: Marcel Dekker, 2003. p.109-142.

85 LOSCHENOV, V. B.; KONOV, V. I.; PROKHOROV, A. M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics. *Laser Physics*, v. 10, n. 6, p. 1188-1207, 2000.

86 ZHOU, X. D.; CHEN, B.; HOOPEs, P. J.; HASAN, T.; POGUE, B. W. Tumor vascular area correlates with photosensitizer uptake: analysis of verteporfin microvascular delivery in the dunning rat prostate tumor. *Photochemistry and Photobiology*, v. 82, n. 5, p. 1348-1357, 2006.

87 VOLLET-FILHO, J. D.; CARACANHAS, M. A.; GRECCO, C.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence for photodynamic therapy outcome. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2010.

88 MENEZES, P. F. C.; IMASATO, H.; FERREIRA, J.; BAGNATO, V. S.; PERUSSI, J. R. Correlation of cytotoxicity and depth of necrosis of the photoproducts of Photogem (R). *Laser Physics*, v. 17, n. 4, p. 461-467, 2007.

89 MELO, C.; KURACHI, C.; GRECCO, C.; SIBATA, C.; CASTRO-E-SILVA, O.; BAGNATO, V. Pharmacokinetics of photogem using fluorescence monitoring in wistar rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 73, n. 3, p. 183-188, 2004.

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

91 ORENSTEIN, A.; KOSTENICH, G.; TSUR, H.; KOGAN, L.; MALIK, Z. Temperature monitoring during photodynamic therapy of skin tumors with topical 5-aminolevulinic acid application. *Cancer Letters*, v. 93, n. 2, p. 227-232, 1995.

92 FINLAY, J. C.; MITRA, S.; PATTERSON, M. S.; FOSTER, T. H. Photobleaching kinetics of photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms. *Physics in Medicine and Biology*, v. 49, n. 21, p. 4837-4860, 2004.

93 PARSA, P.; JACQUES, S. L.; NISHIOKA, N. S. Optical-properties of rat-liver between 350 and 2200 Nm. *Applied Optics*, v. 28, n. 12, p. 2325-2330, 1989.

94 FERREIRA, J.; MORIYAMA, L. T.; KURACHI, C.; SIBATA, C.; SILVA, O. C. E.; ZUCOLOTO, S.; BAGNATO, V. S. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. *Laser Physics Letters*, v. 4, n. 6, p. 469-475, 2007.

95 WOODHAMS, J. H.; KUNZ, L.; BOWN, S. G.; MACROBERT, A. J. Correlation of real-time haemoglobin oxygen saturation monitoring during photodynamic therapy with microvascular effects and tissue necrosis in normal rat liver. *British Journal of Cancer*, v. 91, n. 4, p. 788-794, 2004.

96 AVELINE, B.M.; SATTLER, R. M.; REDMOND, R. W. Environmental effects on cellular photosensitization: correlation of phototoxicity mechanism with transient absorption spectroscopy measurements. *Photochemistry and Photobiology*, v. 68, n. 1, p. 51-62, 1998.

97 BAGNATO, V.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L.; SIBATA, C.; ALLISON, R. PDT experience in Brazil: a regional profile. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, n. 2, p. 107-118, 2005.

98 FIJAN, S.; HONIGSMANN, H.; ORTEL, B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *British Journal of Dermatology*, v. 133, n. 2, p. 282-288, 1995.

99 TROMBERG, B.; ORENSTEIN, A.; KIMEL, S.; BARKER, S.; HYATT, J.; NELSON, J.; BERNS, M. Invivo tumor oxygen-tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 52, n. 2, p. 375-385, 1990.

100 HENDERSON, B. W.; BUSCH, T. M.; VAUGHAN, L. A.; FRAWLEY, N .P.; BABICH, D.; SOSA, T. A.; ZOLLO, J. D.; DEE, A. S.; COOPER, M. T.; BELLNIER, D. A.; GRECO, W. R.; OSEROFF, A. R. Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Research*, v. 60, n. 3, p. 525-529, 2000.

101 EDWARDS, A. *Introduction to linear regression and correlation*. San Francisco, CA: Freeman. 1976.

102 VO-DINH, T. *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press. 2003.

103 HENDERSON, B. W.; BUSCH, T. M.; SNYDER, J. W. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 38, n. 5, p. 489-493, 2006.

104 MORIYAMA, L. *Métodos simplificados para obtenção de distribuição de luz em tecidos biológicos: aplicação para terapia fotodinâmica*. 2011. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

105 NILSSON, A. M. K.; BERG, R.; ANDERSSON-ENGELS, S. Measurements of the optical-properties of tissue in conjunction with photodynamic therapy. *Applied Optics*, v. 34, n. 21, p. 4609-4619, 1995.

106 NIEDRE, M.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochemistry and Photobiology*, v. 75, n. 4, p. 382-391, 2002.

107 COTTRELL, W.; OSEROFF, A.; FOSTER, T. Portable instrument that integrates irradiation with fluorescence and reflectance spectroscopies during clinical photodynamic therapy of cutaneous disease. *Review of Scientific Instruments*, v. 77, n. 6, p.064302, 2006. DOI:10.1063/1.2204617.

108 CONTINI, D.; MARTELLI, F.; ZACCANTI, G. Photon migration through a turbid slab described by a model based on diffusion approximation .2. theory. *Applied Optics*, v. 36, n. 19, p. 4587-4599, 1997.

109 MARTELLI, F.; CONTINI, D.; TADDEUCCI, A.; ZACCANTI, G. Photon migration through a turbid slab described by a model based on diffusion approximation .2. comparison with Monte Carlo results. *Applied Optics*, v. 36, n. 19, p. 4600-4612, 1997.

110 LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Plenum Press. 1983.

APÊNDICE A – Diagramas de fluxo - rotinas

Rotina - inicial

Rotina - alteração atenuação da luz

Rotina – testes intensidade variável

Rotina final – completa

APÊNDICE B – Breve descrição das técnicas de monitoramento tecidual

Este apêndice destina-se a fazer uma breve apresentação das técnicas mencionadas no texto e, com maior grau de detalhamento, da espectroscopia de fluorescência, por se tratar da ferramenta de monitoramento tecidual aplicada neste estudo.

Técnicas ópticas para investigação tecidual

A *microscopia confocal* permite análise de amostras espessas de tecido biológico em três dimensões, usando uma aproximação de varredura junto de um sistema óptico confocal. A idéia básica deste sistema óptico confocal consiste numa fonte de luz puntual usada para investigar um único ponto da amostra. A radiação vinda da luz refletida ou da fluorescência deste ponto único é então medida por um detector puntual, tipo *pinhole*.

A vantagem principal da técnica é a alta definição tanto da resolução lateral quanto na discriminação em profundidade, por conta da iluminação/detecção pontuais. Esta alta resolução de profundidade é que torna possível realizar varreduras em três dimensões, através da combinação de varreduras de alta resolução em duas dimensões. Contudo, além do conhecimento das técnicas de formação de imagens, esta técnica sofre com dificuldades relacionadas às aberrações de absorção em lentes e movimentação de amostras (em especial *in vivo*). No caso de coleta de fluorescência, a resolução pode diminuir devido à localização na qual a fluorescência é gerada ou coletada (devido principalmente aos efeitos de espalhamento que esta luz sofre). Técnicas de fluorescência por dois fótons melhoram esta resolução, pois restringem tais efeitos devido à modificação do foco. Entretanto, para realizar esse tipo de medida são precisos fotossensibilizadores mais eficientes quanto à absorção nas regiões de interesse de excitação, e são requeridos lasers mais especializados (que permitam maiores intensidades para a excitação), aumentando o custo da técnica. Embora haja discriminação em profundidade, a técnica possui ainda limitações nas profundidades alcançadas (da ordem de 250 μm).

A técnica de *OCT*, por sua vez, permite realizar imagens de microestruturas internas de materiais e sistemas biológicos de alta resolução (aproximadamente entre 1 e 15 μm), utilizando luz retroespalhada ou refletida. A *OCT* é de uma a duas ordens de grandeza melhor resolvida que a ultrassonografia, podendo ser realizada *in situ*, em tempo real e

preservando a amostra investigada. O arranjo da instrumentação também pode ser feito de forma tal que o sistema seja compacto e de baixo custo, o que viabiliza sua utilização.

Esta técnica utiliza detecção interferométrica associada a métodos de correlação, com princípios semelhantes aos da ultrassonografia; ela usa a reflexão ou o retroespalhamento da luz nas diferentes camadas teciduais para identificar suas posições e estruturas, de modo semelhante ao efeito de um radar – ou seja, medindo a diferença de tempo entre os “pulsos” das ondas (nesse caso, eletromagnéticas). A grande diferença entre usar ondas sonoras e eletromagnéticas é que a velocidade da luz é cerca de 10^6 vezes mais rápida que a do som, o que exige resolução ultra-rápida para detectar a diferença entre dois sinais de luz em curtas distâncias (da ordem de 30 fs para distâncias de cerca de 10 μm). Como a eletrônica direta não permite tal detecção, utilizam-se técnicas de correlação que comparam a luz coletada com a referência atravessando um caminho conhecido.

A técnica apresenta certo número de vantagens, como boa resolução e sensibilidade, não exigência de contato com a amostra, e o fato de permitir o uso de componentes de fibra óptica que facilitam a aplicação da técnica. A desvantagem principal é que, com comprimentos de onda da ordem de 1,3 μm , é possível chegar a profundidades de 2-3 mm com boa resolução da imagem. Além disso, é preciso alta sensibilidade de detecção para meios altamente espalhadores, como são a maioria dos tecidos biológicos. Por isso, suas melhores indicações são para uso como biópsia óptica oftálmica.

Por *tomografia fotoacústica*, pode-se entender a reconstrução de imagens baseadas em detecção com resolução temporal de perfis de pressão acústica tecidual, induzidos pela absorção de pulsos ópticos sob condições tais que os pulsos de luz sejam entregues mais rapidamente ao tecido que sua resposta acústica é capaz de viajar dentro da resolução espacial desejada – ou seja, uma resolução de 10 μm para um tecido onde a onda acústica viaje a 1 mm/ μs implica na necessidade de pulsos de duração menor que 0,01 μs .

Esta técnica permite uma investigação não-invasiva de tecidos, com resolução razoável para detectar alterações de composição/estrutura de materiais e tecidos. Esta resolução, contudo, depende da velocidade de resposta dos detectores (que deve ser mais rápida que os pulsos), da fonte de luz pulsada, e também da largura da banda de detecção de frequência dos transdutores utilizados – é necessário que sejam transdutores acústicos de banda ultra-larga, para que sejam capazes de detectar rápidas variações de sinal fotoacústico associadas a interfaces, ao mesmo tempo em que permitam detectar variações lentas produzidas pela suave modificação das propriedades ópticas dentro de um mesmo tecido. Além deste limitante para a resolução espacial de profundidade, também é necessária uma geometria adequada de *arrays* de detectores de modo a definir a resolução lateral.

Por *refletância difusa*, ou técnicas de espalhamento elástico, entende-se o uso de medidas de propagação da luz através de um material ou tecido, tal que se possam obter informações biomorfológicas sobre os mesmos por meio do estudo de suas propriedades ópticas e das respectivas modificações que estas sofram. Estas técnicas são comumente associadas a modelos computacionais de propagação de fótons (como as bem conhecidas simulações de Monte Carlo⁷³⁻⁷⁶), ou a outras técnicas (como a espectroscopia de fluorescência¹⁰⁷), na determinação e monitoramento de propriedades ópticas de materiais/tecidos biológicos usando a Teoria de Aproximação da Difusão^{78, 108-109}.

Uma vez que se trata da ferramenta de escolha para este estudo, os fundamentos da técnica de espectroscopia de fluorescência serão tratados em maior grau de detalhamento, a seguir.

Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica baseada na coleta da emissão de fluorescência de determinados átomos ou moléculas. Para apresentá-la, bem como mostrar sua utilidade neste estudo e na TFD de maneira geral, serão discutidos brevemente os tipos de luminescência (emissão de fótons a partir de estados eletrônicos excitados), dentre os quais a fluorescência é uma das formas mais utilizadas.

Figura 34 - Esquema da disposição comumente observada dos spins nos orbitais moleculares para um estado fundamental, um singlete excitado e um triplete excitado.

O processo de emissão de luz pode ser identificado por diferentes nomes, dependendo da natureza do estado fundamental e dos estados excitados da molécula envolvida, mas é conhecido de modo mais amplo como luminescência. Quando uma molécula encontra-se num estado excitado singlete, o elétron no orbital de maior energia tem orientação de spin diferente daquela observada num elétron no orbital de menor energia. Quando nesta situação, eles são denominados “desemparelhados” ($S = 0$). Em um estado tripleto, por outro lado, os elétrons estão “emparelhados”, ou seja, apresentam a mesma orientação do spin ($S = 1$). Não é necessária a alteração na orientação de spin para que ocorra transição para um estado fundamental, mas tal alteração é requerida para que haja uma transição entre um estado singlete e um tripleto ou vice-versa (ver figura 35).

Dentre os processos de emissão, o que recebe o nome de fluorescência é o fenômeno da emissão de fótons por meio de transição radiativa entre estados com mesma multiplicidade de spin (ou seja, entre elétrons emparelhados ou desemparelhados em ambos os níveis de energia), enquanto a fosforescência pode ser definida como a emissão oriunda de transição para o estado fundamental de elétrons que se encontram entre estados de multiplicidade diferente (em geral, com ocorrência de transição de tripletos para singletos).

As transições observadas na fluorescência são chamadas “permitidas” pelas regras de seleção da mecânica quântica (o que quer dizer que elas apresentam alta probabilidade de ocorrência), e têm altas taxas de emissão, da ordem de 10^8 s^{-1} . Estas altas taxas de ocorrência levam a tempos de vida (tempo médio da existência dos estados excitados) que são da ordem de 10 ns (10^{-8} s). Por sua vez, as transições que promovem a fosforescência são “proibidas” pelas regras de seleção (isto é, sua ocorrência é pouco provável) e, por isso, apresentam reduzidas taxas de emissão. Tais taxas apresentam ordens que variam comumente entre milissegundos e segundos – o que faz com que a fosforescência seja tenha uma resolução temporal muito diferenciada da fluorescência, apesar da semelhança entre os processos^{56, 110}.

Moléculas que vão para estados excitados pela absorção de um fóton são pouco estáveis em termos de energia e, por essa razão, tendem a liberar a energia absorvida, comumente na forma de novos fótons. Em gases sob condições de baixa pressão e temperatura, onde a interação molecular é relativamente pouca, os fótons liberados tendem a carregar a mesma energia (e, portanto, ter o mesmo comprimento de onda) dos fótons excitando a molécula – este fenômeno é chamado “fluorescência ressonante”. Em condições de pressão ou temperatura mais elevadas, ou ainda em estado líquido ou sólido, contudo, estas transições ressonantes não acontecem, uma vez que a interação vibracional entre moléculas nestes estados/condições leva as moléculas a perderem parte da energia absorvida (numa interação que ocorre em tempos da ordem de 10^{-15} s), rebaixando-as

(relaxando) para o nível vibracional mais fundamental dentro do estado eletrônico excitado em que se encontram.

Neste trabalho, os tecidos biológicos são os materiais de interesse e – como podemos considerar que eles são um conjunto de substâncias em estados sólido e/ou líquido, e a condições normais de temperatura e pressão – sua fluorescência estará longe da condição de ressonância. Portanto, quando há ocorrência de fluorescência para tais tecidos, a energia do fóton emitido pelas moléculas é menor que a dos fótons absorvidos (em transições de mesma multiplicidade de spin, ainda que a transição ocorra para níveis acima do primeiro estado excitado, tende a ocorrer relaxação não-radiativa para o nível mais fundamental do estado excitado – processo conhecido como *conversão interna*). Conseqüentemente, o comprimento de onda desses fótons é maior que o dos absorvidos, o que faz com que a fluorescência observada sofra um deslocamento na direção da região do vermelho do espectro eletromagnético, com respeito à região de excitação^{56, 84, 110}. De acordo com Lakowicz e Vo-Dinh, os espectros de emissão da fluorescência refletem os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental da molécula excitada; a correlação entre a fluorescência e estes níveis eletrônicos e vibracionais faz com que seja possível empregá-los na caracterização e identificação da molécula em questão (Figura 36)^{84, 102, 110}.

Figura 35 - Diagramas das curvas de energia potencial de dois estados eletrônicos, mostrando transições de absorção e emissão entre os estados, bem como uma distribuição comum dos espectros correspondentes (adaptado de Vo-Dinh (Ed.), *Biomedical Photonics Handbook*¹⁰²).

A técnica de espectroscopia de fluorescência possui grande número de aplicações, sendo usada na ciência dos materiais, por exemplo, na determinação de composições químicas – a qual é possível uma vez que cada composto químico apresenta uma

fluorescência característica que depende do comprimento de onda de excitação. É possível mesmo quantificar a concentração de uma substância específica que esteja inclusa em um meio transparente ou material cristalino, uma vez que existe uma relação direta de proporcionalidade entre a quantidade do composto analisado neste e a fluorescência – desde que as condições de saturação do sistema não sejam atingidas (ou seja, que a concentração máxima do elemento fluorescente tenha sido atingida sem que haja formação de precipitados ou agregados). Quando o meio é turbido, por outro lado, tanto a luz utilizada para excitação quanto a gerada na emissão sofrem influência de efeitos físicos variados, causados pela própria organização, estrutura e pelos constituintes destes tecidos. Por isso, utilizar esta técnica sistemas biológicos (que são meios de alta turbidez, e que são o nosso foco de estudo) é uma tarefa com um grau de complexidade muito maior^{54, 56, 77-81}.

Existe uma imensa quantidade de moléculas, nos tecidos biológicos, que interagem com a luz de diferentes maneiras. Estas moléculas são denominadas *cromóforos*. Há três tipos de cromóforos principais: os *fluoróforos* (grupos químicos que absorvem luz, convertendo-a em fluorescência), os *absorvedores* (grupos que absorvem luz sem gerar conversão em fluorescência) e os *espalhadores* (estruturas que mudam a direção do fóton que com elas interagem sem modificar seu comprimento de onda e, conseqüentemente, sua energia). As propriedades ópticas de cada cromóforo são diferentes conforme o comprimento de onda de excitação muda, e variam com a própria estrutura do cromóforo e, portanto, da composição do tecido investigado. O metabolismo tecidual pode também interferir com tais propriedades, pois os cromóforos e a sua interação com a luz sofrem influência dos meios nos quais estão inseridos^{56, 84}.

A turbidez é um conjunto de fenômenos ópticos associados que implica numa maior incidência de espalhamento e absorção no que diz respeito à fluorescência. Ao penetrar meios túrbidos, a intensidade da luz de excitação diminui (por causa dos elementos absorvedores) e percorre um caminho difícil de ser previsto (uma vez que as moléculas espalhadoras interferem na direção de propagação). A luz da fluorescência que vem de um fluoróforo no meio também passa por tais obstáculos antes de abandonar o meio e chegar à superfície para ser capturada por um detector. A luz da fluorescência é espalhada pelos compostos espalhadores, moléculas e estruturas de tamanhos variados, que modificam a direção original dos fótons incidentes, de modo similar ao ocorrido com a excitação. Parte da fluorescência pode ser absorvida por cromóforos (absorvedores) presentes no meio – a principal delas a hemoglobina, em tecidos biológicos – e isto modifica a intensidade de fluorescência obtida para os comprimentos de onda absorvidos, podendo mesmo mascarar a existência de uma resposta de fluorescência em dadas regiões do espectro – cuja evidência pode se detectar por depressões ou vales no espectro. Devido a estas interferências, a fluorescência coletada é a porção desta capaz de chegar à superfície do

tecido, tendo sofrido as distorções causadas por estes efeitos em seu caminho. Isto faz com que a investigação da presença e da quantificação da concentração de compostos específicos em meios túrbidos, através de técnicas ópticas, seja complexa e de resultados com precisão variável^{78-79, 81-83}.

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 096/2008, sobre o projeto intitulado “*Correlação entre a fotodegradação de fotossensibilizador durante a Terapia Fotodinâmica e a profundidade de necrose pós-terapia*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Vanderlei Salvador Bagnato** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **28 de julho de 2008**.

(We certify that the protocol nº 096/2008, about “*Correlation between the photosensitizer photodegradation during photodynamic therapy and the depth of necrosis after the therapy application*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 07/28/2008 meeting).

Ribeirão Preto, 28 de julho de 2008.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal