UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MIRIAN DENISE STRINGASCI

Investigação da Dosimetria para Terapia Fotodinâmica com o uso de fibra difusora – modelos em *phantom* e *in vivo*

São Carlos
2013

MIRIAN DENISE STRINGASCI

Investigação da Dosimetria para Terapia Fotodinâmica com o uso de fibra difusora – modelos em *phantom* e *in vivo*

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

Área de concentração: Física Aplicada
Orientadora: Profª. Drª. Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2013

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)

Stringasci, Mirian Denise
Investigação da Dosimetria para Terapia Fotodinâmica com o uso de fibra difusora - modelos em phantom e in vivo / Mirian Denise Stringasci; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2013.
91 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Intersticial. 3. Campos de luz. 4. Dosimetria. 5. fibra difusora. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é a minha fortaleza e a luz na minha vida, pois sem dúvida alguma foi quem me deu força e determinação para lutar pelos meus objetivos e concretizar este trabalho.

Agradeço também a minha família: minha mãe Eliana, meu irmão Thiago, meu avô Narciso e ao Marquinho, que sempre estiveram do meu lado, nos momentos bons e ruins, me apoiando sempre em minhas decisões e dando coragem para enfrentar as dificuldades, vocês são essenciais na minha vida, os amo demais. Sem esquecer também do meu pai Jeremias e da minha avó Leotildes, que mesmo não estando mais presentes, fazem parte do que sou hoje e tiveram grande importância na minha formação pessoal.

Ao Lê, meu companheiro, que está sempre presente nas minhas alegrias e dificuldades, me apoiando, dando conselhos e me acalmando nos meus desesperos, me fazendo sentir capaz de enfrentar situações que antes não achava que fosse possível. Seu apoio e compreensão foram essenciais para a realização deste trabalho, te amo muito.

Ao Sergio, a Mara e a Aline que convivem diariamente comigo, que me acolheram em sua casa e são minha segunda família, me amparam em muitos momentos de aflições, muito obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao Vanderlei agradeço pela oportunidade de trabalhar no seu grupo, onde pude adquirir muito conhecimento, científico e pessoal, através do convívio com pessoas fantásticas.

À minha orientadora Cristina que esteve sempre presente, orientando e guiando, me fazendo encontrar a solução de problemas que sozinha, muitas vezes, me pareceu impossível de serem solucionados e, que com o seu auxilio, tudo ficou muito mais simples e claro.

À Thereza, aluna de iniciação científica, que me ajudou tanto na realização das medidas experimentais como no tratamento dos dados obtidos, que graças ao seu conhecimento computacional, puderam ser bastante explorados.

À Lili, que desde o início me instruiu e auxiliou. Me acompanhou em todas as etapas, me passando conhecimento, dividindo experiência e aconselhando.

Ao Didi e ao Tião, pelos importantes conselhos e sugestões que guiaram este trabalho para uma melhor abordagem.

Aos amigos de laboratório, que nos últimos dois anos passaram a fazer parte da minha vida profissional e pessoal, tornando meus dias muito mais alegres e agradáveis. Adorei conhecer vocês e passar meus dias em suas companhias.

E a CAPES pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de mestrado.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe

os capacitados, capacita os escolhidos.”

Albert Einstein

RESUMO

STRINGASCI, M. D. Investigação da Dosimetria para TFD com o uso de fibra difusora – modelos em *phantom* e *in vivo*. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido utilizada no tratamento de lesões neoplásicas e não-neoplásicas. Sua base é a combinação de três elementos-chave: fotossensibilizador, oxigênio molecular e luz em comprimento de onda que excite o fotossensibilizador, levando-o a gerar espécies reativas de oxigênio que causam danos à estrutura celular. Portanto, a iluminação é um dos fatores essenciais para a indução da resposta adequada. Nos casos de lesões superficiais, a iluminação é facilmente obtida através da irradiação da superfície da mesma. Contudo, no tratamento de tumores sólidos ou invasivos, é preciso recorrer à TFD intersticial, na qual fibras ópticas são inseridas no tumor. No entanto, as diferenças no perfil de emissão de luz a partir das fibras difusoras, dependem do modo de fabricação, tamanho e propriedades, o que dificulta o estabelecimento de uma dosimetria de luz apropriada. Com este estudo, buscou-se contribuir no entendimento de como a luz, emitida por uma fibra difusora, se comporta no meio túrbido, assim como no tecido biológico. Dessa forma, buscou-se prever como a luz se propaga no meio e, assim, poder estimar a dose adequada de luz que se deve entregar ao tecido para que toda uma região seja irradiada. Para isto, foi utilizada uma fibra óptica com um difusor cilíndrico de 20 mm de comprimento emissor, acoplada a um laser de diodo em 630 nm e uma fibra óptica isotrópica de coleta, para medir a intensidade de luz emitida pelo difusor em várias posições. As medidas permitiram obter uma caracterização do perfil de emissão da fibra, sendo o ar o único meio de propagação da luz nesse caso. Posteriormente à obtenção do perfil, uma solução lipídica foi utilizada como *phantom* de tecido biológico. As fibras foram encapadas de modo a expor somente uma seção de 1 mm de comprimento delas. Com as fibras submersas na solução do *phantom*, foram realizadas medidas do campo de luz gerado por este elemento de 1 mm de comprimento do difusor. A partir da caracterização da emissão do elemento, foi possível recuperar a distribuição de luz gerada por todo o difusor utilizando composições ponderadas feitas a partir deste elemento. Estas composições apresentaram melhores resultados quando foi considerada a uma prévia caracterização da fibra na ponderação da reconstrução. A TFD foi realizada em fígado de ratos sadios para a análise de uma resposta real e, com o auxílio de ferramentas computacionais, foi possível reconstruir a necrose constituída pela irradiação da fibra toda, a partir da necrose gerada por um elemento difusor de 2 mm da fibra (obtido da mesma forma que o elemento de 1 mm), com resultados também otimizados com o uso da caracterização da fibra como base para a soma ponderada. Os resultados demonstraram que, através da caracterização do perfil de iluminação da fibra difusora e da distribuição de luz em meio túrbido, foi possível definir teoricamente um padrão de necrose semelhante ao observado no

modelo animal. Portanto, a reconstituição do perfil obtida possui potencial para permitir melhorias no entendimento e na dosimetria de aplicações intersticiais de luz para TFD.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Intersticial. Campos de luz. Dosimetria.

ABSTRACT

STRINGASCI, M. D. Investigation of dosimetry for the PDT using diffuser fiber – models in phantom and in *vivo*. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Photodynamic therapy (PDT) has been used for treatment of several tumor types, and presents best results for surface lesion. Light penetration on biological tissue is one limiting factor in PDT, interfering with the treatment of invasive or solid tumors. In those cases, a possible solution is to use interstitial PDT, in which optical fibers are inserted into the tumor. Cylindrical diffusers have been used for the application of interstitial PDT. However, differences in the diffuser light emission depend on the manufacturing process, size and optical properties of the fiber, which make it difficult to establish light dosimeter. This study aims to determine the distribution of light generated by a cylindrical diffuser in a turbid medium. A solution of lipid emulsion was used as an optical phantom. An optical fiber with a cylindrical diffuser of 2 cm in length was connected to a diode laser 630 nm, and the spatial distribution of light generated by the diffuser was measured by scanning a collector optical fiber. From the measurement of the light field generated by an element (1 mm long) of a 20 mm-long cylindrical diffuser, recovery of the distribution of light generated by the entire diffuser is expected. The results obtained so far show that it is possible to reconstruct the light field of a 20 mm-long cylindrical element diffuser by measuring the light emitted simultaneously by 20 elements of 1 mm. Then, the PDT was done in rat liver to analyze a real response and, with help of computational tools, a necrosis generated by irradiation of all fiber was reconstructed, using a necrosis produced by an element 2 mm long (likewise the element 1mm long). The results showed that knowing the illumination profile of a cylindrical diffuser and the light distribution in turbid medium, it was possible to redefine a shape of necrosis from as animal model theoretically. Therefore, the reconstruction of the profile obtained has potential to improve understanding and the light dosimeter in interstitial PDT.

Keywords: Photodynamic therapy. Interstitial. Light fields. Dosimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da propagação de luz na matéria. [Adaptada de 3] 23

Figura 2 - Espectro de absorção de vários constituintes de tecido biológico humano para comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho.[10] 25

Figura 3 - Variação das direções de difusão do Modelo de Henyey-Greenstein em função do coeficiente de anisotropia.[10] 26

Figura 4 - Diagrama de Jablonski. [Adaptada de 4] 28

Figura 5 - (A) Fibra cilíndrica isotrópica com 20 mm de comprimento; (B) Laser de diodo com seis saídas de intensidades diferentes operado em baixa potência e com comprimento de onda de 630nm no vermelho visível; (C) Fibra de coleta fixada em um estágio de translação que permitia seu deslocamento espacial (nos eixos “x”, “y” e “z”); (D) Sistema de leitura, operado através de um software. 34

Figura 6 - (A) Deslocamento da fibra de coleta próximo a fibra de emissão e (B) Fibra cilíndrica isotrópica em 2 posições distintas. 35

Figura 7 - (A) Fibra difusora encapada com um material termocompressor preto de maneira a deixar apenas um elemento de 1 mm emitindo luz; (B) Esquema experimental utilizado contendo uma solução de 3 litros no recipiente de água e Lipofundin (uma solução lipídica espalhadora). 36

Figura 8 - Dois elementos difusores de 1mm cada separados por 10 mm. 37

Figura 9 - (A) Elemento difusor de 1 mm e (B) elemento difusor de 2 mm. 37

Figura 10 - (A), (B) e (C) imagens das fibras difusoras de 5, 20 e 25 mm, respectivamente. 39

Figura 11 - Montagem experimental utilizada para a caracterização tridimensional da fibra. 39

Figura 12 - Estrutura monomérica do Photogem®[38] 41

Figura 13 - Fígado de rato Wistar sendo ilumi0nação na aplicação ds TFD intersticial. 42

Figura 14 - (A) Curvas de intensidade da luz em função do comprimento da fibra (cada curva refere-se a uma distância da fibra difusora à fibra de coleta em mm) e (B) curva de decaimento para a parte central da fibra (correspondente a extensão de 10 mm) na posição 1. 45

Figura 15 - (A) Curvas de intensidade da luz em função do comprimento da fibra (cada curva refere-se a uma distância da fibra difusora à fibra de coleta em mm) e (B) curva de decaimento para a parte central da fibra (correspondente a extensão de 10 mm) na posição 2. 46

Figura 16 - Emissão da fibra, considerando o feixe central partindo de um elemento infinitesimal comparada ao comprimento do difusor da fibra. 47

Figura 17 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em água e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento. 48

Figura 18 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em solução de água com 0,1% de Lipofundin e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento. 48

Figura 19 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em solução de água com 0,5% de Lipofundin e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento. 49

Figura 20 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em solução de água com 1% de Lipofundin e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento. 49

Figura 22 – Curvas de isointensidades referente a dois elementos difusores de 1 mm cada, separados por uma distância de 10mm. 51

Figura 23 - (A) e (B), representam graficamente as matrizes obtidas para o caso em que o elemento da esquerda foi dividido por um fator de 1,5 e para o caso em que o elemento da direita foi multiplicado por um fator de 1,5, respectivamente. 52

Figura 24 - Curvas de isointensidade obtidas utilizando um elemento difusor de 1 mm (A) e um elemento de 2 mm(B), respectivamente, considerando o elemento o centro do eixo x.....53

Figura 25 - (A) Curvas de isointensidade correspondentes à soma de dois elementos difusor de 1 mm e (B) curvas de isointensidade obtidas utilizando um elemento de 2 mm. 53

Figura 26 - (A) Curvas de isointensidade correspondentes à soma de dois elementos difusor de 1 mm multiplicado pela pelo fator 1,2 e (B) curvas de isointensidade obtidas utilizando um elemento de 2 mm. 54

Figura 27 - (A) Curvas de isointensidade referentes à soma simples de 20 matrizes referentes ao elemento difusor de 1 mm deslocadas e (B) referentes à medida da fibra de 20 mm. 55

Figura 28 - (A) Curvas de isointensidade referentes à soma ponderada de 20 matrizes referentes ao elemento difusor de 1 mm deslocadas e (B) referentes à medida fibra de 20 mm. 56

Figura 29 - (A), (B) e (C) Curvas de isointensidade referentes a um elemento difusor da fibra situado na posição 0 mm, 4 mm e 20 mm, respectivamente. A posição dos elementos nas abscissas não reflete sua posição real no difusor, tendo sido deslocadas para facilitar a visualização. 57

Figura 30 - Curvas de isointensidade referentes à soma ponderada das 20 matrizes do elemento difusor de 1mm, para as posições (A) 0, (B) 4 e (C) 20mm da fibra;(D) Curvas de isointensidade referentes à emissão da fibra de 20 mm medida. 58

Figura 31 - Curvas de isointensidade referentes a um elemento de difusor de 1mm emitindo em apenas um quadrante. 59

Figura 32 - (A) Curva reconstruída pela junção da medida dos quatro quadrantes; (B) Curva referente à volta toda do elemento difusor. 60

Figura 33 – Curvas de isointensidades correspondentes a cada ângulo da fibra (A) fora do *phantom*. 63

Figura 34 - Curvas de isointensidades correspondentes a cada ângulo da fibra (A) dentro do *phantom*. 64

Figura 35 - Ilustração das medidas realizadas formando várias cascas cilíndricas ao redor da fibra difusora. 65

Figura 36 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (A) fora do *phantom*. 65

Figura 37 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (A) dentro do *phantom*. 66

Figura 38 – Curvas de isointensidade correspondentes a cada ângulo da fibra (B) fora do *phantom*. 68

Figura 39 – Curvas de isointensidades correspondentes a cada ângulo da fibra (B) dentro do *phantom*. 69

Figura 40 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (B) fora do *phantom*. 70

Figura 41 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (B) dentro do *phantom*. 70

Figura 42 – Curvas de isointensidade correspondentes a cada ângulo da fibra (C) fora do *phantom*. 72

Figura 43 – Curvas de isointensidade correspondentes a cada ângulo da fibra (C) dentro do *phantom*. 73

Figura 44 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (C) fora do *phantom*. 74

Figura 45 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (C) dentro do *phantom*. 74

Figura 46 - (A) Fígado contendo necrose extraído do animal e (B) fatia do tecido com necrose. 75

Figura 47 - (A) Extração do lóbulo do fígado tratado com TFD intersticial, o círculo em branco mostra onde foi inserida a fibra difusora e (B) um corte transversal do tecido corado com eosina e hematoxilina. 76

Figura 48 - Imagem do volume obtido pela necrose gerada por TFD intersticial com iluminação de um elemento difusor de 1 mm, em que os eixos correspondem distâncias em mm.....77

Figura 49 - Imagem do volume obtido pela necrose gerada por TFD intersticial com iluminação de um elemento difusor de 2 mm, , em que os eixos correspondem distâncias em mm.....77

Figura 50 - Imagem do volume obtido pela necrose gerada por TFD intersticial com iluminação de um elemento difusor de 20 mm (fibra toda), , em que os eixos correspondem distâncias em mm. 78

Figura 51 - (A) Necrose original obtida pela iluminação da fibra de 20mm na TFD intersticial; (B) necrose obtida pela soma de 20 necroses gerada pela iluminação do elemento difusor de 1 mm e (C) necrose obtida pela soma de 10 necroses gerada pela iluminação do elemento difusor de 2 mm, , em que os eixos correspondem distâncias em mm. 79

Figura 52 - (A) Necrose original obtida pela iluminação da fibra de 20 mm na TFD intersticial e (B) necrose obtida pela soma ponderada de 10 necroses gerada pela iluminação do elemento difusor de 2 mm, , em que os eixos correspondem distâncias em mm.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação do coeficiente efetivo de atenuação da luz em relação com a concentração de espalhador no meio. 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	terapia fotodinâmica
FS	fotossensibilizador
μa	coeficiente de absorção
μs	coeficiente de espalhamento
g	coeficiente de anisotropia
μT	coeficiente de atenuação total
μeff	coeficiente de atenuação efetivo
mm	milímetro
nm	nanômetro
ms	milissegundo
L	litro
mL	mililitro
kg	kilograma
mg	miligrama
g	grama
W	watt
º	grau

SUMÁRIO

1 Introdução 23
1.1 Interação da Luz com o tecido biológico 23
1.1.1 Absorção da luz 24
1.1.2 Espalhamento da luz 25
1.2 Terapia Fotodinâmica 27
1.2.1 Terapia Fotodinâmica Intersticial 29
1.3 Dosimetria apropriada 30
1.4 Objetivos 31
2 Materiais e Métodos 33
2.1 Experimentos em *phantom* 33
2.1.1 Caracterização da fibra suspensa no ar 34
2.1.2 Avaliação dos campos de luz com a fibra difusora imersa em um *phantom* espalhador 35
2.1.3 Caracterização tridimensional de fibras em *phantom* com caráter absorvedor 38
2.2 Parte *in vivo* 40
2.2.1 Anestesia 40
2.2.2 Fotossensibilizador 41
2.2.3 Terapia Fotodinâmica 42
3 Resultados e discussão 45
3.1 Experimentos em *phantom* 45
3.1.1 Caracterização da fibra suspensa no ar 45
3.1.2 Avaliação dos campos de luz com a fibra difusora imersa no *phantom* espalhador 47
3.1.3 Caracterização tridimensional de fibras em *phantom* absorvedor 61
3.2 Parte *in vivo* 75
4 Conclusões 83
REFERÊNCIAS 85
Apêndice A 89

1 Introdução

O uso da luz visível está cada vez mais sendo implantada em tratamentos clínicos, estando estes presentes tanto na área médica quanto na área odontológica. No entanto, a propagação da luz no tecido é um fator limitante destas técnicas, pois toda a região tratada deve ser iluminada adequadamente, ou seja, quantidades de energia suficientes devem ser depositadas em cada ponto do tecido a ser tratado para que haja sucesso terapêutico. Portanto, o conhecimento prévio de como a luz se distribuirá no tecido é de fundamental importância para uma boa eficiência da técnica empregada. A Terapia Fotodinâmica, foco deste estudo, é um exemplo de modalidade terapêutica, cuja iluminação é um dos pontos-chaves para se obter um resultado satisfatório quando adotada.

1.1 Interação da Luz com o tecido biológico

Opticamente, os tecidos biológicos podem ser classificados como meios túrbidos, meios não homogêneos, onde o índice de refração varia rapidamente com a distância, e são caracterizados por apresentarem tanto absorção quanto espalhamento da luz.[1 - 2]

É muito difícil prever a distribuição da luz em um tecido biológico, pois ao incidir no tecido, assim como em um meio túrbido, um feixe de luz pode interagir de várias maneiras. Os fenômenos de interação estão esquematizados na Figura 1.

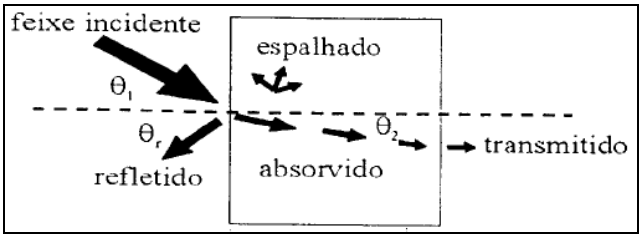


Figura 1 - Esquema da propagação de luz na matéria. [Adaptada de 3]

Quando o feixe penetra em um material completamente transparente, o feixe sofrerá um desvio na direção de propagação (refração) segundo a Lei de Snell ($n_1 sen\theta_1 = n_2 sen\theta_2$) e sairá pela outra face do material (feixe transmitido) sofrendo outra refração, onde n_1 e n_2 são

os índices de refração nos meios 1 e 2, respectivamente, θ_1 é o ângulo de incidência e θ_2 o ângulo refratado. Porém, se o meio não for transparente, o feixe sofrerá uma atenuação de intensidade, através de dois processos: a absorção e o espalhamento.[1]

Em meios túrbidos, estes dois mecanismos de atenuação estão presentes conjuntamente. Os tecidos biológicos são, predominantemente, espalhadores, embora tenham algum caráter absorvedor.[4]

Usualmente, uma solução composta por controladas concentrações de emulsões lipídicas e absorvedoras é utilizada como *phantom* de tecido biológico, a fim de simular a propagação da luz no tecido em experimentos de dosimetria de luz. Pois, esta solução túrbida é opticamente equivalente ao tecido, além de não possuir fortes bandas de absorção na região visível do espectro eletromagnético.[1, 5-7]

1.1.1 Absorção da luz

Os átomos ou moléculas que compõem o meio absorvem a radiação incidente, esta energia pode ser convertida em energia cinética (vibracional e/ou rotacional), gerar calor ou produzir estados excitados.[4]

Em um meio predominantemente absorvedor, o coeficiente de absorção (μ_a) representa a taxa de energia perdida pela absorção por unidade de comprimento. A variação de intensidade na direção de propagação do feixe é dada pela redução da intensidade inicial por um fator igual à taxa de energia perdida 1

$$\frac{\partial I(z)}{\partial z} = -\mu_a I(z) \rightarrow I(z) = I_0 exp(-\mu_a z) \qquad (1)$$

onde I(z) é a intensidade (W/cm^2) em função da profundidade de penetração z (cm), e I_0 é a intensidade em z=0.[8]

Um adulto humano é constituído, em média, por 70% de água e 30% de moléculas orgânicas. A capacidade dos tecidos em absorver radiação pode ser quantificada segundo a contribuição eletrônica das moléculas constituintes e à sua concentração, além da espessura do tecido e do comprimento de onda da radiação utilizada.[9]

A absorção da luz pela água é predominante na região do infravermelho (comprimentos de onda superiores a 1200 nm) e do ultravioleta (comprimentos de ondas inferiores a 200 nm). Nestas regiões, as propriedades de absorção dos tecidos são muito semelhantes às da água. Porém, para comprimentos de onda entre 300 e 700 nm a água é praticamente transparente e as biomoléculas que constituem os principais absorvedores biológicos são as proteínas, a hemoglobina e a melanina. O intervalo de comprimentos de ondas situado entre os 650 e 1300 nm, onde a absorção da água e das moléculas orgânicas é mais baixa, é denominado de "Janela Óptica Terapêutica".[4] O espectro de absorção de vários constituintes de tecido biológico humano, para comprimentos de onda entre o ultravioleta e infravermelho, estão apresentados na Figura 2.

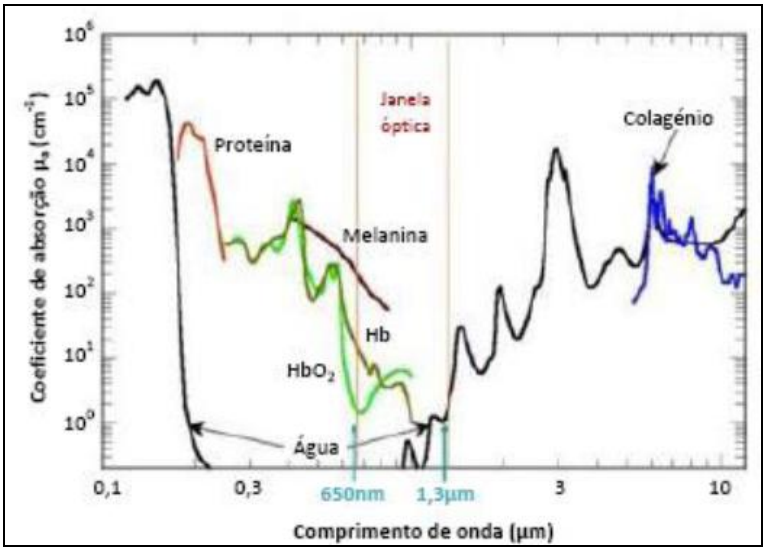


Figura 2 - Espectro de absorção de vários constituintes de tecido biológico humano para comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho.[10]

1.1.2 Espalhamento da luz

O espalhamento está relacionado com as heterogeneidades do meio, tendo variações por diversos fatores como o tamanho das partículas espalhadoras, a distância entre elas e o comprimento de onda da radiação.

Para descrever o espalhamento da luz, alguns modelos teóricos são bastante utilizados:

- O Modelo de Rayleigh trata o espalhamento elástico provocado por centros espalhadores muito menores que o comprimento de onda (apresentam até um décimo de λ). Espalha os fótons igualmente nas direções de 0 e 180º e a energia dos fótons não sofre alteração.[11 - 12]

- O Modelo de Mie define o espalhamento elástico provocado por espalhadores muito maiores que o comprimento de onda da luz incidente. Espalha, preferencialmente, para frente.[11 - 12]

No entanto, estes modelos são incapazes de explicar o fenômeno de múltiplos espalhamentos em tecidos biológicos, devido à complexidade de sua constituição. O Modelo de Henyey-Greenstein descreve a distribuição angular da luz espalhada por partículas pequenas, tal distribuição é descrita por 2, a função de fase p(theta)

$$p(\Theta) = \frac{1 - g^2}{4\pi(1 + g^2 - 2g\cos\Theta)^{3/2}} \qquad (2)$$

onde g é o coeficiente de anisotropia, que representa o cosseno médio de todos os ângulos de espalhamento Θ que pode variar entre -1 e 1, de acordo com as características do tecido. Em tecidos biológicos, geralmente, é usado um valor de g em torno de 0,9.[4] A variação do espalhamento do Modelo de Henyey-Greenstein em função de g pode ser representada pela Figura 3.

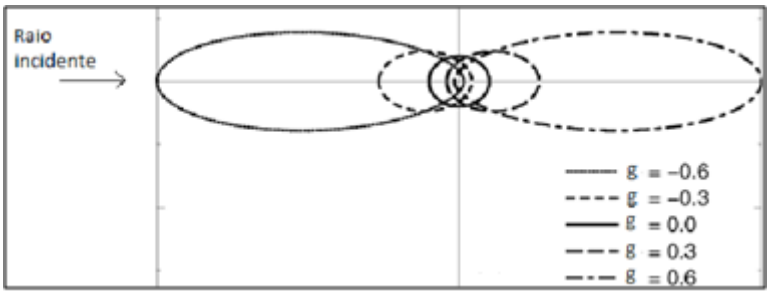


Figura 3 - Variação das direções de difusão do Modelo de Henyey-Greenstein em função do coeficiente de anisotropia.[10]

Em um meio espalhador e não absorvedor, a atenuação do feixe de luz pode ser descrita de maneira análoga à da absorção de acordo com a equação 3,

$$I(z) = I_0 exp(-\mu_s z)) \qquad (3)$$

onde μ_s corresponde ao coeficiente de espalhamento.[8]

Em um meio túrbido, os efeitos de espalhamento e de absorção contribuem para a atenuação da luz incidente. A atenuação da luz, nesse caso, passa a depender do coeficiente de atenuação total (μ_T) de acordo com a equação 4, cujo valor depende dos coeficientes de absorção, de espalhamento e de anisotropia.

$$I(z) = I_0 exp(-\mu_T z) \tag{4}$$

onde $\mu_T = \mu_a + (1-g)\mu_s$.[11]

Além disso, $\mu_s = \rho\sigma_s$, sendo ρ a densidade de partículas espalhadoras no meio e σ_s a seção de choque de espalhamento (ou seja, a habilidade da partícula de espalhar luz).[11]

Neste caso, é considerado que as partículas espalhadoras estão suficientemente separadas para que sejam independentes umas das outras. Entretanto, não é o que ocorre em um tecido biológico e, para este caso, é necessário um tratamento envolvendo teorias de espalhamento múltiplo, já que a densidade de tais partículas é suficiente para que as interações de ondas espalhadas entre partículas vizinhas não possam ser ignoradas. Desta forma, partindo da Teoria Eletromagnética de Maxwell, tem-se o comportamento da luz descrito pela equação 5,

$$I(z) = \frac{I_0}{r} exp(-\mu_{eff} r) \tag{5}$$

onde $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + (1-g)\,\mu_s)}$ e r a distância percorrida pelo feixe. [6, 11]

1.2 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) vem sendo cada vez mais utilizada nos tratamentos de lesões malignas e potencialmente malignizáveis. A TFD, basicamente, consiste no uso de um fotossensibilizador (FS), que é administrado localmente ou sistemicamente. Após um tempo de espera para que ocorra a biodistribuição e acúmulo preferencialmente pelo tecido tumoral, é aplicada luz em comprimento de onda apropriado à absorção pelo FS. Esta iluminação pode ser feita de maneira superficial ou intersticial.[9, 13 - 14]

A interação FS+luz+oxigênio molecular que está presente no tecido, produz espécies reativas de oxigênio que são citotóxicas, ou seja, capazes de levar as células tumorais à

morte.[13] Quando as moléculas de FS recebem luz com energia apropriada, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singleto. Então, este elétron pode voltar para o estado fundamental por fluorescência ou decair para um estado tripleto metaestável, através do chamado cruzamento intersistema, como se verifica no Diagrama de Jablonski da Figura 4. O tempo de vida do estado tripleto varia de 10^{-3} a 10 segundos e, durante esse tempo, o FS excitado pode interagir com moléculas vizinhas através de dois mecanismos: 1º) pode remover um átomo de hidrogênio de uma molécula ou transferir elétrons, gerando radicais livres que são capazes de oxidar uma grande quantidade de moléculas (as chamadas reações tipo I); e 2º) pode transferir energia ao oxigênio molecular inicialmente no estado fundamental (tripleto) para excitá-lo para um estado singleto, que é uma forma altamente reativa de oxigênio, sendo mediador de dano fotoquímico na célula. Tais interações podem resultar na destruição do sistema vascular ou da matriz intercelular ou, ainda, na modificação de funções mitocondriais e de sistemas de biomembranas celulares, em que ambos levam à morte as células neoplásticas, preferencialmente. [15]

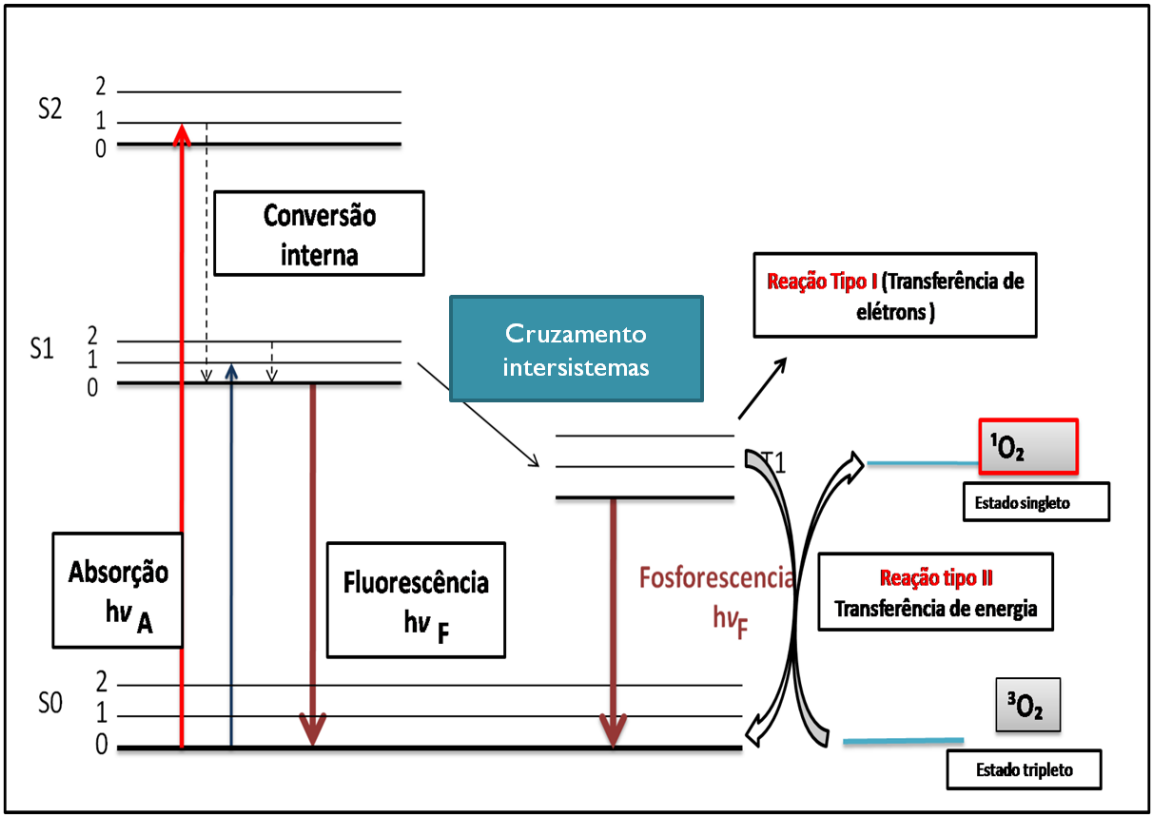


Figura 4 - Diagrama de Jablonski. Adaptada de 4

A qualidade de um fotossensibilizador também pode ser determinada pela sua eficiência em sofrer cruzamento intersistema, quanto maior é essa eficiência, melhor é considerado o FS.[15] Esta eficiência também pode ser determinada por outros aspectos como a seletividade e toxicidade da droga.[16]

1.2.1 Terapia Fotodinâmica Intersticial

A dosimetria de luz consiste um dos pontos-chave da TFD e vem sendo bastante estudada. Teorias que descrevem a propagação da luz em meios túrbidos, bem como em tecidos biológicos têm sido utilizadas a fim de prever a distribuição da luz em uma lesão e assim permitir calcular adequadamente a dose de luz (intensidade de luz pelo volume depositado) que deve ser entregue ao tecido-alvo.[17 - 18]

O uso da iluminação superficial na TFD de tumores geram resultados significativos, porém, a limitação da penetração da luz no tecido durante este tipo de iluminação impossibilita o tratamento de tumores profundos ou volumosos, visto que, a entrega de luz em quantidade suficiente para o tratamento limita-se a uma profundidade de cerca de 5 a10mm, para comprimentos de onda na região do vermelho, intervalo espectral mais empregado para excitação dos FSs disponíveis atualmente.[19]

Neste caso, pode-se recorrer à terapia fotodinâmica intersticial (TFD intersticial), onde uma fibra óptica é inserida diretamente na lesão. Neste tipo de aplicação, são usadas fibras comuns com extremidade plana ou fibras difusoras cilíndricas. Esta estratégia de iluminação permite que o tumor seja tratado de dentro para fora e múltiplas fibras também podem ser utilizadas a fim de que todo o volume tumoral seja tratado.[20 - 21] Desta forma, entregando a luz diretamente ao volume de interesse, minimiza o dano aos tecidos sadios adjacentes.[22 - 23]

Esta técnica é utilizada desde 2000, no tratamento de próstata.[24] Em sua aplicação, a determinação da quantidade de luz a ser depositada é bastante complexa, pois depende de uma série de fatores como: geometria da lesão, estrutura do tecido, propriedades ópticas, inclusive quantidade do FS, e localização da lesão.[1 - 2]

1.3 Dosimetria apropriada

Ao incidir no tecido, o feixe de luz perde sua intensidade a medida que penetra no tecido devido as interações de absorção e espalhamento. Por conta desta perda de intensidade, a necrose do tecido atinge uma determinada profundidade, pois, para que as células sofram necrose é preciso que o tecido absorva uma certa quantidade de energia por unidade de volume, esta quantidade mínima de energia por unidade de volume é chamada de limiar de dose. Hoje, estas quantidades não são medidas e não fazem parte da metodologia de aplicação da TFD. [25-27] Ao realizar a TFD, é preciso ter certeza de que luz penetre em todas as partes da lesão com intensidade acima daquela considerada mínima para causar morte celular. Isto exige um estudo de como a luz se propaga no tecido antes da aplicação da luz durante o procedimento da técnica.[28 - 29]

Em um procedimento clínico convencional de TFD, a luz é aplicada na superfície do tecido com uma determinada irradiância (mW/cm^2) durante um certo período de tempo, até que se atinja a intensidade desejada (J/cm^2). Este tipo de aplicação apresenta resultados satisfatórios quando a lesão é superficial, já que a penetração da luz em comprimentos de onda comumente utilizados na TFD é bastante limitada.[30] Porém, quando a lesão exige um tratamento intersticial, torna-se necessário um método de dosimetria que averigue a distribuição ao longo de todo o volume do tecido.[31]

O método de análise da propagação da luz em meios túrbidos mais usado é o Método de Monte Carlo, pois é o único método que pode ser utilizado tanto no limite próximo à superfície quanto em regiões mais profundas do meio e seus resultados costumam ter boa concordância com dados experimentais. A ideia principal deste método é simular o caminho óptico de um fóton num meio túrbido.[11, 18] Porém, fatores como coeficiente de absorção e espalhamento, coeficiente de anisotropia e fração de isotropia do meio devem ser conhecidos anteriormente, para alimentar o programa. Estes fatores mudam para cada tipo de tecido e valor de comprimento de onda, e estes valores nem sempre são completamente estabelecidos na literatura para todas as regiões do espectro.[11, 19]

Monte Carlo é um método estatístico e sua confiabilidade aumenta com o número de fótons analisados, resultando em um longo tempo de processamento computacional, o que torna este método, novamente, inviável para a prática clínica em tempo real.[4] Além disso, uma grande dificuldade de determinar a dosimetria de luz corretamente é que as

características do tecido-alvo variam de amostra para amostra e de paciente para paciente, fazendo com que a dosimetria apropriada seja à base de informações coletadas do próprio tecido que será submetido à TFD.[32 - 33]

Muitos são os trabalhos que buscam entender a distribuição de luz em tecidos biológicos, porém, em sua maioria, buscam este entendimento ao estabelecer as contribuições da atenuação da luz no tecido para diferentes comprimentos de onda.

No trabalho de H. Ullah (2010), por exemplo, foram encontrados os coeficientes de absorção, de espalhamento e o fator de anisotropia no fígado de rato sadio quando iluminado com os comprimentos de onda de 800, 630 e 490 nm.[34] R. J. Amdur (1996), também determinou o valor do coeficiente de atenuação efetivo de vários tecidos humanos (músculo esquelético, fígado e próstata) quando iluminado no comprimento de onda de 632 nm.[19] Em ambos os trabalhos foram realizados experimentos em tecidos *ex-vivos*, por se tratar de medidas invasivas, desta forma, os coeficientes encontrados podem diferir de seus valores no tecido vivo sabendo que as características ópticas do tecido também se alteram em função da modificação do metabolismo e a interrupção da vida.

Dessa forma, metodologias que caracterizem opticamente os tecidos biológicos, assim como o entendimento da distribuição da luz com diferentes tipos de acoplamento óptico são relevantes para o estabelecimento de uma dosimetria em tempo real para TFD.

1.4 Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi a análise da distribuição da luz em meio túrbido assim como no tecido biológico empregando a emissão com fibra difusora cilíndrica. Para isto foi analisada a possibilidade de criar pequenos elementos de um difusor cilíndrico para prever o campo de luz emitido pelo todo. Então, foi necessário uma avaliação da emissão da fibra, ou seja, sua simetria e sua isotropia, e como ocorre a propagação da luz emitida pela mesma quando inserida no tecido biológico.

Objetivos específicos

1. Avaliação da emissão de uma fibra difusora
2. Avaliação da distribuição da luz em meio túrbido (*phantom*)

3. Modelamento matemático da distribuição da luz
4. Avaliação da resposta fotodinâmica (necrose) em fígado de rato Wistar
5. Comparação da necrose prevista em função da dose limiar e da necrose real (validação do modelo)

2 Materiais e Métodos

2.1 Experimentos em *phantom*

Nesta parte do experimento, foi utilizada uma fibra cilíndrica de difusão isotrópica com 20mm de comprimento e de 2mm de diâmetro, como mostrado na Figura 5 (A). O laser empregado foi o laser de diodo com seis saídas independentes e comprimento de onda de 630nm (Quantumtech, São Carlos, Brasil), mostrado na Figura 5 (B).

Na coleta da luz, foi usada uma fibra óptica de coleta (IP85, Medlight S. A., Suíça) contendo uma esfera de 800μm de diâmetro na extremidade, possibilitando detectar a luz de maneira quase isotrópica. A fibra foi fixada em um estágio de translação para deslocamento espacial (nos eixos “x”, “y” e “z”), como na Figura 5 (C). A saída de laser do protótipo utilizada foi avaliada quanto à estabilidade temporal e mostrou-se estável.

A fibra de coleta foi conectada a um sistema de leitura, que consiste em um espectrofotômetro (USB, OcenOptics, Orlando, FL, EUA) acoplado a um computador portátil operado através de um software (OOIBase32™, OceanOptics), Figura 5 (D). O espectrofotômetro separa o feixe de laser em comprimentos de onda e fornece o número de fótons incidentes em intensidade de luz (unidades arbitrarias) em tempo real. Nessa leitura, puderam ser selecionados parâmetros para que o sinal não fosse saturado, neste caso foram usados valores de tempo de exposição de 20 ms e uma média de 10 leituras para cada aquisição. Além disso, também foi certificado de que a intensidade na saída do laser se mantinha estável durante o tempo de iluminação.

Nesta parte foi realizada a caracterização bidimensional e tridimensional da fibra e tentativas de reconstrução da fibra a partir de elementos utilizando os mesmos sistemas de emissão de luz e detecção de medidas.

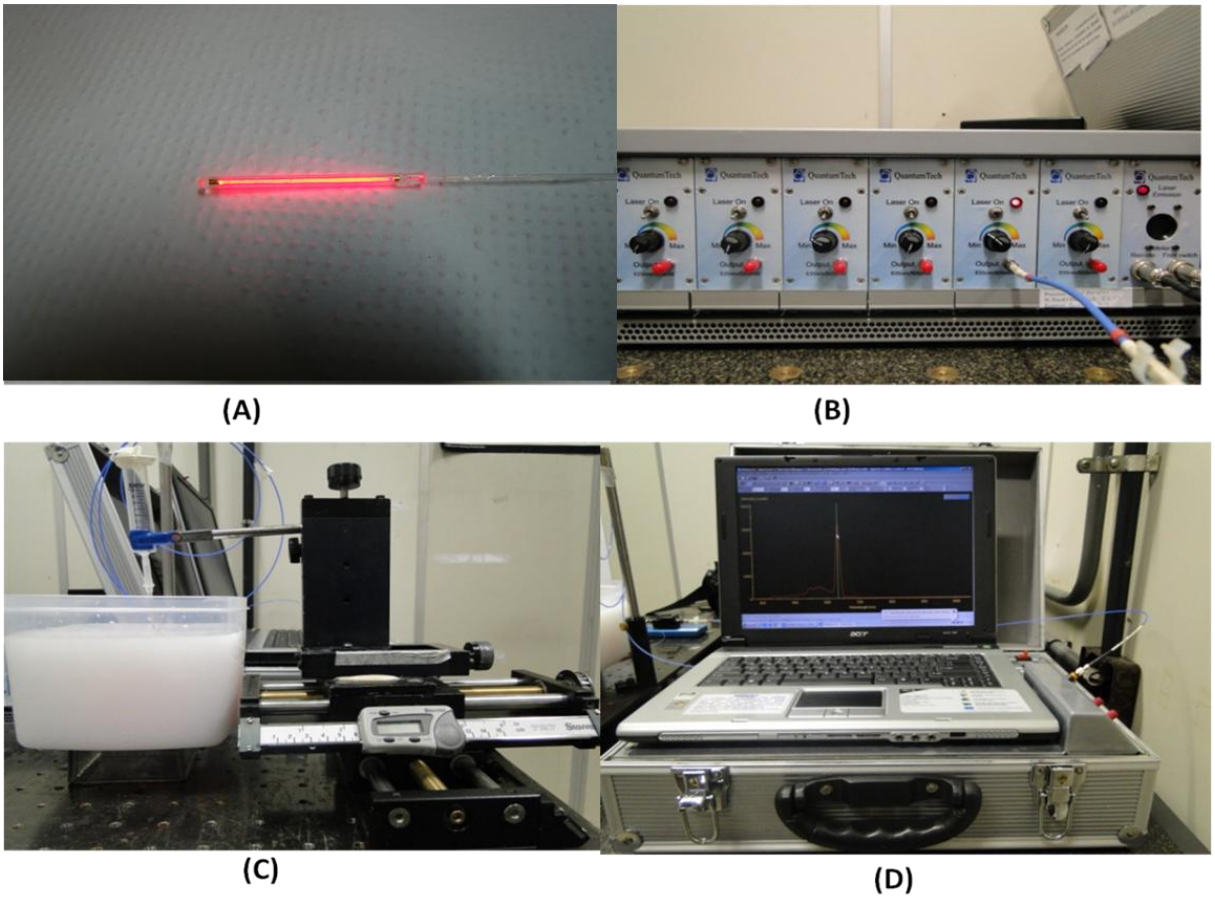


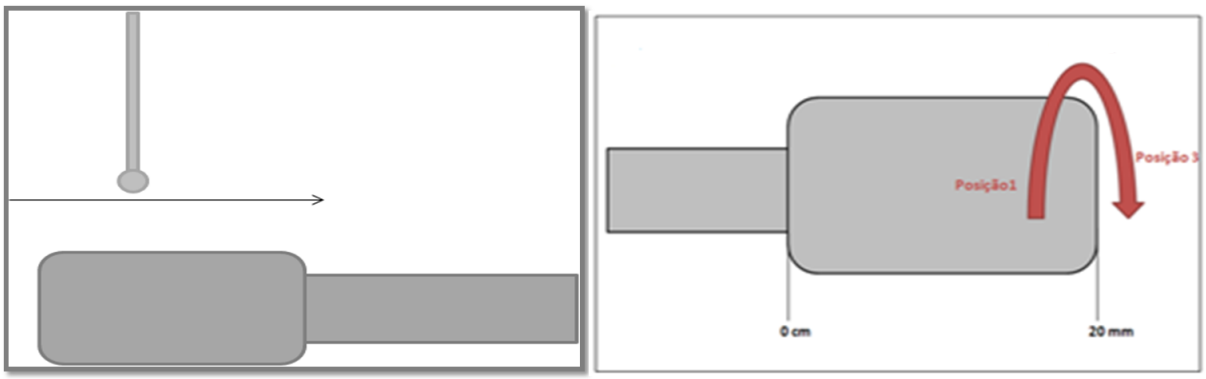
Figura 5 - (A) Fibra cilíndrica isotrópica com 20 mm de comprimento; (B) Laser de diodo com seis saídas de intensidades diferentes operado em baixa potência e com comprimento de onda de 630nm no vermelho visível; (C) Fibra de coleta fixada em um estágio de translação que permitia seu deslocamento espacial (nos eixos "x", "y" e "z"); (D) Sistema de leitura, operado através de um software.

2.1.1 Caracterização da fibra suspensa no ar

Um passo muito importante é saber como a emissão de luz da fibra se comporta na extensão de seu comprimento. Caso a emissão da fibra fosse uniformemente distribuída, os campos de luz se distribuiriam elipsoidalmente ao redor da fibra[30], porém a emissão depende da fabricação da fibra e, eventualmente, pode apresentar irregularidades nesta emissão e comprometer a entrega uniforme de luz num dado volume quando desconhecidas.[35 - 36]

Para tal caracterização, o sistema foi alinhado de maneira que a fibra de coleta percorresse paralelamente à fibra difusora, Figura 6 (A). Então, o plano "x-y" foi deslocado paralelamente à fibra, os valores de intensidade foram coletados e anotados em tabelas e, assim, utilizando o software Origin® (versão 8.0, OriginLab Corporation), como em todos os

casos a seguir, foram obtidas as curvas de isointensidades medidas. Este processo foi realizado no outro lado da fibra. Para isso, a fibra emissora foi rotacionada em torno do próprio eixo em 180º com relação à montagem original, de acordo com a Figura 6 (B).



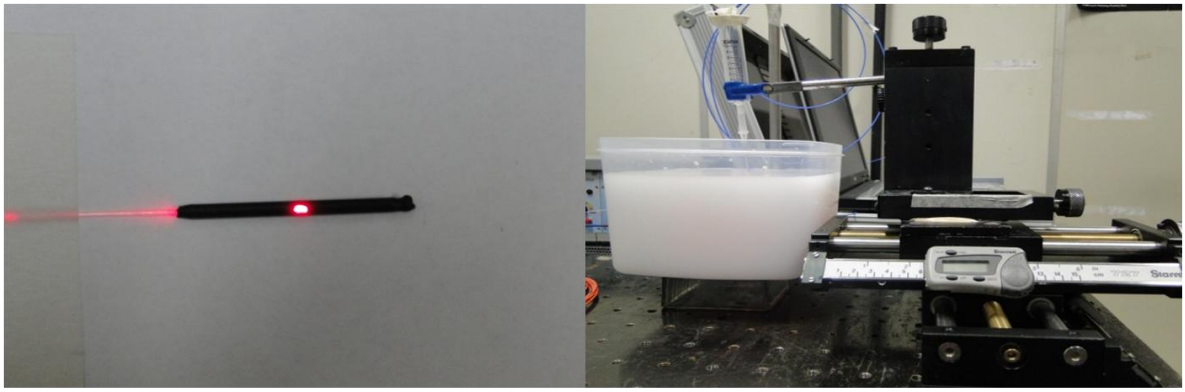
(A) (B)

Figura 6 - (A) Deslocamento da fibra de coleta próximo a fibra de emissão e (B) Fibra cilíndrica isotrópica em 2 posições distintas.

2.1.2 Avaliação das curvas da isointensidades de luz com a fibra difusora imersa em um *phantom* espalhador

Para avaliar a propagação da luz quando imersa em soluções com diferentes concentrações de agente espalhador, foram utilizadas soluções de água com quatro diferentes concentrações de Lipofundin (emulsão lipídica espalhadora). No primeiro caso foi utilizado apenas água; no segundo, 0,1% de Lipofundin em água; no terceiro, 0,5% de Lipofundin em água; e no quarto, 1% de Lipofundin em água.

A fim de facilitar as medidas, foi utilizado apenas um elemento de 1mm da fibra difusora emitindo luz. Para restringir a iluminação a este elemento, o restante da fibra difusora foi encapado com um material termoretrátil preto de modo a deixar apenas este elemento emitindo luz no centro da fibra, como mostrado na Figura 7 (A). Então, para a realização das medidas, o eixo de varredura da fibra de coleta foi alinhado de modo a garantir que o deslocamento fosse paralelo à fibra difusora, as fibras foram inseridas num recipiente plástico (com volume de 3 litros) e este foi completamente preenchido pelas soluções, como mostra a Figura 7 (B).



(A) (B)

Figura 7 - (A) Fibra difusora encapada com um material termocompressor preto de maneira a deixar apenas um elemento de 1 mm emitindo luz; (B) Esquema experimental utilizado contendo uma solução de 3 litros no recipiente de água e Lipofundin (uma emulsão lipídica espalhadora).

A fibra de coleta, inicialmente, foi colocada no centro do elemento difusor. Então, a coleta foi realizada deslocando de 0,5 em 0,5 mm nos eixos x e y, formando um plano tangente ao elemento difusor. Com as medidas realizadas, os resultados, para cada caso, foram normalizados, de forma a obter valores entre 0 e 1. E então, foram obtidas as matrizes e gerados os gráficos de distribuição das curvas de isointensidades de luz.

Todas as medidas foram realizadas em um recipiente contendo grande volume de solução, aproximadamente 3L, suficiente para as medidas de espalhamento na região do vermelho. As fibras de emissão e de coleta foram arranjadas bem ao centro do recipiente, para que desta forma fosse evitado interação da luz com a interface do material e, assim, consequentes efeitos de borda.

A solução contendo água e 1% de Lipofundin, concentração que é utilizada em um *phantom* de tecido biológico bastante empregado na literatura, o *phantom* de pele[37], será utilizada em alguns testes para reproduzir campos de luz emitidos por parcelas diferentes da fibra difusora:

- Na tentativa de verificar se o campo de luz emitido por um elemento difusor é múltiplo do campo de outro elemento, ou seja, se através do campo de um elemento é possível reconstruir outro através de uma multiplicação, foi realizado este experimento. Foi utilizado o difusor de 20 mm e o material termoretrátil para encapá-la. Nesta configuração, a fibra foi encapada de modo a deixar dois elementos difusores expostos (1 mm cada), separados por uma distância de 10 mm, como mostra a Figura 8.

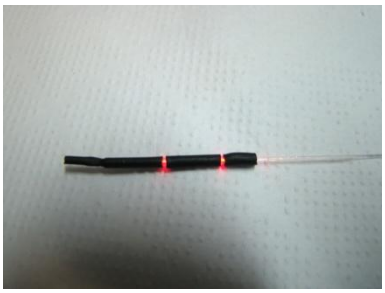
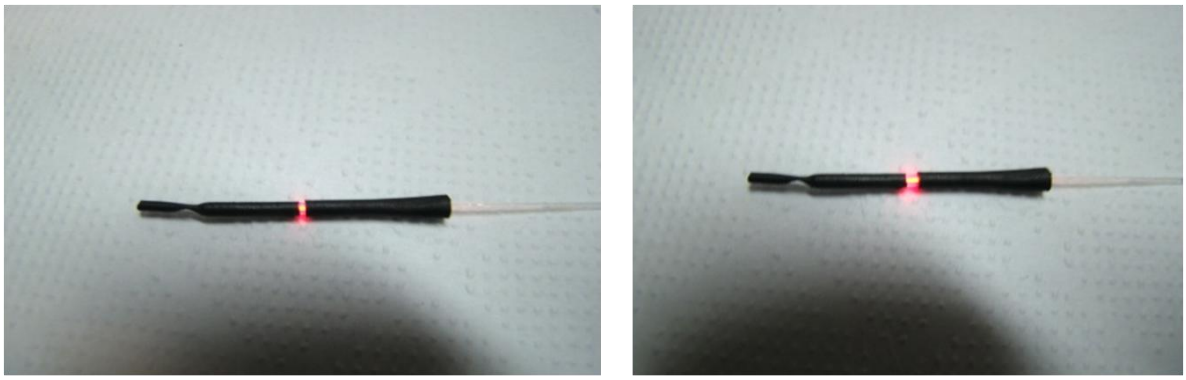


Figura 8 - Dois elementos difusores de 1mm cada separados por 10 mm.

O sistema de coleta adotado foi o mesmo mencionado anteriormente, com a fibra imersa no *phantom*, e tomando o centro da fibra como o ponto p_0. A matriz e o gráfico da distribuição da intensidade de luz foram obtidos.

- Para verificar se a junção de dois elementos difusores de 1mm é equivalente a um elemento difusor de 2 mm, foram realizadas medidas para dois casos: no primeiro, foi utilizado um difusor de 1 mm; no segundo, um difusor de 2 mm como mostrados na Figura 9.



(A) **(B)**

Figura 9 - (A) Elemento difusor de 1 mm e (B) elemento difusor de 2 mm.

A matriz obtida no primeiro caso foi transladada 1 mm em relação à sua posição anterior no eixo do difusor, e então somadas as duas matrizes (a matriz transladada e a não transladada). Assim, a matriz resultante da soma foi obtida. A matriz final foi comparada com a matriz correspondente ao elemento difusor de 2 mm.

- As mesmas medidas também foram realizadas com a fibra emissora toda desencapada, ou seja, tendo um elemento difusor de 20 mm. A matriz obtida anteriormente para o elemento difusor de 1mm foi transladada 1mm em relação a sua posição anterior, desta vez, 19 vezes e somadas todas as 20 matrizes (a matriz original com as 19 matrizes transladadas). Novamente o resultado obtido pela soma foi comparado com o resultado obtido pela medida da fibra com emissão total e, assim, pôde-se avaliar se a emissão de uma fibra pode ser reconstruída a partir de um elemento difusor pequeno.

Então, na tentativa de avaliar se, mudando a posição do elemento escolhido na extensão do difusor para reconstruí-la, mantêm-se o mesmo resultado, foram realizadas mais três medidas de elementos difusores de 1mm em posições diferentes (na extensão de 0, 4 e 20 mm no comprimento do difusor) e, foi realizado, para cada uma delas, uma nova soma das 20 matrizes deslocadas.

- Utilizando novamente um elemento difusor de 1mm, verificou-se se pode ser reconstruído o campo de luz em torno de todo elemento difusor através da medida de um único quadrante. Para isso, foi posicionada a fibra de emissão no eixo y e a fibra de coleta no eixo x, alinhada com o centro do elemento difusor, ambas as fibras foram imersas no mesmo *phantom*. As medidas foram feitas, inicialmente, em toda a circunferência da fibra e, posteriormente, em apenas um quadrante emitindo luz, ou seja, com os outros três quadrantes encapados com o material termocompressivo.

Então, a matriz encontrada no caso de um quadrante foi transladada para os outros quatro quadrantes, as translações foram somadas entre si e os gráficos obtidos. O resultado foi comparado com a medida com emissão em toda a circunferência da fibra.

2.1.3 Caracterização tridimensional de fibras em *phantom* com caráter absorvedor

A fim de comparar a emissão de luz para fibras de diferentes comprimentos, foram utilizadas três fibras difusoras com tamanhos diferentes: 5, 20 e 25 mm, como mostrado em (A), (B) e (C) da Figura 10, respectivamente.

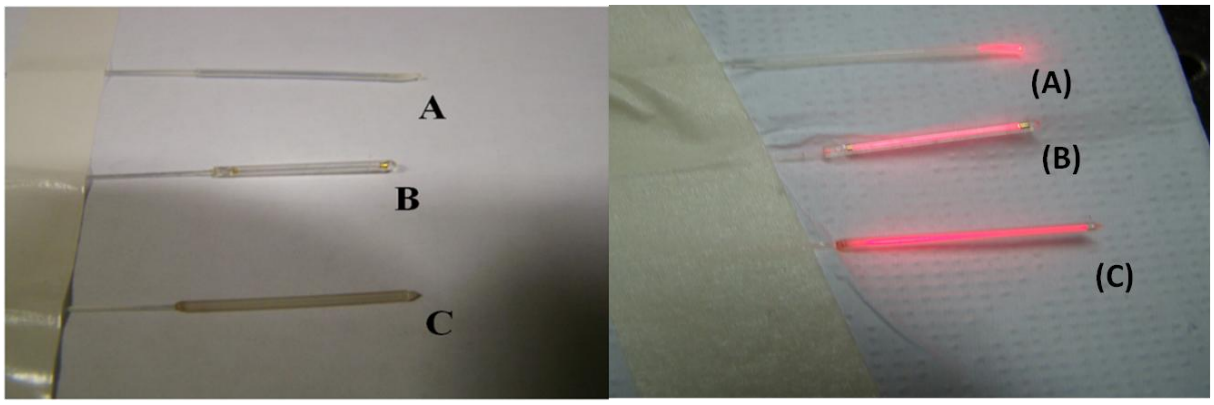


Figura 10 - (A), (B) e (C) imagens das fibras difusoras de 5, 20 e 25 mm, respectivamente.

Para caracterizá-las, foi utilizada uma montagem experimental de acordo com a Figura 11, onde a fibra de coleta é acoplada a eixos de translações em que fez-se a varredura nas três coordenadas cilíndricas. Após garantir que a fibra de emissão estava posicionada no centro do volume cilíndrico de varredura, fez-se a leitura e coleta de intensidade em cada ponto. Cada uma das três fibras foi caracterizada no ar e submersa no *phantom*.

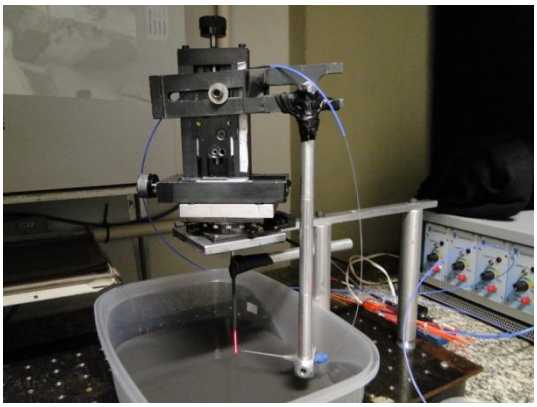


Figura 11 - Montagem experimental utilizada para a caracterização tridimensional da fibra.

Para que as características ópticas do *phantom* se aproximassem ainda mais com as de um tecido biológico, nesta parte do experimento foi inserido um agente absorvedor na solução. Então, o *phantom* utilizado foi composto por 5 L de água, 50 ml de Lipofundin (1%) como material espalhador e 1,5 ml de tinta nanquim (0,03%) como material absorvedor. A

escolha da concentração de tinta nanquim foi estabelecida a partir de testes realizados, visando ter uma região de iluminação suficiente para poder coletar uma grande quantidade de valores de intensidade e ao mesmo tempo, notar o efeito da absorção do material.

2.2 Parte *in vivo*

Após averiguar a propagação da luz em meio túrbido e reproduzir o campo de luz emitido por um difusor através da soma de elementos menores, também foram analisadas o volume de necrose obtido após TFD intersticial em fígado de rato sadio, empregando a iluminação com diferentes elementos difusores, para que a mesma reconstrução pudesse ser realizada.

Foram utilizados 12 ratos machos da linhagem Wistar, pesando cerca de 400g. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: controle, iluminação com elemento difusor de 1 mm, de 2 mm de 20 mm (cada grupo composto por 3 animais). No grupo controle, não foi aplicado o fotossensibilizador no animal e, então, para cada um dos três animais do grupo, foi adotada um diferente situação: iluminação com elemento de 1mm e com a fibra de 20 mm, além de inserir a fibra completa no interior do órgão, sem proceder com a iluminação.

2.2.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados usando quetamina 5% (Vetanarcol®, Konig) na dose 0,08 mL por 100g de massa corporal e xilazina 2g (Coopazine®, Coopers) na dose de 0,04 mL por 100g de massa corporal. O medicamento foi injetado por via intramuscular.

2.2.2 Fotossensibilizador

O FS utilizado foi o Photogem®, um derivado de hematoporfirina de primeira geração, de origem russa (Photogem®, Photogem, Moscou, Rússia), e consiste em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de porfirina unidos por ligações éter ou éster. O FS é produzido através da desfibrilação de protoporfirina IX (PpIX) presente na corrente sanguínea de animais e de humanos.[15] A estrutura monomérica do Photogem® é apresentada na Figura 12.

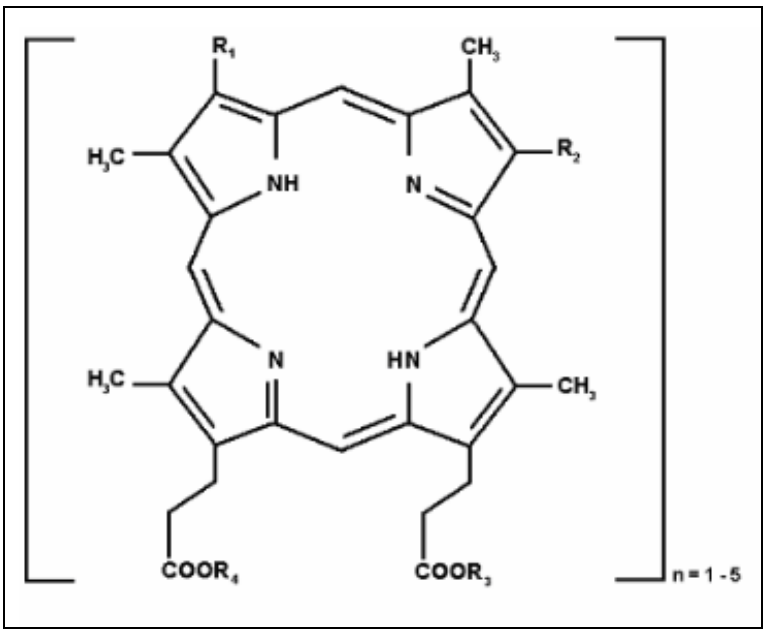


Figura 12 - Estrutura monomérica do Photogem®[38].

O Photogem® foi preparado na concentração 1,5mg por 1kg de massa corporal. Foi realizada uma laparotomia no animal para acesso direto à veia cava. O FS foi injetado lentamente na veia cava. Após a aplicação do FS, foi esperado o tempo de 30 minutos para que o medicamento se acumulasse no tecido alvo (fígado).[39]

2.2.3 Terapia Fotodinâmica

Após a espera dos 30 minutos, a superfície do fígado foi exposta para iluminação. A fibra com elemento difusor de tamanho selecionado (novamente pelo uso do material termocompressivo), foi inserida no interior do órgão, a aproximadamente 2 mm da superfície. Uma abertura no órgão foi realizada com uma agulha e a fibra com vaselina líquida foi introduzida.

Então, o tecido foi iluminado com o laser de Diodo operando em 630 nm (Ceralas®, Ceramoptec, Germany) por 1000 s com 0,4 W de potência, como na Figura 13. Depois da irradiação, os animais foram suturados e receberam analgésico Banamine® (Martecorp®, Rio de Janeiro, Barsil) na dose 2,2 mg por 1 kg de massa muscular. A potência do laser foi estabelecida por testes preliminares, onde foi definido o maior valor de potência sem alteração da temperatura da fibra durante o tempo de tratamento, garantindo, desta forma, a ausência de necrose causada por dano térmico e, ao mesmo tempo, garantindo um volume de necrose que fosse suficiente para análise dos resultados.

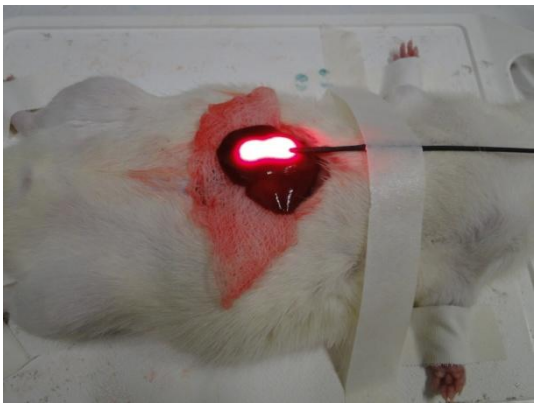


Figura 13 - Fígado de rato Wistar sendo iluminação durante a aplicação da TFD intersticial.

O tempo de espera para o estabelecimento da necrose induzida no fígado foi de 30 horas[39], durante este tempo os animais se alimentaram normalmente, com água filtrada e ração para roedores. Passado as 30 horas, os animais foram eutanasiados por inalação de CO_2, o tecido foi extraído, fatiado, corado com hematoxilina e eosina e submetido para montagem de lâminas.

As lâminas coradas foram fotografadas e, através do Programa MATLAB®, foram estabelecidos os limites da necrose (interface com o tecido hepático normal). As áreas de necrose foram alinhadas e empilhadas de forma a obter seu volume espacial global.

A figura obtida da lesão iluminada pelo elemento difusor de 1mm foi transladada em 1 mm 19 vezes, e as 20 componentes (1 original e 19 transladadas) foram somadas à fim de reconstruir a necrose iluminada por todo difusor (20 mm); a figura correspondente ao difusor de 2 mm também foi transladada 9 vezes e, assim, somadas as 10 componentes (1 original e 9 transladadas) com o mesmo intuito. A fim de obter melhores resultados, estas somas foram refeitas considerando os valores de intensidade máxima de cada ponto da extensão da fibra obtidos pela sua caracterização.

O estudo *in vivo* foi aprovado pelo Comitê em Ética no uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, protocolo número 009/2012 (Apêndice A).

3 Resultados e discussão

3.1 Experimentos em *phantom*

3.1.1 Caracterização da fibra suspensa no ar

É de fundamental importância que, antes de qualquer tentativa reconstruir o campo de luz de um emissor cilíndrico através da soma de pequenos elemento desse difusor, seja realizada uma caracterização de sua emissão e que, desta forma, se tenha o entendimento de como a luz é emitida por este.

Então, na caracterização da fibra, que contém um difusor cilíndrico de 20 mm, suspensa no ar, foram obtidas as curvas de intensidade em função do comprimento do difusor para várias distâncias da fibra difusora em relação a fibra de coleta. Esta caracterização foi realizada em duas posições distintas da fibra rotacionada, a fim de verificar se existe um perfil regular de emissão da luz. As curvas obtidas para cada posição são mostradas na Figura 14(A) e na Figura 15(A), respectivamente. Em cada figura encontram-se curvas correspondentes a diferentes distâncias entre 0 e 15 mm da superfície da fibra, como especificado nas legendas, além da curva de decaimento da intensidade como função da distância da fibra para a região central da fibra (x = 10 mm).

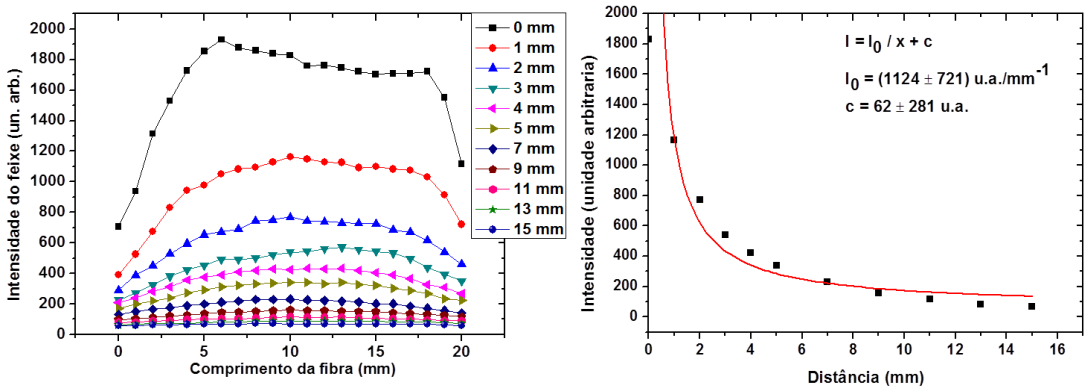


Figura 14 - (A) Curvas de intensidade da luz em função do comprimento da fibra (cada curva refere-se a uma distância da fibra difusora à fibra de coleta em mm) e (B) curva de decaimento para a parte central da fibra (correspondente a extensão de 10 mm) na posição 1.

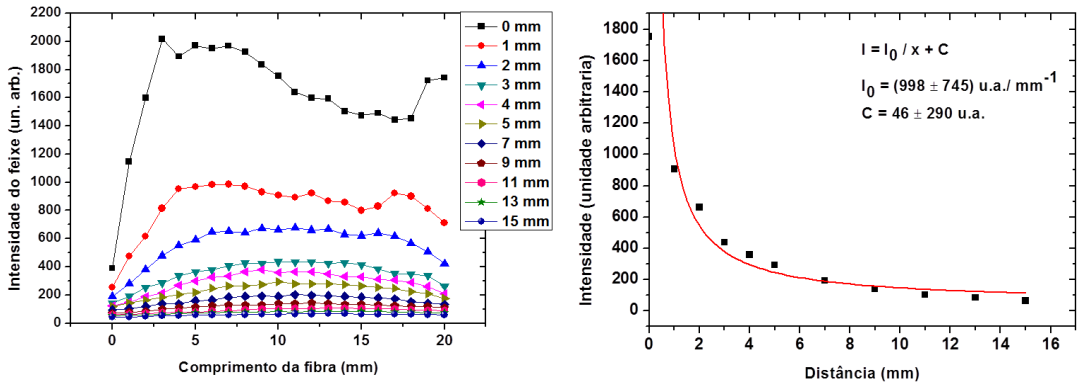


Figura 15 - (A) Curvas de intensidade da luz em função do comprimento da fibra (cada curva refere-se a uma distância da fibra difusora à fibra de coleta em mm) e (B) curva de decaimento para a parte central da fibra (correspondente a extensão de 10 mm) na posição 2.

Nas imagens das curvas obtidas, verifica-se que a intensidade de luz não é homogênea ao longo do comprimento do difusor, ou seja, sua emissão é assimétrica, principalmente nas posições mais próximas a esta, pois nota-se uma grande irregularidade principalmente nas curvas obtidas para distância de 0 mm da fibra, ou seja, rente a ela (curvas em preto). Entretanto, ao distanciar a coleta da fibra, estas irregularidades ficam menos evidentes, pois a luz, ao sofrer interações com diversas moléculas em seu caminho, tende a ficar igualmente distribuída depois de certa distância. A região central apresenta uma maior intensidade de luz emitida.

Além disso, também se verifica que, para cada posição da fibra rotacionada, a emissão também é diferente, o que pode ser notado nas diferenças das curvas de cada figura. Logo, pela caracterização realizada, nota-se que a emissão do cilindro difusor além de ser não ser simétrica, também não é isotrópica, fato que já desfavorece qualquer tentativa de reconstruir o campo de luz emitido por este difusor.

Na Figura 14(B) e na Figura 15(B) também verifica-se que o decaimento da intensidade ocorre inversamente com o aumento da distância, de acordo com o esperado.

De acordo com a Figura 16, considera-se que o feixe central é emitido por uma parcela infinitesimal da fibra, ou seja, que a extensão da fibra tende a infinito se comparada a este centro emissor e, sendo r o raio da fibra e R a distância do emissor.

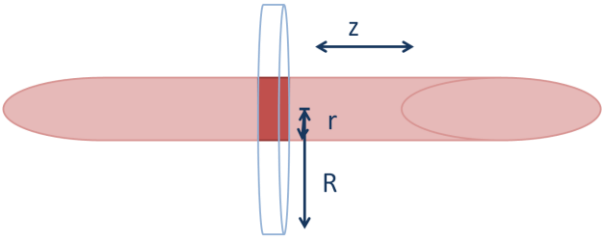


Figura 16 - Emissão da fibra, considerando o feixe central partindo de um elemento infinitesimal comparada ao comprimento do difusor da fibra.

Logo, partindo de que a potência na superfície da fibra é igual à potência na distância R, ou seja, $P_r = P_R$, e que a potência é o produto da intensidade do feixe com a área da superfície de iluminação (P = I.A), tem-se a equação 7

$$2\pi r \Delta z I_0 = 2\pi R \Delta z I \tag{7}$$

sendo r=1mm (raio do cilindro difusor), implica na equação 8

$$I = \frac{I_0}{R} \tag{8}$$

3.1.2 Avaliação dos campos de luz com a fibra difusora imersa no *phantom* espalhador

3.1.2.1 Variação da concentração de espalhador no *phantom*

Para os grupos de medidas com imersão em água pura, e em soluções de água com concentrações de 0,1%, 0,5% e 1% de Lipofundin, foram obtidas as curvas de isointensidades medidas para iluminação de um elemento difusor de 1 mm. Estas curvas estão presentes na Figura 17(A), na Figura 18(A), na Figura 19(A) e na Figura 20(A). O centro do elemento difusor está situado na origem do gráfico. O eixo “x” corresponde à distância paralela à fibra e o eixo “y” à distância radial da fibra, ambos em milímetros. Nas matrizes, as linhas de isointensidades são diferenciadas por cores, de forma que o vermelho corresponde às maiores intensidades (de 0,9 a 1 unidade arbitrária) e o preto corresponde às menores intensidades (de 0 a 0,1 unidades arbitrárias) como indicado nas legendas. Ao lado de cada

mapa de intensidade, pode-se observar também a curva de decaimento do feixe na diagonal principal do mapa (que no caso é a diagonal da matriz medida) e ajustado o coeficiente de atenuação de cada um deles. Nas curvas de decaimento foi ajustada a função mais simples encontrada na literatura $I(r) = I_0 \exp(-\mu_T r)$ que, mesmo sendo um modelo simplificado, apresentou melhor ajuste aos pontos, quando comparada com a expressão mais complexa (que tem uma dependência com 1/r, $I(r) = \frac{I_0}{r} exp(-\mu_{eff} r)$). Os coeficientes encontrados estão indicados nas tabelas apresentadas junto às curvas, como mostrado na Figura 17(B), na Figura 18(B), na Figura 19(B) e na Figura 20(B).

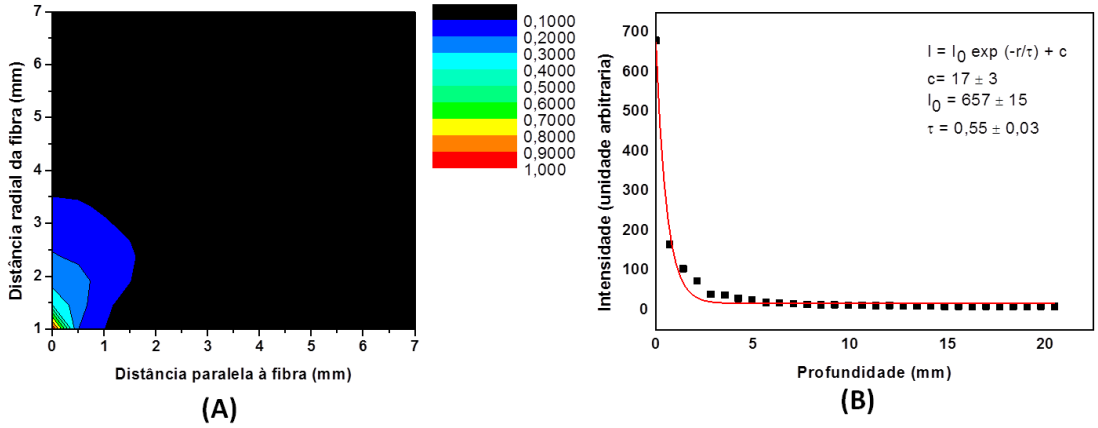


Figura 17 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em água e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento.

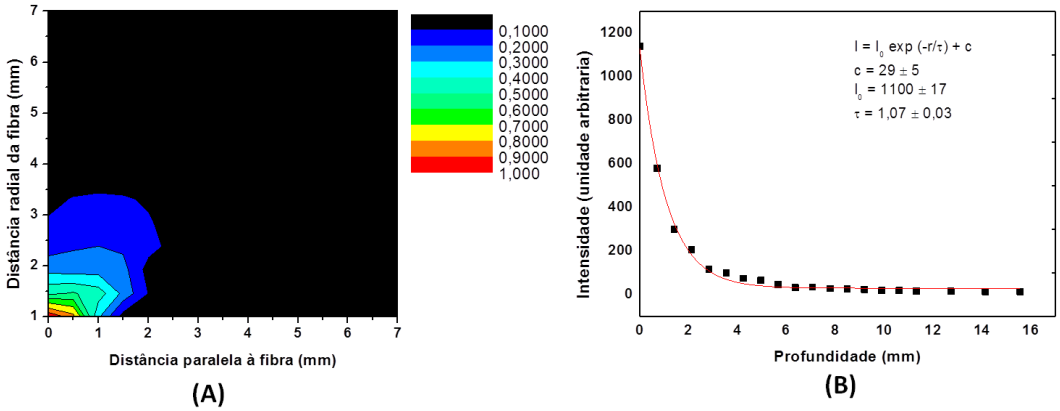


Figura 18 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em solução de água com 0,1% de Lipofundin e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento.

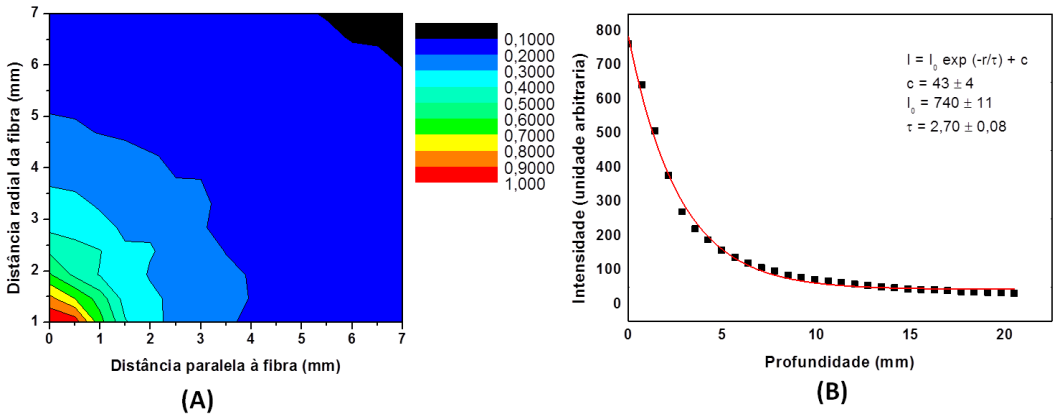


Figura 19 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em solução de água com 0,5% de Lipofundin e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento.

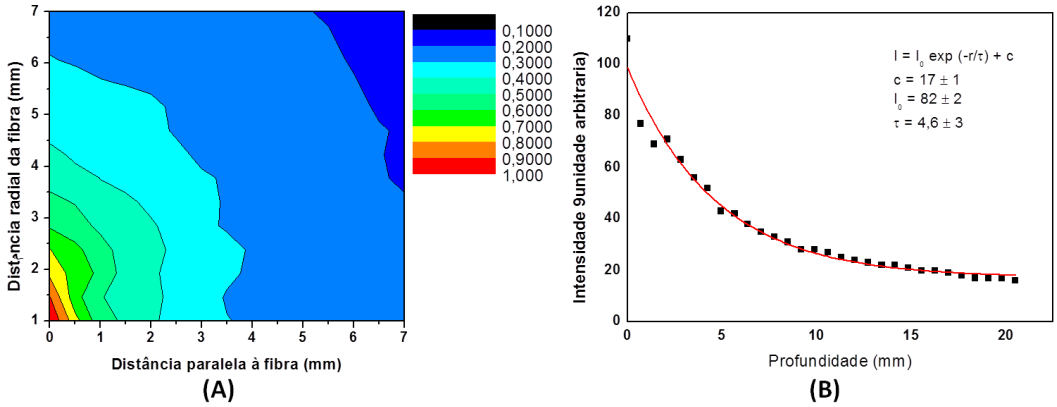


Figura 20 - (A) Curvas de isointensidades para o elemento de 1mm da fibra difusora imerso em solução de água com 1% de Lipofundin e (B) corresponde a sua respectiva curva de decaimento.

Pela Figura 20 verifica-se que as linhas de maiores intensidades se encontram mais próximas do elemento difusor (na origem do gráfico) e, à medida que se afasta da origem, as intensidades vão ficando cada vez menores.

Curiosamente, podemos observar que no caso em que a solução era composta apenas por água (Figura 17), as linhas de intensidades maiores se propagou mais na direção perpendicular do que na direção paralela à fibra. Quando adicionando solução lipídica nas concentrações 0,1 e 0,5 % (Figura 18 e Figura 19) esta direção se inverteu, tendo maior propagação na direção paralela a fibra. Porém, quando aumentada ainda mais a concentração de Lipofundim em 1% (Figura 20), estas linhas passaram a ter novamente a mesma direção do primeiro caso (Figura 17).

Além disso, à medida que aumenta a concentração de Lipofundin na solução, esta se torna mais espalhadora, pois, para estes casos, as curvas de maiores intensidades se propagam até maiores distâncias do elemento difusor em comparação com o caso em que a concentração de Lipofundin é menor. Este fato é nitidamente observado nas curvas de isointensidades (Figura 20). Portanto, foi detectada mais luz em cada posição distante da fonte de iluminação, pois, embora o meio fosse praticamente transparente para a luz nesse comprimento de onda, o detector, por ser isotrópico, foi capaz de captar a luz vinda de diversas direções após sofrer múltiplos espalhamentos.

Á medida que se aumenta a concentração do Lipofundin, a curva de decaimento fica mais suave, ou seja, a intensidade da luz sofre menor atenuação ao penetrar no meio. Os coeficientes de atenuação encontrados também confirmam esse fato, pois seus valores ($1/\tau$) diminuem com o aumento da concentração do espalhador. Pode-se notar também, pelas curvas de decaimento, que os valores de intensidade observados são cada vez menores; esse resultado corrobora com a observação da luz em maiores distâncias da fibra, uma vez que se a luz chega mais longe, menos luz será detectada em cada ponto, já que a intensidade inicial seria a mesma.

A partir das curvas de decaimento, foi possível determinar o valor do coeficiente de atenuação da curva ($\mu_\tau = {}^{1}/_{\tau}$). Com este valor foi possível estabelecer o coeficiente de atenuação da luz para cada concentração, cuja relação está indicada na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação do coeficiente efetivo de atenuação da luz em relação com a concentração de espalhador no meio.

Concentração de espalhador (%)	Coeficiente de atenuação (mm^{-1})	Erro do coeficiente (mm^{-1})
0	1,8	0,1
0,1	0,93	0,03
0,5	0,37	0,01
1	0,21	0,02

Verifica-se que o coeficiente de atenuação diminui com o aumento da concentração de espalhador na solução, ao contrário do que se esperava,[40] pois acredita-se que com o aumento das partículas espalhadoras aumenta-se a barreira que impede que os fótons escapem da

solução e também contribuem para que fótons antes espalhados voltem a somar no mesmo no mesmo ponto.

3.1.2.2 Multiplicabilidade de elementos do difusor

Para testar a multiplicabilidade de um elemento difusor por outro, foram realizadas as medidas de intensidade de luz para dois elementos difusores de 1 mm cada, distantes por 10 mm, imersos no *phantom* contendo 1% de Lipofundin. Com os resultados obtidos gerou-se o gráfico da Figura 21 (B). Analogamente, o eixo "x" corresponde à extensão longitudinal do difusor da fibra e o eixo "y" à distância radial da fibra até o ponto de coleta, em milímetros. A origem dos eixos do gráfico encontra-se no centro longitudinal da fibra, entre os dois elementos.

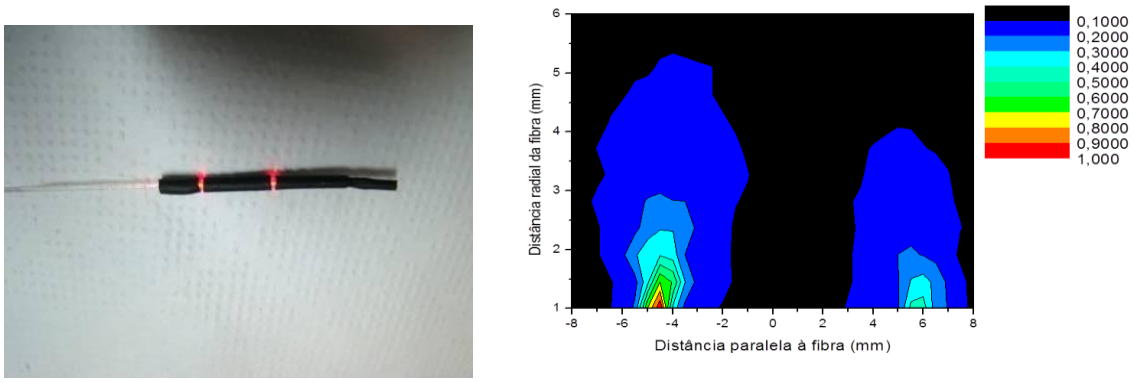


Figura 21 – (A) imagem da seleção dos elementos difusores e (B) curvas de isointensidades referente a dois elementos difusores de 1 mm cada, separados por uma distância de 10mm.

Pode-se verificar que um elemento difusor está localizado próximo à posição -4,5 mm do eixo "x" e, o outro, próximo à posição 5,5 mm e, que, além disso, o difusor da esquerda é claramente muito mais intenso que o da direita, o que concorda com as medidas de caracterização do emissor difusor mostradas em 3.1.1.

O resultado mais satisfatório dentre as diversas possibilidades para os fatores de multiplicação foi o fator 1,5, ou seja, foi aquele em que o elemento da esquerda foi dividido por um fator de 1,5 ou em que o elemento da direita foi multiplicado por 1,5. Portanto, o elemento da esquerda permite que fótons emitidos atinjam uma distância do centro emissor

50% maior do que a da fibra da direita. Ambos os casos estão representados nas Figura 22(A) e (B), respectivamente.

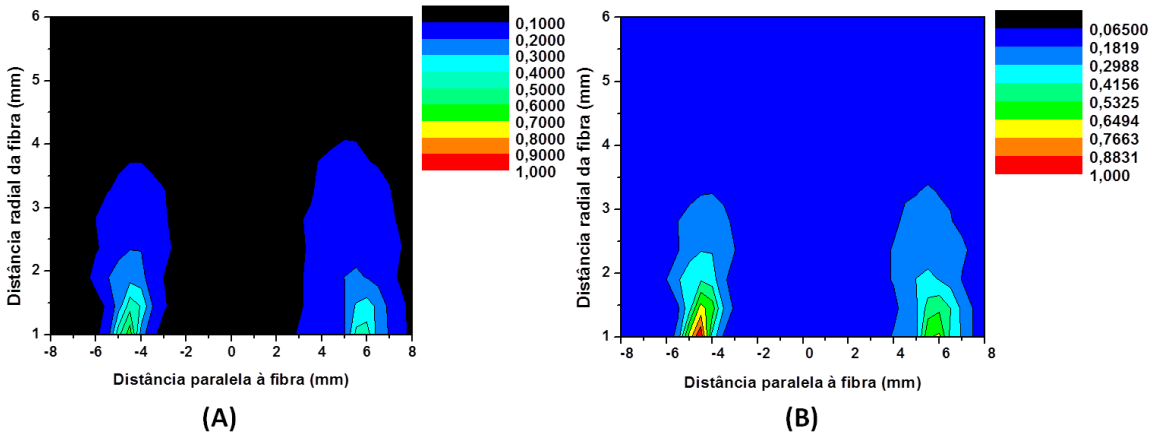


Figura 22 - (A) e (B), representam graficamente as matrizes obtidas para o caso em que o elemento da esquerda foi dividido por um fator de 1,5 e para o caso em que o elemento da direita foi multiplicado por um fator de 1,5, respectivamente.

Verifica-se que o resultado foi bastante satisfatório para as curvas mais distantes do difusor e, no entanto, teve uma menor reprodutibilidade próxima a fonte, como já esperado, pois nesta região a luz não sofreu interações que resultassem em uma iluminação mais uniforme.

3.1.2.3 Junção de dois elementos de difusor de 1mm

Na tentativa de reconstruir o campo de luz de um elemento difusor de 2 mm a partir da soma dos campos de luz de dois elementos difusores de 1 mm, foram realizadas medidas de intensidade de luz para dois casos: elemento difusor de 1 mm e elemento difusor de 2 mm.

As matrizes obtidas nos casos em que foram utilizados um elemento difusor de 1 mm e um de 2 mm estão graficamente representadas nas Figura 23 (A) e (B), respectivamente. Nos dois casos, o centro do elemento difusor foi considerado o centro do eixo “x” que é, novamente, paralelo à extensão longitudinal do difusor da fibra.

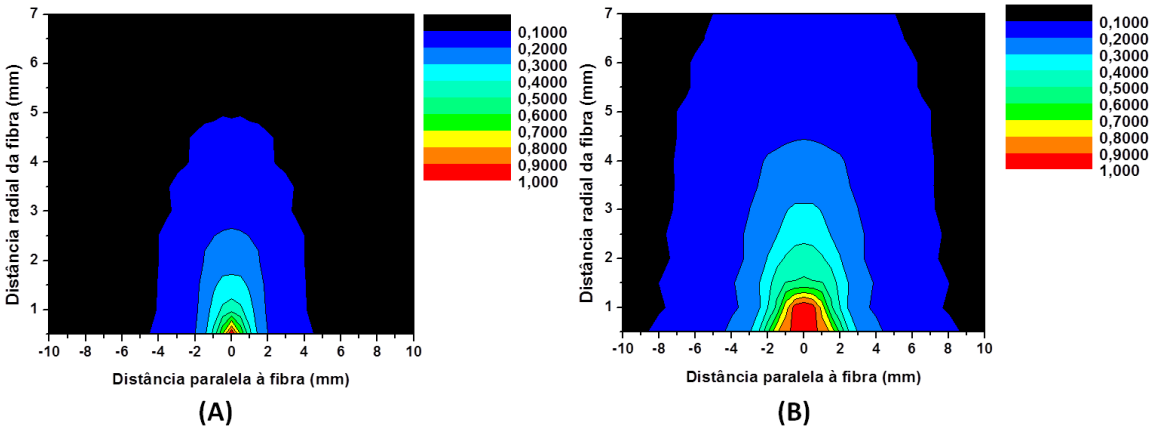


Figura 23 - Curvas de isointensidade obtidas utilizando um elemento difusor de 1 mm (A) e um elemento de 2 mm(B), respectivamente, considerando o elemento o centro do eixo x.

A matriz de dados de intensidade coletados correspondente ao elemento difusor de 1 mm foi transladada de tal forma que reproduzisse este elemento em posição adjacente ao mesmo, e as duas matrizes (a matriz original e a matriz transladada) foram somadas visando reproduzir um elemento de extensão de 2 mm. A matriz obtida, já normalizada, está representada na Figura 24 (A). O resultado obtido não ficou tão próximo do esperado, mesmo nas partes mais distantes do elemento difusor, embora seja evidente que há um padrão de proporcionalidade entre ambas. Esta diferença pode advir de imprecisões ao encapar cada fibra que interferiram com as extensões reais dos elementos difusores medidos. Aplicar sobre a matriz obtida um fator multiplicativo de 1,2 mostrou-se a forma mais satisfatória de reproduzir o elemento real de 2 mm, e esta comparação está representada na Figura 25 (B).

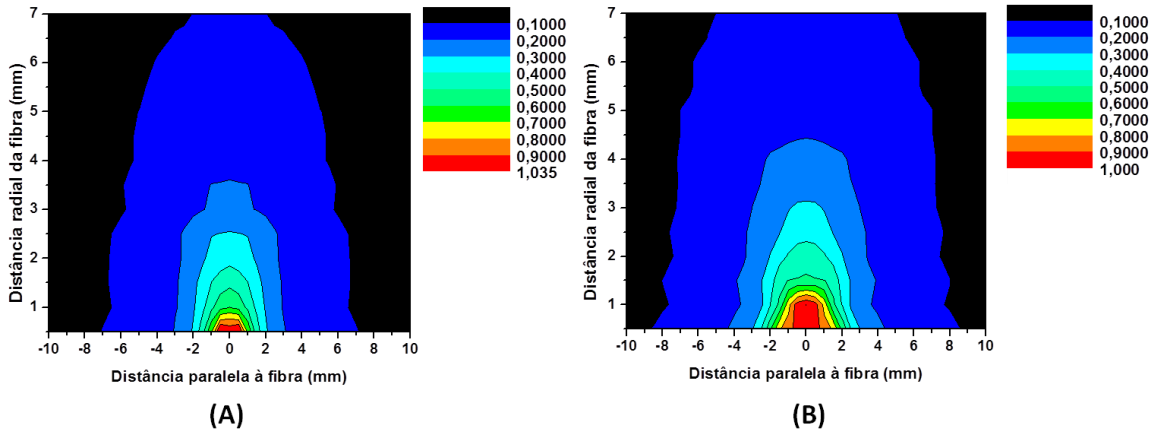


Figura 24 - (A) Curvas de isointensidade correspondentes à soma de dois elementos difusor de 1 mm e (B) curvas de isointensidade obtidas utilizando um elemento de 2 mm.

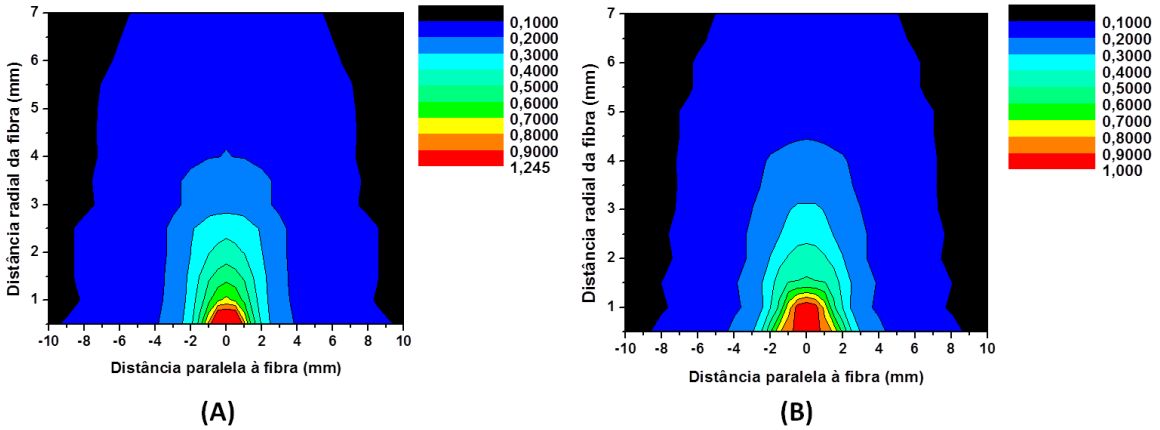


Figura 25 - (A) Curvas de isointensidade correspondentes à soma de dois elementos difusor de 1 mm multiplicado pela pelo fator 1,2 e (B) curvas de isointensidade obtidas utilizando um elemento de 2 mm.

O fator de 1,2 de correção sugere um erro de 20% ao encapar a fibra, que é totalmente plausível com a situação, já que os elementos requerem uma precisão micrométrica, muito difícil de garantir com a instrumentação disponível para estes testes.

Além disso, se considerarmos este erro, chega-se a um resultado muito semelhante ao esperado, ao comparar as Figura 25 (A) e (B). Quanto mais próximos do elemento difusor, mais as imperfeições locais da fibra interferem na análise da propagação da luz, diminuindo a eficácia da reprodução das curvas de isointensidade. Contudo, quanto mais distante dos elementos, os resultados ficam muito mais próximos. De modo geral, as curvas de isointensidades ficaram praticamente com o mesmo perfil em ambas as figuras, pois as várias interações de espalhamento da luz com as moléculas do meio em seu percurso tornam a distribuição espacial da luz cada vez mais homogênea.

3.1.2.4 Reconstrução da fibra através de um elemento difusor de 1mm

Após verificar uma possibilidade razoável de reprodução de um elemento mais longo de uma fibra difusora com base em um elemento menor, tentou-se reconstruir toda a fibra de 20 mm a partir da soma de 20 elementos difusores de 1 mm representado na Figura 23 (A), de modo semelhante ao do item 3.1.2.3, ou seja, pela reprodução e soma dos elementos unitários.

Figura 26 (B) apresenta as curvas de isointensidades obtidas a partir da matriz de intensidades medidas para todo o comprimento do difusor da fibra, ou seja, um “elemento difusor de 20 mm” imerso no *phantom*.

A matriz correspondente ao elemento difusor de 1 mm foi 19 vezes transladada de forma a se obter 20 matrizes (1 original e 19 transladadas) adjacentes idênticas que foram somadas, obtendo como resultado a matriz que gerou a curva de isointensidades da Figura 26 (A). Como se pode observar, a matriz gerada apresenta curvas de isointensidades com uma variação mais suave entre a fibra e maior distância radial observada, sugerindo que a luz se propague muito além do esperado. Porém, para uma reprodução apropriada da fibra real, é preciso levar em conta a informação apresentada na Figura 15, onde a caracterização da fibra mostra que a intensidades diferentes são coletadas ao longo do eixo longitudinal do difusor. Esta caracterização pode ser utilizada para realizar uma ponderação ao somar as matrizes, de acordo com a posição para a qual o elemento unitário foi transladado. O resultado desta soma ponderada encontra-se na Figura 27 (A).

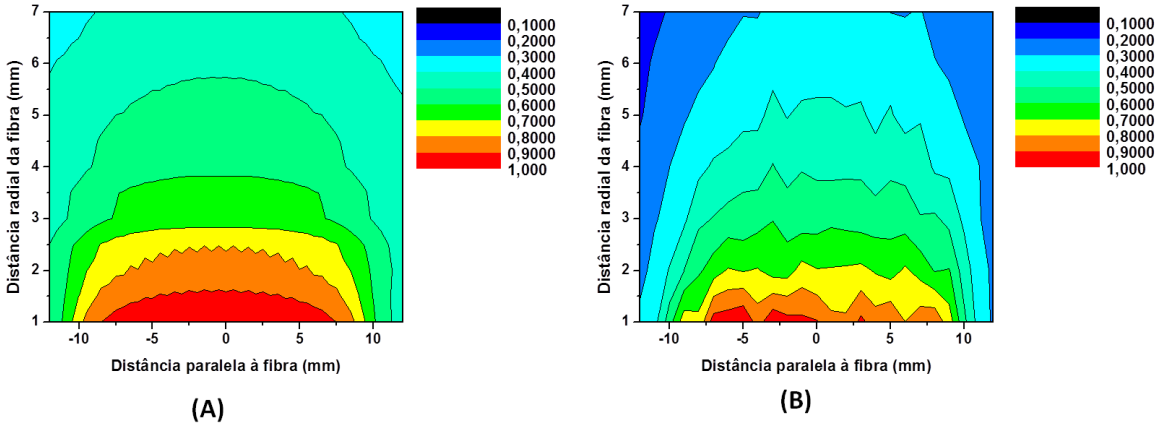


Figura 26 - (A) Curvas de isointensidade referentes à soma simples de 20 matrizes referentes ao elemento difusor de 1 mm deslocadas e (B) referentes à medida da fibra de 20 mm.

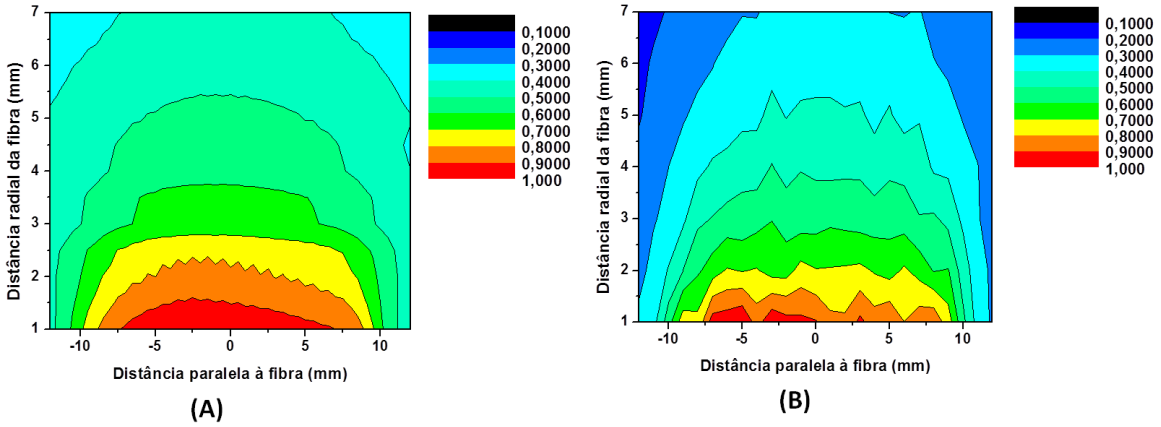


Figura 27 - (A) Curvas de isointensidade referentes à soma ponderada de 20 matrizes referentes ao elemento difusor de 1 mm deslocadas e (B) referentes à medida fibra de 20 mm.

O resultado obtido ainda superestima a propagação radial da luz quando comparado com o perfil medido e apresentado na Figura 27 (B). Porém, é significativamente mais próximo do resultado real quando comparado com o resultado obtido sem usar a soma ponderada, em especial para as menores distâncias radiais.

Para avaliar o quanto a escolha do elemento unitário utilizado para a reprodução da emissão da fibra depende da posição longitudinal para a qual este foi tomado, foram realizadas as medidas de elementos difusores de 1 mm nas posições 0 mm, 4 mm e 20 mm ao longo do difusor, sendo 0 mm o extremo do difusor ligado à fibra e 20 mm a outra extremidade. O elemento de 1 mm medido para as etapas anteriores, Figura 23 (A), corresponde à região central do difusor, ou seja, à posição de 10 mm ao longo do difusor. As matrizes obtidas pelas medidas encontram-se graficadas nas Figura 28 (A), (B) e (C), respectivamente.

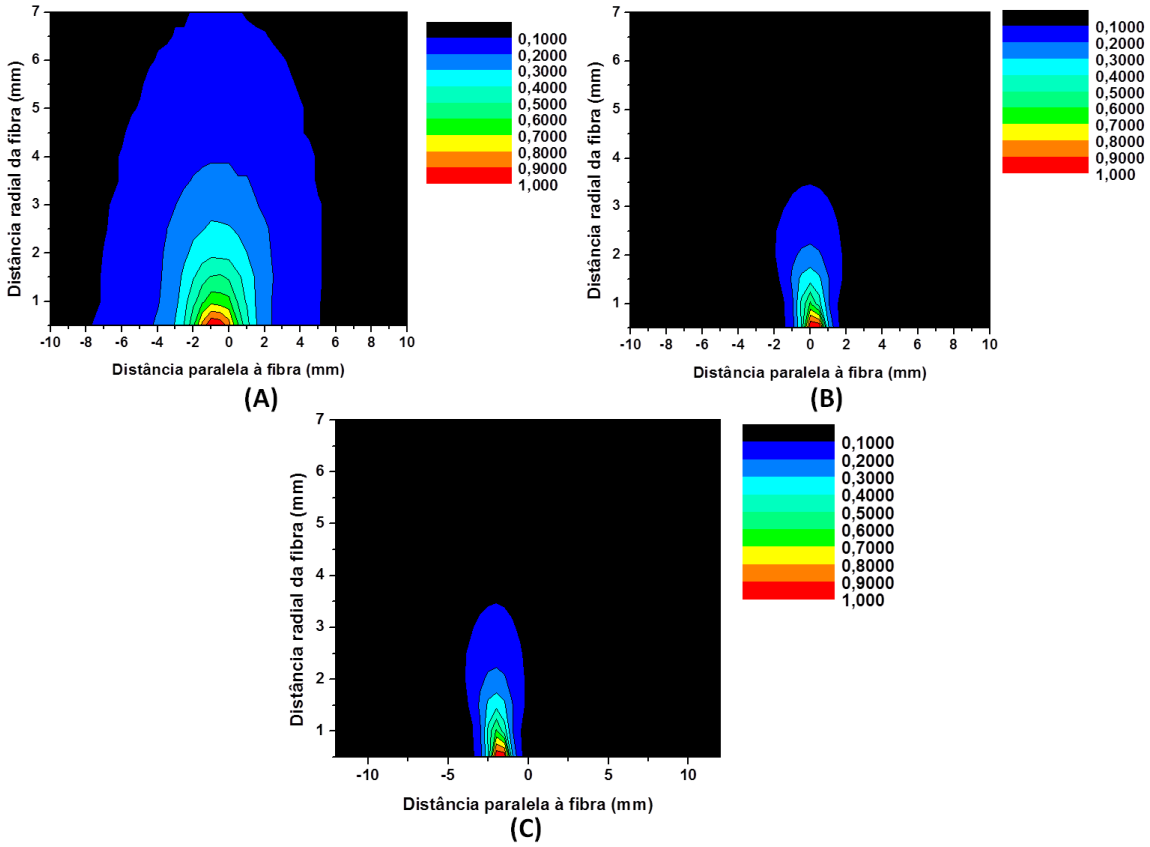


Figura 28 - (A), (B) e (C) Curvas de isointensidade referentes a um elemento difusor da fibra situado na posição 0 mm, 4 mm e 20 mm, respectivamente. A posição dos elementos nas abscissas não reflete sua posição real no difusor, tendo sido deslocadas para facilitar a visualização.

Nota-se que o perfil de propagação de luz muda muito de acordo com a posição do elemento difusor. Em todos os casos, manteve-se o laser com a mesma intensidade, tomando-se ainda o cuidado de normalizar as intensidades para facilitar a comparação.

Recorrendo ao mesmo processo de transladação de 20 vezes e soma dos elementos das matrizes para cada caso, foi possível encontrar a reconstrução do difusor da fibra para cada elemento medido. As reconstruções obtidas pelos elementos das posições 0 mm, 4 mm e 20 mm, estão nas Figura 29 (A), (B) e (C), sendo que todas as somas foram realizadas ponderadamente de acordo com o perfil real da fibra. Na Figura 29 (D), encontra-se a matriz correspondente às medidas realizadas no difusor de 20 mm (idêntica à apresentada na figura 12 (B)), a fim de facilitar a visualização dos resultados.

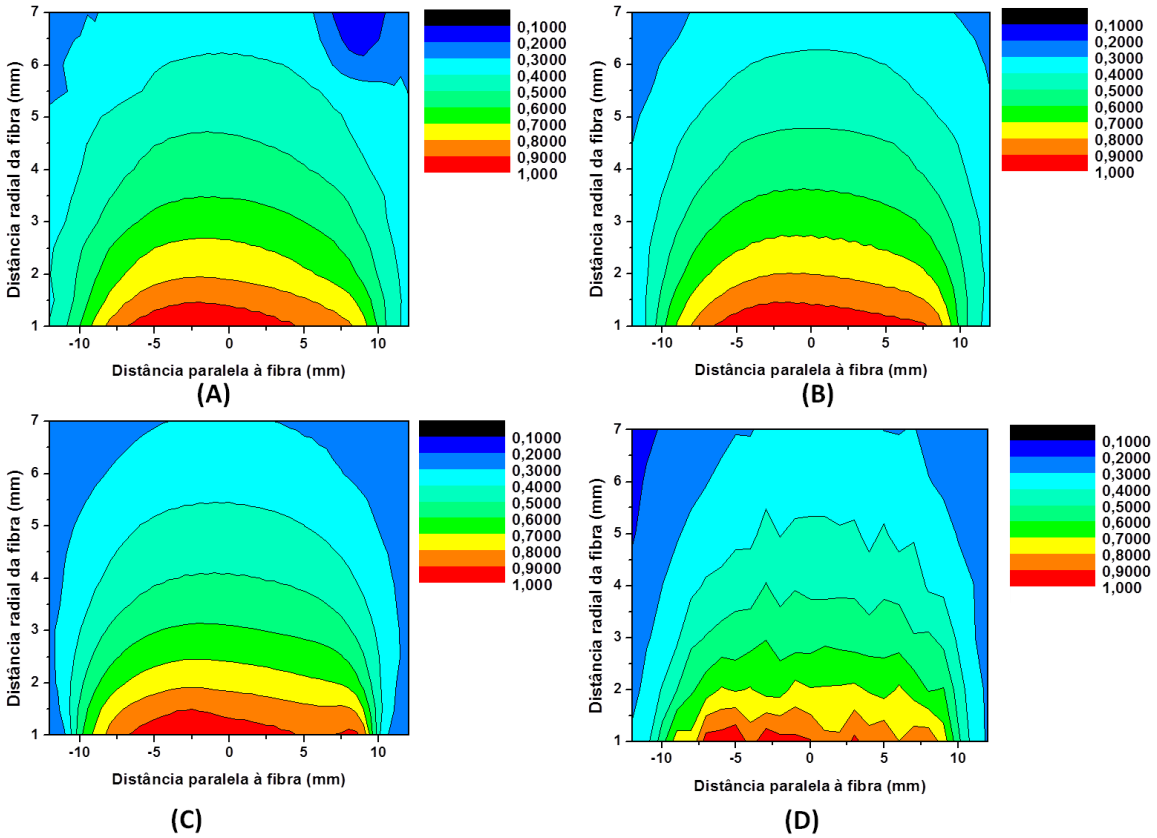


Figura 29 - Curvas de isointensidade referentes à soma ponderada das 20 matrizes do elemento difusor de 1mm, para as posições (A) 0, (B) 4 e (C) 20mm da fibra; (D) Curvas de isointensidade referentes à emissão da fibra de 20 mm medida.

Nas novas reconstruções realizadas, para algumas posições o resultado se assemelha mais com o resultado esperado, como no caso da Figura 29 (C), ou seja, verifica-se que a reconstrução do difusor através da soma do elemento cuja posição era 20 mm foi a que mais se aproximou do real.

Tal verificação pode resultar do fato de que existe a possibilidade de que para cada posição da fibra, exista um ângulo preferencial para a propagação da luz, o que deve influenciar significativamente o resultado da soma.

3.1.2.5 Reconstrução da emissão no entorno da fibra através de um quadrante

Na tentativa de reconstruir o campo de luz produzido ao redor de todo o eixo longitudinal do elemento difusor de 1 mm, inicialmente, foram realizadas medidas de

intensidade de luz quando apenas um quadrante deste emitia luz, de forma que os outros três quadrantes foram encapados para impossibilitar a emissão de luz.

O difusor foi posicionado no sentido vertical e a fibra de coleta no sentido horizontal, alinhada com o centro do elemento difusor como mostrado na Figura 11. As curvas de isointensidade correspondentes às medidas realizadas encontram-se na Figura 30.

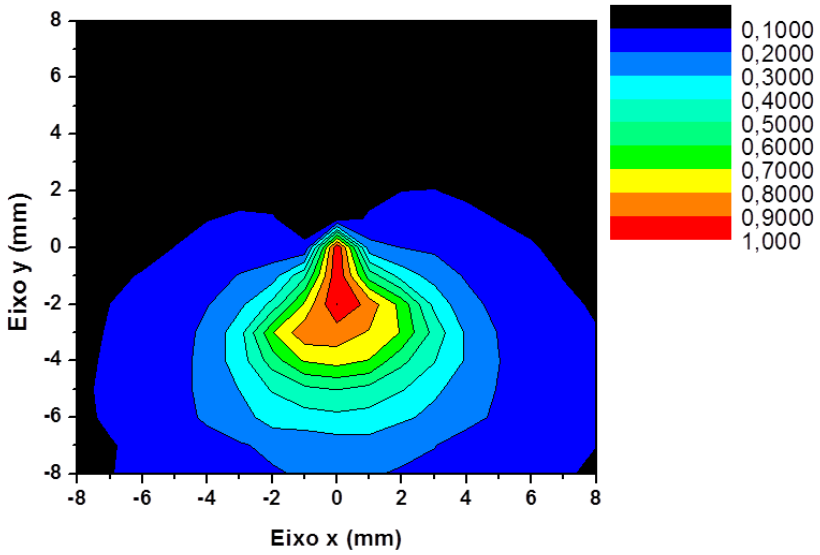


Figura 30 - Curvas de isointensidade referentes a um elemento de difusor de 1mm emitindo em apenas um quadrante.

A matriz foi, então, rotacionada para os outros quadrantes e a estas foram somadas. O resultado está indicado na Figura 31 (A), enquanto que as medidas realizadas para toda a volta do difusor emitindo luz esta representada na Figura 31 (B).

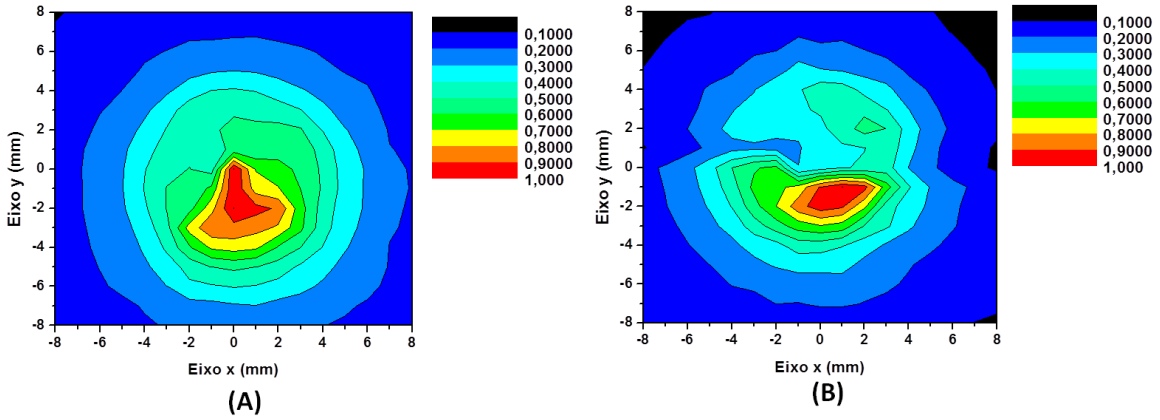


Figura 31 - (A) Curva reconstruída pela junção da medida dos quatro quadrantes; (B) Curva referente à volta toda do elemento difusor.

Verifica-se que próximo ao difusor, no centro da imagem, as linhas de intensidades de luz não foram bem reconstruídas, mas que quanto mais afastadas do difusor estas linhas chegam mais próximas do real. Além disso, também se observa que em ambos os casos o difusor emite menos no segundo quadrante (entre 90 e 180º) e emite mais no quarto quadrante (entre 270 e 360º), estando as curvas reconstruídas coerente com as curvas medidas.

3.1.2.6 Dificuldades encontradas com a técnica adotada

Os resultados obtidos através da análise de pequenos elementos da fibra, delimitadas com o auxilio do material termorretrátil, tiveram algumas divergências com o resultado esperado: na seção 3.1.2.2, por exemplo, a largura da fenda da esquerda aparentou ser um pouco mais larga que a largura da fenda da direita, ao observar as curvas de isointensidades da Figura 21; nas seções 3.1.2.3. e 3.1.2.4, em que foi utilizado um elemento de 1 mm da fibra para recompor um elemento de 2 mm e a fibra de 20 mm, respectivamente, também apresentaram algumas diferenças em relação ao esperado.

Estas divergências, entretanto, podem estar relacionadas com a falta de precisão micrométrica ao encapar a fibra, pois os cortes do material foram realizados a mão com uso de um estilete. Imprecisões micrométricas, entretanto, podem gerar resultados consideráveis.

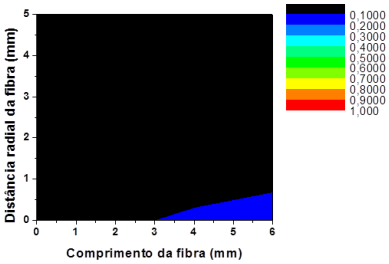
Porém, as ferramentas utilizadas foram as que melhor se adequaram a situação, pois, para cobrir a fibra, era necessário um material que: permitisse a mobilidade do próprio, a mobilidade da fibra, se ajustasse à fibra para que não se movesse quando fosse imersa a solução líquida, não solúvel em água, que não refletisse a luz e que não danificasse a fibra.

3.1.3 Caracterização tridimensional de fibras em *phantom* absorvedor

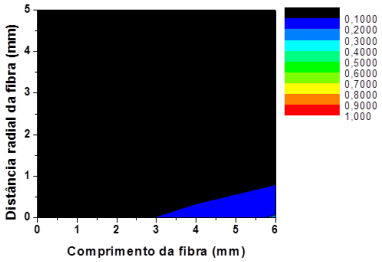
Foram utilizadas três fibras com difusores cilíndricos de comprimentos distintos de 5, 20 e 25 mm (fibras A, B e C, respectivamente). Para cada uma das fibras, foram realizadas medidas de intensidades de luz dentro e fora do *phantom*, no qual foram adicionados 1% de Lipofundim (material espalhador) e 0,03% de nanquim (absorvedor). Em tais medidas foi utilizado um eixo de translação conectado à fibra de coleta, fazendo a varredura radial, angular e na altura, formando cascas cilíndricas de coleta.

Fibra (A)

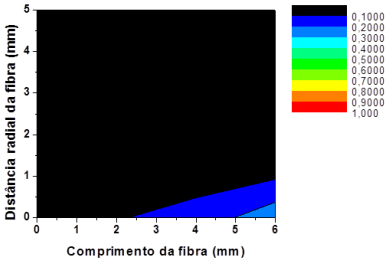
Para a fibra (A), de 5mm, foram obtidas as matrizes para cada ângulo e os gráficos obtidos. A Figura 32 e a Figura 33 correspondem às curvas de isointensidade geradas pelas matrizes com a fibra fora e dentro do *phantom*, respectivamente.



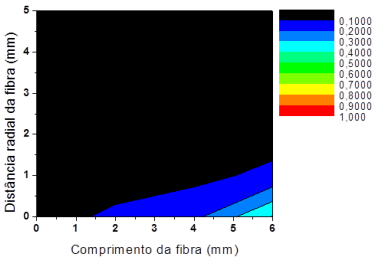
(0º)



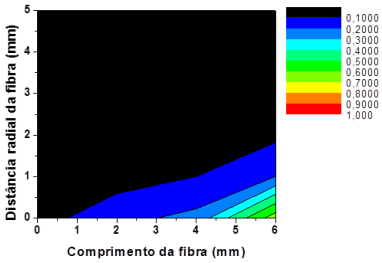
(20º)



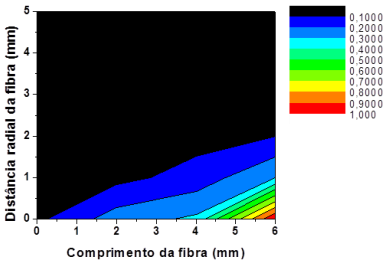
(40º)



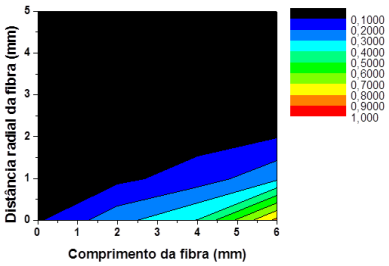
(60º)



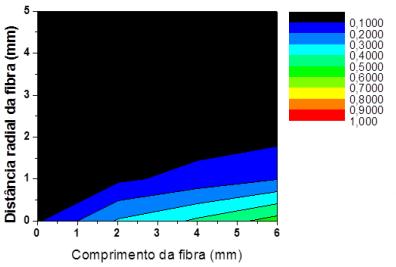
(80º)



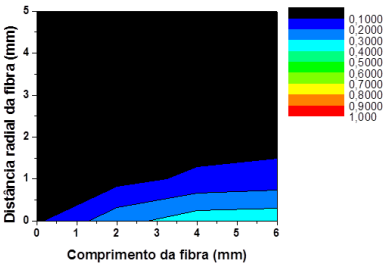
(100º)



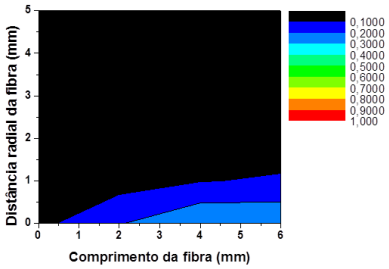
120º



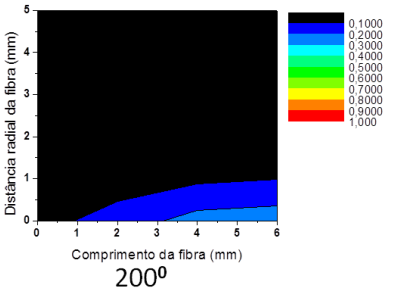
140º



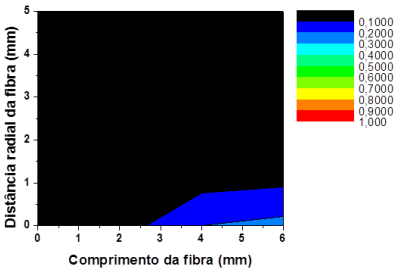
160º



180º



200º



220º

continua

continuação

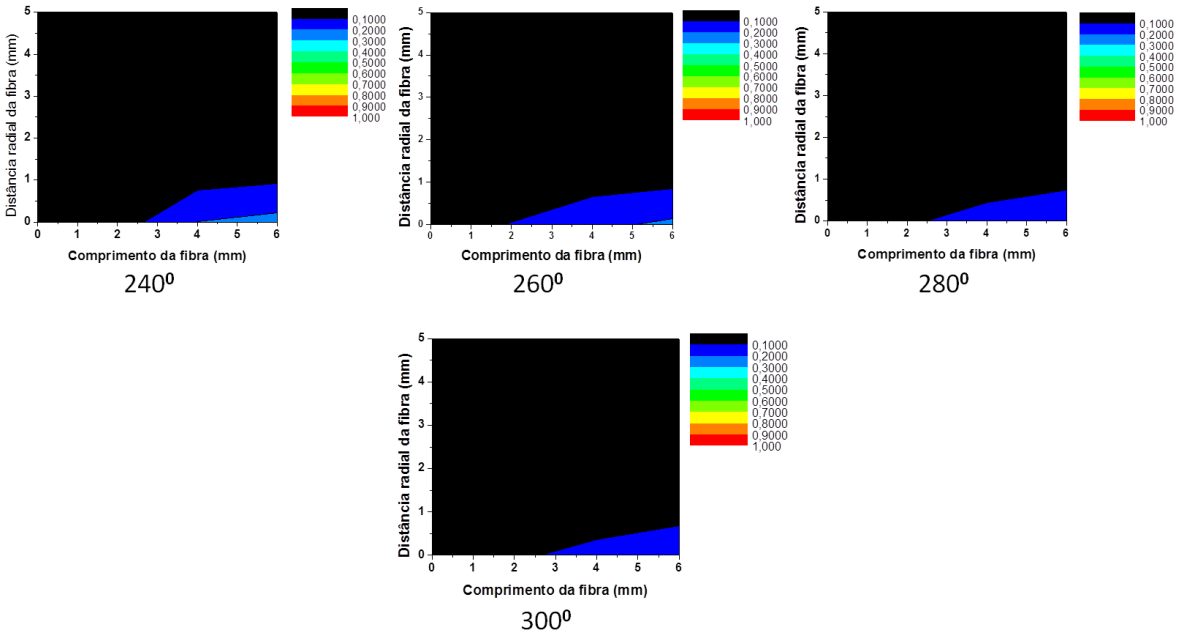
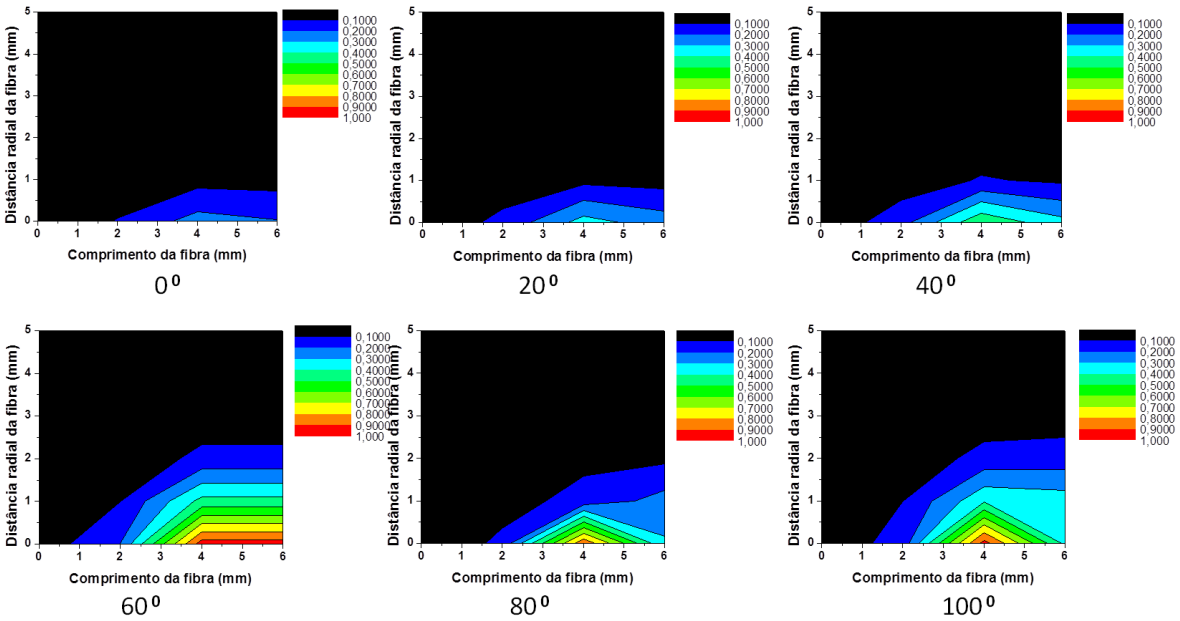


Figura 32 – Curvas de isointensidades correspondentes a cada ângulo da fibra (A) fora do *phantom*.



continua

continuação

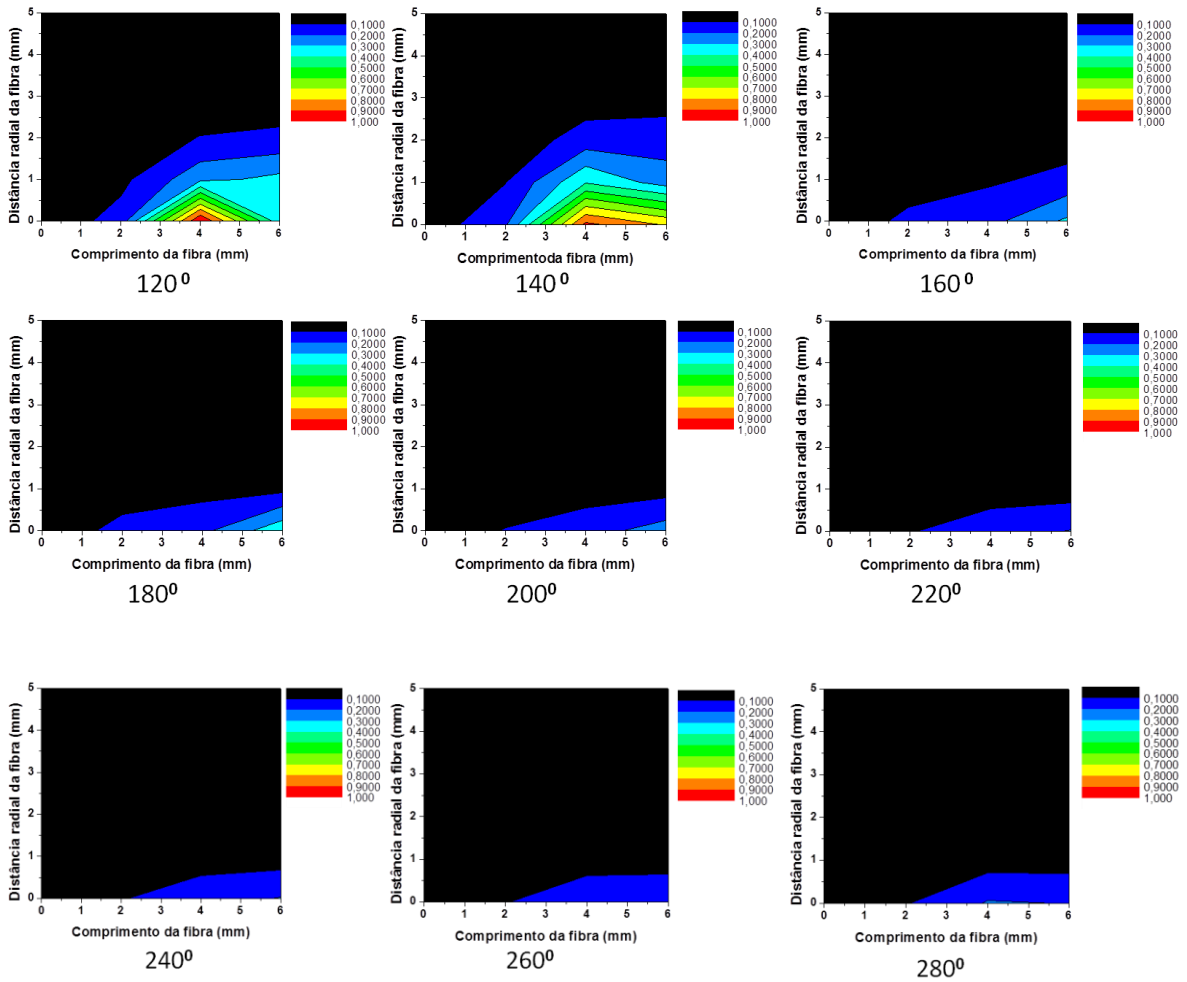


Figura 33 - Curvas de isointensidades correspondentes a cada ângulo da fibra (A) dentro do *phantom.*

Nota-se na Figura 32 que, no ar, a emissão do difusor de 5 mm é bastante irregular e que essa irregularidade é bem mais acentuada na Figura 33, quando a fibra é imersa no *phantom*.[7] Seu máximo de emissão, que se encontrava exatamente na extremidade da fibra (nos 5mm), ficou deslocado mais para o centro da fibra (nos 3mm). Neste caso, a maior irregularidade da fibra foi bem mais evidente quando estava imersa no *phantom*. Como o difusor é muito pequeno e praticamente irregular em todas as suas regiões, essa irregularidade ficou mais acentuada.

As medidas foram realizadas de modo a formar várias cascas cilíndricas ao redor do difusor, como ilustra a Figura 34.

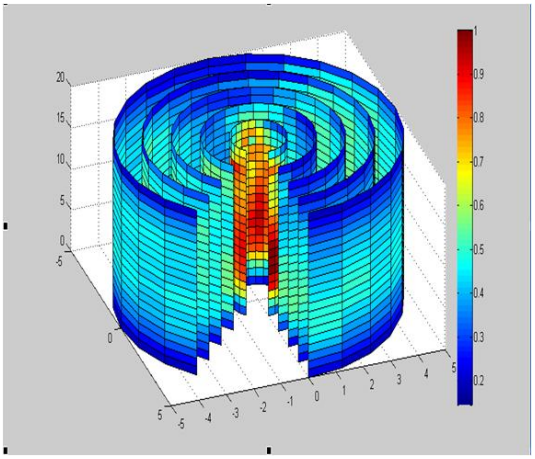


Figura 34 - Ilustração das medidas realizadas formando várias cascas cilíndricas ao redor da fibra difusora.

Nesta figura, a fibra está localizada no centro (raio r = 0) e sua extensão corresponde a altura do cilindro. Cada casca é separada de 1mm da casca anterior e corresponde às coletas realizadas ao redor da fibra para cada distância radial.

Utilizando uma rotina no programa MatLab também foi possível gerar imagens tridimensionais em que as intensidades estão representadas pelo *dégradé* de cores indicadas na legenda. Nesta figura de mérito, as cascas são alongadas de tal forma que o eixo "x" seja a posição angular da medida e "z", a medida realizada paralelamente a extensão do difusor (comprimento do difusor). Em y, visualizamos a distância radial das medidas, ou seja, até que distância da fibra foi possível detectar luz. As imagens das Figura 35 e Figura 36 correspondem a fibra fora e dentro do *phantom*, respectivamente.

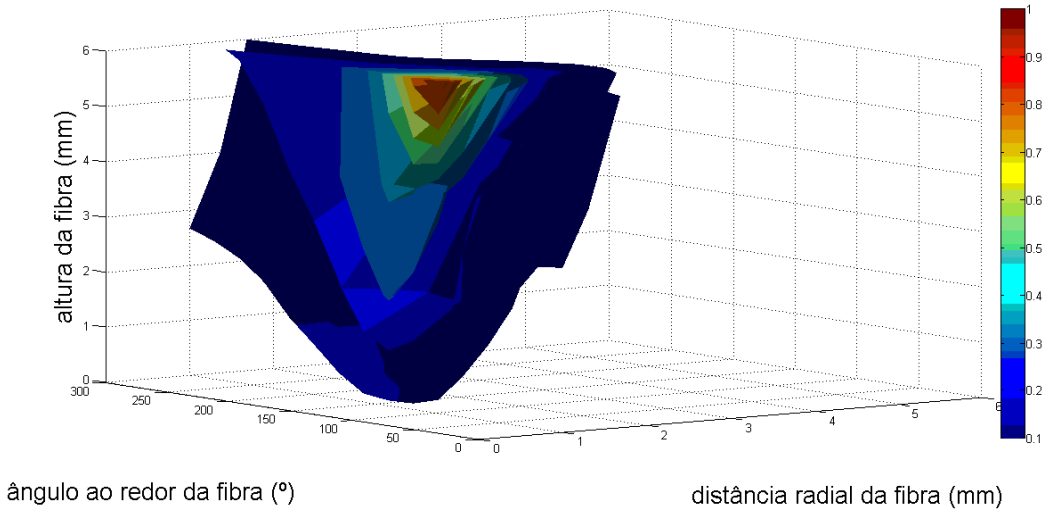


Figura 35 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (A) fora do *phantom.*

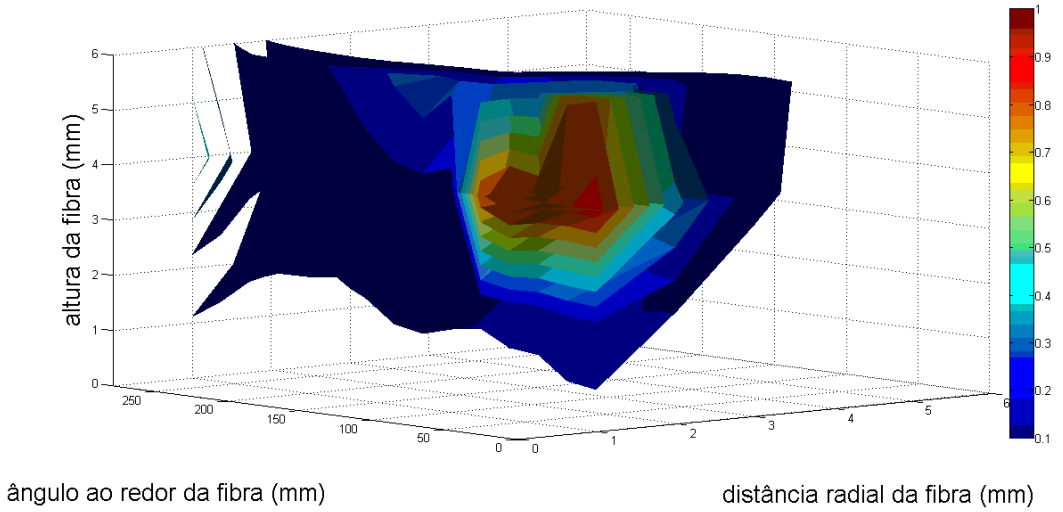
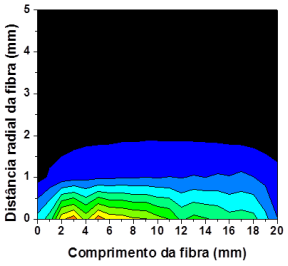


Figura 36 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (A) dentro do *phantom.*

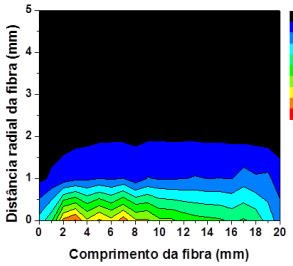
Nas figuras acima, é evidente que a fibra não possui um aspecto regular em sua emissão. No entanto, as linhas de intensidades de luz se propagam até mais longe da fibra (aproximadamente 2 mm se comparada com 3mm fora do *phantom*), quando esta é imersa ao phantom e, além disso, a irregularidade da fibra fica bem mais evidente neste caso e deslocada do extremo da fibra (nos 5 mm) para a região mais central (nos 3mm).

Fibra (B)

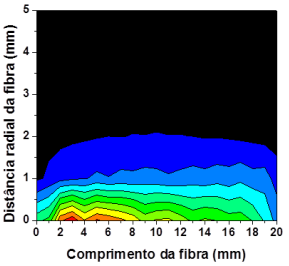
Para a fibra (B), de 20mm, foram obtidas as matrizes para cada ângulo e os gráficos obtidos. A Figura 37 e a Figura 38 correspondem às curvas de isointensidade geradas pelas matrizes com a fibra fora e dentro do *phantom*, respectivamente.



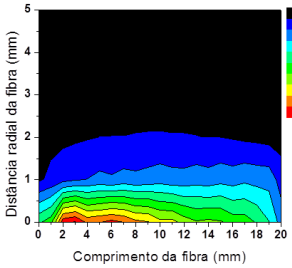
0⁰



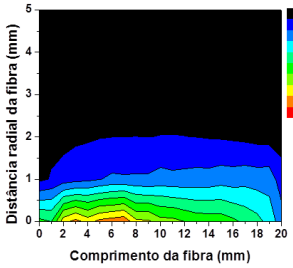
15⁰



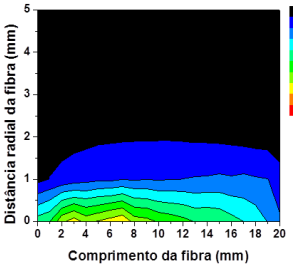
30⁰



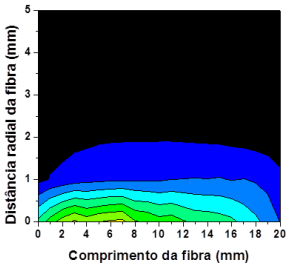
45⁰



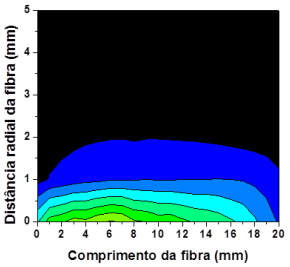
60⁰



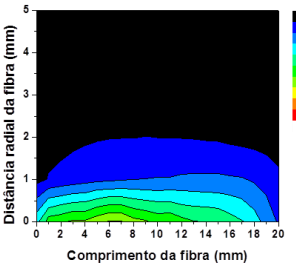
75⁰



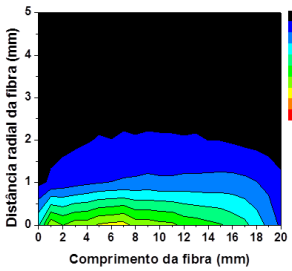
90⁰



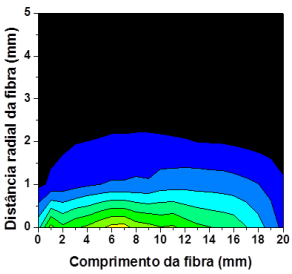
105⁰



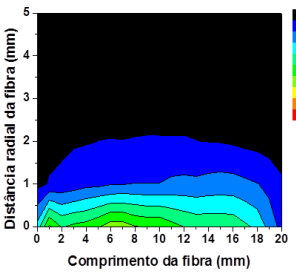
120⁰



135⁰



150⁰



165⁰

continua

continuação

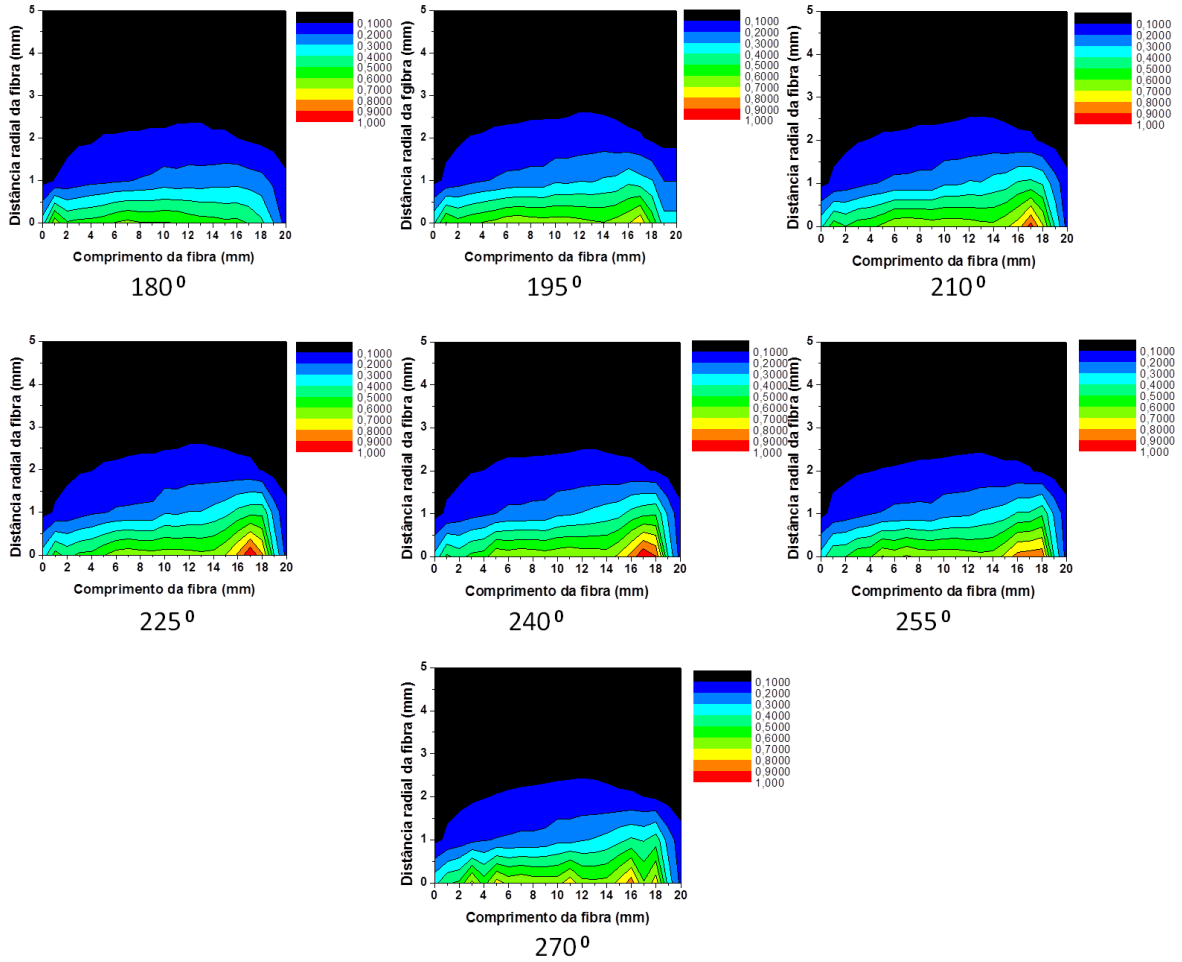
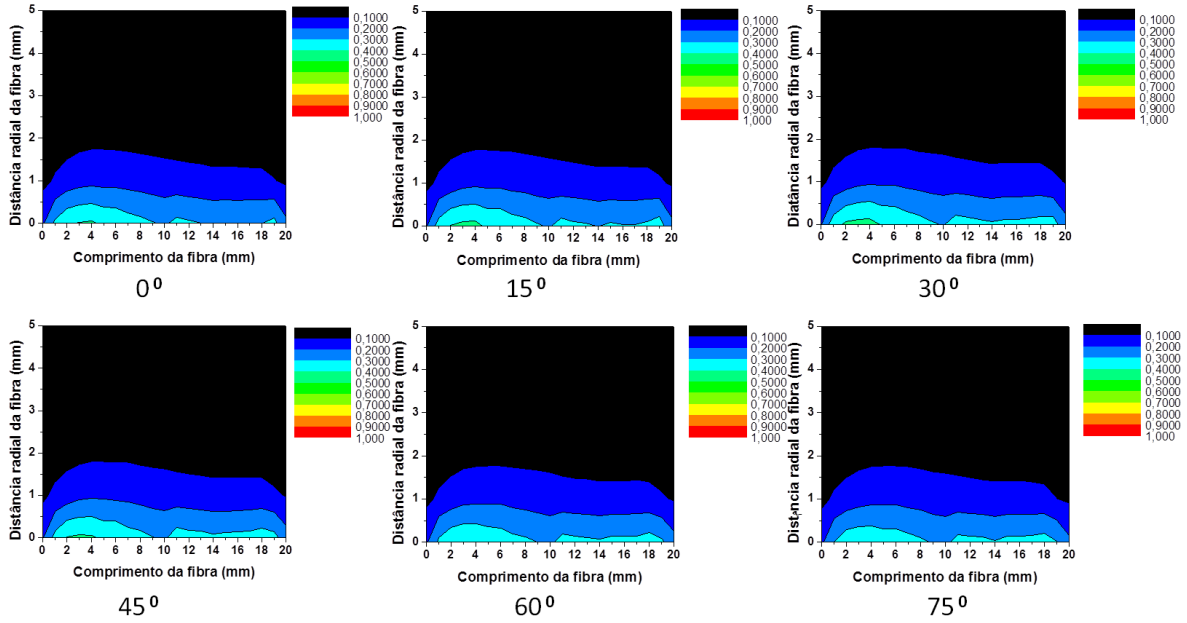


Figura 37 – Curvas de isointensidade correspondentes a cada ângulo da fibra (B) fora do *phantom*.



continua

continuação

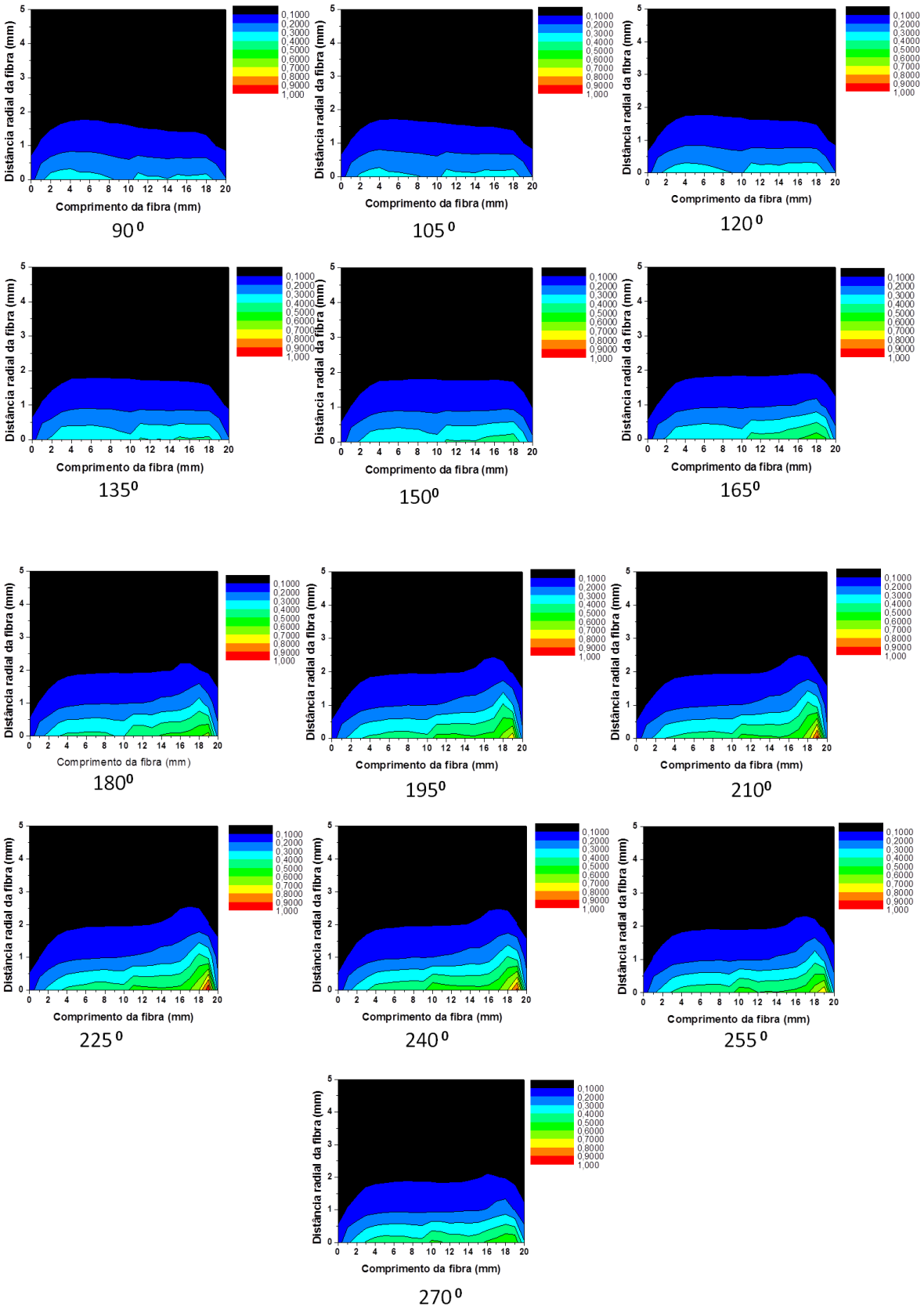


Figura 38 – Curvas de isointensidades correspondentes a cada ângulo da fibra (B) dentro do *phantom*.

De acordo com o esperado, quando a fibra é imersa no *phantom*, a propagação da luz é bem mais atenuada, devido à presença do nanquim que tem propriedades absorvedoras[7]. Neste caso a emissão da luz, no geral, fica bem mais homogênea, com exceção da irregularidade de emissão da fibra presente na região dos 19 mm nas posições entre 180 a 255^0 (como verificado nos gráficos da Figura 38), que fica bem mais acentuada e evidente em comparação com a fibra suspensa no ar.

Utilizando uma rotina no programa MatLab foi possível, também, obter figuras tridimensionais em que as isointensidades estão representadas pelo *dégradé* de cores indicadas na legenda. Analisando as fatias em diferentes posições do volume formado pelas curvas encontradas, as imagens da Figura 39 e da Figura 40 correspondem à fibra fora e dentro do *phantom*, respectivamente.

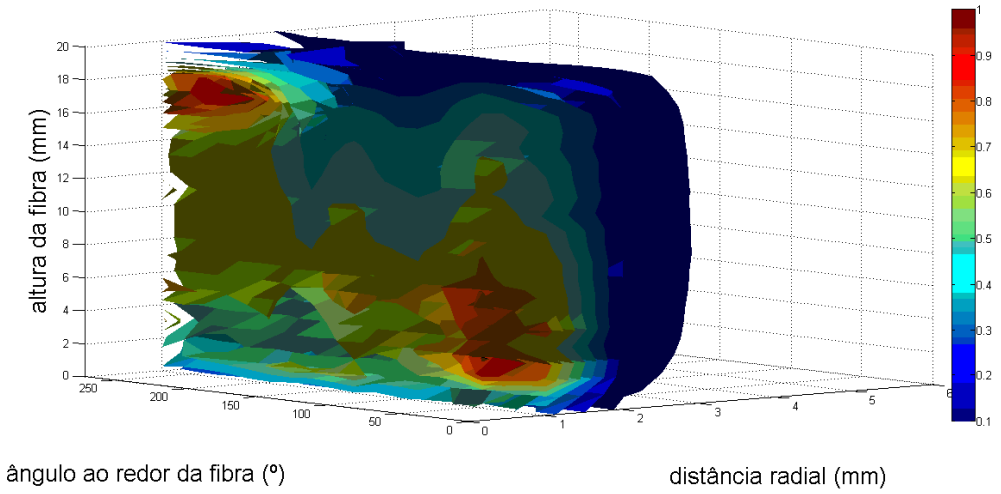


Figura 39 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (B) fora do *phantom*.

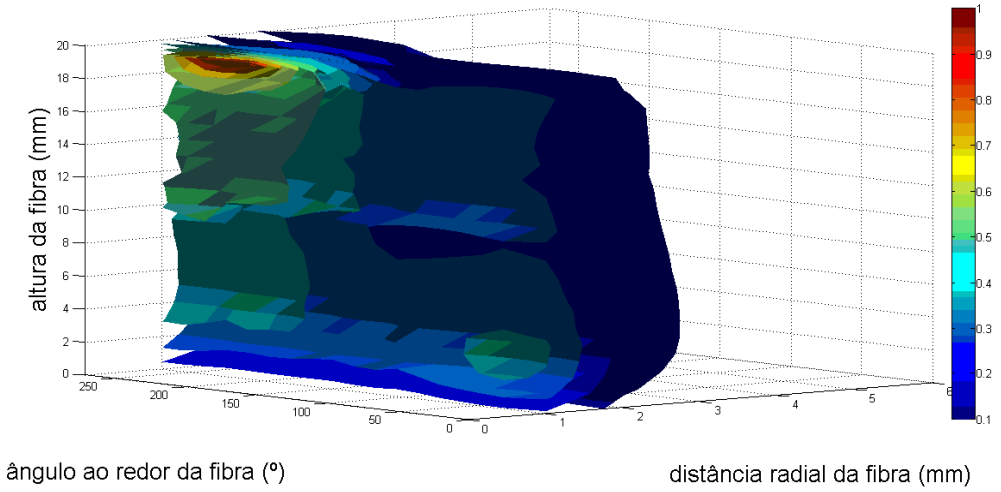
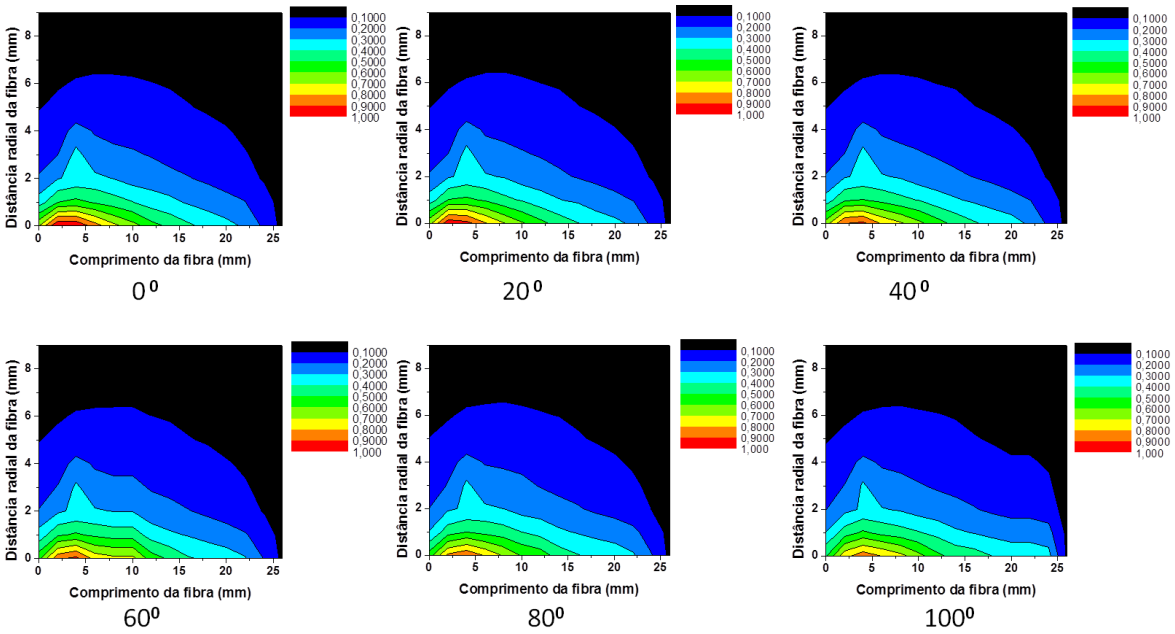


Figura 40 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (B) dentro do *phantom*.

Nota-se que a fibra, como já evidenciado anteriormente, não possui um aspecto regular em sua emissão, mas essa irregularidade é diminuída quando a fibra é imersa no *phantom*. Além disso, devido à absorção do nanquim, verifica-se que a luz se propaga menos (aproximadamente 3 mm) se comparada com o difusor emitindo luz fora do *phantom* (aproximadamente 5 mm), ou seja, as curvas de isointensidades encontram-se mais próximas da fibra, quando a fibra difusora está imersa no *phantom*. No geral, a emissão da fibra apresentou um aspecto mais uniforme quando inserida no *phantom*.

Fibra (C)

Para a fibra (C), de 25 mm, foram obtidas as matrizes para cada ângulo de coleta. A Figura 41 e a Figura 42 correspondem a essas matrizes para a fibra fora e dentro do *phantom*, respectivamente.



continua

continuação

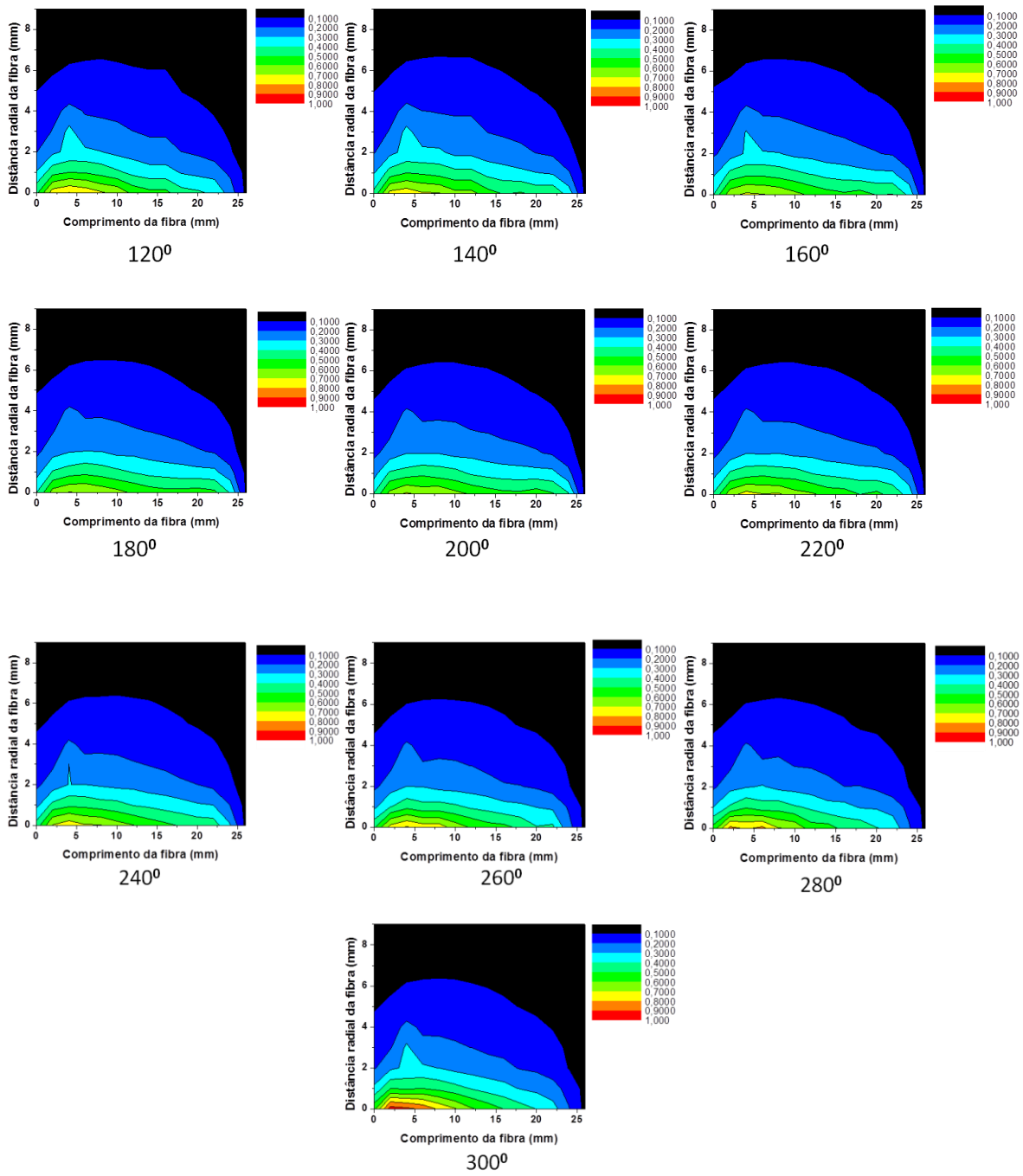


Figura 41 – Curvas de isointensidade correspondentes a cada ângulo da fibra (C) fora do *phantom*.

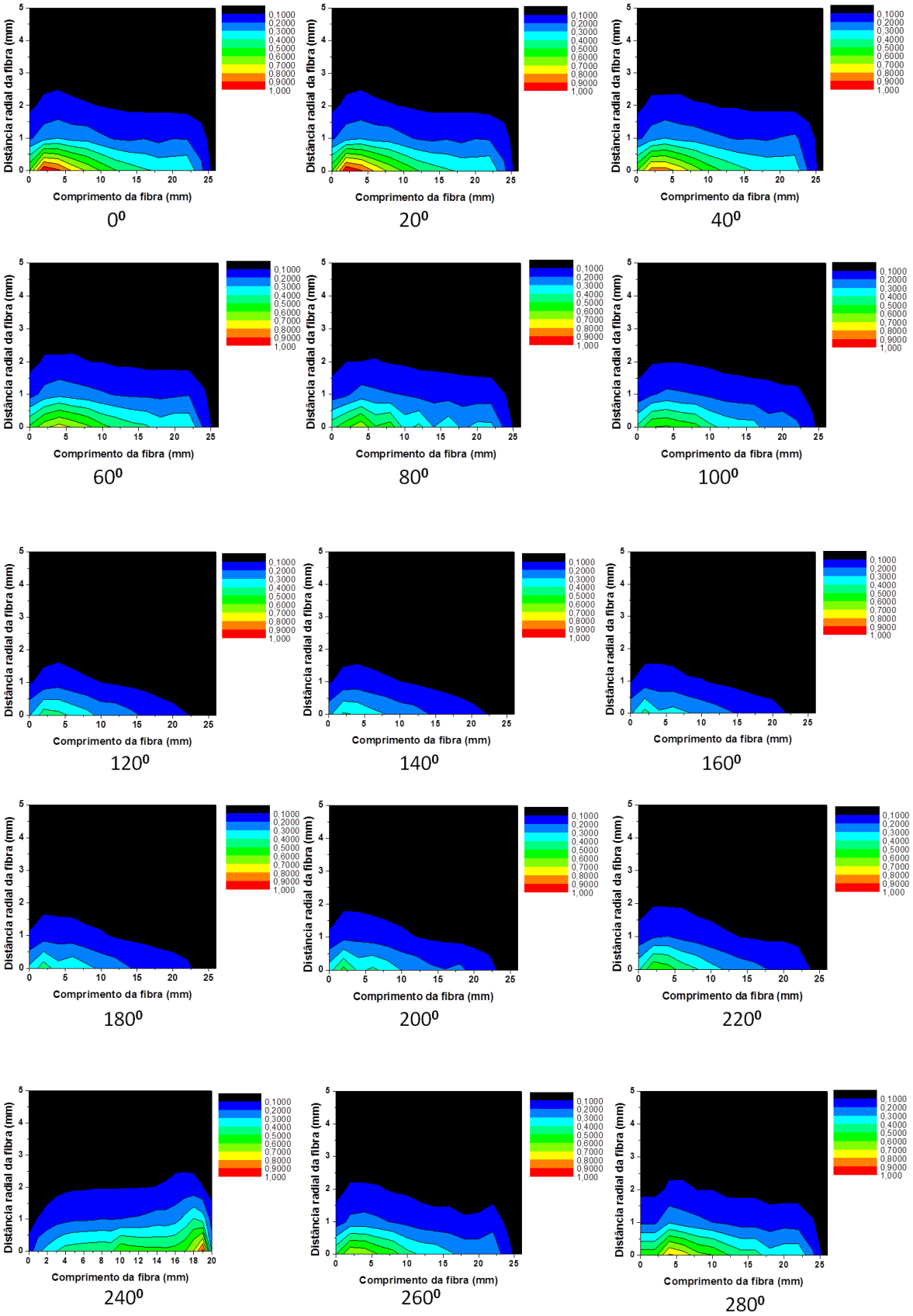


Figura 42 – Curvas de isointensidade correspondentes a cada ângulo da fibra (C) dentro do *phantom*.

Nesta fibra, novamente aumentou-se a atenuação da luz devido à absorção do nanquim[7]. Além disso, a irregularidade da região dos 3mm ficou menos acentuada em praticamente todas as posições da fibra e, uma nova irregularidade na região dos 22 mm, que antes quase nem se notava, ficou bem evidente nas posições entre 220 e 80^0.

Utilizando uma rotina no programa MatLab foi possível, também, obter figuras tridimensionais em que as isointensidades estão representadas pelo *dégradé* de cores indicadas na legenda. Analisando as fatias em diferentes posições do volume formado pelas curvas encontradas, as imagens da Figura 43 e da Figura 44 representam a fibra fora e dentro do *phantom*, respectivamente.

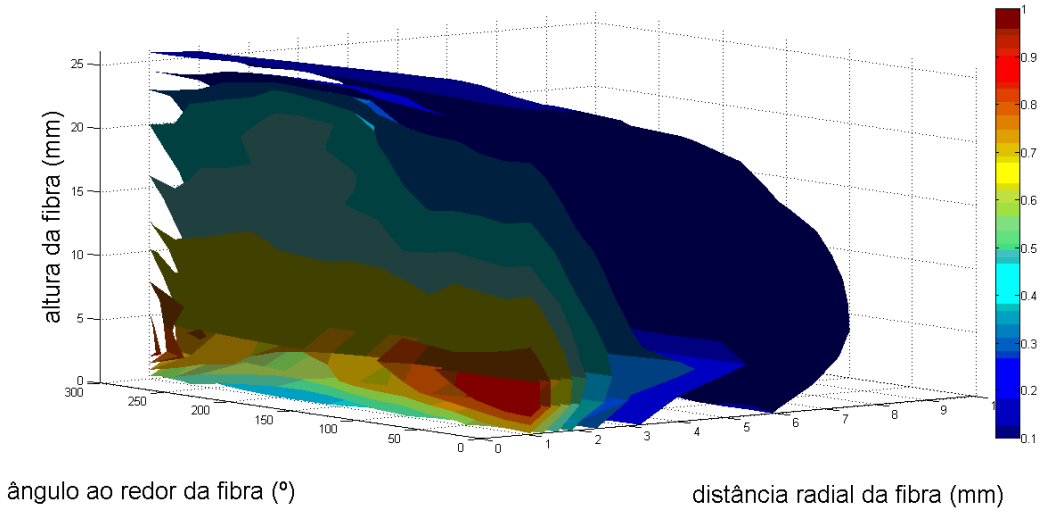


Figura 43 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (C) fora do *phantom.*

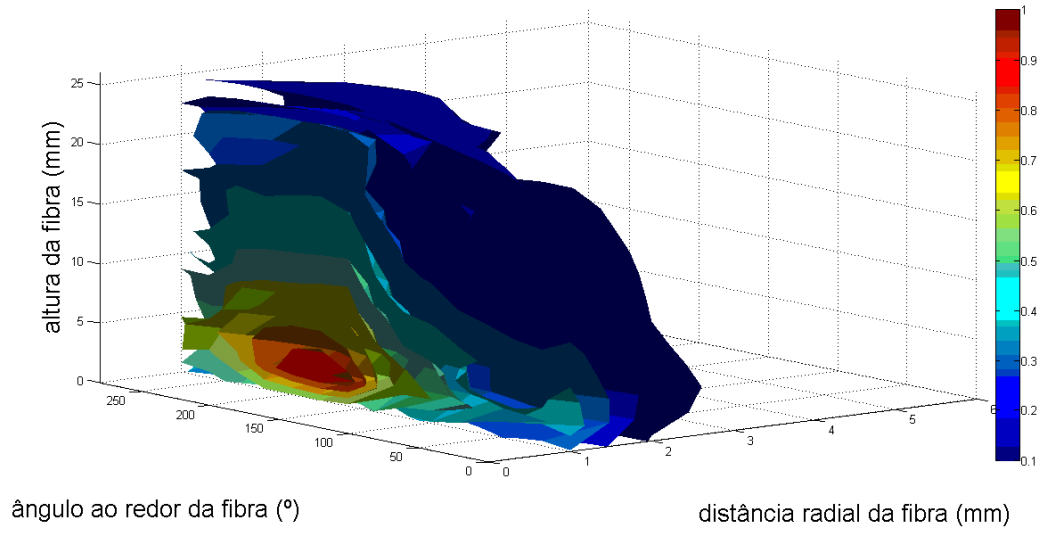


Figura 44 - Imagem tridimensional encontrada para a caracterização da fibra (C) dentro do *phantom.*

Nota-se que a fibra não possui um aspecto regular em sua emissão, mas que essa irregularidade é diminuída quando a fibra é imersa no *phantom*. Neste caso, voltou-se a verificar a redução da propagação dos campos de luz, quando a fibra é imersa no *phantom*, tendo maior atenuação da luz, ou seja, quando a fibra foi inserida no *phantom*, a luz propagou menos (aproximadamente 3 mm) comparado quando fora do *phantom* (aproximadamente 6mm).

3.2 Parte *in vivo*

Após aplicação da TFD e eutanásia dos animais, o lóbulo do fígado contendo necrose foi extraído, imerso em solução de formol tamponado por 24 horas para fixação, e fatiado como mostra a Figura 45.

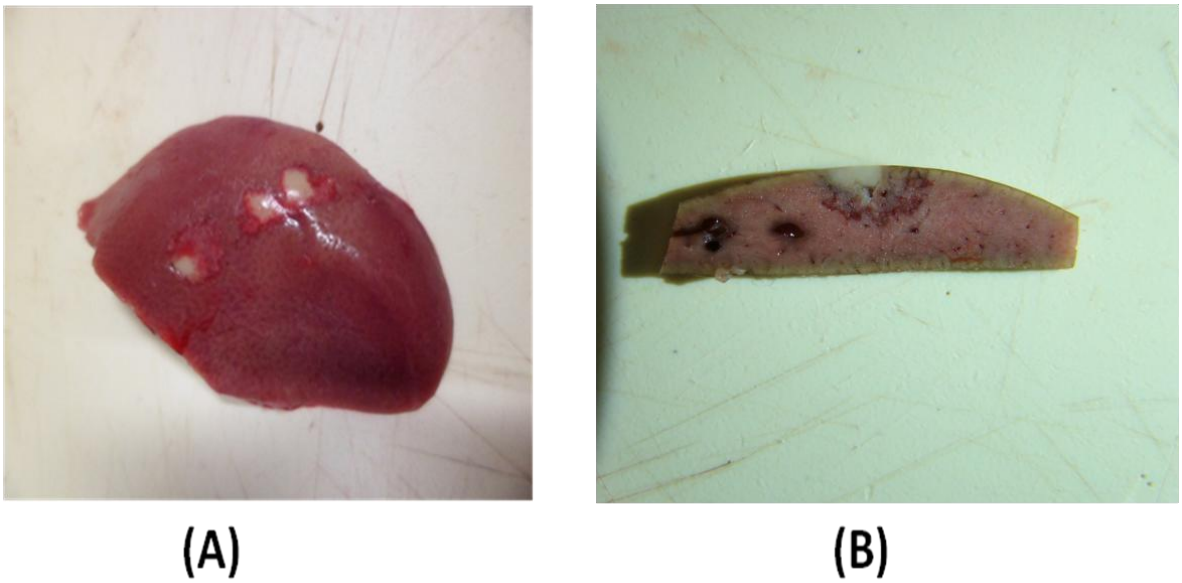


Figura 45 - (A) Fígado contendo necrose extraído do animal e (B) fatia do tecido com necrose.

O tecido foi preparado para fixação, desidratação, inclusão em parafina e seccionadas em fatias de aproximadamente 5 µm. As lâminasforam coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio óptico para a visualização das bordas das necroses. Todas as lâminas histológicas foram fotografadas nas mesmas condições: distância da câmera, ajuste de foco, iluminação e fundo da imagem.

Um dos grandes problemas encontrados nesta parte do estudo foi que, quando o difusor é inserido no tecido rompe algum vaso responsável pela irrigação de uma certa parte do lóbulo, toda a região irrigada é prejudicada, impedindo a análise da região necrosada exclusivamente pelo uso da TFD. Na Figura 46 tem-se um exemplo desta situação, pois verifica-se que onde foi inserido o difusor (marcada pelo círculo branco) obteve-se uma grande necrose em toda a região abaixo desse local.

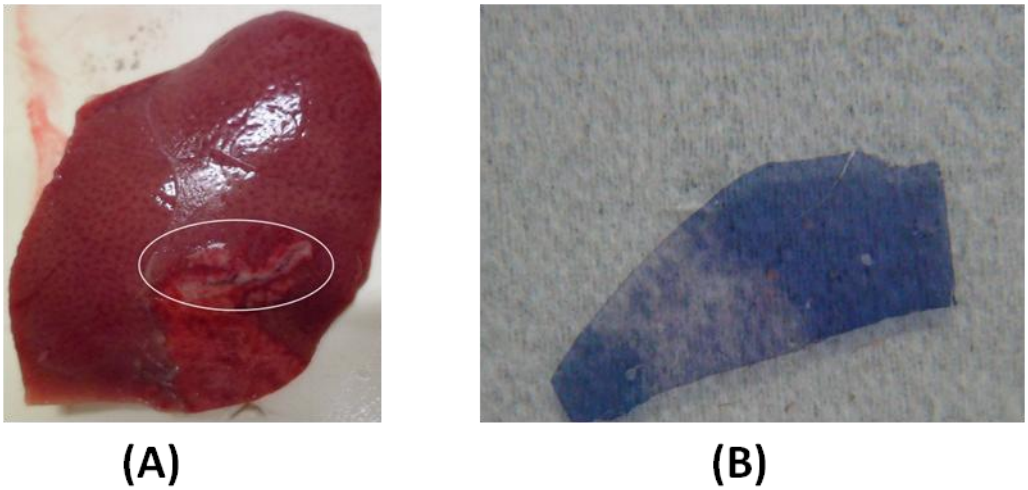


Figura 46 - (A) Extração do lóbulo do fígado tratado com TFD intersticial, o círculo em branco mostra onde foi inserida a fibra difusora e (B) um corte transversal do tecido corado com eosina e hematoxilina.

Uma rotina foi desenvolvida utilizando o Programa MATLAB® para delimitar as bordas das imagens obtidas. Essa rotina baseou-se em métodos de detecção de bordas binárias já existentes no pacote de imagens do matlab, onde primeiramente era feito a limiarização para a obtenção do parâmetro de limite para a detecção das bordas. Além disso, também, utilizando a mesma, foi possível empilhar as áreas delimitadas construindo o volume da necrose, as imagens obtidas são observadas na Figura 47, na Figura 48 e na Figura 49.

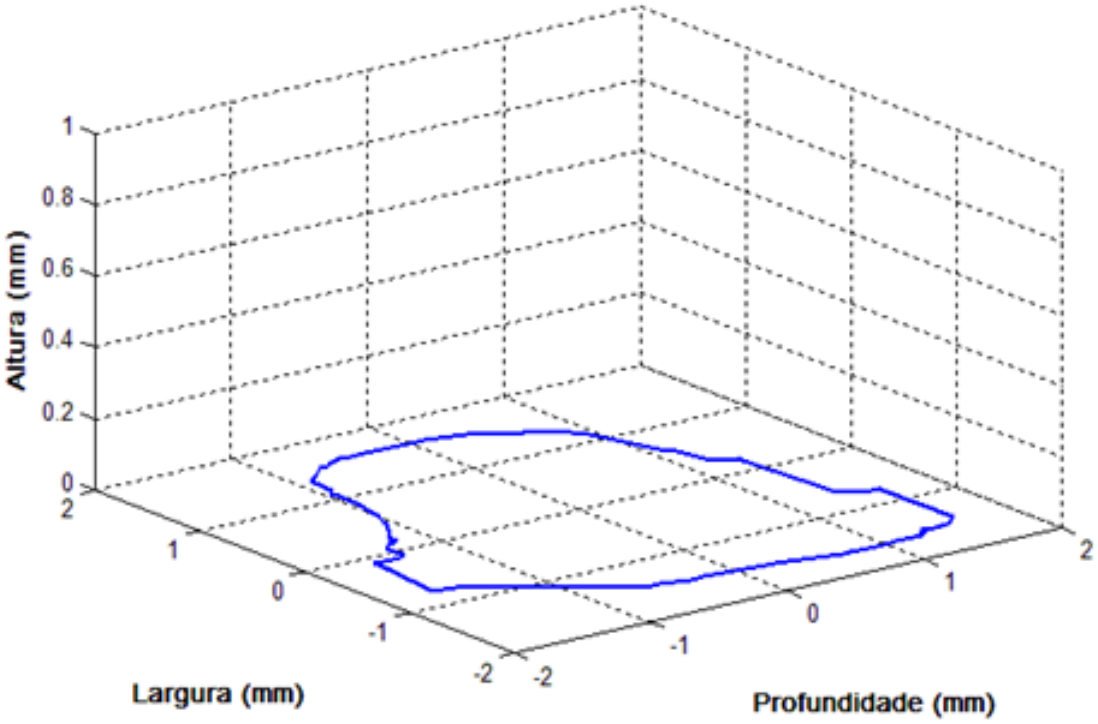


Figura 47 - Imagem do volume obtido pela necrose gerada por TFD intersticial com iluminação de um elemento difusor de 1 mm, em que os eixos correspondem distâncias em mm.

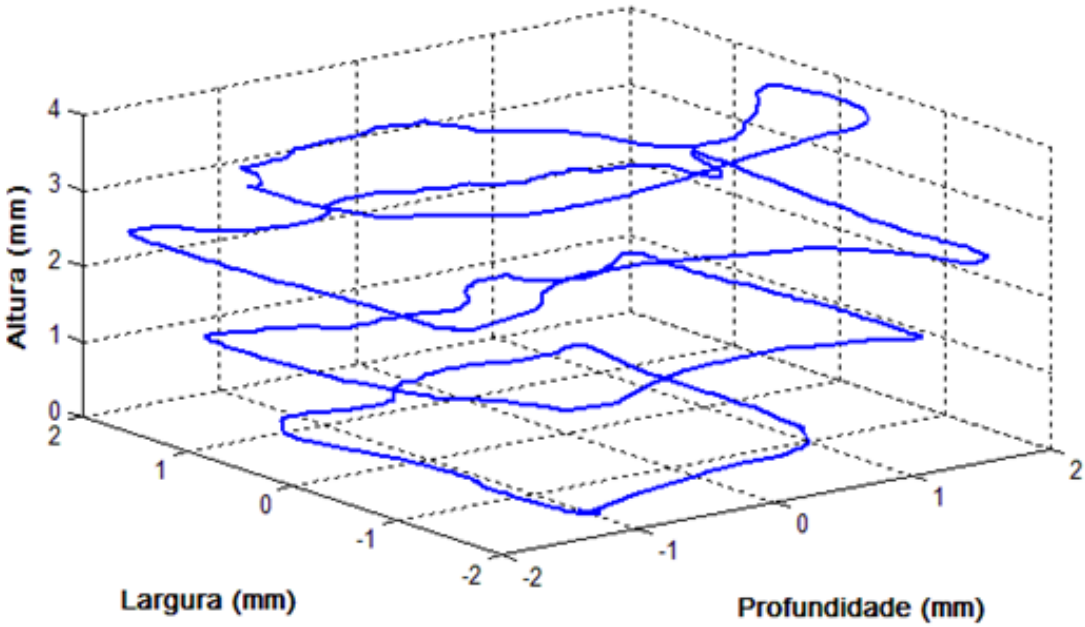


Figura 48 - Imagem do volume obtido pela necrose gerada por TFD intersticial com iluminação de um elemento difusor de 2 mm, , em que os eixos correspondem distâncias em mm.

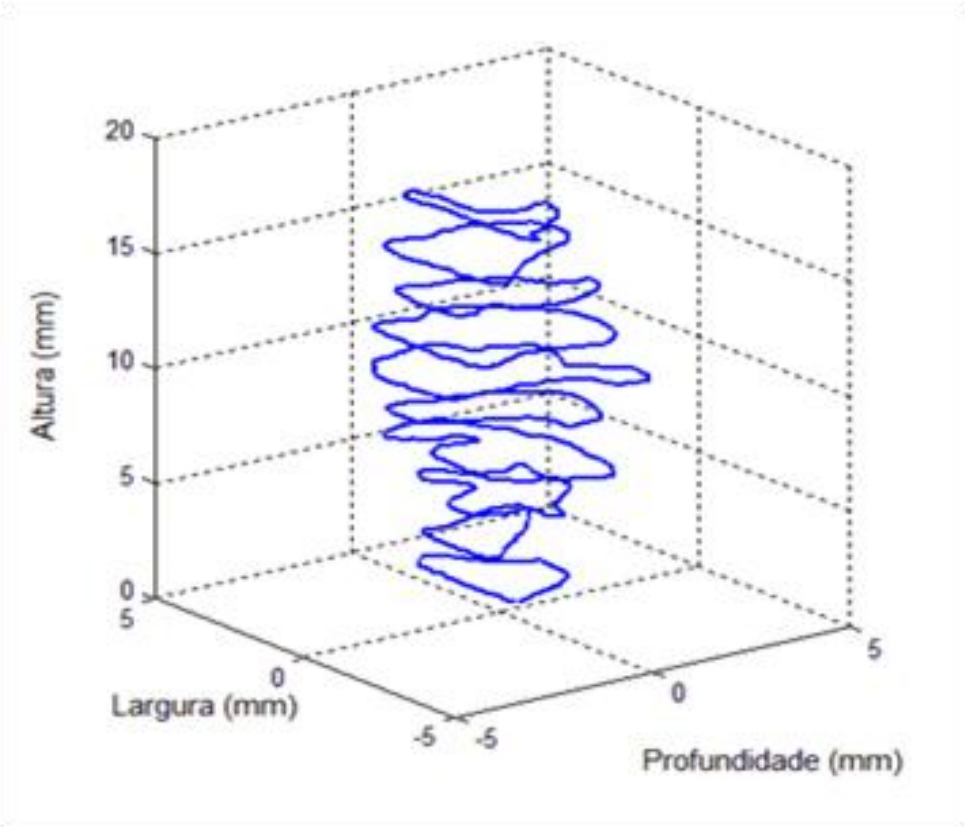


Figura 49 - Imagem do volume obtido pela necrose gerada por TFD intersticial com iluminação de um elemento difusor de 20 mm (difusor todo), em que os eixos correspondem distâncias em mm.

Na tentativa de reconstruir uma necrose gerada pela iluminação de um elemento difusor maior através da soma das necroses obtidas por difusores menores, foi realizada outra rotina utilizando o mesmo algoritmo. Nesta rotina, a fatia da Figura 47 foi transladada 19 vezes 1mm acima da anterior e então somadas as 20 necroses (1 original e 19 transladadas). As fatias da Figura 48 foram transladadas 9 vezes 2 mm acima da anterior e somadas as 10 contribuições, as áreas das fatias que coincidiram na mesma altura foram somadas angularmente. Os resultados encontram-se na Figura 50.

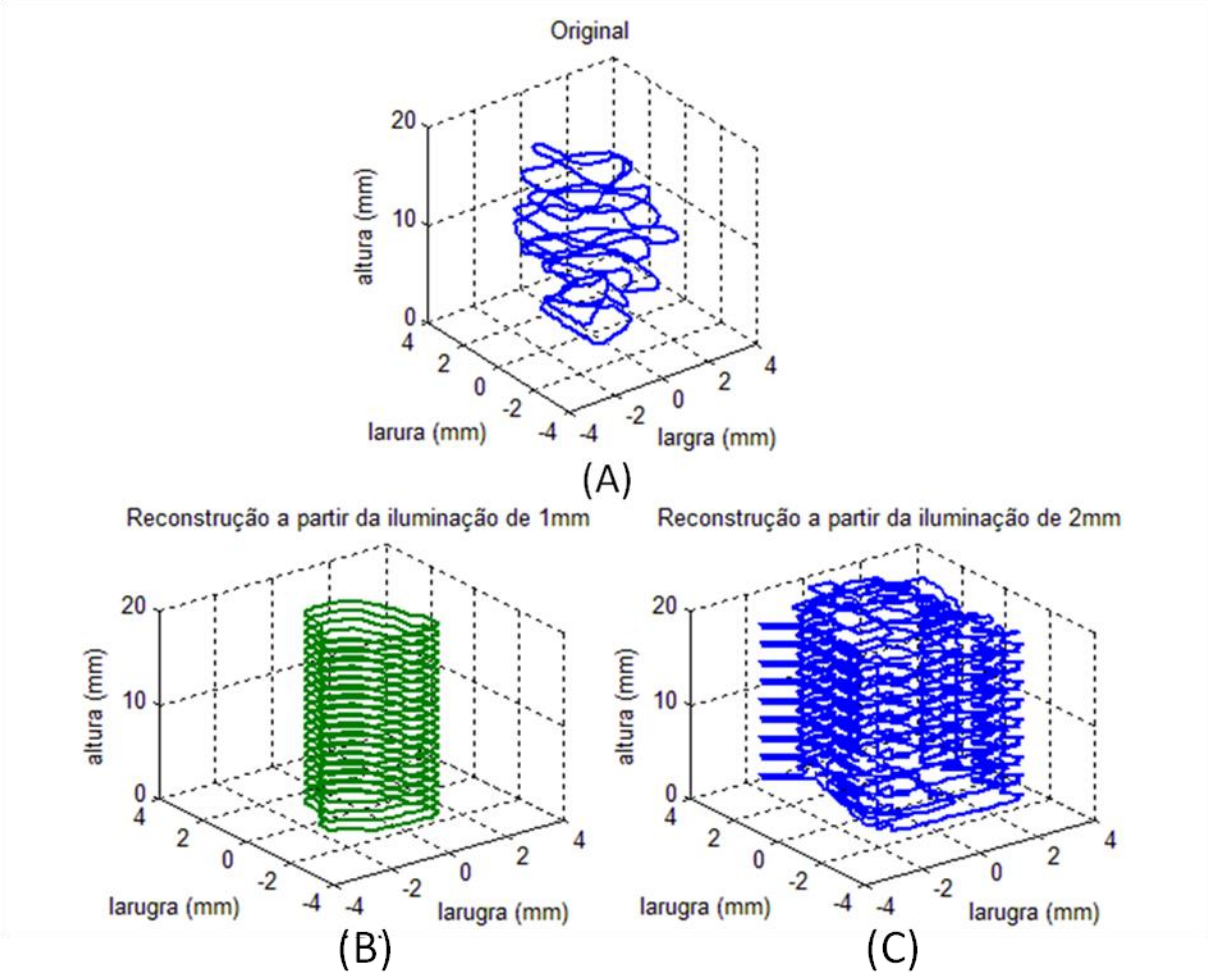


Figura 50 - (A) Necrose original obtida pela iluminação da fibra de 20mm na TFD intersticial; (B) necrose obtida pela soma de 20 necroses gerada pela iluminação do elemento difusor de 1 mm e (C) necrose obtida pela soma de 10 necroses gerada pela iluminação do elemento difusor de 2 mm, , em que os eixos correspondem distâncias em mm.

No caso em que o tecido foi iluminado por elemento difusor de 1 mm, foi obtida apenas uma fatia de necrose, ou seja, a soma dessas 20 necroses (ilustrada na parte B da Figura 50) resume-se a 20 fatias empilhadas, tornando tal resultado menos expressivo.

Já no caso em que foi iluminado por 2 mm, foram obtidas quatro fatias tendo uma soma mais consistente das necroses (parte B da Figura 50). Esta soma, porém, teve um perfil mais homogêneo do que o esperado (parte A da Figura 50), e o seu volume foi superestimado quando comparado com a necrose real. Este fato talvez deva-se a não terem sido levadas em conta as irregularidades da fibra. A fim de aperfeiçoar o resultado obtido, esta soma foi refeita considerando as intensidades máximas de cada ponto da extensão da fibra, ou seja, colocando peso a cada item somado. A soma ponderada obtida é ilustrada na Figura 51.

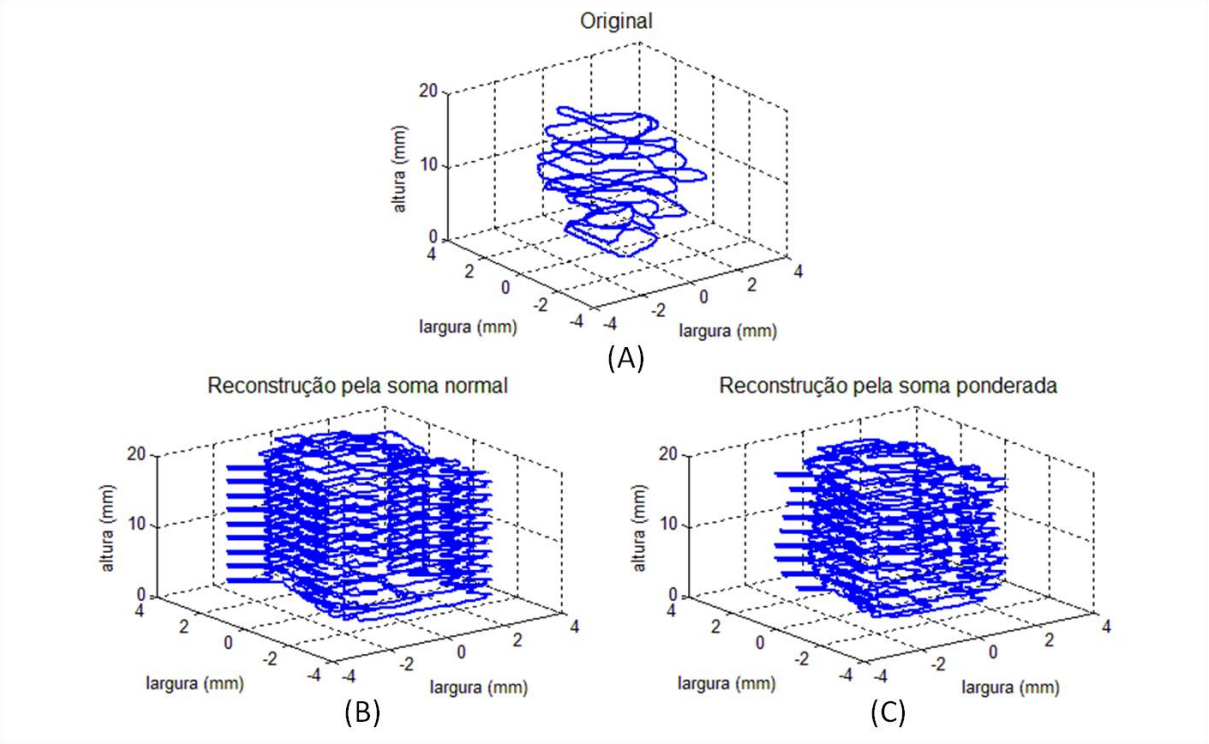


Figura 51 - (A) Necrose original obtida pela iluminação da fibra de 20 mm na TFD intersticial e (B) necrose obtida pela soma ponderada de 10 necroses gerada pela iluminação do elemento difusor de 2 mm, em que os eixos correspondem distâncias em mm.

Nesta reconstrução, observa-se que o resultado se aproxima ainda mais do real, mas a necrose reconstruída ainda continua superestimada em relação a necrose obtida pela terapia. Além disso, o seu perfil heterogêneo também não foi reconstruído, provavelmente por conta de heterogeneidades presentes no tecido – como os vasos que atravessam os lobos do mesmo e os danos promovidos ao inserir o difusor – que não puderam ser considerados, pois tais heterogeneidades variam para cada indivíduo.

Este valor superestimado na reconstrução, provavelmente deve-se ao fato de que os obstáculos à passagem da luz no tecido aumentem com um volume maior (caso da iluminação para 20 mm), se comparado com um volume menor de tecido tratado (caso da iluminação para 2 mm). Logo, as inomogeneidades presentes no tecido se tornam mais significantes que as irregularidades do perfil de emissão do difusor.

Em um estudo realizado por Ann Johansson, foi utilizado o método de elemento finito para simular uma necrose antes da iluminação intersticial e, após a terapia, notou-se que a necrose obtida, assim como estudo aqui realizado, também apresentava volume muito menor

que o teórico, pois importantes alterações do tecido como mudança no volume de sangue, desoxigenação e edema podem ter sido causados pela inserção da fibra no tecido[41].

Heterogeneidades no tecido modificam as propriedades de absorção e espalhamento, relevantes para a distribuição de luz e, assim, para a resposta da terapia[24]. Um exemplo é quando existe um vaso sanguíneo na proximidade da fibra, essa área com alta absorção, devido a presença de sangue, constitui uma região de sombra, modificando a resposta fotodinâmica. Desta forma, a eficácia do tratamento depende da distribuição da luz, que por sua vez, depende, entre outros fatores, das inomogeneidades do tecido que mudam de paciente para paciente e nem sempre são conhecidas.[42] Além disso, as irregularidades do tecido afetam na captação de FS e a distribuição de oxigênio presente no tecido, que também podem resultar em diferentes quantidades de necrose.[24, 42 - 43]

Portanto, para se obter sucesso na resposta da TFD é necessário que a dose de luz depositada no tecido seja muito maior que a prevista, pois as propriedades ópticas do tumor nem sempre são conhecidas. Assim, uma grande dose deve ser entregada para que, seguramente, as irregularidades da iluminação possam ser supridas, otimizando parâmetros como tempo de iluminação, posição da fibra no tecido e potencia da fonte de luz.[24, 44]

Visto as dificuldades em prever a propagação da luz no tecido antes da inserção da fibra no mesmo, devido as grandes heterogeneidades do tecido, uma possível solução seria a técnica clínica elaborada por Marcelo Soto Thompson. Nesta, são inseridas várias fibra no tecido canceroso, em cada ponto é inserida uma fibra capaz de emitir e coletar a luz. Então, uma fibra ilumina enquanto as demais coletam os fótons que atingem seu detector, uma de cada vez. Desta forma, têm-se a distribuição da luz em vários pontos do tecido para cada fibra de iluminação.[45]

4 Conclusões

Com os experimentos realizados foi possível observar que se pode reconstruir a iluminação de um difusor através da soma de elementos difusores menores, empregando medidas em *phantom* (*in vitro*).

Nos testes *in vitro*, constatou-se que é possível reconstruir o campo de luz emitido por um elemento difusor de 2 mm através da soma de dois elementos difusores de 1 mm, além de que pode-se reconstruir o campo de luz emitido por um difusor de 20 mm a partir da soma de 20 elementos difusores de 1 mm. Embora os resultados divirjam um pouco do esperado por conta da irregularidade da emissão da fibra (constatada pela caracterização da mesma), estes também são bastante satisfatórios se considerada as regiões mais afastadas do difusor.

Nos testes *in vivo*, verificou-se que a necrose induzida por TFD, gerada pela iluminação de todo o difusor 20 mm, é passível de ser reconstruída a partir da soma de 10 elementos de iluminação de 2 mm. O resultado obtido assemelha-se bastante com o esperado, ao considerar que o raio da lesão perpendicular ao eixo longitudinal do difusor é de cerca de 2 mm em ambos os casos. No entanto, a irregularidade da lesão não permitiu uma reconstituição completa de seu perfil pois, embora tenha sido considerado o padrão irregular de emissão da fibra através de uma soma ponderada dos elementos, as heterogeneidades do tecido não puderam ser levadas em conta, já que tais características variam para cada animal.

Este estudo, portanto, apresenta a possibilidade de reconstituir fontes de luz extensas a partir de porções caracterizadas destas mesmas fontes. Os avanços deste tipo de investigação são valiosos, dado que há pouco neste sentido descrito na literatura a partir de medidas empíricas. A ideia proposta neste estudo pode mostrar-se viável para estimativas de propagação de luz utilizando fibras difusoras em meios túrbidos, e o desenvolvimento de técnicas para estimar e reproduzir os perfis de iluminação apresentam grande potencial para aperfeiçoar as técnicas de fototerapia, que dependem crucialmente da distribuição adequada da luz nos tecidos tratados.

REFERÊNCIAS

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

2 GROSSWEINER, L. I. PDT light dosimetry revisited. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*-biology, v. 38, n. 2-3, p. 258-268, 1997.

3 MIYAKAWA, W. *Laser de CuHBr em tecido dentais duros*. 2004. 108 p. Tese (Doutorado em tecnologia nuclear - materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo 2004.

4 NIEMZ, M. H. *Laser-tissue interactions*. Berlin: Springer, c2007.

5 FLOCK, S. T.; JACQUES, S. L.; WILSON, B. C.; STAR, W. M.; VANGEMERT, M. J. C. Optical-properties of intralipid - a phantom medium for light-propagation studies. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 12, n. 5, p. 510-519, 1992.

6 MOES, C. J. M.; VANGEMERT, M. J. C.; STAR, W. M.; MARIJNISSEN, J. P. A.; PRAHL, S. A. Measurements and calculations of the energy fluence rate in a scattering and absorbing phantom at 633 Nm. *Applied Optics*, v. 28, n. 12, p. 2292-2296, 1989.

7 RIPLEY, P. M.;MILLS, T. N.;BROOKES, J. A. S. Measurement of the emission profiles of cylindrical light diffusers using a video technique. *Lasers in Medical Science*, v. 14, n. 1, p. 67-72, 1999.

8 CHEONG, W. F.; PRAHL, S. A.; WELCH, A. J. A review of the optical-properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v. 26, n. 12, p. 2166-2185, 1990.

9 HENDERSON, B. W.; GOOLNICK, S. O. Mechanistic principles of photodynamic therapy. In: VO-DINH, T. (Ed.). *Biomedical photonics.* Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 978-1004.

10 GOMES, R. F. S. *Optimização da focagem de feixes de laser em tecidos biológicos:* desenvolvimento de um simulador óptico. 2011. p. 57. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Departamento de Física, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

11 MOBLEY, J.; VO-DINH, T. Optical properties of tissue. In: VO-DINH, T. (Ed.). *Biomedical photonics*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 42-116.

12 HAHN, D. W. *Light scattering theory*. 2009. Disponível em: <http://plaza.ufl.edu/dwhahn/Rayleigh%20and%20Mie%20Light%20Scattering.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2012.

13 SMALL, W.;BUCKLEY, P. R.; WILSON, T. S.; LOGE, J. M.; MAITLAND, K. D.; MAITLAND, D. J. Fabrication and characterization of cylindrical light diffusers comprised of shape memory polymer. *Journal of Biomedical Optics*, v. 13, n. 2. 10.1117/1.2904952, 2008.

14 MACHADO, A. E. H. *Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas*. *Química Nova*, v.23, n. 2, p. 237-243, 1999.

15 BAGNATO, V. S. *Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde*. São Paulo: Livraria da Física, 2008.

16 PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

17 ARNFIELD, M. R.; TULIP, J.; CHETNER, M.; MCPHEE, M. S. *Optical dosimetry for interstitial photodynamic therapy. Medical Physics*, v. 16, n. 4, p. 602-608, 1989.

18 MURRER, L. H. P.; MARIJNISSEN, J. P. A.; STAR, W. M. Ex-vivo light dosimetry and Monte-Carlo simulations for endobronchial photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, v. 40, n. 11, p. 1807-1817, 1995.

19 AMDUR, R. J.; O'HARA, J.; LAUGHLIN, J.; CLOUGH, S.; MCCLEAN, A.; HOOPES, P. J.; OSTERBERG, U. Tissue dosimetry of 632 nm light delivered through brachytherapy needles. *Radiation Oncology Investigations*, v. 4, n. 6, p. 281-286, 1996.

20 CHANG, S. C.; BUONACCORSI, G. A.; MACROBERT, A. J.; BOWN, S. G. Interstitial photodynamic therapy in the canine prostate with disulfonated aluminum phthalocyanine and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Prostate*, v. 32, n. 2, p. 89-98, 1997.

21 HILLEGERSBERG, R. V.; MARIJNISSEN, J. P. A.; KORT, W. J.; ZONDERVAN, P. E.; TERPSTRA, O. T. Interstitial photodynamic therapy in a rat liver metastasis model. *British Journal of Cancer*, v. 66, n. 6, p. 1005-1014, 1992.

22 LOWDELL, C. P.; ASH, D. V.; DRIVER, I.; BROWN, S. B. Interstitial photodynamic therapy - clinical-experience with diffusing fibers in the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors. *British Journal of Cancer*, v. 67, n. 6, p. 1398-1403, 1993.

23 MARTIN, N. E.; HAHN, S. M. Interstitial photodynamic therapy for prostate cancer: a developing modality. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 2, p. 123-136, 2004.

24 SVANBERG, K.; BENDSOE, N.; AXELSSON, J. ;ANDERSSON-ENGELS, S.; SVANBERG, S. Photodynamic therapy: superficial and interstitial illumination. *Journal of Biomedical Optics*, v. 15, n. 4. 10.1117/1.3466579, 2010.

25 MELO, C. A. S.; LIMA, A. L. L. A.; BRASIL, I. R. C.; SILVA, O. C. E.; MAGALHAES, D. V.; MARCASSA, L. G.; BAGNATO, V. S. Characterization of light penetration in rat tissues. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 19, n. 4, p. 175-179, 2001.

26 WILSON, B. C.; JACQUES, S. L. Optical reflectance and transmittance of tissues - principles and applications. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v. 26, n. 12, p. 2186-2199, 1990.

27 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, v. 31, n. 4, p. 327-360, 1986.

28 HOURDAKIS, C. J.; PERRIS, A. A Monte-Carlo estimation of tissue optical-properties for use in laser dosimetry. *Physics in Medicine and Biology*, v. 40, n. 3, p. 351-364, 1995.

29 ZHU, T. C.; FINLAY, J. C.; HAHN, S. M. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*-biology, v. 79, n. 3, p. 231-241, 2005.

30 ARNFIELD, M. R.; MATHEW, R. P.; TULIP, J.; MCPHEE, M. S. Analysis of tissue optical coefficients using an approximate equation valid for comparable absorption and scattering. *Physics in Medicine and Biology*, v. 37, n. 6, p. 1219-1230, 1992.

31 WILSON, B. C.; MULLER, P. J.; YANCH, J. C. Instrumentation and light dosimetry for intraoperative photodynamic therapy (PDT) of malignant brain-tumors. *Physics in Medicine and Biology*, v. 31, n. 2, p. 125-133, 1986.

32 STAR, W. M. Light dosimetry in vivo. *Physics in Medicine and Biology*, v. 42, n. 5, p. 763-787, 1997.

33 JOHANSSON, A.; AXELSSON, J.; ANDERSSON-ENGELS, S.; SWARTLING, J. Realtime light dosimetry software tools for interstitial photodynamic therapy of the human prostate. *Medical Physics*, v. 34, n. 11, p. 4309-4321, 2007.

34 ULLAH, H.; ATIF, M.; FIRDOUS, S.; MEHMOOD, M. S.; IKRAM, M.; KURACHI, C.; GRECCO, C.; NICOLODELLI, G.; BAGNATO, V. S. Femtosecond light distribution at skin and liver of rats: analysis for use in optical diagnostics. *Laser Physics Letters*, v. 7, n. 12, p. 889-898, 2010.

35 HASSELGREN, L.; GALT, S.; HARD, S. Diffusive optical fiber ends for photodynamic therapy - manufacture and analysis. *Applied Optics*, v. 29, n. 30, p. 4481-4488, 1990.

36 MURRER, L. H. P.; MARIJNISSEN, J. P. A.; STAR, W. M. Light distribution by linear diffusing sources for photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, v. 41, n. 6, p. 951-961, 1996.

37 KEPSHIRE, D.; DAVIS, S. C.; DEHGHANI, H.; PAULSEN, K. D.; POGUE, B. W. Fluorescence tomography characterization for sub-surface imaging with protoporphyrin IX. *Optics Express*, v. 16, n. 12, p. 8581-8593, 2008.

38 CAMPOS DE MENDES, P. F. *Estudos espectroscópicos e citotóxicos do photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser*. 2006. p 157. 21-22. Tese(Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

39 VOLLET-FILHO, J. D.; MENEZES, P. F. C.; MORIYAMA, L. T.; GRECCO, C.; SIBATA, C.; ALLISON, R. R.; CASTRO E SILVA, O. J.; BAGNATO, V. S. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. *Journal of Applied Physics*, v. 105, n. 10, p., 2009.

40 BASHKATOV, A. N.; GENINA, E. A.; KOCHUBEY, V. I.; TUCHIN, V. V. Effects of scattering particles concentration on light propagation through turbid media. *Optical Biopsy Iii*, v. 1, n. 11, p. 256-263, 2000.

41 JOHANSSON, A. B., N.; SVANBERG, K.; SVANBERG, S.; ANDERSON-ENGELS, S. Influence of treatment-induced changes in tissue absorption on treatment volume during intertitial photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, v. 21, n. 4, p. 261-270, 2006.

42 KOZODOY, R. L.; LUNDAHL, S. L.; BELL, D.; HARRINGTON, J. A. 3-Dimensional characterization of the light-distribution from diffusing cylindrical optical-fiber tips. *Applied Optics*, v. 33, n. 28, p. 6674-6682, 1994.

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

44 POTTER, W. R.; WOOD, L.; PURCELL, E. Factors effecting the light-distribution of cylindrical diffusers. *Proceedings of Optical Fibers in Medicine V*, v. 1201, p. 292-297. 10.1117/12.17548, 1990.

45 THOMPSON, M. S.; JOHANSSON, A.; JOHANSSON, T.; ANDERSSON-ENGELS, S.; SVANBERG, S.; BENDSOE, N.; SVANBERG, K. Clinical system for interstitial photodynamic therapy with combined on-line dosimetry measurements. *Applied Optics*, v. 44, n. 19, p. 4023-4031, 2005.

Apêndice A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

nº 009/2012

Protocolo nº. 004/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "Análise da distribuição de luz em tecidos biológicos através da necrose intersticial produzida por TFD" submetido pela pesquisadora *Mirian Denise Stringasci.*

São Carlos, 20 de abril de 2012.

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais