

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Estudo histomorfométrico da necrose em tecido hepático de ratos: Terapia Fotodinâmica combinada com ablação a *laser* e Terapia Fotodinâmica com o fotossensibilizador Luzitin[®].

RAQUEL FERREIRA REGO

São Carlos - SP

2012

RAQUEL FERREIRA REGO

Estudo histomorfométrico da necrose em tecido hepático de ratos: Terapia Fotodinâmica combinada com ablação a *laser* e Terapia Fotodinâmica com o fotossensibilizador Luzitin[®].

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientadores: Prof. Dr. Fernando Manuel Araujo-Moreira
Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**

São Carlos - SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R343eh

Rego, Raquel Ferreira.

Estudo histomorfométrico da necrose em tecido hepático de ratos : terapia fotodinâmica combinada com ablação a *laser* e terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador Luzitin[®] / Raquel Ferreira Rego. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

102 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Ablação a laser. 3. Luzitin[®]. 4. Necrose. 5. Histomorfometria. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Raquel Ferreira Rego

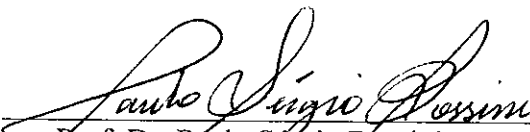
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 08/11/2012

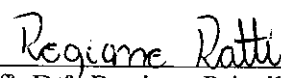
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira (DF/UFSCar)




Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini (UNIFESP)



Prof^ª. Dr^ª. Regiane Priscila Ratti (USP)



Prof^ª. Dr^ª. Carla Raquel Fontana (UNESP)



Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Rastelli (UNESP)

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese

À minha filha *Rayssa Ferreira Faria*,

Por ter sido o melhor presente que recebi de Deus e por ter trazido mais força, motivação e determinação para que eu pudesse concluir essa tese.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo-Moreira e Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, pelo exemplo e pelos ensinamentos passados.

Ao meu orientador de Coimbra, Prof. Dr. Luís Arnaut, por ter me recebido de portas abertas e por ter acreditado no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvério Cabrita por ter cedido o espaço e os animais para realização do trabalho.

À Prof. Dra. Mariete Pereira por fornecer o fotossensibilizador Luzitin[®].

A todos os colegas do laboratório de Biofotônica, especialmente o Didi, Boto, Gustavo e Carla, que se mostraram verdadeiros amigos.

Aos colegas de Coimbra, Fabio, Gonçalo, Elsea, Janusz, Pedro e Tiago que me auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

À Larissa Marilla e à Dna Margarida, por dedicarem parte de seu precioso tempo na confecção das lâminas histológicas.

Aos colegas do PPGBiotech pela companhia agradável neste período.

À Cláudia, secretária do PPGBiotech por todos os serviços prestados com grande eficiência.

Às meninas que moraram comigo, Valéria Ghislotti Yared e Natália Cerântola por terem sido sempre grandes amigas.

À CAPES, CNPq e ao Programa Erasmus Mundus - ISAC pelo apoio financeiro.

Especialmente, à minha mãe, irmãos, marido e filha por apostarem em mim e pelo apoio, dedicação e amor incondicionais.

E, principalmente, a Deus por todas as oportunidades que me proporcionou e por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas no meu caminho.

EPIGRAFE

"É impossível avaliar a força que possuímos, sem medir o tamanho do obstáculo que podemos vencer; nem o valor de uma ação, sem sabermos o sacrifício que ela comporta."

H. W. Beecher

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica conhecida por sua limitada aplicação em tumores volumosos, devido a sua restrita penetração. Portanto, a TFD com o fotossensibilizador (FS) Luzitin[®], bem como a combinação da TFD com a cirurgia a laser possuem potencial destrutivo para tumores volumosos. Assim, com o intuito de propor um protocolo de tratamento minimamente invasivo envolvendo a TFD para aplicação em tumores volumosos, o presente estudo analisou histomorfometricamente a necrose resultante tanto da combinação de lasers ablativos com a TFD, quanto da TFD com o fotossensibilizador Luzitin[®] (uma bacterioclorina sintética com maior potencial para penetração nos tecidos biológicos) em fígados de ratos saudáveis. No primeiro estudo, 87 animais foram divididos em 2 grupos: grupo laser de CO₂ e grupo laser de Diodo. Cada um desses grupos foram subdivididos em 6 subgrupos: 1) subgrupo ablação a laser, 2) subgrupo fotossensibilização seguida de ablação a laser, 3) subgrupo TFD, 4) subgrupo fotossensibilização e luz seguido pela ablação a laser, 5) subgrupo laser seguido de fotossensibilização e luz, e 6) subgrupo fotossensibilização seguida da ablação a laser e luz. Para cada subgrupo, três condições de fotossensibilização foram utilizadas: ácido 5-aminolevulínico (ALA) tópico, ALA endovenoso e Photogem[®] endovenoso. Trinta horas após o tratamento, os animais foram eutanasiados e os fígados removidos para estudo histológico e morfométrico da necrose. Os resultados mostram que os efeitos do tratamento com TFD foram consideravelmente melhorados quando combinada com a ablação a laser. Para o grupo laser de CO₂, a profundidade de necrose média obtida mostrou uma mínima diferença entre as condições estudadas para o grupo fotossensibilizado com o Photogem[®] e um aumento da profundidade de necrose após os procedimentos combinados em comparação com as técnicas isoladas para os subgrupos fotossensibilizados com o ALA, especialmente quando o tratamento com a TFD foi realizado antes da ablação pelo laser de CO₂. No grupo laser de Diodo, os subgrupos com melhor desempenho foram aqueles em que a ablação foi realizada antes da TFD para os fotossensibilizadores intravenosos e o subgrupo fotossensibilizado com ALA tópico, ablacionado e iluminado. A partir desses resultados, sugere-se que a TFD e a ablação a laser podem atuar de forma sinérgica no tratamento de tumores volumosos. No segundo estudo, dezesseis ratos machos normais foram randomicamente divididos

em 4 grupos, com 4 animais cada. Inicialmente foi realizada a fotossensibilização por meio da administração intravenosa de 2mg/kg ou 2,6mg/kg da droga e após 12 horas, uma área de 1cm² na região abdominal direita correspondente ao fígado foi irradiada durante 22 minutos e 13 segundos ou 16 minutos e 40 segundos. Os grupos estão descritos a seguir: 1) grupo controle: fotossensibilizado com 2mg/kg, porém não tratado; 2) grupo tratado 1: irradiado com intensidade de 100J/cm² após 12hs da fotossensibilização com 2mg/kg; 3) grupo tratado 2: irradiado com intensidade de 70J/cm² e fotossensibilizados com 2mg/kg de Luzitin[®], 4) grupo tratado 3: fotossensibilizado com 2,6mg/kg da droga e irradiado com intensidade de 70J/cm². Os animais foram eutanasiados após 30 horas da irradiação, exceto o grupo controle, que foram aguardadas 42hs após a administração do composto. Os fígados dos animais foram removidos e preparados para a análise histológica. Além disso, foram observados aspectos macroscópicos do fígado. A análise dos resultados mostrou uma necrose significativamente mais extensa e com maior grau de severidade para o grupo tratado 1. Com base nos dados observados, sugere-se que, dentre as condições estudadas, a dose mais adequada para o tratamento com TFD do tecido fotossensibilizado com Luzitin[®] seja de 100J/cm² e que uma redução de 30% desse valor provoca um decaimento na resposta da TFD, mesmo com aumento proporcional da concentração da droga no organismo.

Palavras-chave: TFD, ablação a laser, ALA, Photogem[®], Luzitin[®], necrose, histomorfometria.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is known to be limited to applications in large volume tumours due to its limited penetration. Therefore, the PDT with the Luzitin[®] photosensitizer as well as a combination of PDT and laser surgery may constitute a potential to destroy bulk tumors. Thus, with the aim of proposing a minimally invasive treatment protocol involving the application of PDT for large tumors, the present study analyzed histomorphometrically necrosis resulting from both a combination of a laser ablation with PDT as PDT with the photosensitizer Luzitin[®] (a bacteriochlorin synthetic with greater potential for penetration into biological tissue) in livers of healthy rats. In the first study, 87 animals were divided into 2 groups: CO₂ laser and diode laser. Each of these groups were subdivided into six subgroups: 1) only laser ablation, 2) administered the PS and ablated with laser, 3) only PDT (drug and light), 4) drug and light (PDT) followed by laser ablation, 5)) laser ablation followed by a PDT and 6) drug, followed by laser ablation and light. For each subgroup, three types of photosensitization were used: topical 5- aminolevulinic acid (ALA), intravenous ALA and intravenous Photogem[®]. Thirty hours after the different treatments, the animals were sacrificed and the livers removed for the histological and morphometric study of necrosis. The results showed that the effects of treatment were considerably improved when PDT was used in combination with laser ablation. For the group CO₂ laser, the average depth of necrosis obtained showed a minimum difference between the studied conditions for the group photosensitized Photogem[®] and with an increased depth of necrosis after the combined procedures in comparison with the isolated techniques for the subgroups photosensitized with ALA, especially treatment with PDT was performed before ablation by CO₂ laser. In the diode laser group, subgroups with better performance were those in which the ablation was performed before PDT using intravenous photosensitizers and ALA topic. From these results, it is suggested that PDT and laser ablation can synergistically in the treatment of large tumors. In the second study, sixteen normal male rats were randomly divided into 4 groups with 4 animals each. Initially, all groups were intravenously photosensitized with 2 mg/kg or 2.6 mg/kg of the drug and after 12 hours, a 1cm² of area, in the right abdominal region, corresponding to the liver, was irradiated during 22 minutes and 13 seconds or 16

minutes and 40 seconds. Groups are described following: 1) control group: photosensitized with 2mg/kg, but untreated, 2) treated group 1: irradiated with light dose of 100J/cm² after photosensitization with 2mg/kg of 12hs and 3) treated group 2: irradiated with light dose of 70J/cm² and photosensitized with 2mg/kg of Luzitin[®], 4) treated group 3: photosensitized with 2.6 mg/kg of the drug and irradiated with light dose of 70J/cm². Animals were sacrificed 30 hours after irradiation, except the control group, which were sacrificed 42hs after drug administration. Livers were removed and prepared for histological analysis. Moreover, macroscopic aspects of liver were observed. Results showed significantly more extensive necrosis and greater severity in treated group 1. Data suggested that, among the conditions studied, light dose suitable for PDT treatment of photosensitized tissue by Luzitin[®] is 100J/cm² and that 30% of reduction in this value produces decay in PDT response, even with proportional increase of drug concentration in the organism.

Key words: PDT, Laser ablation, ALA, Photogem[®], Luzitin[®], necrosis, morphohistometry.

Lista de Figuras

Figura 1: As etapas da carcinogênese [12].....	19
Figura 2: Crescimento de um tumor maligno primário [12].	20
Figura 3: Efeito da irradiação da luz no FS dentro das células [26].....	24
Figura 4: Espectro de absorção óptica dos HpD [31].	26
Figura 5: Estruturas Químicas do ALA (A) e do Photogem® (B) [32].....	26
Figura 6: Estrutura do macrociclo de uma bacterioclorina.....	29
Figura 7: Espectro de Absorção das bacterioclorinas sintéticas [68].....	30
Figura 8: Espectro de absorção do Luzitin [70].	30
Figura 9: Alojamento dos animais montado no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica no IFSC – USP/São Carlos.	38
Figura 10: Iluminação do fígado de um animal fotossensibilizado mostrando a delimitação da área iluminada com uma máscara de papel alumínio envolto por gaze com um orifício de 1.0 x 1.0 cm.....	41
Figura 11: Em a, observa-se a imagem do equipamento laser de CO ₂ e em b, tem-se a imagem do laser de CO ₂ acoplado ao sistema de varredura x-y.	42
Figura 12: Imagens do animal sendo submetido à ablação com o laser de Diodo de 810nm. Em a, observa-se o equipamento laser acoplado ao translador x-y e em b, o detalhe da fibra realizando a varredura no fígado do animal.	43
Figura 13: Esquema representativo de uma lâmina histológica demonstrando a maneira na qual foram obtidas as medidas da profundidade de necrose do fígado.	45
Figura 14: Esquema da lâmina histologia com um corte de tecido hepático mostrando como foram realizadas as medidas da flutuação da necrose. Em rosa está representada a região necrosada e em roxo a região de tecido normal. As distâncias F2 são a profundidade de necrose e F1 as distâncias das oscilações da necrose real até a linha imaginária.....	46
Figura 15: Imagem dos fígados dos animais fotossensibilizados com ALA intravenoso após os tratamentos isolados e combinados. Em a, o fígado fotossensibilizado foi ablacionado com laser de CO ₂ , em b, o fígado foi tratado com TFD e em c, o fígado foi tratado com as técnicas combinadas (TFD com ALA i.v. + ablação a laser).	47
Figura 16: Imagens dos fígados dos animais fotossensibilizados com ALA tópico e vistas através do equipamento Vel Scope®. Em a, observa-se o tecido fotossensibilizado, em b, o tecido fotossensibilizado e ablacionado com o laser, e em c, os cortes transversais do fígado mostrando sua profundidade após a ablação a laser.	48
Figura 17: Imagens dos fígados dos animais fotossensibilizados com ALA i.v. iluminadas com luz UV no equipamento Vel Scope®. Em a, observa-se o tecido fotossensibilizado, na em b, o tecido fotossensibilizado e ablacionado com o laser, e em c, os cortes transversais do fígado mostrando sua profundidade após a ablação a laser.	48
Figura 18: Imagens vistas no Vel scope do fígado de um animal fotossensibilizado com Photogem® (figura 18a), fígado fotossensibilizado com Photogem® e ablacionado com laser de CO ₂ (figura 18b) e cortes transversais do fígado fotossensibilizado com Photogem® ablacionado com laser de CO ₂ (figura 18c).....	49
Figura 19: Gráfico com as médias de profundidade de necrose obtidas para cada subgrupo tratado com as técnicas de ablação com o laser de CO ₂ , TFD ou ambas associadas.....	50

Figura 20: Gráfico com os valores de porcentagem de flutuação da necrose.....	52
Figura 21: Fotomicrografia da visão geral do parênquima hepático mostrando a direita margem com lesão necrótica e edema, contendo ilhas de hemorragia intersticial (*) e dois grandes focos inflamatórios (I). Tecido contendo hepatócitos normais (H) abaixo e à esquerda em transição com tecido lesado. Vênula hepática (VH). HE, 100x.	54
Figura 22: Fotomicrografia mostrando necrose branda (*) e necrose associada a edema intersticial (E) na margem do tecido no subgrupo 2A. Tecido normal (H) e vênula hepática (V). HE, 100x.....	55
Figura 23: Fotomicrografia de um animal do subgrupo 3A com infiltrado inflamatório (I) na margem do tecido e mais profundamente edema intersticial envolvendo duas ilhas de tecido hepático normal (IH) apresentando focos de hemorragia na sua margem (*). Espaço porta (P) e hepatócitos normais (H). HE, 100x.....	56
Figura 24: Fotomicrografia das lesões observadas no subgrupo 4B. Área de necrose associada a focos inflamatórios (I) e a edema intersticial ao redor de vênula hepática (região superior direita). À esquerda, margem com extensa área de edema e de infiltrado inflamatório (*). HE, 100x.	57
Figura 25: Fotomicrografia do tecido hepático no subgrupo 5A com a presença de um extenso edema na margem do tecido (E) e infiltrados inflamatórios (I) em meio à área de necrose e edema intersticial. HE, 100x.....	58
Figura 26: Fotomicrografia de um animal do subgrupo 6B mostrando área de necrose associada a extenso edema intersticial difuso (E) e focos hemorrágicos (*) na área de necrose. Tecido normal (H) e vênula hepática (V). HE, 50x.....	59
Figura 27: Imagens dos fígados dos ratos ablacionados com o laser de Diodo. Na figura 27a, nota-se um dano com gradações, sendo mais intenso na região superior, com presença de carbonização, e menos intenso mais inferiormente. . Na figura 27b, tem-se o fígado de um animal após o tratamento com a TFD, seguido da irradiação com o laser de Diodo. Nota-se uma necrose mais homogênea, sem evidência de carbonização.....	60
Figura 28: Valores médios das profundidades de necrose obtidas para cada subgrupo do grupo laser de Diodo.	61
Figura 29: Fotomicrografia da margem da necrose do subgrupo 1. Acima e à esquerda têm-se grandes vacúolos resultantes do dano térmico (♦). Na superfície e mais profundamente estão as regiões hemorrágicas (*). HE, 50x.	63
Figura 30: Fotomicrografia da margem da lesão no subgrupo 2B com focos de infiltrado neutrofílico (I), edemas focais (E) e área de hemorragia (*), seguida pelo tecido hepático normal (H). HE, 50x.	64
Figura 31: Fotomicrografia do subgrupo 4A. Na figura, observa-se a área necrosada com presença de focos hemorrágicos (*), de infiltrado neutrofílico (I) e regiões com edema (E).HE, 50x.	65
Figura 32: Fotomicrografia da necrose observada no subgrupo 5B. Nota-se na região de necrose edema intersticial difuso (E), regiões de hemorragia (*) e infiltrado neutrofilico (I), HE, 50x.	66
Figura 33: Fotomicrografia do parênquima hepático no subgrupo 6C com focos inflamatórios (I) em meio à extensa área de necrose (N) e edema intersticial (E). HE, 50x.	67
Figura 34: Imagem mostrando animal no momento da irradiação com o laser de Diodo. A fonte de luz foi mantida fixa e o mais perpendicular possível à região abdominal.	76

Figura 35: Imagem dos fígados com necrose 30 horas após tratamento com TFD. Em a, observa-se um fígado do grupo Tratado 1, em b, do grupo Tratado 2, e em c, do grupo Tratado 3.....	78
Figura 36: Gráfico com as médias de profundidade de necrose obtidas para os grupos tratados 1, 2 e 3.....	79
Figura 37: Fotomicrografia mostrando um detalhe da extensa área de necrose com focos de hemorragia (*) e infiltrado inflamatório (I), HE 400x.....	81
Figura 38: Fotomicrografia da extensa área de necrose mostrando em detalhe a presença de edema intersticial e hepatócitos com perda da basofilia e alguns núcleos picnóticos (↑). HE, 400x.....	82
Figura 39: Fotomicrografia mostrando extensa área de necrose e espaço porta com alterações no epitélio na região de transição entre necrose (N) e tecido hepático normal (H). HE, 100x. .	83
Figura 40: Fotomicrografia mostrando área necrosada (N) com presença de edema intersticial difuso e sinusoidal (E), focos hemorrágicos (*) e detalhe do espaço porta (P) circundado por necrose e infiltrado inflamatório (I) no lúmen, HE, 50x.....	84
Figura 41: Fotomicrografia mostrando detalhe da vênula hepática (V) na região necrótica (N), circundada por tecido normal (H) com extravasamento de hemácias (*). HE, 400x.....	85
Figura 42: Fotomicrografia da região de transição entre o tecido normal (H) e a necrose (N) com presença de hepatócitos com núcleos picnóticos (↑), focos hemorrágicos (*) e vênula hepática (V). HE, 400x.	86

Lista de Tabelas

Tabela 1: Diferenciação entre tumores benignos e malignos [12].	18
Tabela 2: Classificação dos tumores [12].	21
Tabela 3: Efeitos fototérmicos e danos subsequentes à interação do laser de CO ₂ com o tecido biológico [97].	34
Tabela 4: Grupos experimentais	39
Tabela 5: Classificação dos seguintes tipos de lesões histológicas observadas nos subgrupos estudados.	53
Tabela 6: Classificação dos tipos de lesões observadas nos subgrupos do grupo laser de Diodo.	62
Tabela 7: Coeficiente de absorção α e comprimento de absorção L da água em diferentes comprimentos de onda [119].	73
Tabela 8: Descrição dos grupos experimentais.	75
Tabela 9: Descrição das lesões histopatológicas observadas em cada grupo experimental.	80

Lista de abreviaturas

ALA - ácido aminolevulínico

CBC - Carcinomas Basocelulares

CO₂ – Dióxido de carbono

DLI - Drug Light Interval

DNA - deoxyribonucleic acid

FS – fotossensibilizador

HE – Hematoxilina-eosina

Hpd – hematoporphyrin derivative

PpIX – Protoporfina IX

TFD – Terapia Fotodinâmica

UV-Vis – ultravioleta visível

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Câncer.....	18
2.2 Terapia Fotodinâmica.....	23
2.2.1 Fotossensibilizadores	24
2.2.1.1 Luzitin®	28
2.3 Tratamentos Cirúrgicos para o Câncer.....	31
2.4 Lasers Ablativos.....	31
2.4.1 Laser de Dióxido de Carbono (CO ₂)	33
2.4.2 Laser de Diodo.....	35
3. OBJETIVOS	37
4. TFD COMBINADA COM A ABLAÇÃO A LASER.....	38
4.1 MATERIAIS e MÉTODOS	38
4.1.1 Animais.....	38
4.1.2 Grupos Experimentais	39
4.1.3 Fotossensibilizadores	40
4.1.4 Preparação dos animais	40
4.1.5 Terapia Fotodinâmica.....	41
4.1.6 Ablação do tecido hepático.....	42
4.1.6.1 Ablação com laser de CO ₂	42
4.1.6.2 Ablação com laser de Diodo.....	43
4.1.7 Distribuição do fotossensibilizador após ablação com laser de CO ₂	43
4.1.8 Combinação entre TFD e lasers ablativos	44
4.1.9 Morte e remoção do fígado	44
4.1.10 Preparação do material para estudo histológico	44
4.1.11 Estudo Histológico da Necrose.....	45
4.1.12 Análise morfométrica da necrose	45
4.1.13 Análise Morfométrica da Flutuação da Necrose.....	46
4.2 RESULTADOS	47
4.2.1 Laser de CO ₂	47

4.1.2	Laser de Diodo.....	60
4.3	DISCUSSÃO	68
4.3.1	Laser de CO ₂	68
4.3.2	Laser de Diodo.....	71
4.3.3	Comparação entre grupos laser de CO ₂ e laser de Diodo	73
4.4	CONCLUSÕES.....	74
5.	TFD COM LUZITIN®	75
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	75
5.2	RESULTADOS	78
5.2.1	Análise Macroscópica da Necrose.....	78
5.2.2	Morfometria da Necrose.....	79
5.2.3	Histopatologia da Necrose	79
5.3	DISCUSSÃO	87
5.4	CONCLUSÕES.....	89
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

A crescente incidência dos casos de câncer nas últimas décadas impulsionou a busca por tratamentos mais eficazes. Com isso, a área de óptica, especialmente a biofotônica, tem se destacado com sua gama de opções de tratamentos utilizando LEDs (*Light Emitting Diode*) e Lasers (*Light amplification stimulated emission radiation*) para o combate ao câncer. Nesse sentido, a Terapia Fotodinâmica (TFD) desponta como técnica promissora nessa área e tem sido insistentemente estudada em nosso grupo de pesquisas em óptica e fônica com resultados animadores.

No entanto, essa técnica apresenta como fator limitante a penetração no tecido. Segundo Pope & Bown [7], de modo geral, a luz visível que é utilizada na TFD para ativação do fotossensibilizador (FS) possui uma penetração no tecido inferior a 5 mm. Então, se a espessura do tumor for menor, a TFD pode ser usada como terapia isolada sem a necessidade de terapias complementares. No caso de tumores maiores e mais profundos, a TFD tem sido usada somente como método paliativo de tratamento.

Assim, com o intuito de aumentar a penetrabilidade da TFD, foram desenvolvidos novos fotossensibilizadores, com destaque para o Luzitin[®], uma bacterioclorina sintética que, devido a sua propriedade de absorver luz na região do infravermelho próximo, possui uma propensão maior para atingir tumores mais profundos.

Além disso, a cirurgia a laser tem se mostrado uma técnica bastante eficiente de tratamento para tumores localizados. Contudo, em situações nas quais a remoção completa do tumor pode causar danos a um órgão ou organismo, é necessária a complementação do tratamento com outras técnicas, como radioterapia, quimioterapia ou TFD, para minimizar as possibilidades de recidivas. A TFD pode ser utilizada tanto previamente como posteriormente a uma ressecção cirúrgica. Quando utilizada previamente, o intuito é reduzir o volume tumoral para que a cirurgia seja menos agressiva. Se empregada após a cirurgia, a TFD objetiva a eliminação de células neoplásicas no leito cirúrgico que possam resultar em recidiva tumoral.

Portanto, a combinação da cirurgia a laser com TFD apresenta um potencial destrutivo para o tumor, já que reúne uma técnica cirúrgica minimamente invasiva de remoção localizada da lesão visível com outra técnica altamente seletiva, que possibilita

a eliminação de resquícios de tumor não-aparentes que estejam localizados na área irradiada onde haja presença do FS [8-10].

Entretanto, não há trabalhos reportados na literatura sobre a profundidade da necrose resultante tanto da interação entre TFD com a ablação a laser, quanto da TFD utilizando o FS Luzitin[®], bem como sobre protocolos de tratamento especificando a forma e os parâmetros mais eficientes para se aplicar tais técnicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

Câncer não é uma única doença, mas um conjunto de mais de cem diferentes tipos de patologias. O termo câncer é utilizado para designar genericamente qualquer tumor maligno. A palavra câncer é derivada do latim “cancer”, que significa caranguejo. Essa denominação é decorrente da facilidade com que esse crustáceo tem de se fixar a qualquer lugar, assim como o tumor se adere ao local do corpo humano em que se desenvolve [11].

Tumor, sinônimo de neoplasma ou blastoma, é o crescimento anormal dos tecidos, no qual células com distúrbio genético passam a se reproduzir mais rapidamente que as células normais. De acordo com o comportamento biológico, os tumores são divididos em benignos e malignos. O tumor é considerado maligno quando possui crescimento desenfreado e desorganizado, com tendência a se alastrar para outros órgãos [11].

Tabela 1: Diferenciação entre tumores benignos e malignos [12].

CRITÉRIOS	BENIGNOS	MALIGNOS
Encapsulação	Presença frequente	Geralmente ausente
Crescimento	Lento, expansivo e bem delimitado	Rápido, infiltrativo com delimitação imprecisa
Morfologia	Reproduz o aspecto do tecido de origem	Caracteres diferentes do tecido de origem
Mitoses	Raras e típicas	Frequentes e atípicas
Antigenicidade	Ausente	Presente – embora, geralmente fraca
Metástases	Não ocorrem	Frequentes

A carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou induzida pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Em ambos os casos, verifica-se a indução de alterações celulares mutagênicas e não mutagênicas ou epigenéticas. Independentemente da exposição à carcinógenos, as células sofrem processos de mutação espontânea, que não alteram o desenvolvimento normal da população celular como um todo. Estes fenômenos incluem danos oxidativos, erros de ação das

polimerases e das recombinases e redução e reordenamento cromossômico (Figura 1). Há também que se considerar a vigilância imunológica como mecanismo de correção ou exclusão das células mutantes [12].



Figura 1: As etapas da carcinogênese [12].

Anatomicamente, todos os tumores apresentam dois componentes básicos: o parênquima, constituído de células, e o estroma, formado por tecido conjuntivo e vasos. Imediatamente após a transformação maligna, visto através da microscopia óptica, as células cancerosas e as suas células não tumorais apresentam poucas diferenças visíveis. No entanto, conforme o tumor vai se desenvolvendo, suas células podem tornar-se cada vez mais alteradas, apresentando diferenças estruturais e funcionais significativas [13].

Quando um tumor maligno alcança aproximadamente um centímetro de diâmetro, torna-se detectável pelos métodos diagnósticos convencionais e contém cerca de 10^9 células. Acredita-se que é necessário um longo período de tempo para o tumor alcançar este tamanho, talvez alguns anos. O câncer possui tempos diferentes de duplicação em momentos diferentes de seu desenvolvimento natural e, em alguns deles, bem antes de ser detectado, provavelmente, já ocorreu a metastatização hematogênica (Figura 2) [12].

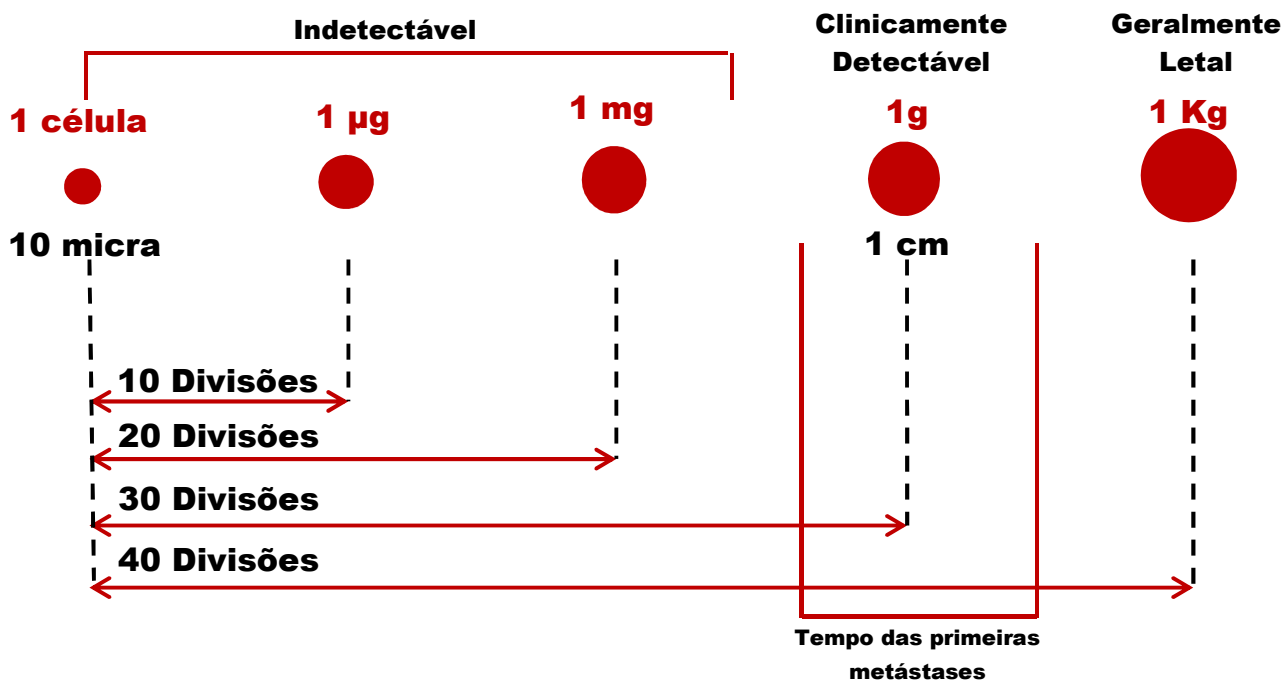


Figura 2: Crescimento de um tumor maligno primário [12].

A classificação dos cânceres é realizada de acordo com o tipo de tecido e de célula dos quais derivam: os tumores originários do epitélio de revestimento interno ou externo são denominados carcinomas; aqueles oriundos do tecido conjuntivo são formados pelo nome do tecido mais a desinência sarcoma (lipossarcoma, condrossarcoma, leiomiossarcoma), aqueles originários do tecido hematopoiético são denominados leucemias, e os de origem embrionária são os blastomas [12].

Tabela 2: Classificação dos tumores [12].

ORIGEM	BENIGNOS	MALIGNOS
Tecido Epitelial		
Revestimento	Papiloma	Carcinoma
Glandular	Adenoma	Adenocarcinoma
Tecido Conjuntivo		
Fibroso	Fibroma	Fibrossarcoma
Mixóide	Mixoma	Mixossarcoma
Adiposo	Lipoma	Lipossarcoma
Cartilagem	Condroma	Condrossarcoma
Vasos Sanguíneos	Hemangioma	Hemangiossarcoma
Glômus	Glomangioma	-
Pericitos	Hemangiopericitoma	Hemangiopericitoma maligno
Vasos Linfáticos	Linfangioma	Linfangiossarcoma
Mesotélio		Mesotelioma maligno
Meninge	Meningioma	Meningioma maligno
Tecido Hemolinfopoético		
Mielóide	-	Leucemia (vários tipos)
Linfóide	-	Leucemia linfocítica
-	-	Linfoma
-	-	Plasmocitoma
-	-	Doença de Hudgkin
Células de Langerhans	-	Histiocitose X
Tecido Muscular		
Liso	Leiomioma	Leiomiossarcoma
Estriado	Rabdomioma	rabdomiossarcoma
Tecido Nervoso		
Neuroblasto e/ou	Ganglioneuroma	Ganglioneuroblastoma
Neuronio	-	Neuroblastoma

Aproximadamente 90% dos cânceres humanos são carcinomas, dos quais os cinco mais comuns acometem os pulmões, o estômago, as mamas, o cólon/reto e o cérvix uterino [14].

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de um milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda [15]. Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em

países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderia ser prevenido.

No Brasil, a distribuição de diferentes tipos de câncer sugere uma transição epidemiológica em andamento. Com o recente e exponencial envelhecimento da população, é possível identificar um aumento expressivo na prevalência do câncer, que demanda dos gestores do Sistema Único de Saúde (SUS) a atenção adequada aos doentes [14].

O número estimado para 2012/2013 é de 518.510 casos novos de câncer no país, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (134 mil casos novos), seguido de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) [16].

Este cenário ilustra a necessidade de grande investimento no desenvolvimento de ações amplas e abrangentes para melhoria do controle e tratamento do câncer [17], já que o sucesso na cura do câncer está associado a um diagnóstico precoce da doença, bem como uma terapia eficiente.

Atualmente, os recursos mais utilizados para o tratamento oncológico são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser usados de forma isolada ou combinada. Embora estas técnicas tenham mostrado eficiência, principalmente quando a doença é detectada nos seus estágios iniciais, apresentam muitos efeitos colaterais, como alopecia (queda de cabelo), alterações gastrointestinais (vômito, diarreia, náuseas), adinamia (prostração física) e imunodepressão [18]. Devido, tanto à gravidade dos efeitos colaterais, quanto às limitações dessas terapias convencionais, tratamentos alternativos estão sendo estudados para o tratamento do câncer [11], dentre estes destacaremos a terapia fotodinâmica e a ablação a laser.

2.2 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica, do inglês, *Photodynamic Therapy*, ou PDT é uma promissora modalidade de tratamento do câncer que se caracteriza por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorre após a administração de compostos fotossensibilizantes que ficam retidos prioritariamente nos tecidos tumorais, seguido pela irradiação com luz visível [11, 13, 19].

Essa técnica apresenta várias vantagens sobre os métodos tradicionais de tratamento de neoplasias. Dentre elas podem-se citar: dano seletivo às células tumorais, ausência de intervenções cirúrgicas, possibilidade de repetição do procedimento quantas vezes forem necessárias, efeitos colaterais mais controlados e menos adversos. Outra vantagem é que, uma vez sensibilizado, o paciente pode ser submetido ao diagnóstico por fluorescência para detecção tumoral. Além disso, o procedimento em geral é ambulatorial, não requerendo internação do paciente e em muitos casos pode ser realizada sem medicação anestésica [20].

Devido a todos esses fatores entre outros, hoje, praticamente não há nenhum centro de tratamento oncológico nos países desenvolvidos que não disponha de uma infra-estrutura para a TFD. Inúmeros resultados apresentados em todo mundo, comprovam de forma irrefutável a eficácia desta terapia [20].

O tratamento com TFD pode ser útil em qualquer patologia que envolva tecidos de crescimento rápido, como é o caso das doenças cardiovasculares (tratamento de arteriosclerose), em doenças de pele (psoríase, queratose solar), no campo da oftalmologia (degeneração macular relacionada à idade), artrite reumatóide sistêmica, restenoses, micoses fúngicas, infecções bacterianas e verrugas [11, 21-22].

Na TFD, é administrado um fotossensibilizador (FS), por uma rota específica (tópica, oral ou intravenosa). Aguardado o tempo para que o FS atinja seletivamente o tecido alvo com máximo acúmulo, é realizada a irradiação por luz de comprimento de onda específico [23-24]. A interação da luz em comprimento de onda específico, ativa o fotossensibilizador presente nos tecidos, transferindo energia para o oxigênio molecular resultando em espécies reativas de oxigênio, entre elas o oxigênio singlete, que induzem a morte das células [25] (Figura 3).

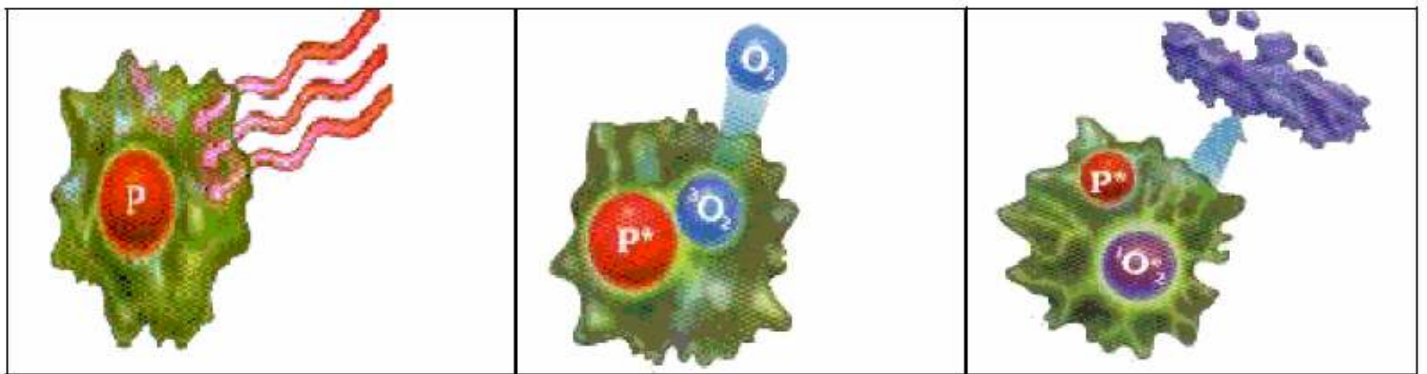


Figura 3: Efeito da irradiação da luz no FS dentro das células [26].

As espécies reativas geradas a partir da interação entre o estado excitado do fotossensibilizador e o oxigênio (oxigênio singlete e ânion radical superóxido), entre o estado excitado do fotossensibilizador e sítios dos substratos que estão sendo atacados, e as resultantes dos processos secundários (radicais livres e outras espécies carregadas), tendem a se difundir nas vizinhanças do tecido afetado, iniciando uma cadeia de reações bioquímicas, gerando danos de diferentes proporções à célula tumoral, podendo levá-la a morte. O oxigênio singlete tende a reagir com sítios ativos presentes nas células-alvo, como, por exemplo, a guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídeos insaturados. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, sendo alvos subcelulares destruídos pela TFD. Portanto, essas reações resultam em alterações da permeabilidade celular, provocando efeitos celulares como edemas, levando a morte das células [27-28].

2.2.1 Fotossensibilizadores

Segundo Sternberg, et. al. [29], um agente fotossensibilizador adequado deve possuir algumas propriedades como: baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade); fotossensibilidade não prolongada; simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado (tempo mínimo de dois anos) que, geralmente, é mantido seco, bastando ao médico adicionar água ou soro fisiológico e agitar; farmacocinética favorável (rápido acúmulo no tecido alvo e rápida eliminação do organismo); facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis; possibilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa

reprodutibilidade; facilidade de análise total dos componentes da fórmula, inclusive com fornecimento de roteiros de validação; alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade).

Além disso, é importante que o FS apresente características fotofísicas favoráveis, como o comprimento de onda da luz necessária à foto-excitação da substância. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior a penetração no tecido. Tecidos normais contêm muitas substâncias que absorvem ou refletem radiação eletromagnética como as proteínas e o DNA que absorvem na faixa do ultravioleta (200-350 nm), a melanina (absorve em comprimentos de onda menores), a hemoglobina, que absorve na região do verde-amarelo do espectro visível e a água na região do infravermelho. Radiação de comprimento de onda menor sofre maior espalhamento e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos, que absorvem em comprimentos de onda menores faz com que a penetração de luz seja menor. Na região entre 600 e 700 nm não há competição dos cromóforos endógenos, e a profundidade de penetração no tecido é de 1 a 5 cm [21].

Os fotossensibilizadores mais utilizados, até o momento, em estudos clínicos, têm sido os derivados de hematoporfirina (do inglês, hematoporphyrin derivative, ou HpD), que são considerados FSs de primeira geração. Estes FSs apresentam espectro de absorção eletrônica contendo cinco bandas de absorção, sendo uma banda intensa na região de 370 nm, conhecida como banda de Soret e quatro de menor intensidade em comprimentos de onda maiores, conhecidas como bandas-Q (Figura 4) [30].

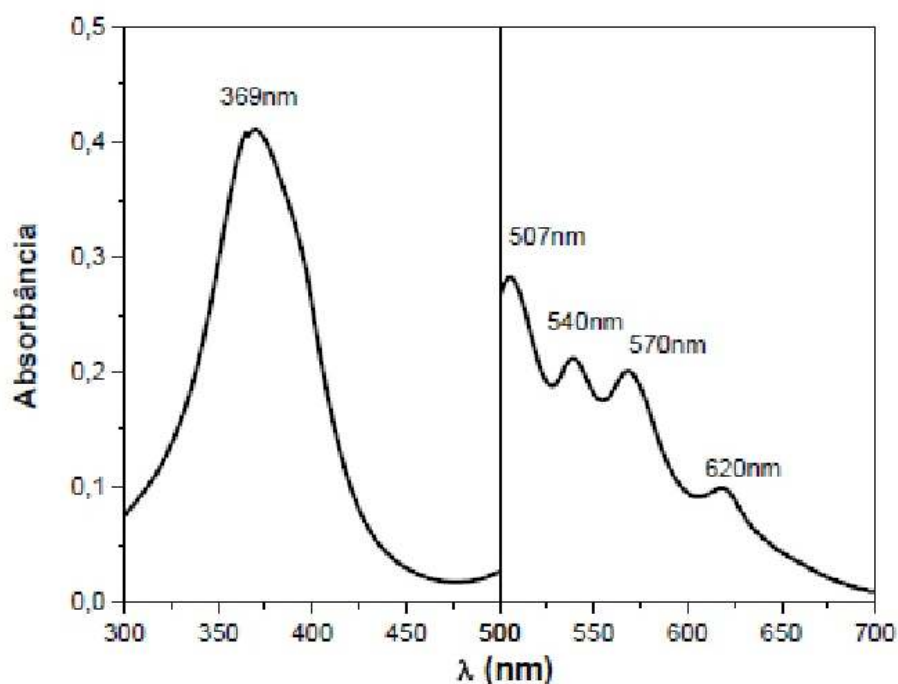


Figura 4: Espectro de absorção óptica dos HpD [31].

Há vários fotossensibilizadores de primeira geração aprovados e sendo utilizados em tratamentos clínicos, dentre eles o Photogem[®] (Rússia) e o ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Europa e EUA).

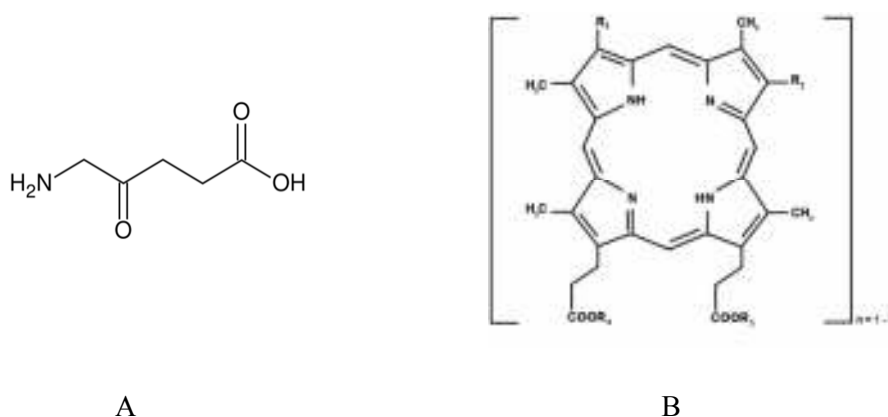


Figura 5: Estruturas Químicas do ALA (A) e do Photogem[®] (B) [32].

O Photogem[®] é um FS derivado de hematoporfirina de origem russa. É produzido a partir de sangue de animais e sua preparação é feita no Instituto de Química Fina de Moscou. Segundo alguns trabalhos, Photogem[®] possui características físicas, químicas e diagnósticas semelhantes ao Photofrin[®] relacionadas ao aspecto terapêutico

[33-35]. A estrutura monomérica do Photogem[®] apresentada na figura 5 tem a fórmula representada por $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$ e o peso molecular variando de 598 a 2920. Nos radicais R1 e R2 ligam-se CH (OH) CH₃, CH=CH₂ ou a própria estrutura monomérica da porfirina e nos ligantes R3 e R4 ligam H ou a própria estrutura monomérica da porfirina podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros [32-33].

A utilização do Photogem[®] como FS em TFD apresentou resultados positivos no tratamento de vários tipos de câncer, como cancer de pulmão [36], câncer esofágico e outros neoplasmas [37].

O ALA não é um FS exógeno, mais sim um precursor de um FS, pois ele atua nas células induzindo a produção de protoporfirina IX (banda de absorção centrada em 635 nm). Quando esse FS é irradiado com luz em comprimento de onda adequado, provoca o efeito fotodinâmico nas células [38-39].

O ALA é um composto hidrofílico em pH fisiológico, por isso possui uma capacidade limitada de atravessar barreiras biológicas da pele, como membranas celulares e extrato córneo. Essa penetração é uma condição fundamental para conversão do ALA em PpIX [40]. Em células de mamíferos, o ALA é carregado, principalmente por mecanismos de transporte ativo, que requerem energia. Esses sistemas são lentos, mas encontram-se levemente acelerados em células tumorais [41-44].

Um estudo que comparou os efeitos do ALA tópico e ALA sistêmico na microcirculação de ratos mostrou que esta aplicação tópica induz efeitos mais pronunciados em vasos na periferia do tumor e no tecido normal circundante que a aplicação sistêmica [45].

Quando o ALA é aplicado topicamente em tumores cutâneos ocorre um aumento na permeabilidade da pele cancerosa. Por isso, a frequência de indução da síntese e acúmulo de PpIX pelo ALA é muito maior em células malignas e pré-malignas, se comparado a condições normais [46].

A formação da PpIX apresenta uma considerável heterogeneidade quando o ALA é aplicado topicamente. Há uma distribuição não homogênea e limitada da PpIX no tecido, resultando em um tratamento ineficiente e com pouca penetração para lesões nodulares. A fim de assegurar níveis de PpIX clinicamente relevante, é necessário administrar doses razoavelmente altas do ALA por longos períodos de tempo [47].

Há vários estudos reportados na literatura sobre o uso tópico do ALA associado à TFD. Sziemias et al. [48] observou que, após 3 meses do tratamento do ALA tópico

associado a TFD, 71% da ceratose actínica presente na cabeça regrediram completamente.

No tratamento de Carcinomas Basocelulares (CBC), a TFD tópica com ALA mostrou uma frequência de regressão de 79 a 100% para lesões superficiais e de 10 a 75% para CBC nodular [49-51].

O ALA tópico associado à TFD apresentou resultados positivos no tratamento da doença de Bowen com frequência de regressão de 90 a 100% e uma recorrência muito baixa de 0 a 10% [52-54].

No entanto, Morton et al. [55], em seu trabalho com CBC superficiais, mostrou haver uma relação inversa entre a espessura tumoral e sua resposta à TFD.

A eficácia da TFD em lesões nodulares e nodulares ulcerativas é drasticamente reduzida quando estas possuem mais de 2 ou 3 mm [50,56-59].

Portanto, em casos de lesões mais profundas faz-se necessário a utilização de técnicas mais invasivas, como a cirurgia. E combinada a este recurso, o emprego de TFD no tratamento de lesões avançadas tende a aumentar a operabilidade do paciente, assim como também reduzir o volume do tumor que necessita ser removido [60].

2.2.1.1 Luzitin®

Os fotossensibilizadores de 1ª geração, apesar de serem amplamente usados no tratamento de vários tipos de cânceres ou condições pré-cancerígenas, apresentam algumas desvantagens. Dentre elas, destacam-se a prolongada fotossensibilidade cutânea, a baixa seletividade pelo tecido tumoral e a banda de absorção onde a droga é fotoativada (região do vermelho) é fraca, não se encontrando na região ideal do espectro [27,61-62].

No caso da hemoglobina, sua absorção mais intensa ocorre próxima de 425, 544 e 577 nm e, por isso, necessita de iluminação no tecido em comprimentos maiores que 600 nm para garantir uma penetração significativa. Em comprimentos de onda maiores que 1200 nm, a absorção de luz por moléculas de água começa a se tornar substancial. Para comprimentos de onda entre 850-900 nm, os fótons podem não ter energia suficiente para participar de uma reação fotoquímica. Portanto, o intervalo de comprimento de onda entre 600 e 800 nm foi determinado como a janela terapêutica da TFD para prática clínica [63].

Nesse sentido, uma importante característica dos fotossensibilizadores de 2ª geração, faz com que as clorinas destaquem-se, pois, quando comparadas com as propriedades espectroscópicas das porfirinas, possuem um deslocamento para a região do vermelho no espectro de UV-vísivel da última banda Q, bem como, um aumento do coeficiente de extinção molar desta banda [64-66]. Com isso, as clorinas absorvem fortemente na região do azul e do vermelho do espectro de UV-Vis, enquanto que as porfirinas absorvem fortemente na zona do azul, pois as porfirinas possuem coloração vermelha e as clorinas, verde.

Assim como as clorinas, as bacterioclorinas são fotossensibilizadores de 2ª geração derivados de porfirinas reduzidas. Essas substâncias apresentam duas ligações opostas do macrociclo hidrogenadas (figura 6).



Figura 6: Estrutura do macrociclo de uma bacterioclorina.

No espectro de absorção de uma bacterioclorina típica (figura 7), a banda Q de mais baixa energia sofre um deslocamento batocrômico para 750 nm ($\epsilon \approx 105 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A banda Q intensa é acompanhada por uma banda fraca próxima de 690 nm e uma banda de intensidade média em 560 nm (com $\epsilon \approx 104 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A banda Soret se divide em duas (em aproximadamente 360 e 400 nm, com $\epsilon \approx 105 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [67].

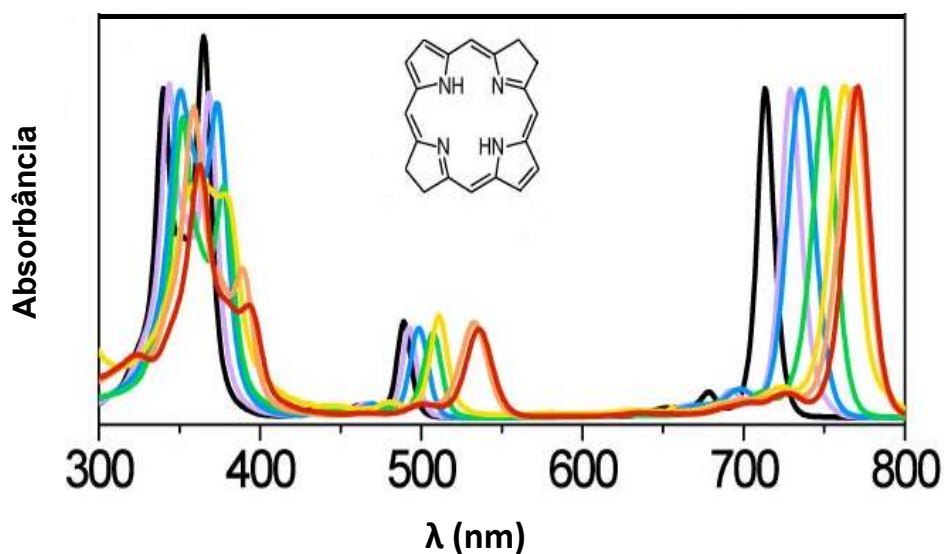


Figura 7: Espectro de Absorção das bacterioclorinas sintéticas [68].

O Luzitin[®] é uma bacterioclorina sintética derivada das meso-tetrarilbacterioclorinas halogenadas, apresenta maior fotoestabilidade a temperatura ambiente que outras bacterioclorinas utilizadas em TFD, com produção de oxigênio singlete superior a maioria dos fotossensibilizadores atualmente disponíveis, baixa citotoxicidade no escuro, forte ação fotodinâmica em baixa dose e tempo de irradiação [69,70]. Além disso, esse composto possui absorção na região do infravermelho próximo (figura 8).

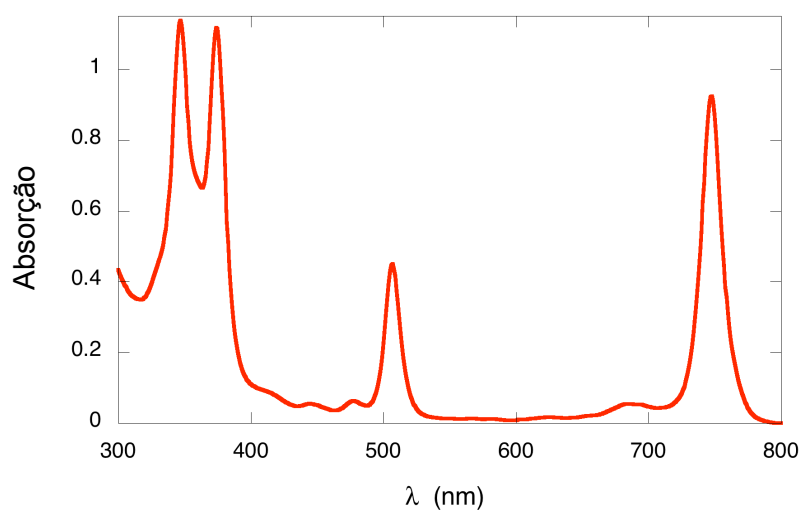


Figura 8: Espectro de absorção do Luzitin [70].

Apesar do potencial para atingir tumores mais profundos, há poucos trabalhos reportados na literatura sobre os efeitos histológicos da TFD, bem como da penetrabilidade nos tecidos quando se é utilizado um fotossensibilizador que absorve luz na região do infravermelho próximo.

2.3 Tratamentos Cirúrgicos para o Câncer

Segundo a American Cancer Society [71], a cirurgia é a mais antiga forma de tratamento de câncer. Aproximadamente 60% de todos os pacientes oncológicos são submetidos a algum tipo de procedimento cirúrgico. Muitas vezes mais limitada e menos invasiva, as operações são feitas para remover tumores tentando preservar ao máximo a função normal do tecido. A cirurgia oferece a maior chance de cura para muitos tipos de câncer, especialmente aqueles que ainda não se disseminaram para outras partes do corpo. Se o tumor está localizado, a cirurgia é muitas vezes o tratamento mais indicado.

O objetivo da cirurgia pode ser tanto a remoção de apenas o tumor, ou o órgão inteiro. Uma vez que uma única célula de câncer pode se transformar em tumor significativo, removendo apenas o tumor, há maior probabilidade de reincidência [71].

A ressecção cirúrgica (debulking) elimina uma parte, mas não o tumor como um todo. É utilizada em determinadas situações, quando a remoção total do tumor pode causar danos a um órgão ou ao organismo. Nesses casos, é utilizada outra técnica para completar o tratamento, como a radioterapia e a quimioterapia visando potencializar o resultado final e reduzir as chances de recidivas [71]. Nesse sentido, uma alternativa viável para se eliminar possíveis resquícios do tumor é a TFD, pois permite uma ação mais localizada com efeitos colaterais mínimos.

2.4 Lasers Ablativos

Lasers ablativos têm sido utilizados em medicina humana, desde a década de 60. Nos últimos 20 anos ocorreram importantes melhorias nos lasers cirúrgicos de CO₂ em termos de unidades, dimensão, facilidade de operação, manutenção, e principalmente, custo [72].

Todos os lasers cirúrgicos possuem uma estrutura básica semelhante. Um laser pode ser dividido em 3 partes principais. A primeira parte é o chamado meio ativo, que pode ser gasoso, sólido ou líquido. Nela estão contidos os átomos ou moléculas. Essas partículas estão carregadas eletricamente e prontas para serem excitadas passando a um nível superior de energia. Como as partículas tendem a retornar ao nível mais estável energeticamente, elas decaem liberando energia sob a forma de fóton (energia luminosa). Cada partícula libera um fóton em um comprimento de onda específico (monocromático). A segunda parte do laser é composta por uma fonte de energia externa, responsável por produzir estados excitados, a fim de que nos decaimentos haja produção de luz. Esse estágio é fundamental para a produção do laser. A terceira parte importante do laser é a cavidade ótica ou ressonador formada por um conjunto de espelhos que orientam o feixe laser de forma unidirecional, Os fótons são refletidos de volta para o sistema, produzindo continuamente a emissão estimulada. Além disso, há um mecanismo de entrega (braço articulado ou fibra ótica) que conduz o feixe laser para o paciente. [73-75].

O grau e a extensão dos efeitos térmicos da irradiação laser nos tecidos biológicos estão relacionados às propriedades ópticas dos mesmos (coeficiente de absorção, espalhamento, capacidade e condutividade térmicas) assim como com os parâmetros de irradiação do laser (comprimento de onda, potência, energia, irradiância) [76].

O impacto do feixe laser sobre o tecido é proporcional à densidade de potência (a potência do feixe dividido pelo quadrado do diâmetro do feixe no ponto focal). Irradiância ou densidade de energia é a quantidade de energia liberada por área de pele tratada em um pulso. Portanto, a intensidade da energia é medida em watts/cm^2 . Quanto mais curto for o pulso, maior deverá ser a irradiância a fim de alcançar energia suficiente para obtenção de efeito térmico. Alta irradiância leva ao aquecimento muito rápido do tecido, ocasionando vaporização. Ao contrário, baixa irradiância, leva à coagulação [77].

Além do ponto atingido pela radiação, a energia do laser é absorvida apenas por uma fina camada de tecido adjacente. A espessura dessa camada depende do tipo de laser, da potência usada e do tempo de aplicação. Assim, quando se utilizam grandes potências ($>400 \text{ W}$), ou quando o laser é aplicado em frações de segundo, essa camada praticamente inexistente [78].

Em cirurgia cutânea, o laser é usado como instrumento para excisão e destruição de malignidades [79-83], tratamento de queimaduras [84] e debridamento de úlceras de decúbito [85]. O uso dermatológico mais comum é como substituto da cureta e/ou eletrocautério [86-88].

A remoção cirúrgica de tecido através de mecanismos térmicos, mecânicos, de fotodecomposição ou mediados por plasma utilizando a radiação laser é denominada ablação explosiva. Esse é um processo de natureza térmica, portanto depende da absorção da radiação laser pelo tecido. A água é o principal componente para este fim, seja pela sua concentração nos tecidos, pela sua absorção intensa no infravermelho ou ainda pela sua localização sob camadas do tecido. Altas pressões são geradas pelo rápido aquecimento de camadas de água confinadas abaixo da superfície do tecido, levando a microexplosões [89].

2.4.1 Laser de Dióxido de Carbono (CO₂)

O laser de Dióxido de Carbono (CO₂) foi desenvolvido por Patel, em 1964 [90], mas foi Polanyi, em 1965 [91], que realizou o primeiro procedimento cirúrgico utilizando este equipamento. As propriedades de corte e hemostáticas do laser contínuo de CO₂ foram documentadas por Yahr e Strully em 1966 [92].

O laser de CO₂ é um laser ablativo composto por uma mistura de gás carbônico, nitrogênio e hélio, cujo comprimento de onda é de 10,6 μm na faixa espectral do infravermelho [93]. Este comprimento de onda é ideal para a cirurgia de tecidos moles, já que é absorvido por moléculas de água (mais de 85% do conteúdo dos tecidos moles) sofrendo um mínimo espalhamento.

A maioria dos lasers cirúrgicos de CO₂ são sistemas focados, o que significa que a intensidade mais elevada encontra-se a poucos milímetros do sistema de entrega – onde o ponto focal é menor. Uma vez que a densidade de potência é inversamente proporcional ao quadrado do diâmetro da ponteira, o cirurgião pode alterar a incidência do feixe afastando o sistema de entrega do tecido. Isso lhe permite aumentar a coagulação movimentando a máquina no sentido antero-posterior sem quaisquer alterações nas suas configurações. Sistemas focados também são mais seguros porque a sua intensidade diminui rapidamente com o distanciamento do sistema de entrega – reduzindo as possibilidades de danos acidentais pessoais ou no equipamento [94].

A reação provocada pelo laser depende das propriedades particulares do tecido, tempo de exposição, da potência e do tamanho do ponto [95].

A interação laser-tecido é do tipo fototérmico, a energia do raio laser é convertida em calor no ponto de impacto, instantaneamente ocorre ebulição da água intercelular provocando a vaporização das células que evaporam – vaporização térmica dos tecidos [96].

Os tipos de danos térmicos ocasionados pelo laser de CO₂ estão resumidos na tabela 3 :

Tabela 3: Efeitos fototérmicos e danos subsequentes à interação do laser de CO₂ com o tecido biológico [97].

Interação Fototérmica	Temperatura Aplicada (°C)	Efeito Histopatológico
Baixa temperatura processo de lesão tecidual	40-45	Inativação de enzima; dano celular reversível
	43-45	Inativação de enzima; morte celular
	>40	Contração celular e hiperchromasia
	43	Perda da birrefringência em miocárdio congelado
	50	Desnaturação térmica de proteínas estruturais
	>50	Rotura da membrana
	58	Hialinização do colágeno
	69-72	Perda da refrigência em miocárdio fresco
	70-75	Mudança da refrigência do colágeno
	140	Desnaturação térmica da elastina
Vaporização da água	100	Formação de vacúolos extracelulares
	>100	Rotura dos vacúolos: efeito “pipoca”
	>100	Ablação dos tecidos por vaporização explosiva
Ablação por alta temperatura	300	Ablação dos tecidos
	1000	
	3550	Vaporização do carbono

O laser de CO₂ ideal para cirurgia cutânea deve cortar e vaporizar rapidamente e efetivamente o tecido, coagular o sangue dos vasos e permitir rápida e normal cura de estruturas anexas bem como da epiderme adjacente não tratada sem interferir no tecido sadio remanescente [98].

A cirurgia com laser de CO₂ apresenta vantagens sobre a técnica convencional, pois é capaz de selar pequenas terminações nervosas ao invés de deixar terminações expostas como ocorre na cirurgia com bisturi, o que pode reduzir a dor no pós-operatório [99]. Pequenos vasos linfáticos também são selados resultando em diminuição do edema [78, 97]. Além disso, a capacidade do laser de CO₂ de manter intacto o tegumento em comparação com outros procedimentos pode reduzir a bacteremia induzida [98].

No entanto, utilizada como técnica isolada, o número de recidivas após a cirurgia a laser é relativamente alto, já que a remoção pode não ser completa e as células cancerosas que permanecem voltam a se proliferar. Por essa razão, algumas alternativas de combinação de técnicas para o tratamento de tumores mais volumosos têm sido testadas.

Um estudo realizado em 12 pacientes com CBC mostrou que combinação entre TFD e ablação com laser de CO₂ apresentou um resultado estético superior à excisão cirúrgica convencional com ou sem reconstrução [99].

2.4.2 Laser de Diodo

Os lasers de Diodo de alta potência são amplamente divulgados por serem semicondutores e possibilitarem a compactação dos equipamentos para o emprego em clínica [100-102].

A utilização comercial do laser de Diodo de alta potência se deu na década de 90, mas a grande ampliação de seu uso em cirurgias de tecidos moles se deu devido a sua capacidade de hemostasia, redução microbiana e facilidade de alcançar regiões de difícil acesso [103].

Lasers semicondutores (lasers de Diodo) são equipamentos relativamente pequenos e utilizam baixa energia (4ª geração de lasers). São os mais utilizados em cirurgia vasculares [104].

Esse tipo de laser apresenta seu comprimento de onda final determinado de acordo com as características da constituição do semicondutor. O sistema laser consiste

em um pequeno cubo de proporções submilimétricas formado por material semicondutor responsável por converter energia elétrica em energia luminosa. Essa energia é emitida em feixes por uma das faces desse pequeno cubo e caracteriza-se por apresentar uma potência máxima de poucos Watts (W). Um laser de Diodo de alta potência necessita de uma quantidade mínima aproximada de vinte desses cubos. Todos são colocados lado a lado concomitantemente formando uma barra de diodo. Um bloco de cobre é prensado junto à barra para auxiliar a dissipação de calor formado durante a utilização do equipamento [105].

O espectro do laser de Diodo varia de 630 a 980nm, pode ser utilizado em modo pulsado ou contínuo e seu feixe geralmente é conduzido por fibra óptica [106]. A energia emitida pelo laser de Diodo é suficiente para vaporizar e coagular tecidos moles, bem como para gerar um efeito térmico que pode ser danoso às células, causando desnaturação de proteínas e microexplosões de líquidos intracelulares [107], o que possibilita seu uso em condições cirúrgicas e em diversos procedimentos que necessitam da aplicação do laser em locais não acessíveis a outros tipos de laser como o de CO₂. Possui excelente capacidade de coagulação e permite a vaporização de grandes quantidades de tecido sem atingir as camadas mais profundas [108].

Estas propriedades permitem seu emprego na retirada de tumores e outros tipos de lesões [109-110].

Estudos recentes com lasers de Diodo tem demonstrado sua alta eficiência em cirurgias de tecidos moles, como remoção de tumores, promovendo incisões precisas, hemostasia e um bom pós-operatório quando utilizados com parâmetros adequados, devido à afinidade desses comprimentos de onda com pigmentos de tecidos moles [111].

3. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Esse estudo teve como objetivo avaliar e comparar morfometricamente e histopatologicamente a penetração do dano tecidual provocado pelas técnicas de terapia fotodinâmica e ablação a laser (CO₂ ou Diodo), isoladas e combinadas (TFD + Laser), e TFD com o FS Luzitin[®], através das medidas da profundidade da necrose resultante desses procedimentos.

Objetivos Específicos

- Obter as profundidades de necrose médias para cada subgrupo estudado;
- Comparar os valores de profundidade de necrose dos subgrupos tratados com as técnicas isoladas com os subgrupos tratados com as técnicas combinadas;
- Analisar a melhor condição para se combinar as técnicas de TFD (FS + luz) e ablação a laser a fim de se sugerir um possível protocolo de tratamento para tumores mais profundos;
- Para o experimento com o Luzitin[®], com base nas médias de profundidades de necrose mensuradas, definir qual dos parâmetros testados foi mais eficiente e propor um protocolo de tratamento com irradiação externa utilizando esse FS.

4. TFD COMBINADA COM A ABLAÇÃO A LASER

4.1 MATERIAIS e MÉTODOS

4.1.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal Protocolo nº015/2009 (Anexo 1). Foram utilizados 87 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com massa corporal média de 350g cada, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP). Durante todo experimento, os animais foram mantidos em gaiolas com cinco animais cada, em um alojamento para animais (figura 9), com quatro filtros para entrada de ar, um exaustor para as saídas de ar e controle da iluminação com ciclos de doze horas de claro e doze horas de escuro, montado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – USP, no laboratório de Biofotônica. Nesse período, receberam água filtrada e ração comercial específica para roedores (Primor). A temperatura foi mantida entre 23 e 25°C.



Figura 9: Alojamento dos animais montado no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica no IFSC – USP/São Carlos.

4.1.2 Grupos Experimentais

Os animais foram separados aleatoriamente em dois grandes grupos, sendo um para o laser de CO₂ e outro para o laser de Diodo. Cada um desses grupos foi subdividido em seis subgrupos: 1) subgrupo controle laser ablativo, 2) subgrupo controle TFD (FS e luz), 3) subgrupo controle fotossensibilização seguida de ablação a laser, 4) subgrupo laser seguido de FS e luz, 5) subgrupo FS e luz seguido pela ablação a laser, e 6) subgrupo FS seguido da ablação a laser e luz. Para cada subgrupo, três condições de fotossensibilização foram utilizadas: ácido 5-aminolevulínico (ALA) tópico, ALA endovenoso e Photogem® endovenoso. Esses grupos experimentais estão descritos na tabela 4:

Tabela 4: Grupos experimentais

Subgrupos	Animais	Procedimento			Fotossensibilizador
		Primeiro	Segundo	Terceiro	
1	3	Laser ablativo (CO ₂ ou Diodo)			
2 ^a	3		Laser ablativo (CO ₂ ou Diodo)		ALA tópico
2B	3	FS			ALA i.v.
2C	3				Photogem®
3 ^a	3		Luz		ALA tópico
3B	3	FS			ALA i.v.
3C	3				Photogem®
4 ^a	3		Luz	Laser ablativo (CO ₂ ou Diodo)	ALA tópico
4B	3	FS			ALA i.v.
4C	3				Photogem®
5 ^a	3	Laser ablativo (CO ₂ ou Diodo)			ALA tópico
5B	3		FS	Luz	ALA i.v.
5C	3				Photogem®
6 ^a	3		Laser ablativo (CO ₂ ou Diodo)		ALA tópico
6B	3	FS		Luz	ALA i.v.
6C	3				Photogem®

Os subgrupos 3A, 3B e 3C foram uma exceção, pois o tratamento com a TFD foi realizado uma única vez. Portanto, os dados apresentados nos resultados tanto para o

grupo laser de CO₂ quanto para o grupo laser de Diodo são relativos aos mesmos animais.

4.1.3 Fotossensibilizadores

Para a fotossensibilização do tecido hepático dos animais foram utilizados o Photogem[®] e um precursor da PpIX, o ALA, nas formas tópica e intravenosa.

O Photogem[®] foi separado em alíquotas de 5mg, sendo cada alíquota diluída em 1ml de cloreto de sódio (0,9%), obtendo uma concentração final de $1,32 \times 10^{-3}$ mol/L, estocada a 4°C.

Para a preparação do ALA tópico, 16% do ácido 5-aminolevulínico em pó (ALAsens – Rússia) foi incorporado a um creme com a seguinte composição: Cera polawax (alcoois graxos + álcool etoxilado); Crodalan LA (álcool de lanolina acetilada), Miristato de isopropila, BHT (butil hidroxitolueno), uniphen (fenoxietanol + parahidroxibenzoatos de metila, etila, butila e propila), Propilenoglicol, EDTA, água destilada. O creme foi armazenado em embalagem própria e estocado a 4°C.

O ALA endovenoso foi obtido a partir do mesmo ácido 5-aminolevulínico em pó (ALAsens – Rússia) diluído em 1ml de cloreto de sódio (0,9%) na concentração de 100mg/ml, obtendo-se uma solução ácida (pH=3), estocada a 4°C.

Na fotossensibilização dos animais com ALA tópico 0,08 ml do medicamento foi aplicado no fígado dos animais. O ALA endovenoso diluído foi administrado na veia cava na concentração de 200mg/Kg [112-114]. No caso do Photogem[®], a substância diluída foi injetada na veia cava na quantidade de 1,5mg/Kg [20].

4.1.4 Preparação dos animais

Todos os animais foram submetidos a um período de jejum de doze horas, tendo acesso livre à água. Posteriormente, foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução estéril de cloridrato de ketamina a 5% (Vetanarcol[®]-Konig), na dose de 0,08 ml/100g de massa corporal, associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de xilasina a 2% (Coopazine[®] - Coopers) na dose de 0,04 ml/100g. A região abdominal dos animais foi tricotomizada e realizada uma incisão mediana para o acesso à veia cava, no caso da administração endovenosa dos medicamentos, ou exposição do lobo esquerdo do fígado para aplicação tópica do ALA.

4.1.5 Terapia Fotodinâmica

A TFD (FS + luz) foi realizada após o DLI (“Drug Light Interval”), ou intervalo ótimo entre administração da droga e irradiação do tecido, pré-determinado para cada fotossensibilizador em estudos anteriores [38,115] como sendo de 2 horas e 45 minutos para o ALA tópico, 6 horas e 30 minutos para o ALA intravenoso e 30 minutos para o Photogem[®].

Como fonte de luz para a TFD utilizou-se o laser de Diodo 630 Ceramoptec[®] (Alemanha) na intensidade de 150 J/cm^2 , intensidade total de 150 mW/cm^2 e tempo de 600 segundos.

Uma máscara de papel alumínio envolto por gaze com um orifício de $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ foi utilizada para delimitar a área a ser irradiada e proteger o restante do tecido, evitando a iluminação de áreas indesejadas (Figura 10).

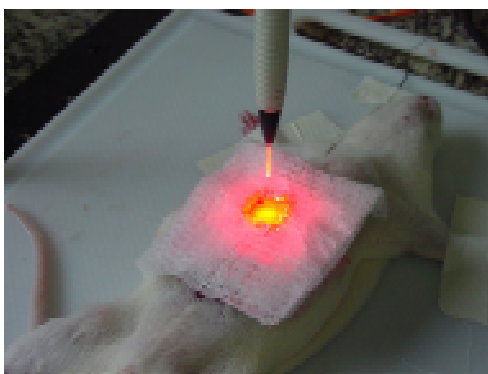


Figura 10: Iluminação do fígado de um animal fotossensibilizado mostrando a delimitação da área iluminada com uma máscara de papel alumínio envolto por gaze com um orifício de $1.0 \times 1.0 \text{ cm}$.

4.1.6 Ablação do tecido hepático

4.1.6.1 Ablação com laser de CO₂

No grupo laser de CO₂, a ablação do tecido hepático foi realizada com um equipamento Laser de CO₂ Medical Energy, INC, SL-225 CO₂ laser, no comprimento de onda de 10.600 nm, sistema focado, feixe colimado, modo de operação pulsado com frequência de 45Hz e potência de 4W.

Para uma melhor padronização do método de ablação do tecido, o braço articulado do laser foi acoplado a um sistema de translação x-y comandado por um software de computador específico (Figura 11). Esse sistema foi programado para realizar varredura em uma área de aproximadamente 10x10mm² durante 42 s a uma velocidade de 5mm/s.

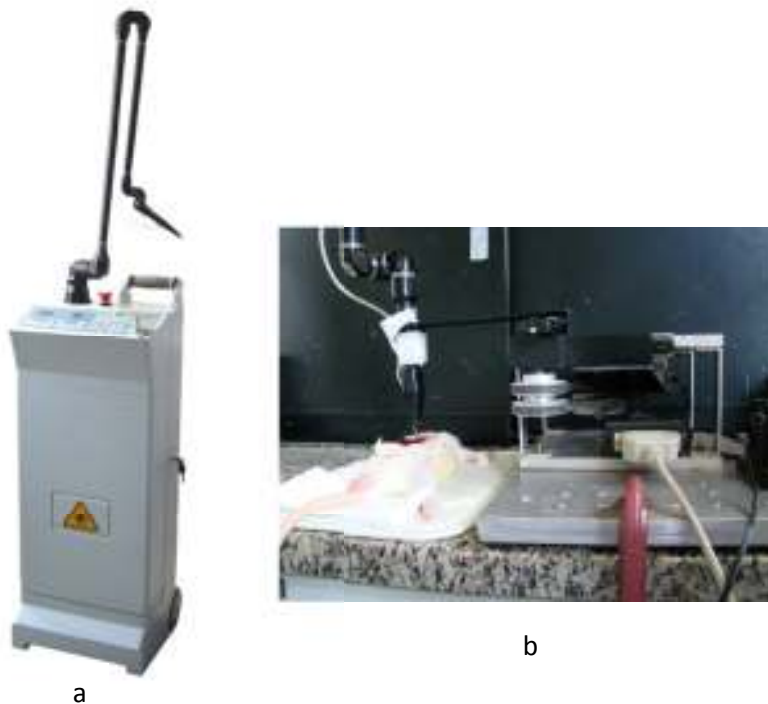


Figura 11: Em a, observa-se a imagem do equipamento laser de CO₂ e em b, tem-se a imagem do laser de CO₂ acoplado ao sistema de varredura x-y.

4.1.6.2 Ablação com laser de Diodo

No grupo laser de Diodo, a ablação do tecido hepático foi realizada com um equipamento Laser de Diodo, comprimento de onda de 810nm, feixe acoplado em fibra óptica, modo de operação pulsado com frequência de 50Hz e potência de 4W.

A ponteira da fibra óptica também foi acoplada ao mesmo sistema de translação x-y (Figura 12 a), controlado por um software específico, mantendo-se o mais próxima possível do tecido, porém sem contato (Figura 12b), de modo a permitir uma melhor padronização do método.

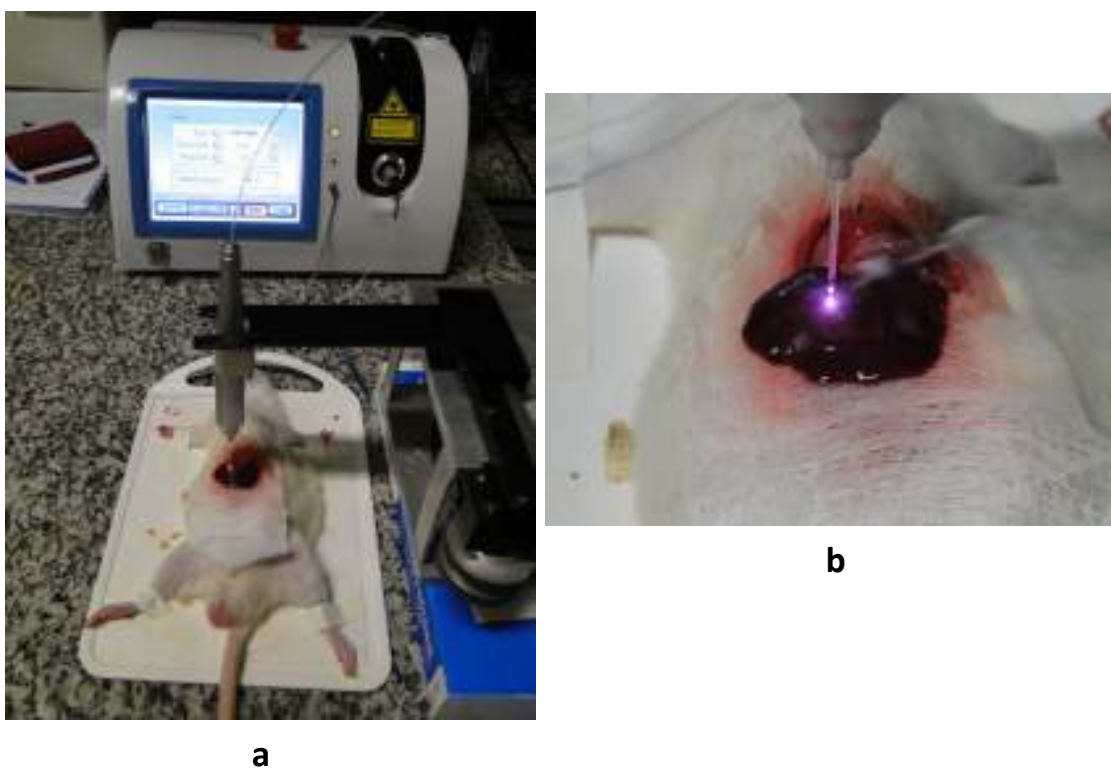


Figura 12: Imagens do animal sendo submetido à ablação com o laser de Diodo de 810nm. Em a, observa-se o equipamento laser acoplado ao transladador x-y e em b, o detalhe da fibra realizando a varredura no fígado do animal.

4.1.7 Distribuição do fotossensibilizador após ablação com laser de CO₂

Após o procedimento de preparação dos animais, o lobo esquerdo do fígado dos animais foi exposto e isolado em uma gaze embebida em soro fisiológico.

Antes do DLI ótimo para cada medicamento, foi realizada a ablação de uma área de aproximadamente 100mm² do lobo esquerdo do fígado dos ratos com o laser de CO₂.

A fim de se observar uma possível degradação do FS após o procedimento de ablação, o tecido hepático foi observado no Velscope[®], equipamento que emite luz em comprimento de onda específico para detecção da fluorescência do FS. As imagens da fluorescência dos fígados foram captadas com uma câmera CCD para serem analisadas.

4.1.8 Combinação entre TFD e lasers ablativos

Com o intuito de investigar como o tecido hepático normal responde a interação entre TFD e ablação com diferentes tipos de lasers, foi realizado um estudo associando ambas as técnicas descritas nos itens 4.1.5 e 4.1.6 em diferentes condições. A ordem dos procedimentos variou em cada grupo experimental, de acordo com o descrito no item 4.1.2.

4.1.9 Morte e remoção do fígado

Após o tratamento, os animais foram suturados, colocados nas respectivas gaiolas e levados ao alojamento. Após 30 horas, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico. O lobo esquerdo do fígado foi removido e a área necrosada cortada em fatias com espessuras aproximadas de 1 mm, no sentido ântero-posterior, para permitir análise da profundidade.

4.1.10 Preparação do material para estudo histológico

As amostras do tecido foram colocadas em frascos plásticos contendo solução de formaldeído 40% (Formol – Merck[®]), misturado a uma solução de monofosfato de sódio hidratado (NaH₂PO₄H₂O - Merck[®]) e difosfato de sódio hidratado (Na₂HPO₄H₂O- Merck[®]) diluídos em água destilada, durante 24 horas para fixação. Em seguida, as amostras foram desidratadas e inclusas em parafina. Cortes transversais de 5µm foram realizados, utilizando-se um micrótomo rotativo Reichert Jung 2040. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina (HE).

4.1.11 Estudo Histológico da Necrose

Também com a finalidade de caracterizar os aspectos microscópicos dos procedimentos resultantes dos tratamentos isolados e combinados realizados em tecido hepático de ratos *Wistar*, foram captadas fotomicrografias das lâminas histológicas para ilustração e descrição dos padrões observados.

Para a análise histológica foi utilizado o microscópio Zeiss[®], modelo Axioskop 2 plus. As imagens dos campos foram registradas pela câmara (Axio Cam Hrc[®]) acoplada ao microscópio, sendo posteriormente arquivadas pelo programa Axio Vision 4.6[®].

4.1.12 Análise morfométrica da necrose

A morfometria da profundidade da necrose foi a principal forma de análise comparativa entre as respostas provocada pelas técnicas de TFD e ablação com laser de CO₂ isoladas ou combinadas. Através de medidas entre a distância da superfície necrosada e o tecido normal adjacente (Figura 13) foi estabelecida a profundidade de necrose média atingida em cada condição estudada. Para cada animal foram obtidos quatro a cinco cortes da região aparentemente necrosada e, em cada corte, realizadas três medidas para, então, ser calculada a média, como descrito em trabalhos anteriores [38, 115].

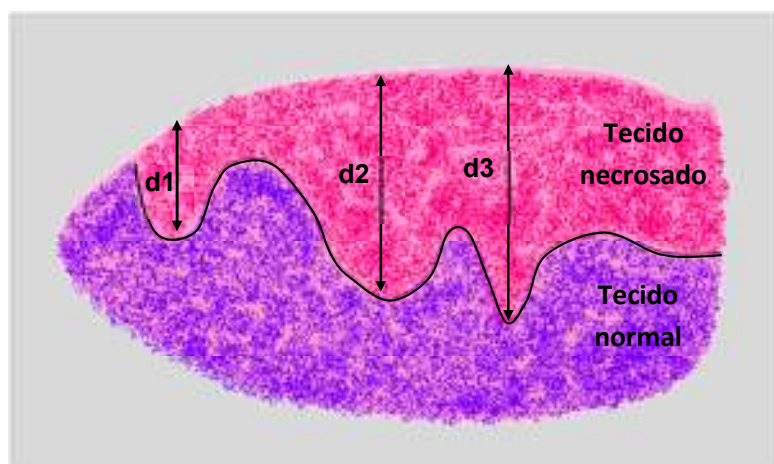
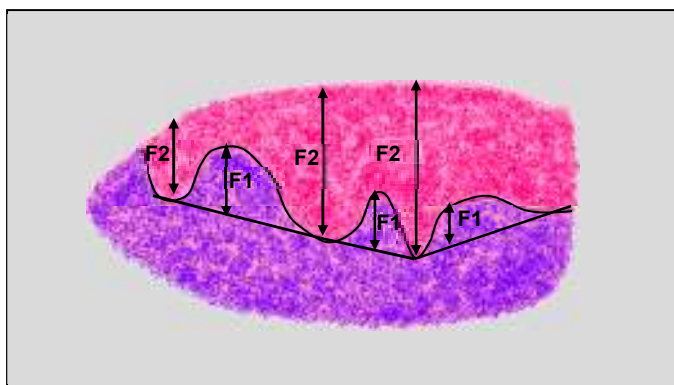


Figura 13: Esquema representativo de uma lâmina histológica demonstrando a maneira na qual foram obtidas as medidas da profundidade de necrose do fígado.

Os valores de profundidade de necrose médios foram analisados para cada grupo experimental, gerando gráficos de profundidade de necrose *versus* técnica utilizada.

4.1.13 Análise Morfométrica da Flutuação da Necrose

Devido à irregularidade da necrose na região de transição entre esta e o tecido normal adjacente presente no grupo Laser de CO₂, foi realizada a medida da flutuação da necrose utilizando o mesmo equipamento para mensuração da profundidade de necrose. A fim de quantificar o quanto a necrose oscilou para cada subgrupo testado do grupo Laser de CO₂, traçou-se linha imaginária do que seria uma necrose regular e verificou-se a distância entre as oscilações da necrose real até esta linha como pode ser observado na figura 14. Dessa forma, foram realizadas medidas em três pontos de cada corte, obtendo-se um valor médio para cada grupo expresso em porcentagem.



$$\text{Flutuação (\%)}: \frac{F1 \text{ média}}{F2 \text{ média}} \times 100$$

Figura 14: Esquema da lâmina histológica com um corte de tecido hepático mostrando como foram realizadas as medidas da flutuação da necrose. Em rosa está representada a região necrosada e em roxo a região de tecido normal. As distâncias F2 são a profundidade de necrose e F1 as distâncias das oscilações da necrose real até a linha imaginária.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Laser de CO₂

A profundidade de necrose medida nas lâminas histológicas dos tecidos hepáticos dos animais submetidos às técnicas de TFD e ablação com laser de CO₂ isoladas ou combinadas foi utilizada como principal critério para se avaliar a resposta final ao tratamento.

Os lobos esquerdos dos animais foram tratados com técnicas combinadas ou isoladas. A figura 15 mostra o aspecto dos fígados dos animais após ablação com laser de CO₂ (Figura 15a), terapia fotodinâmica (Figura 15b) e, na figura 15c, as técnicas combinadas, que consistiu primeiramente na TFD e, na sequência, a ablação com o laser de CO₂.

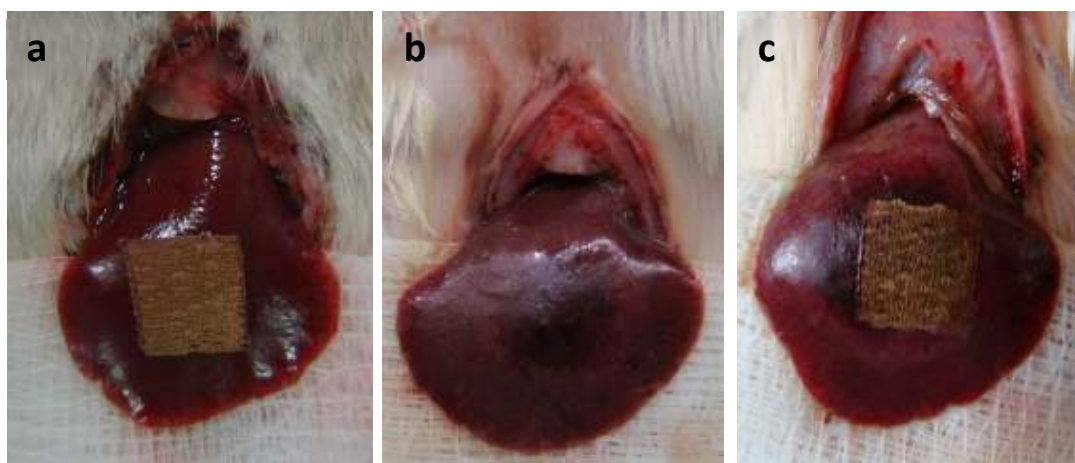


Figura 15: Imagem dos fígados dos animais fotossensibilizados com ALA intravenoso após os tratamentos isolados e combinados. Em a, o fígado fotossensibilizado foi ablacionado com laser de CO₂, em b, o fígado foi tratado com TFD e em c, o fígado foi tratado com as técnicas combinadas (TFD com ALA i.v. + ablação a laser).

Imagens macroscópicas obtidas dos fígados dos animais fotossensibilizados e ablacionados com o laser de CO₂ e iluminados com luz UV no equipamento Vel Scope[®] foram captadas por câmera CCD para ilustração dos padrões observados.

Os fígados fotossensibilizados com o ALA tópico apresentaram uma coloração em tom de vinho devido à presença da porfirina. Após a ablação a laser, houve uma degradação do fotossensibilizador na região ablacionada, conferindo um tom esverdeado ao tecido devido à mudança na fluorescência do tecido causada pela

degradação do fotossensibilizador. No entanto, os cortes transversais realizados no sentido próximo distal, mostram que a ablação foi apenas superficial, não promovendo uma degradação do fotossensibilizador ao longo da profundidade do tecido (Figura 16).

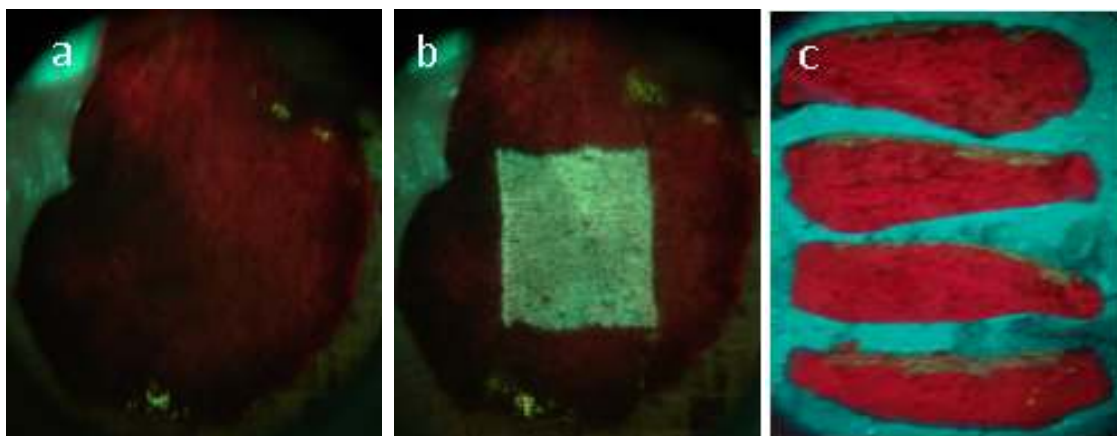


Figura 16: Imagens dos fígados dos animais fotossensibilizados com ALA tópico e vistas através do equipamento Vel Scope®. Em a, observa-se o tecido fotossensibilizado, em b, o tecido fotossensibilizado e ablacionado com o laser, e em c, os cortes transversais do fígado mostrando sua profundidade após a ablação a laser.

Após 6 horas e meia da fotossensibilização intravenosa com o ALA, os fígados dos animais iluminados com luz UV apresentaram fluorescência vermelha, evidenciando a forte presença da porfirina formada. Na região central, nota-se a degradação do FS pela ablação a laser. Os cortes transversais realizados no sentido próximo distal mostram o perfil superficial da lesão provocada pelo laser (Figura 17).

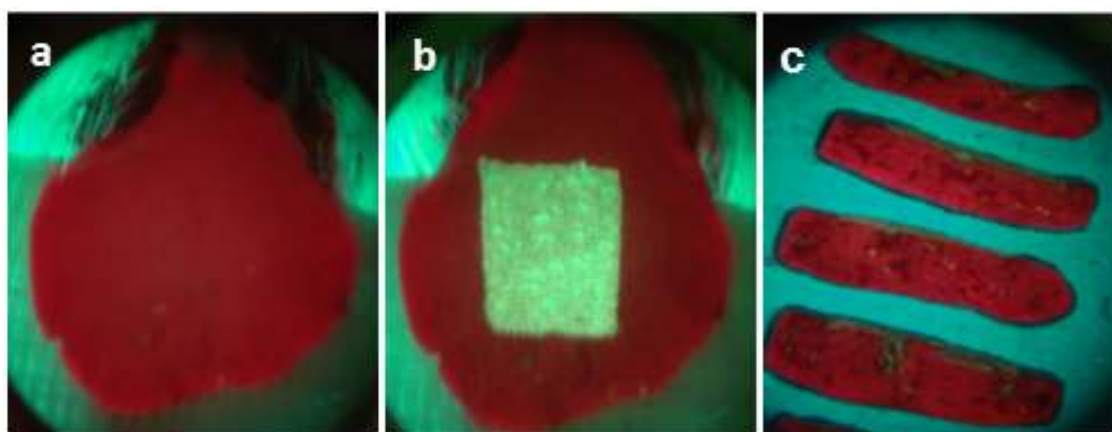


Figura 17: Imagens dos fígados dos animais fotossensibilizados com ALA i.v. iluminadas com luz UV no equipamento Vel Scope®. Em a, observa-se o tecido fotossensibilizado, na em b, o tecido fotossensibilizado e ablacionado com o laser, e em c, os cortes transversais do fígado mostrando sua profundidade após a ablação a laser.

No tecido fotossensibilizado com Photogem[®] e, após 30 minutos, ablacionado com o Laser de CO₂, não é possível distinguir visualmente a presença do FS. No entanto, observa-se a degradação na região ablacionada com o laser conferindo um tom averdeado ao tecido decorrente da perda da fluorescência da porfirina provocada pela degradação do FS (figura 18).

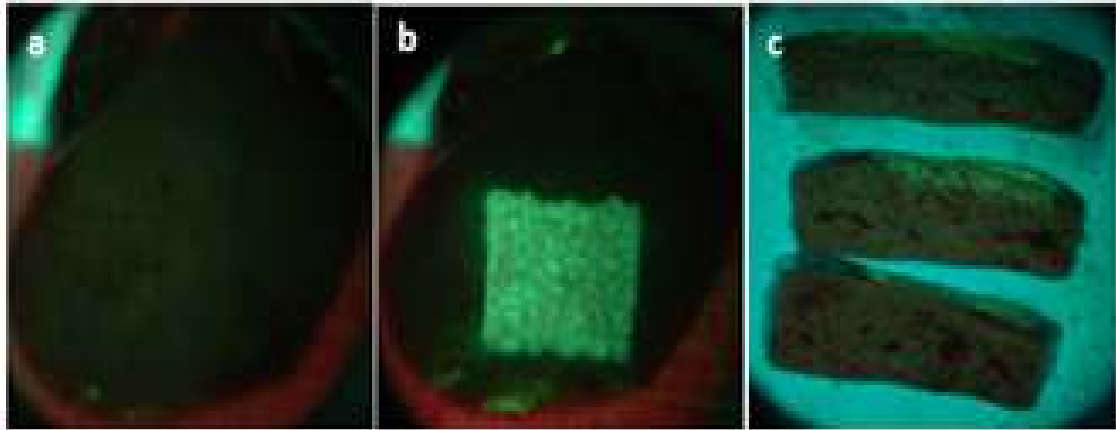


Figura 18: Imagens vistas no Vel scope do fígado de um animal fotossensibilizado com Photogem[®] (figura 18a), fígado fotossensibilizado com Photogem[®] e ablacionado com laser de CO₂ (figura 18b) e cortes transversais do fígado fotossensibilizado com Photogem[®] ablacionado com laser de CO₂ (figura 18c).

A figura 19 mostra o gráfico com as médias de profundidade de necrose para o grupo laser de CO₂ resultante do tratamento com as técnicas combinadas e isoladas para os diferentes tipos de fotossensibilização utilizados.

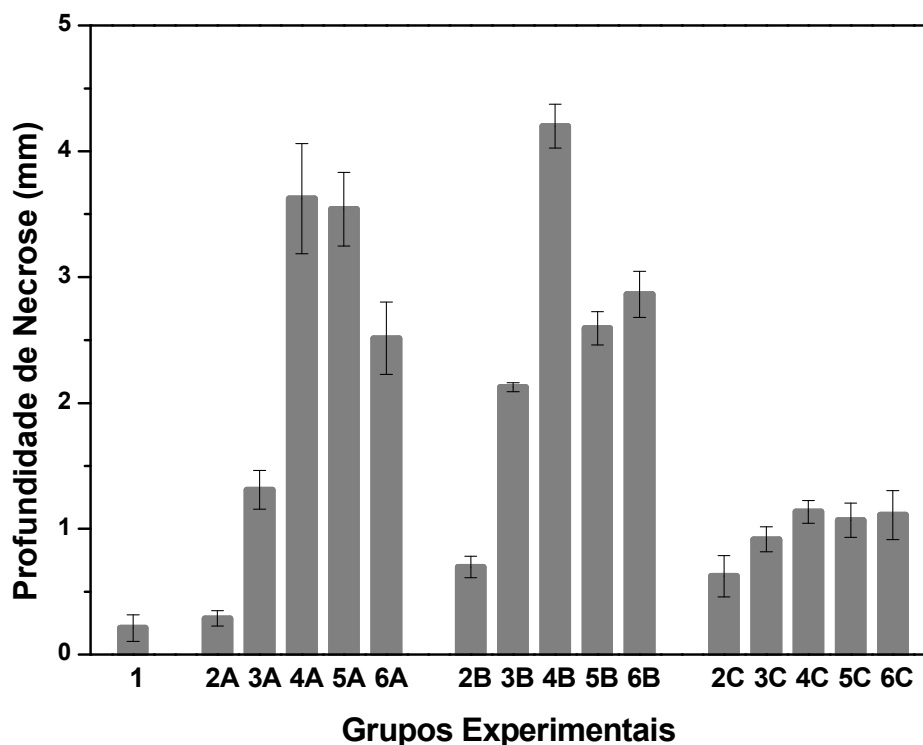


Figura 19: Gráfico com as médias de profundidade de necrose obtidas para cada subgrupo tratado com as técnicas de ablação com o laser de CO₂, TFD ou ambas associadas.

No subgrupo 1, a profundidade de necrose corresponde exclusivamente ao dano térmico provocado pela ablação com o laser de CO₂. Quando o tecido foi fotossensibilizado previamente à ablação com o laser, houve um aumento da profundidade de necrose (subgrupos 2A, 2B e 2C).

Para o ALA tópico, bem como para os outros fotossensibilizadores (ALA intravenoso e Photogem[®]) utilizados, uma maior profundidade de necrose foi observada no tecido hepático dos animais quando tratados com técnicas combinadas (subgrupos 4, 5 e 6), em relação aos procedimentos isolados (subgrupos 1, 2 e 3).

Nos animais fotossensibilizados com o ALA tópico notou-se que a profundidade de necrose obtida para o subgrupo 5A foi semelhante à do subgrupo 4A, porém significativamente maior quando comparado aos subgrupos 2A, 3A e 6A.

A profundidade da necrose usando ALA intravenoso foi maior para as técnicas combinadas (subgrupos 4B, 5B e 6B), quando comparado à utilização das técnicas individualmente (subgrupos 1, 2B e 3B). No entanto, quando a TFD foi realizada antes da ablação de tecidos com o laser de CO₂ (subgrupo 4B), a extensão da profundidade de necrose foi praticamente duplicada.

No caso em que o fotossensibilizador utilizado foi o Photogem[®], a comparação entre os subgrupos 3C e 4C mostrou que, após a irradiação da TFD no tecido fotossensibilizado, a ablação com laser de CO₂ adicionou a profundidade de necrose esperada, observada no subgrupo 1C. A realização do tratamento com TFD antes da ablação a laser de CO₂ (subgrupos 4C e 6C) mostrou um aumento na profundidade de necrose. Os subgrupos 5C e 6C, nos quais foi realizada a ablação do tecido fotossensibilizado e a ablação antes da fotossensibilização seguidas pela TFD não apresentaram diferença significativa.

Como observação geral, para todos os fotossensibilizadores utilizados, a média da profundidade de necrose medida foi maior nos subgrupos em que o tecido fotossensibilizado foi tratado com a TFD previamente à ablação com laser de CO₂ (subgrupos 4A, 4B e 4C).

A figura 20 exibe os valores das porcentagens de flutuação para os subgrupos do grupo laser de CO₂.

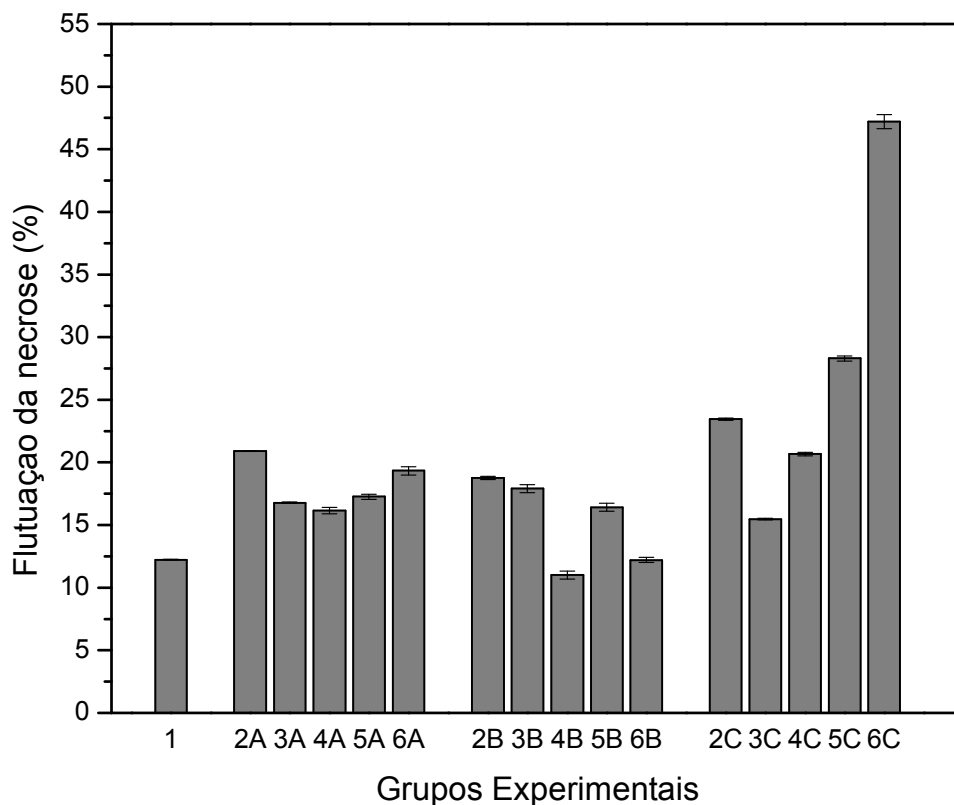


Figura 20: Gráfico com os valores de porcentagem de flutuação da necrose.

A porcentagem de flutuação da profundidade de necrose para o ALA tópico, não se mostrou expressiva, com valores abaixo de 25%. Comparando os subgrupos estudados fotossensibilizados com o ALA tópico, não se observou grande diferença.

No caso do ALA intravenoso, a irregularidade da necrose foi a menor observada com valores inferiores a 20%. A flutuação da necrose apresentou-se relativamente superior nos subgrupos fotossensibilizados e tratados exclusivamente com TFD ou laser de CO₂ em comparação aos demais subgrupos.

Para o Photogem[®], observou-se um aumento da flutuação da necrose quando a ablação foi realizada no tecido fotossensibilizado em comparação com a ablação no tecido sem a presença de droga. Além disso, a flutuação da necrose foi mais elevada nos subgrupos ablacionados com laser de CO₂ como procedimento prévio a TFD, sendo que o subgrupo 6C, no qual o laser de CO₂ foi realizado após a fotossensibilização do tecido pelo Photogem[®] e anteriormente a TFD foi o que apresentou uma flutuação da necrose significativamente maior em relação aos demais subgrupos estudados.

Um estudo histológico mostrou que as alterações para todos os animais dos diferentes subgrupos experimentais foram acompanhados por certas características histológicas com variações de leve inflamação e edema com necrose extensa e hemorragia grave. Basicamente, as lesões observadas foram: edema, extravasamento microvascular causando reação inflamatória aguda, destruição do parênquima hepático e destruição dos vasos sanguíneos com hemorragia intersticial subsequente.

A Tabela 5 apresenta uma classificação histopatológica qualitativa indicando leve (1), moderada (2) e grave (3) as alterações predominantes em cada subgrupo experimental após ter avaliado as principais lesões observadas nos cortes histológicos.

Tabela 5: Classificação dos seguintes tipos de lesões histológicas observadas nos subgrupos estudados.

Grupos Experimentais	Np	Tipos de Lesões				Total
		H	Ed	Ef	I	
1	2	2	3	1	2	10
2A	1	1	2	1	1	6
3A	2	2	2	1	2	9
4A	3	2	2	1	2	9
5A	3	2	3	1	2	11
6A	3	2	3	2	2	12
2B	2	2	2	1	2	9
3B	3	2	2	2	2	11
4B	3	2	2	2	2	11
5B	3	2	3	2	2	12
6B	3	3	1	1	3	11
2C	2	1	1	2	1	7
3C	2	2	2	1	2	9
4C	3	1	2	2	1	9
5C	2	2	1	1	2	8
6C	3	1	3	3	2	12

*: necrose parenquimatosa (np), hemorragia(h), edema difuso (ed), edema focal (ef) e infiltrado neutrofílico (I).

Os subgrupos 1, 2 e 3 foram considerados subgrupos controle, pois representam os padrões histológicos de comparação entre os efeitos dos tratamentos isolados e as técnicas combinadas. Os subgrupos 3, 4 e 5 mostram uma combinação das alterações histológicas observadas nos subgrupos controle.

De acordo com a classificação histopatológica apresentada na tabela 5, os subgrupos que, de modo geral apresentaram maior gravidade para as lesões analisadas foram os subgrupos 6A, 5B e 6C, destacados em vermelho. No entanto, as lesões observadas nos subgrupos 6A e 5B variaram entre moderadas e graves, enquanto que o subgrupo 6C apresentou predomínio de lesões graves, porém hemorragia leve.

A análise de cada fotossensibilizador para todos os subgrupos tratados utilizando técnicas combinadas permitiu observar alterações histopatológicas mais pronunciadas e extensas do que nos grupos tratados com as técnicas isoladas.

O subgrupo 1, que foi somente ablacionado com o laser, apresentou lesões na margem do tecido hepático seguida de uma extensa área de necrose parenquimatosa com perda focal da basofilia nas células necróticas e núcleos picnóticos (com intensa condensação da cromatina), algumas vezes associada com edema intersticial. Focos da congestão intersticial, infiltrados inflamatórios e hemorragia foram observados na área necrosada do tecido (Figura 21).

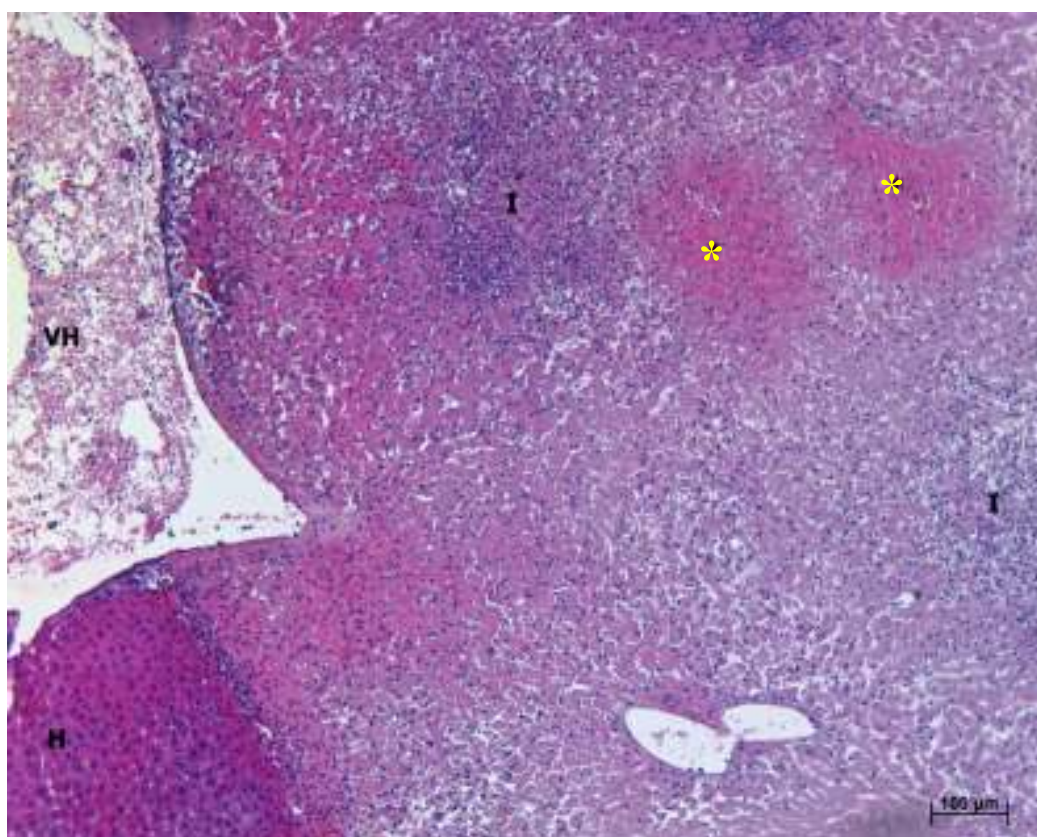


Figura 21: Fotomicrografia da visão geral do parênquima hepático mostrando a direita margem com lesão necrótica e edema, contendo ilhas de hemorragia intersticial (*) e dois grandes focos inflamatórios (I). Tecido contendo hepatócitos normais (H) abaixo e à esquerda em transição com tecido lesado. Vênula hepática (VH). HE, 100x.

Quando os animais foram fotossensibilizados antes da ablação com o laser de CO₂ (subgrupos 2A, 2B e 2C), observou-se uma necrose mais homogênea, com focos hemorrágicos nas áreas intersticiais e focos de edema na margem do tecido, seguidas de uma necrose leve continuada por tecido normal (Figura 22).

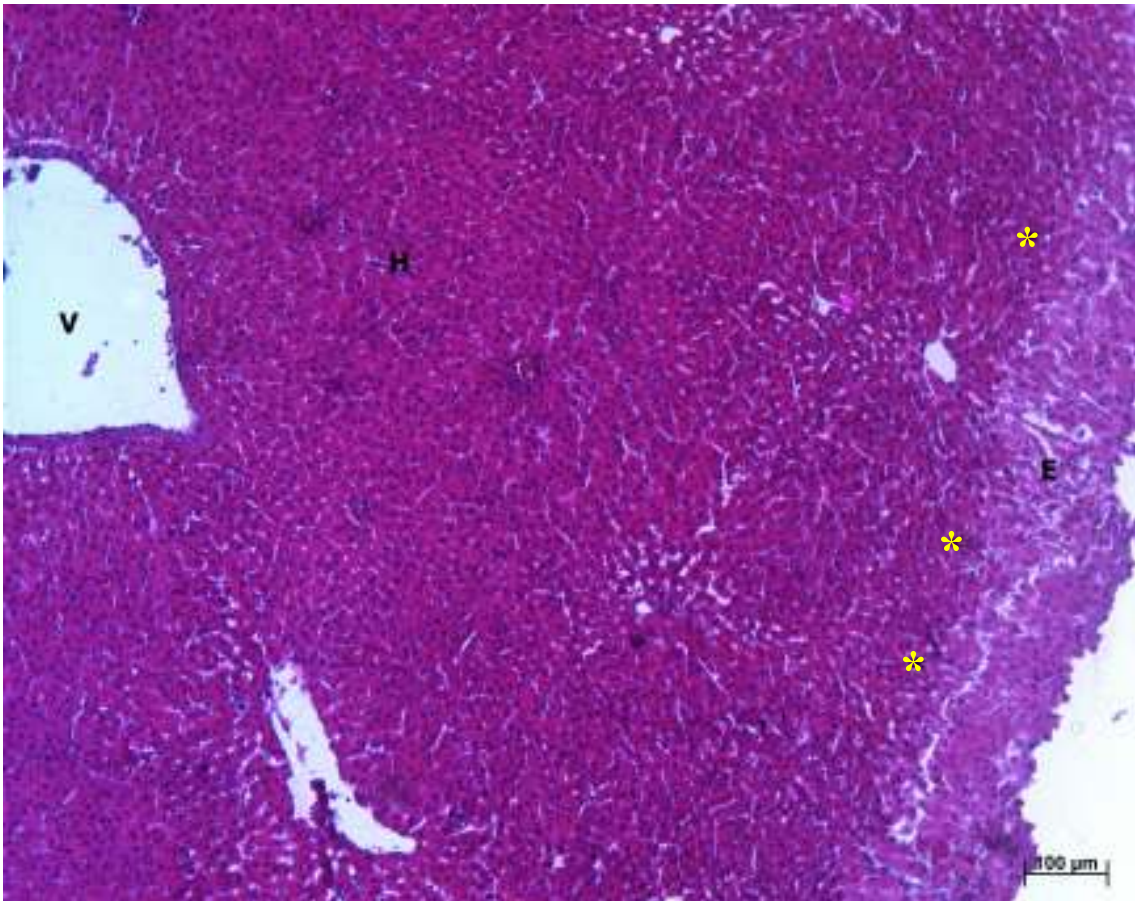


Figura 22: Fotomicrografia mostrando necrose branda (*) e necrose associada a edema intersticial (E) na margem do tecido no subgrupo 2A. Tecido normal (H) e vênula hepática (V). HE, 100x.

Os animais tratados apenas com TFD (subgrupos 3A, 3B e 3C) apresentaram uma área necrótica com presença de infiltrado inflamatório e focos inflamatórios, bem como hemorragia intersticial. Ilhas de tecido normal foram observadas na área necrótica e em torno do espaço porta para alguns animais (Figura 23).

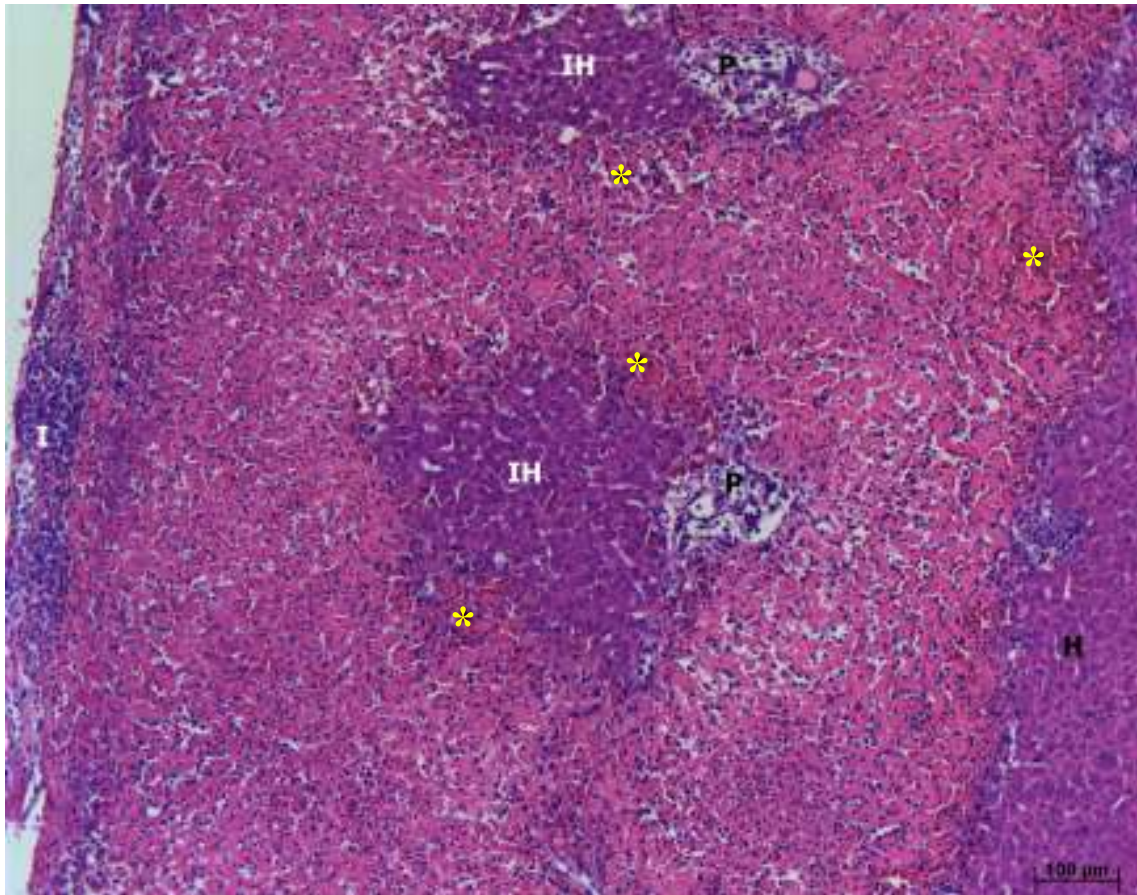


Figura 23: Fotomicrografia de um animal do subgrupo 3A com infiltrado inflamatório (I) na margem do tecido e mais profundamente edema intersticial envolvendo duas ilhas de tecido hepático normal (IH) apresentando focos de hemorragia na sua margem (*). Espaço porta (P) e hepatócitos normais (H). HE, 100x.

Os subgrupos 4A, 4B e 4C, em que a TFD foi realizada antes da ablação com o laser de CO₂, apresentaram uma extensa necrose com edemas intersticiais graves difusos e focais na margem do tecido, além de estase vascular com presença de neutrófilos e leucócitos no lúmen dos vasos (Figura 24).

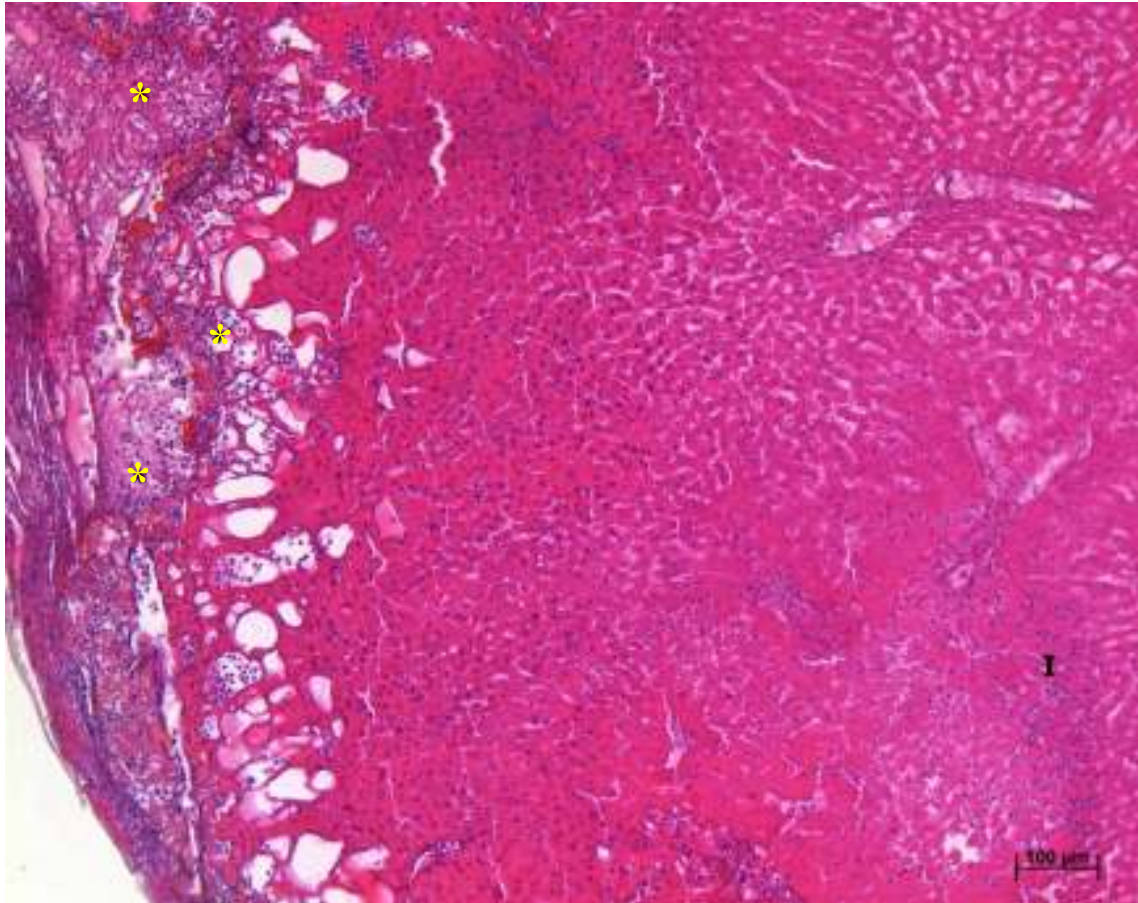


Figura 24: Fotomicrografia das lesões observadas no subgrupo 4B. Área de necrose associada a focos inflamatórios (I) e a edema intersticial ao redor de vênula hepática (região superior direita). À esquerda, margem com extensa área de edema e de infiltrado inflamatório (*). HE, 100x.

Nos subgrupos em que a ablação a laser de CO₂ foi seguida pela fotossensibilização e TFD (subgrupos 5A, 5B e 5C) apresentaram uma vasta região de necrose associada com edemas intersticiais difusos e focais que se estendem profundamente no fígado até a margem do tecido normal (figura 25).

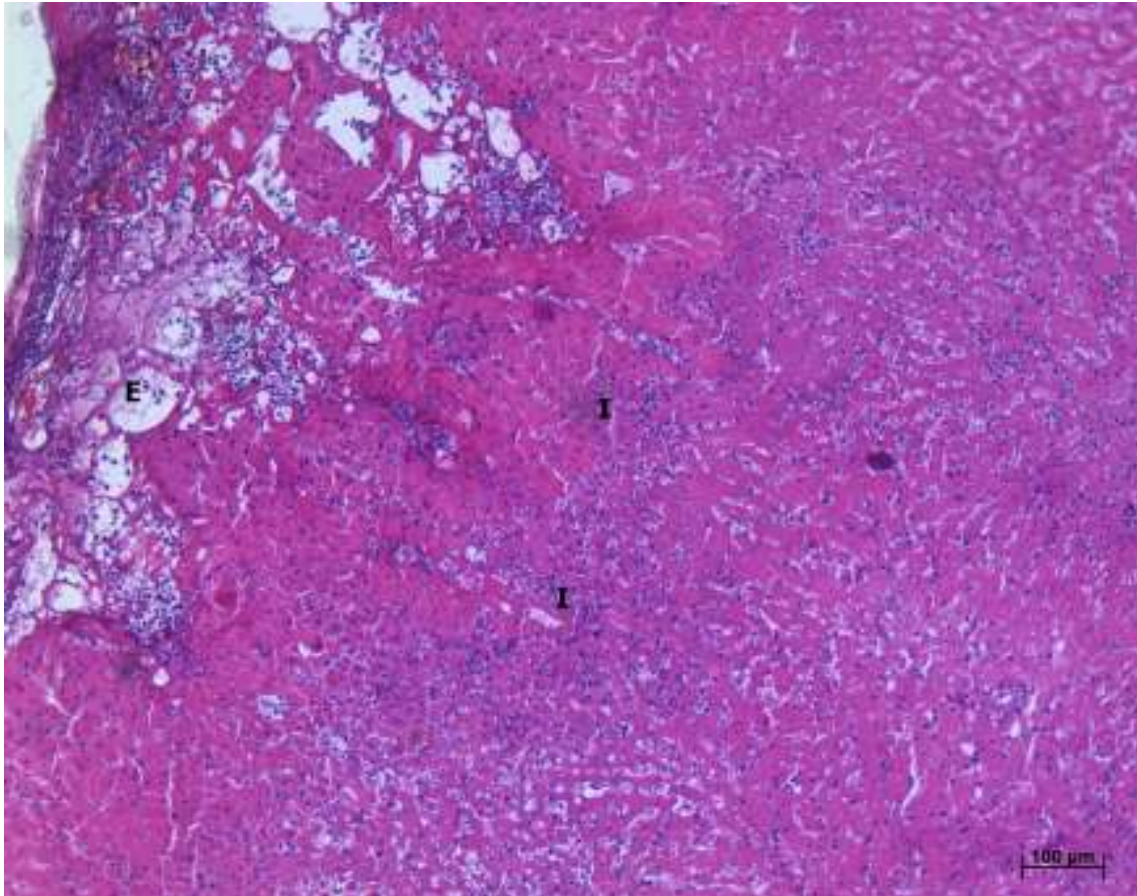


Figura 25: Fotomicrografia do tecido hepático no subgrupo 5A com a presença de um extenso edema na margem do tecido (E) e infiltrados inflamatórios (I) em meio à área de necrose e edema intersticial. HE, 100x.

Quando a ablação por laser de CO₂ foi realizada após a fotossensibilização e antes da TFD (subgrupos 6A, 6B e 6C), a análise histopatológica mostrou focos de hemorragia e inflamação em uma extensa área de necrose com grave edema intersticial focal na margem do tecido normal. É importante notar a presença de necrose e infiltrado inflamatório ao redor das vênulas hepáticas (centrolobular) e espaço porta, predominantemente no grupo 6B (Figura 26).

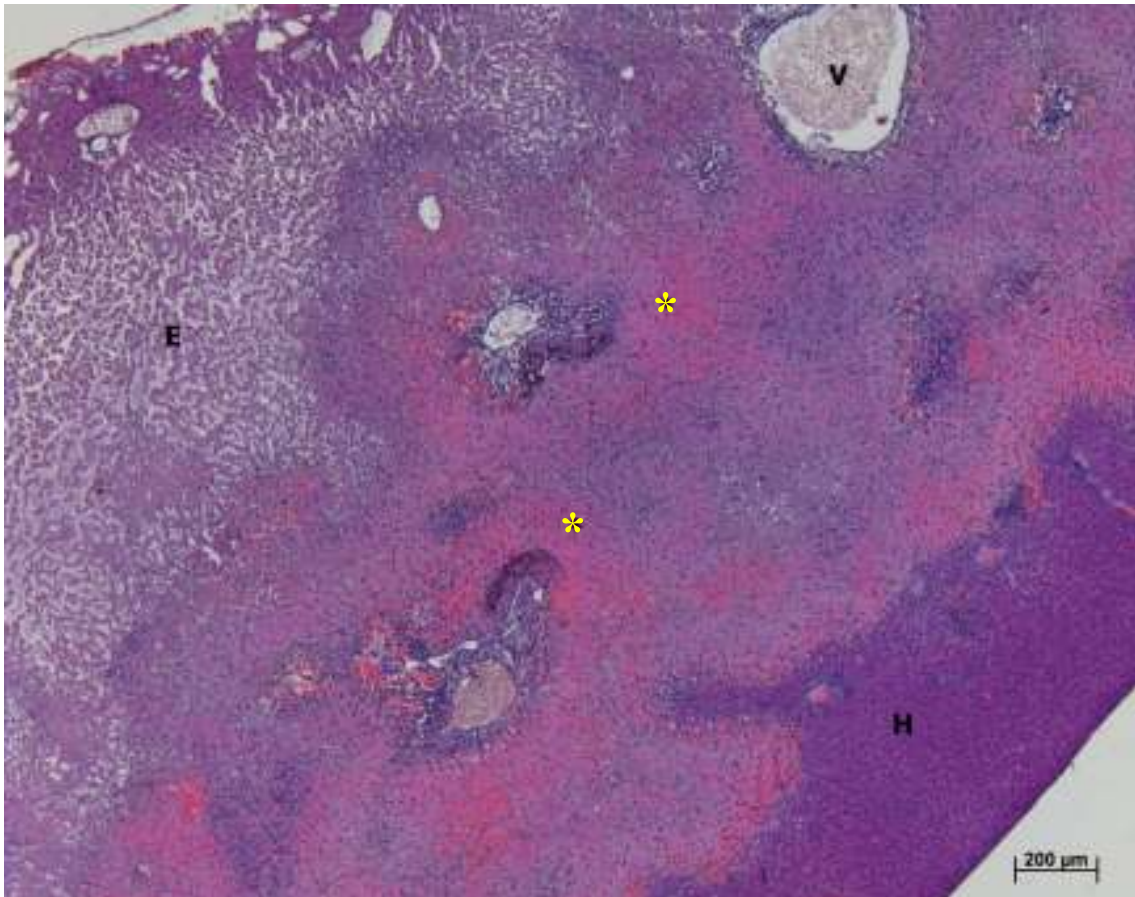


Figura 26: Fotomicrografia de um animal do subgrupo 6B mostrando área de necrose associada a extenso edema intersticial difuso (E) e focos hemorrágicos (*) na área de necrose. Tecido normal (H) e vênula hepática (V). HE, 50x.

Além disso, os subgrupos 6A, 6B e 6C apresentaram necroses mais intensas com alterações histopatológicas mais evidentes. Por outro lado, se compararmos as três condições de tratamento com as técnicas combinadas, menores alterações histológicas foram observadas nos subgrupos 4A, 4B e 4C.

4.1.2 Laser de Diodo

A realização da ablação do tecido hepático com o laser de Diodo de alta potência no comprimento de onda de 810 nm apresentou adversidades. Durante a varredura do fígado dos animais observou-se lesões de diferentes intensidades, como mostra a figura 27. Com exceção do subgrupo em que foi realizada primeiro a fotossensibilização do animal, seguida da TFD e por último o laser de Diodo, em que a lesão foi mais homogênea, nos demais grupos, o dano apresentado foi similar ao observado no subgrupo 1, somente ablacionado com o laser.

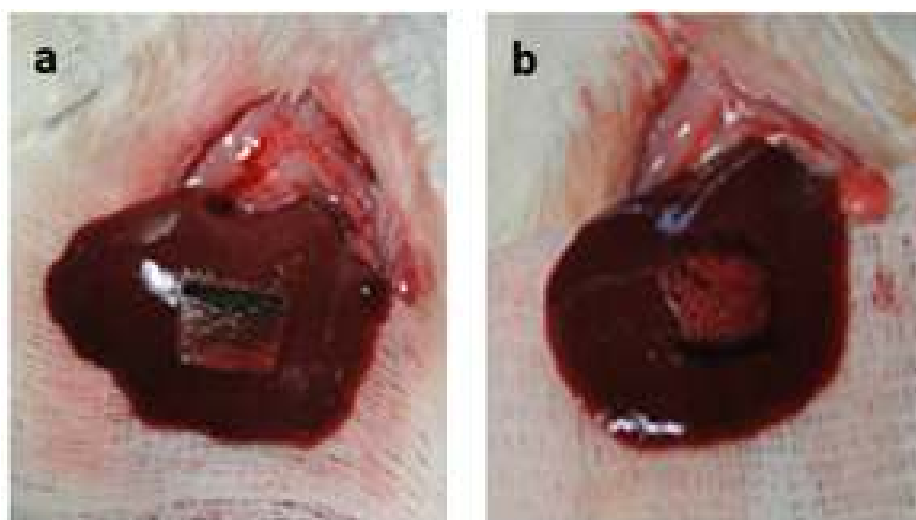


Figura 27: Imagens dos fígados dos ratos ablacionados com o laser de Diodo. Na figura 27a, nota-se um dano com graduações, sendo mais intenso na região superior, com presença de carbonização, e menos intenso mais inferiormente. . Na figura 27b, tem-se o fígado de um animal após o tratamento com a TFD, seguido da irradiação com o laser de Diodo. Nota-se uma necrose mais homogênea, sem evidência de carbonização.

A análise morfométrica da profundidade de necrose realizada nas lâminas histológicas gerou o gráfico apresentando na figura 28. Nele encontram-se os valores médios das profundidades de necrose obtidas para o grupo laser de Diodo.

É possível observar para os tratamentos com as técnicas isoladas que, quando o tecido foi previamente fotossensibilizado, a necrose provocada pelo laser de Diodo foi relativamente mais profunda do que a necrose causada somente pela ação do laser em tecido hepático sem a presença de fotossensibilizador. Além disso, que os valores obtidos para o subgrupo 1 foram superiores aos encontrados para o subgrupo 3A e 3C.

Outros dados relevantes presentes na figura 28 estão relacionados aos tratamentos com as técnicas combinadas. De modo geral, as técnicas combinadas mostraram melhor desempenho em relação às técnicas isoladas para todos os fotossensibilizadores testados. Comparando as técnicas combinadas, notamos que tanto para o ALA i.v. quanto para o Photogem®, os subgrupos 4 e 5 apresentaram melhores resultados que o subgrupo 6, com uma tendência a superioridade para o subgrupo 5, no qual o laser foi realizado antes da TFD. No entanto, o padrão apresentado para o ALA tópico foi um pouco diferente. O subgrupo que apresentou as maiores profundidades de necrose foi o subgrupo 6A, no qual o FS foi aplicado antes da irradiação com o laser de Diodo e, em seguida, foi realizada a TFD. Já os subgrupos 4A e 5A não mostraram uma diferença significativa entre os valores de profundidade de necrose obtidos.

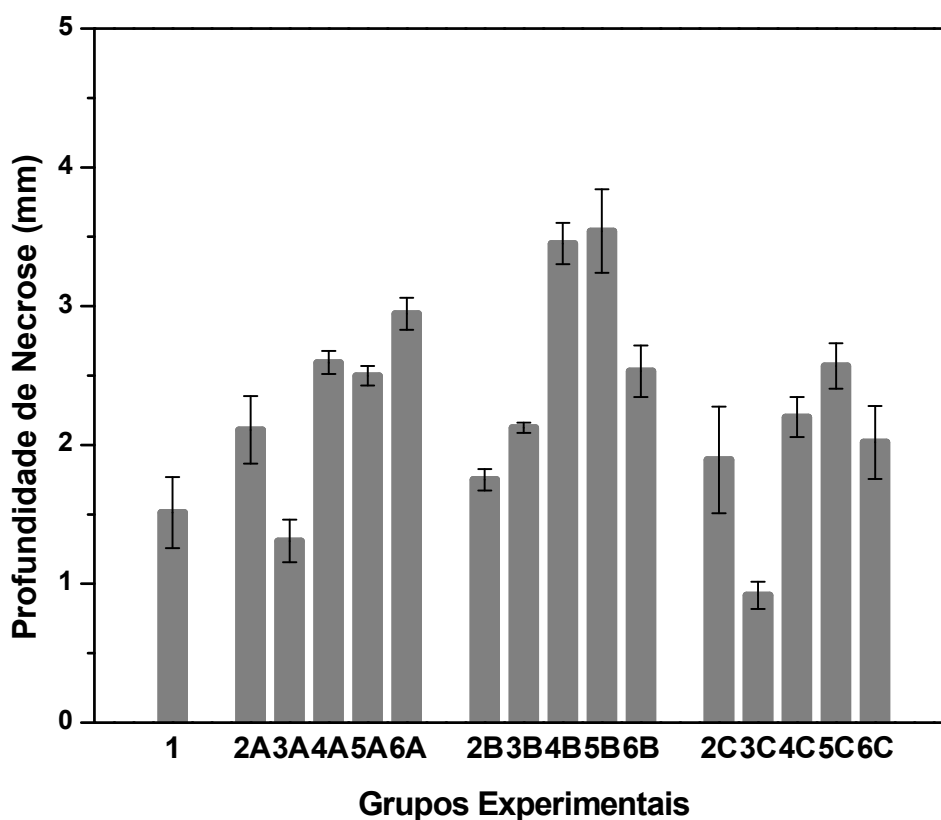


Figura 28: Valores médios das profundidades de necrose obtidas para cada subgrupo do grupo laser de Diodo.

As mesmas lâminas histológicas utilizadas na análise morfométrica da necrose foram utilizadas para realização de uma classificação histopatológica das lesões

observadas. A tabela 6 mostra uma classificação qualitativa das lesões histológicas observadas nos subgrupos do grupo laser de Diodo.

Tabela 6: Classificação dos tipos de lesões observadas nos subgrupos do grupo laser de Diodo.

Grupos Experimentais	Np	Tipos de Lesões				Total
		H	Ed	Ef	I	
1	2	1	2	1	1	7
2A	2	1	2	1	1	7
3A	2	2	2	1	2	9
4A	3	3	3	2	2	13
5A	3	2	2	1	2	10
6A	3	1	2	2	2	10
2B	3	2	1	1	2	9
3B	3	2	2	2	2	11
4B	3	2	2	2	3	12
5B	3	2	3	2	2	12
6B	3	2	3	2	3	13
2C	2	2	1	1	2	8
3C	2	2	2	1	2	9
4C	3	3	2	2	2	12
5C	3	1	3	2	2	11
6C	3	1	3	2	2	11

* necrose parenquimatosa (np), hemorragia(h), edema difuso (ed), edema focal (ef) e infiltrado neutrofílico (I)

** leve (1), moderada (2) e grave (3)

Segundo a classificação histopatológica apresentada na tabela 6, os subgrupos tratados com as técnicas combinadas mostraram danos mais intensos do que os grupos tratados com as técnicas isoladas. Além disso, quando se observa cada fotossensibilizador, os subgrupos que mostraram maior gravidade para as lesões analisadas foram o 4A, 6B e 4C, destacados em vermelho, sendo que nos subgrupos 4A e 4C predominaram lesões graves.

O estudo histológico realizado nas mesmas lâminas utilizadas para análise morfométrica da necrose mostrou extensas áreas de necrose parenquimatosa em todos os subgrupos estudados. Também foram constatadas nas regiões de lesões, vazamento microvascular causando edema; reação inflamatória aguda; destruição do parênquima hepático e destruição dos vasos sanguíneos com extravasamento hemorrágico no interstício. Esses acometimentos podem ser vistos nas figuras a seguir (Figuras 29-33).

O subgrupo tratado somente com o laser de Diodo apresentou extensa área de necrose composta por células necróticas com perda de basofilia e núcleos picnóticos, além de infiltrado inflamatório na margem do tecido e hemorragia na superfície e mais profundamente. Observa-se, também, uma região com grandes vacúolos próximos a região superficial do tecido representando o dano térmico ocorrido.

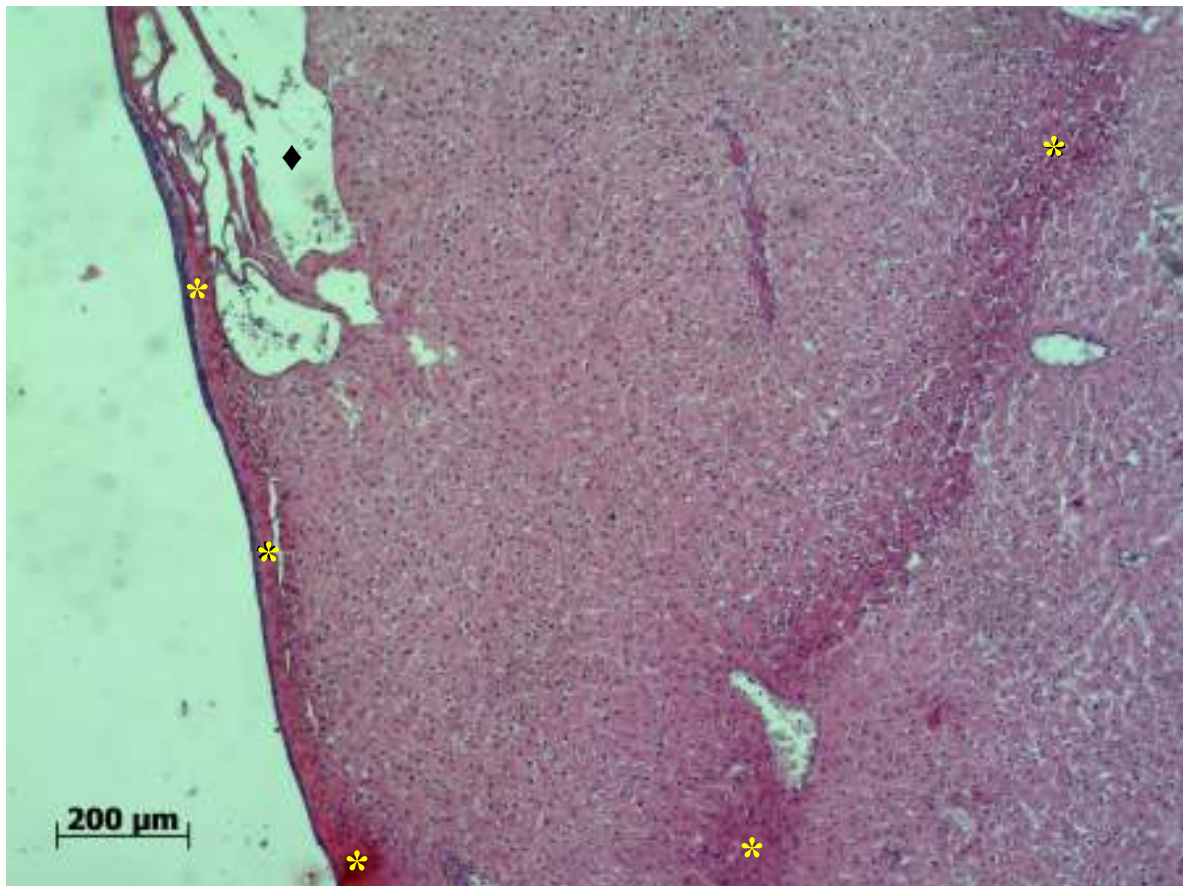


Figura 29: Fotomicrografia da margem da necrose do subgrupo 1. Acima e à esquerda têm-se grandes vacúolos resultantes do dano térmico (◆). Na superfície e mais profundamente estão as regiões hemorrágicas (*). HE, 50x.

Nos animais fotossensibilizados e ablacionados com o laser de Diodo, de modo geral, pode-se visualizar algumas alterações na borda do tecido hepático, tais como focos inflamatórios e infiltrado inflamatório em meio ao tecido necrótico, além de hemorragia intersticial tanto na área necrótica quanto na margem entre necrose e tecido hepático normal.

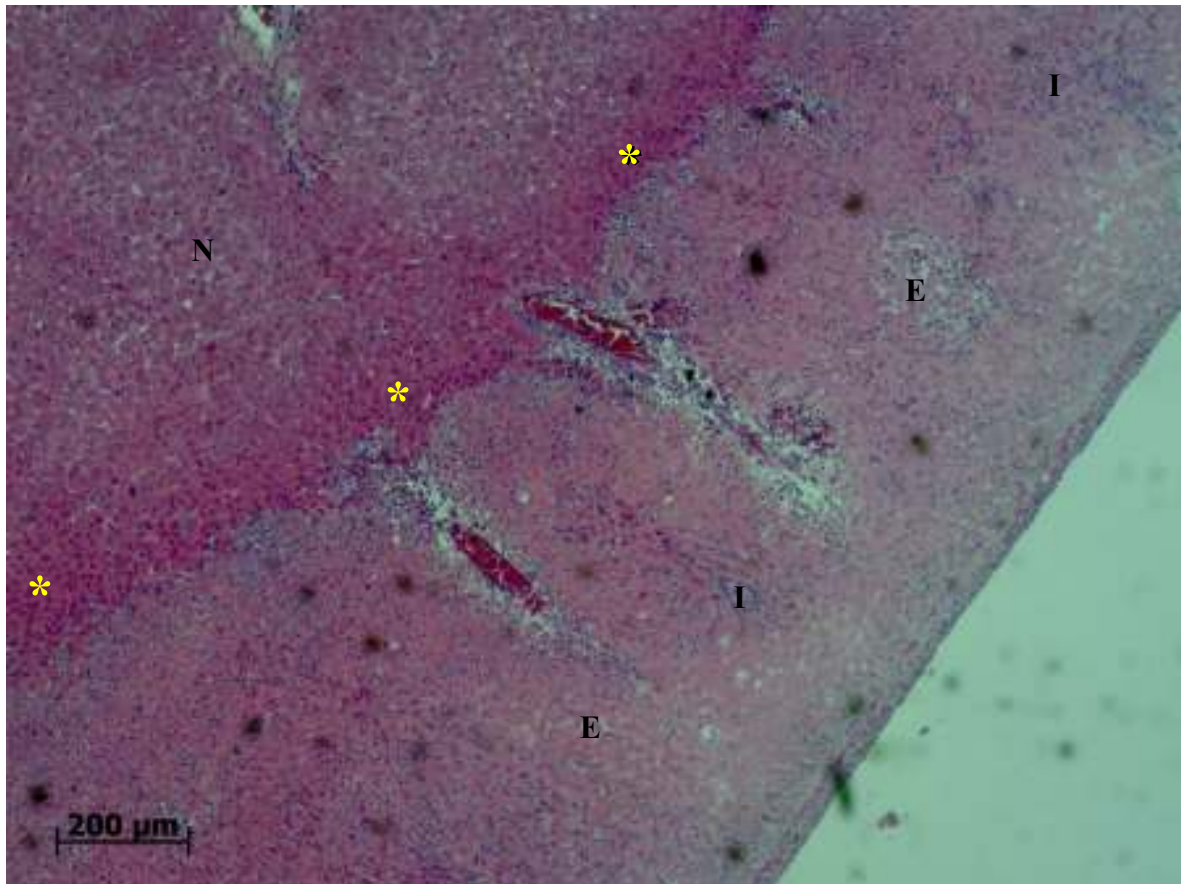


Figura 30: Fotomicrografia da margem da lesão no subgrupo 2B com focos de infiltrado neutrofílico (I), edemas focais (E) e área de hemorragia (*), seguida pelo tecido hepático normal (H). HE, 50x.

Dentre os subgrupos tratados com TFD antes do procedimento ablativo, o que mostrou uma necrose com maior gravidade foi o 4A. Na análise histológica, observou-se intenso processo inflamatório, com extensa área de necrose e vários focos de hemorragia e de focos infiltrado neutrofilico, e edema intersticial difuso.

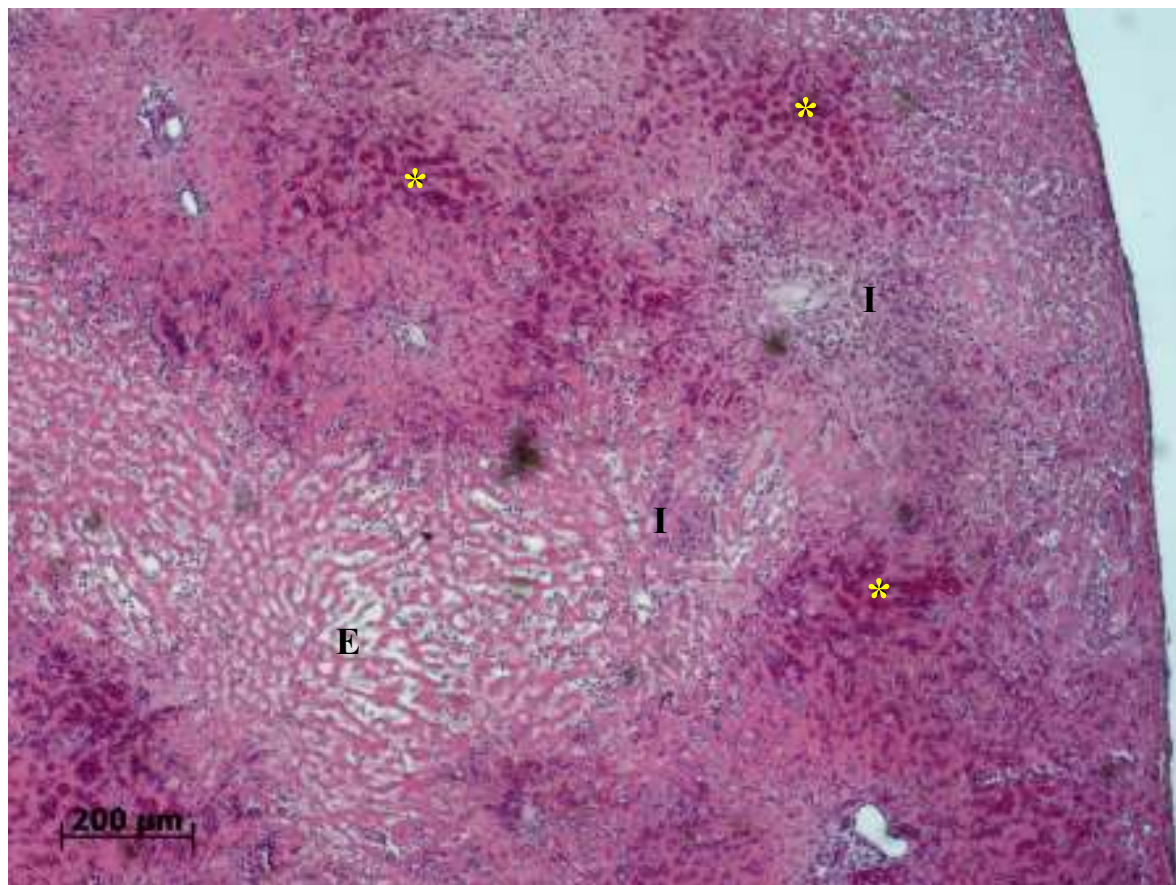


Figura 31: Fotomicrografia do subgrupo 4A. Na figura, observa-se a área necrosada com presença de focos hemorrágicos (*), de infiltrado neutrofilico (I) e regiões com edema (E).HE, 50x.

Os animais fotossensibilizados, e ablacionados antes da TFD apresentaram uma necrose extensa com lesões que evidenciam um processo inflamatório intenso, com edema intersticial difuso, extravasamento de hemácias e hemorragia intersticial, e presença de infiltrados neutrofilicos.

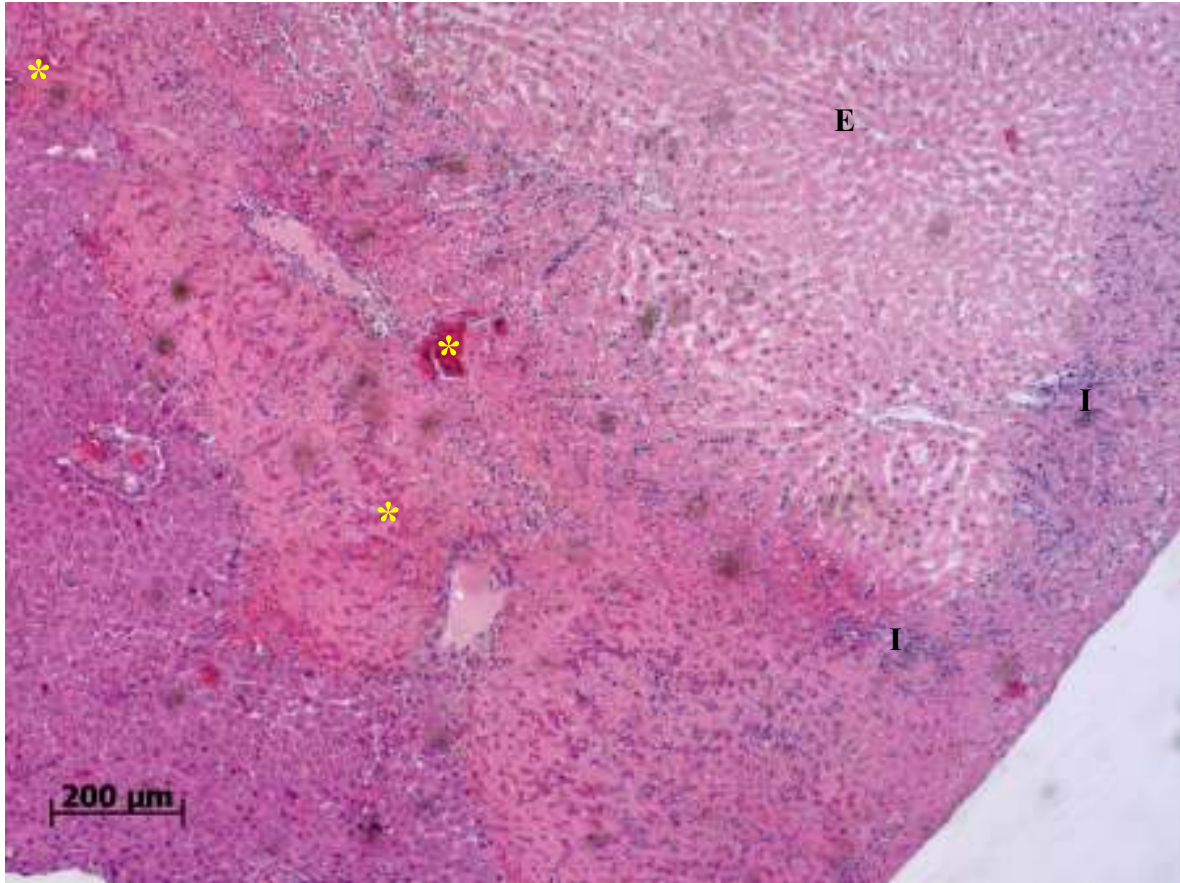


Figura 32: Fotomicrografia da necrose observada no subgrupo 5B. Nota-se na região de necrose edema intersticial difuso (E), regiões de hemorragia (*) e infiltrado neutrofilico (I), HE, 50x.

A maioria dos animais dos subgrupos que passaram pelo procedimento de ablação antes da TFD apresentou uma necrose parenquimatosa bastante extensa. No entanto, a gravidade das lesões variou um pouco. Na figura 33 observa-se a margem do parênquima necrosado do subgrupo 6C, com intenso edema difuso e focos de infiltrado neutrofílico.

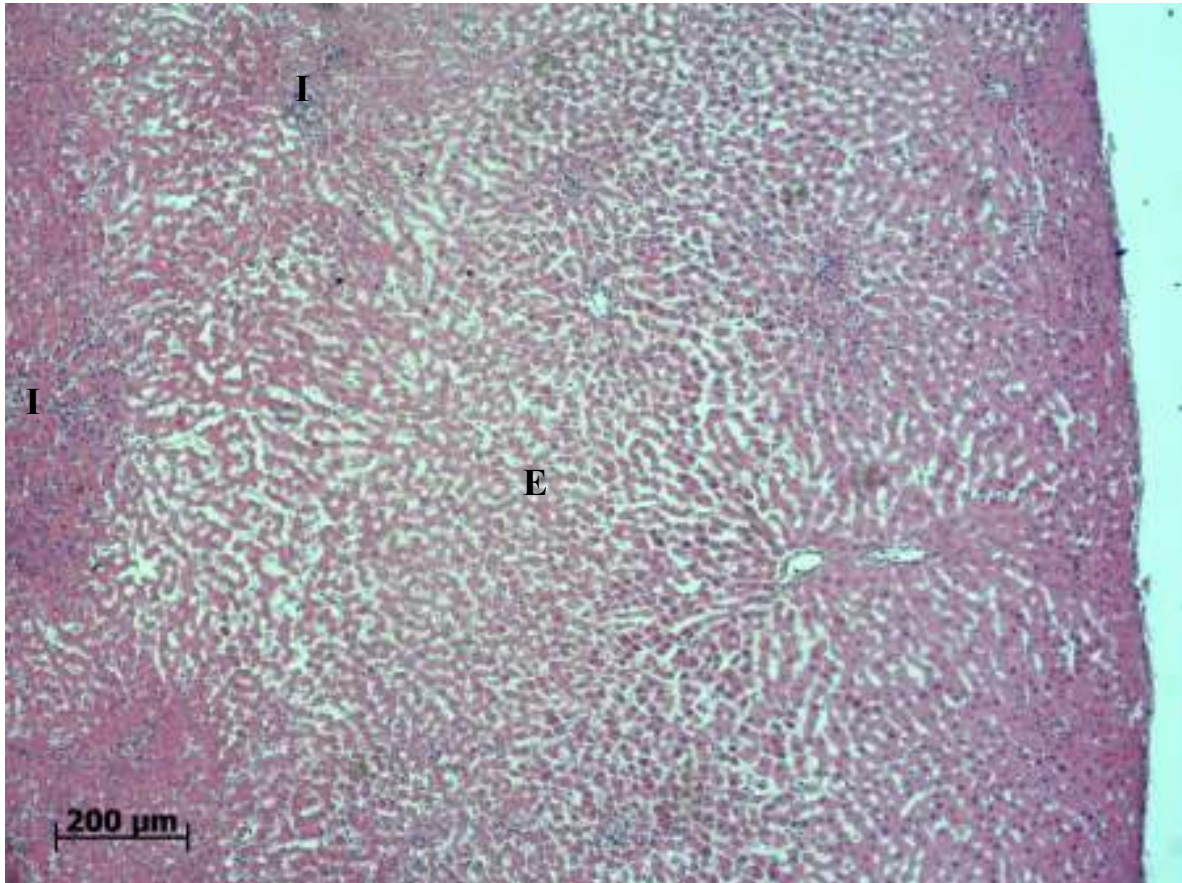


Figura 33: Fotomicrografia do parênquima hepático no subgrupo 6C com focos inflamatórios (I) em meio à extensa área de necrose (N) e edema intersticial (E). HE, 50x.

4.3 DISCUSSÃO

Primeiramente, é importante ressaltar que o presente estudo não teve por objetivo realizar um estudo comparativo do uso de diferentes drogas, uma vez que cada fotossensibilizador tem características específicas. Além disso, foram utilizados em diferentes concentrações, variados DLI e vias de administração distintas.

Enquanto que o ALA foi administrado topicamente a 16%, com um DLI de 2 horas e 45 minutos, e intravenosamente na concentração de 200mg/kg com um DLI de 6 horas e meia, o Photogem[®] foi administrado também intravenosamente, mas na concentração de 1,5mg/Kg e com um DLI de 30 minutos.

Portanto, foram comparadas as médias de profundidade de necrose obtidas somente dentre os subgrupos tratados com as diferentes técnicas isoladas e combinadas para cada FS utilizado, a fim de se propor um protocolo de tratamento para tumores volumosos.

4.3.1 Laser de CO₂

As imagens macroscópicas com iluminação UV mostram uma degradação do FS provocada pelo laser de CO₂ que pode ser considerada meramente superficial. Nenhum dano grave profundo pôde ser observado para qualquer uma das drogas estudadas. Portanto, a ablação provocada pelo laser não alterou a integridade do FS na profundidade do tecido, permitindo que esse se mantivesse presente durante os demais procedimentos.

O aumento observado nas profundidades de necrose no fígado, que tinham sido fotossensibilizados após ablação por laser de CO₂ pode ser devido ao efeito dos FSs no escuro. Este acréscimo é menos pronunciado para o ALA tópico, o que pode estar relacionado às diferentes vias de administração e concentrações das substâncias.

Ao comparar os subgrupos 5A e 6A, notou-se um aumento da profundidade de necrose no subgrupo 5A, o que pode ser o resultado da facilitação da penetração da droga no tecido, causada pela ablação de laser de CO₂, uma vez que o FS foi administrado após o procedimento de ablação. Este achado está de acordo com estudos reportados na literatura que têm mostrado que a ablação com laser de CO₂ pode facilitar a entrega da droga no tecido, aumentando a sua penetração [116-117].

Para ambos, ALA intravenoso e tópico, os resultados sugerem que o aumento considerável na profundidade de necrose, resultante das técnicas combinadas em comparação com o tratamento com técnicas isoladas, pode ser uma consequência da ação sinérgica entre dano térmico, promovido pelo laser de CO₂ e resposta fotodinâmica, resultante do tratamento com a TFD.

Estes resultados indicam possibilidade de fotossensibilização do tecido e realização da ablação a laser seguida pela TFD sem comprometer o desempenho global. Vale observar que, mesmo com a alteração da superfície do tecido pela ablação, a penetração da luz parece não ter sido seriamente comprometida.

O comportamento do Photogem[®] no organismo após a sua administração pode explicar a pequena diferença na profundidade de necrose para os tratamentos realizados no fígado. Após 30 minutos de administração, quando o fígado foi irradiado, a maior concentração do FS encontrava-se, provavelmente, nos vasos sanguíneos. Se o intervalo entre a administração da droga e a iluminação fosse maior, poderia ter havido uma melhor distribuição do fotossensibilizador nos hepatócitos, e conseqüentemente, o Photogem[®] resultaria em uma necrose mais profunda.

O laser de CO₂ emite radiação no comprimento de onda de 10,6 µm. Nessa região do espectro ocorre intensa absorção pelos tecidos biológicos que convertem a luz infravermelha em calor localizado [118]. A energia térmica pode agir localmente ou na região circundante.

A profundidade da necrose normalmente resulta da atenuação da luz enquanto penetra no tecido e à existência de uma dose limiar [38]. Em nosso estudo, o desempenho do tratamento com TFD isolada (subgrupos 3A, 3B e 3C) são basicamente os resultados da necrose resultante apenas da penetração de luz. No subgrupo 3B a maior concentração da droga administrada pode ter levado a uma produção de PpIX mais eficiente e, com isso, este FS deve ter alcançado maior profundidade no tecido o que, associado à irradiação luminosa do local em dose adequada, resultou em necrose mais profunda.

Quando o tratamento com TFD é combinado com o laser de CO₂, o dano celular é potencializado pelo efeito térmico, aumentando a profundidade de necrose. No caso das técnicas associadas, a ordem de tratamento teve influencia nos resultados apresentados. A TFD seguida pela ablação por laser de CO₂ produziu um efeito maior em comparação com os grupos em que TFD foi realizada após a ablação por laser de CO₂. Acredita-se que os danos causados na superfície do tecido após a ablação de laser

de CO₂ promoveu alterações nas propriedades do tecido, o que dificultou a penetração da luz e, conseqüentemente, reduziu o efeito esperado da TFD. Uma forma de diminuir este dano causado sobre a superfície do tecido após a ablação pode ser a utilização de um laser em regime de femtossegundos, já que neste regime é possível obter-se uma ablação mais precisa com um mínimo dano térmico [119]. Conseqüentemente, os fatores que dificultam a penetração da luz poderiam ser amenizados.

Além disso, o tecido saudável foi alterado pela aplicação da TFD, desencadeando um processo inflamatório com extravasamento vascular, o que agirá como "pontos focais" foto-absorventes para o próximo passo, a ablação a laser. Assim, o laser de alta potência interage com esses componentes absorventes, vaporizando-os e provocando um dano térmico mais pronunciado. Este efeito pode ser transmitido para as regiões circundantes.

Os efeitos no local da aplicação podem ser do tipo físico-mecânicos, em que níveis elevados de energia levam à rápida vaporização da água contida nas células como "pequenas explosões" com extravasamento do conteúdo sólido [120-123], ou físico-químico, no qual ocorre desnaturação de proteínas podendo resultar em carbonização do tecido [120]. Esse efeito foi descrito em vários tecidos como fígado, baço, pele, musculo-esquelético, tecido adiposo e lobo da orelha [121-123].

Os efeitos ao redor da área irradiada são causados pela transmissão de calor e propagação do dano térmico as células vizinhas, estendendo-se a necrose a essa região [120]. Alguns investigadores encontraram que uma hipertermia suave (40–42°C) pode agir complementarmente ou sinergicamente com a TFD [124-125]. Esses achados corroboram com nossa hipótese.

De modo geral, os valores de profundidade de necrose foram maiores para os grupos em que o tecido fotossensibilizado foi submetido à TFD previamente ao procedimento ablativo.

A ação do laser de CO₂ provoca alterações teciduais estruturais, que podem dificultar a penetração e a absorção, tanto da radiação quanto do FS, durante a TFD. Conseqüentemente, a resposta fotodinâmica do tecido pode ser prejudicada e a profundidade de necrose reduzida.

No caso do ALA, é importante lembrar que a dinâmica de produção da protoporfirina IX pode ser alterada em função da resposta inflamatória provocada pelo laser de CO₂. Segundo estudos reportado na literatura [126,127], a atividade da via

enzimática de biossíntese do heme celular modifica-se em caso de doenças hereditárias (porfirias), processo inflamatório, condições patológicas e estresse psicológico.

Outro fator que influencia fortemente no resultado final do tratamento com TFD é a concentração de oxigênio molecular. O oxigênio é necessário nas reações fotodinâmicas. A eficiência da TFD é diminuída para metade quando a concentração de O_2 no tecido oxigenado é reduzido [128]. Durante a TFD a concentração de O_2 no tecido é reduzida de duas formas: através de danos do sistema vascular e através do consumo de O_2 nas reações oxidativas locais. Assim, a perfusão sanguínea é um dos principais determinantes para limitação da TFD [56].

Os efeitos térmicos causados pelo laser de alta potência resultam em considerável destruição celular e vascular do tecido, o que pode ocasionar a redução na concentração de O_2 no local e áreas circunvizinhas, prejudicando a resposta da TFD.

A análise histológica revelou mudanças que são características de danos térmicos. De acordo com Mariuzzo [118], a homogeneização e intensificação da eosinofilia do citoplasma e a presença de grandes vacúolos citoplasmáticos pode ser uma indicação de necrose térmica.

Ilhas de tecido normal foram observadas na área necrótica e em torno do espaço porta em alguns animais. Isto também foi observado em outros estudos [38, 115].

4.3.2 Laser de Diodo

Os resultados obtidos mostraram que a ablação com laser de Diodo não ocorreu de forma homogênea. Vários fatores podem ter colaborado para tal irregularidade no dano tecidual, tais como a presença de vasos sanguíneos, as diferenças de espessura no lobo do fígado e a própria respiração do animal, que faz com que a proximidade do feixe de luz ao tecido altere durante a irradiação.

Ademais, houve carbonização do tecido em alguns casos. Sabe-se que a ablação ou vaporização ocorrem a uma temperatura aproximada de $100^\circ C$ e que para ocorrer carbonização é necessário que o tecido atinja uma temperatura superior a $150^\circ C$. Esse aumento exacerbado na temperatura do tecido biológico pode promover a desnaturação de proteínas, e a consequente necrose tecidual [129].

No entanto, a literatura mostra que o laser de Diodo de 830nm e 940nm em modo contínuo provoca carbonização severa em tecido muscular de peru com pouca desnaturação/coagulação protéica na profundidade do tecido [130].

O gráfico referente às médias de profundidade de necrose (figura 28) mostrou que o laser de Diodo utilizado como técnica isolada resultou em uma necrose com profundidade aproximada de 1,5mm.

Além disso, o valor superior de profundidade de necrose média encontrado para o subgrupo 1 em relação aos grupos 3A e 3C mostra que a ablação com o laser de Diodo provoca uma necrose mais profunda do que a TFD isoladamente é capaz de ocasionar.

A ablação pelo laser age promovendo uma oclusão não-trombótica nos vasos, pelo emprego de energia (aquecimento). O endotélio é destruído e o vaso se contrai [104]. No entanto, essa destruição pode ocorrer em regiões que não foram diretamente expostas à radiação. Isso ocorre devido ao transporte do calor gerado no tecido irradiado para as regiões vizinhas e depende das propriedades térmicas do tecido, especialmente a condutividade térmica [76].

No caso do tecido hepático, sua composição pode favorecer a condutividade do calor gerado, devido presença de substâncias condutoras de calor, como os cromóforos ou fotoceptores, por exemplo, a hemoglobina.

Dentre os subgrupos estudados, as maiores médias de profundidade de necrose foram observadas nos subgrupos tratados com as técnicas combinadas. Tal desempenho ocorreu, possivelmente, devido à combinação das necroses provocadas pela TFD e pelo laser de Diodo.

De acordo com a mesma figura 28, as maiores profundidades de necrose foram obtidas para o ALA i.v. e para o Photogem[®] quando a ablação a laser foi realizada como procedimento prévio à TFD. Isso significa que a carbonização ocorrida no tecido não foi prejudicial em termos de profundidade de necrose, mas atuou como coadjuvante no processo de necrose tecidual, colaborando para obtenção de um melhor resultado.

Nos subgrupos fotossensibilizados com o ALA tópico, o resultado apresentado sugere ter havido alguma influência da via de administração do fotossensibilizador, pois diferentemente dos subgrupos fotossensibilizados por via intravenosa, na administração tópica, o subgrupo 6A destacou-se. Neste caso, a ablação a laser foi mais eficaz no tecido previamente fotossensibilizado.

É importante ressaltar que a profundidade máxima de necrose atingida nos subgrupos tratados foi de aproximadamente 3,8mm. Como o laser de Diodo tem penetração de até 3mm sem perda de potência [131-132], a profundidade alcançada neste caso mostra que a combinação das técnicas apresentou um efeito sinérgico.

4.3.3 Comparação entre grupos laser de CO₂ e laser de Diodo

A ablação causada pelo laser de CO₂ exibiu um perfil diferente da ablação com o laser de Diodo. No primeiro caso, notou-se a formação de uma crosta homogênea superficial de tecido ablacionado morto. Já no segundo caso, o tecido apresentou alterações heterogêneas, que variaram de um dano térmico menos pronunciado à carbonização. Provavelmente, o laser de CO₂ é menos suscetível a variações na distância entre a ponteira do laser e o tecido do que o laser de Diodo.

Comparando os resultados de profundidade de necrose apresentados para o grupo laser de CO₂ com os obtidos para o grupo laser de Diodo, observa-se que, apesar de ter sido utilizada a mesma potência média em ambos os lasers testados, a necrose provocada pelo laser de Diodo foi mais profunda que a necrose provocada pelo laser de CO₂, com exceção dos subgrupos 4A, 5A e 4B.

Tal fato pode ser explicado pelo coeficiente de absorção da água, que é um dos principais constituintes dos tecidos biológicos, em 10600nm ser muito maior do que em 800nm (tabela 7). Isso implica numa maior profundidade de penetração para o laser de diodo em 810 nm do que para o laser de CO₂.

Tabela 7: Coeficiente de absorção α e comprimento de absorção L da água em diferentes comprimentos de onda [119].

Comprimento de onda (nm)	Tipo de laser	α (cm ⁻¹)	L (cm)
193	ArF	0.1	10
248	KrF	0.018	55
308	XeCl	0,0058	170
351	XeF	0.0023	430
514	Íon Argonio	0.00029	3400
633	He-Ne	0.0029	340
694	Rubi	0.0056	180
800	Diodo	0.020	50
1053	Nd:YFL	0.57	1.7
1064	Nd:YAG	0.61	1.6
2120	Ho:YAG	36	0.028
2940	Er:YAG	12000	0.00008
10600	CO ₂	860	0.001

4.4 CONCLUSÕES

A análise da eficácia do tratamento realizado neste estudo baseou-se fundamentalmente na profundidade de necrose mensurada nas lâminas histológicas. Foi demonstrado que, para todos os tipos de fotossensibilizadores testados, o tratamento com a TFD é consideravelmente melhorado quando combinado com ablação usando um laser de CO₂ ou um laser de Diodo de 810nm, independentemente da ordem de realização. Especialmente no caso em que a TFD foi realizada antes da ablação usando o laser de CO₂, o tratamento resultou em um aumento significativo na profundidade final da necrose. Já para o laser de Diodo, o tratamento mais eficaz foi notado quando o laser foi seguido pela fotossensibilização com ALA i.v ou Photogem[®] e TFD, bem como para aplicação do ALA tópico com posterior ablação a laser e TFD. Portanto, para o tratamento de tumores mais profundos, sugere-se a utilização da TFD combinada com a ablação a laser, no caso do laser de CO₂ e, se utilizado o laser de Diodo, a TFD deve ser seguida da ablação a laser.

Além disso, para o ALA tópico, a ablação com laser de CO₂ pode melhorar a penetração da droga no tecido, sendo potencialmente aplicável n o tratamento do câncer de pele.

Ademais, a combinação de ablação com um laser de CO₂ ou laser de Diodo, seguido ou precedido por TFD não compromete o resultado final do tratamento. Pelo contrário, a incidência tanto do laser de CO₂ quanto do laser de Diodo no tecido fotossensibilizado potencializa a destruição por meio de um efeito sinérgico causado pela combinação de calor e luz.

5. TFD COM LUZITIN[®]

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 16 ratos *Wistar* machos com aproximadamente 350g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos descritos a seguir (Tabela 8):

Tabela 8: Descrição dos grupos experimentais

Grupos Experimentais	Quantidade de Fotossensibilizador	Intensidade
Grupo Controle	2,0mg/Kg	_____
Grupo Tratado 1	2,0mg/Kg	100J/cm ²
Grupo Tratado 2	2,0mg/Kg	70J/cm ²
Grupo Tratado 3	2,6mg/Kg	70J/cm ²

Os animais foram submetidos a um período de jejum de doze horas, tendo acesso livre à água. Posteriormente, foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução estéril de cloridrato de *ketamina* a 5% (*Imalgene 1000[®]* - *Merial*), na dose de 0,08 ml/100g de massa corporal, associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *xilasina* a 2% (*Rompun[®]* - *Bayer*) na dose de 0,04 ml/100g. A região abdominal do animal foi tricotomizada para reduzir possíveis efeitos de espalhamento da luz, bem como para permitir a irradiação mais precisa do local de interesse.

O fotossensibilizador foi dissolvido na quantidade de 3:1:1 em propileno-glicol:etanol:PBS, e em seguida administrado na veia caudal dos animais na concentração de 2mg/Kg ou 2,6mg/Kg.

O intervalo de tempo entre a administração da droga e a irradiação do tecido hepático foi de 12 horas, determinado com base nos estudos de biodistribuição [64].

Para o tratamento com a TFD foi utilizado como fonte de luz um laser de Diodo modelo model TEC 500, powered by PilotPC 500 Laser Controller (Sacher Lasertechnik, Marburg, Gerhmany) com comprimento de onda de 748nm, fluência de 100 J/cm^2 ou 70 J/cm^2 , potencia média de 70 mW/cm^2 e tempo de 22 minutos e 13 segundo e 16 minutos e 40 segundos, respectivamente. A iluminação foi realizada externamente na região abdominal direita, logo abaixo da última costela.

Uma máscara de papel cartonado com um orifício de 1cm x 1cm foi utilizada para delimitar a área a ser irradiada (Figura 34).

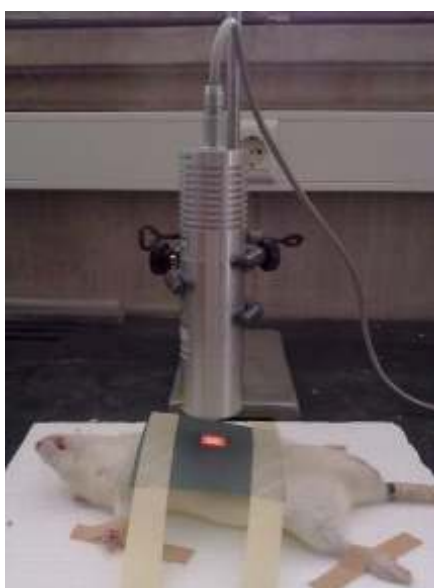


Figura 34: Imagem mostrando animal no momento da irradiação com o laser de Diodo. A fonte de luz foi mantida fixa e o mais perpendicular possível à região abdominal.

Após 30 horas da realização da TFD, os animais foram eutanasiados por *overdose* de anestésico. O fígado foi removido e pesado. Cada lobo foi cortado em fatias de aproximadamente 1 mm, no sentido ântero-posterior para permitir análise da profundidade. As fatias do tecido foram colocadas em frascos plásticos contendo solução de formaldeído 40% (*Formol – Merck*[®]), misturado a uma solução de monofosfato de sódio hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ - *Merck*[®]) e difosfato de sódio hidratado ($\text{Na}_2\text{H}(\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$ - *Merck*[®]) diluídos em água destilada, durante 24 horas para fixação do material, a fim de se iniciar o processo de preparo das lâminas histológicas. Os fragmentos foram então, incluídos em parafina e cortados com o micrótomo em

espessura de 4 μm . O processo de coloração foi realizado pela metodologia padrão com hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas foram fotomicrografadas e analisadas com o auxílio do equipamento CoolScope[®] (Nikon[®]).

A morfometria da necrose foi realizada através de medidas entre a distância da superfície necrosada e o tecido normal adjacente. A profundidade de necrose média atingida para cada grupo tratado foi determinada. Para cada animal foram obtidos quatro a cinco cortes da região aparentemente necrosada e, em cada corte, realizadas três medidas para, então, ser calculada a média.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Análise Macroscópica da Necrose

A análise macroscópica foi realizada através da observação dos aspectos aparentes do fígado.

O grupo controle não apresentou nenhuma alteração morfológica visível, como coloração, tamanho e peso, em nenhum dos lobos do fígado (Figura 35a).

Observou-se a presença de necrose na área irradiada no fígado nos grupos tratado 1, tratado 2 e tratado 3. As alterações foram mais evidentes e mais extensas no grupo tratado 2 (Figura 35 b e c, respectivamente).

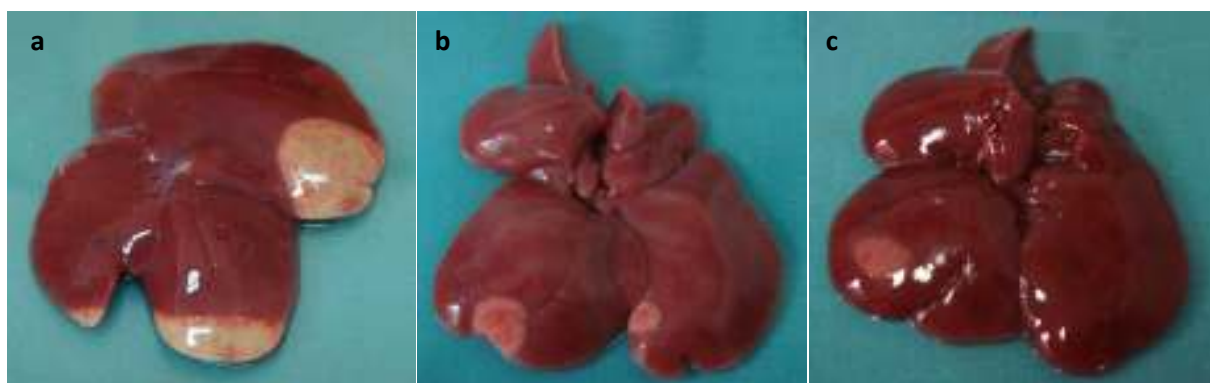


Figura 35: Imagem dos fígados com necrose 30 horas após tratamento com TFD. Em a, observa-se um fígado do grupo Tratado 1, em b, do grupo Tratado 2, e em c, do grupo Tratado 3.

De modo geral, a região de necrose apresentou coloração esbranquiçada predominantemente no lobo direito na porção médio-distal. No grupo tratado 1 a área necrosada foi de aproximadamente 1 cm² e atingiu mais de um lobo. Já no grupo tratado 2, houve a presença, com uma área significativamente inferior ao grupo tratado 1. No grupo tratado 3, a necrose foi evidente, porém com pequena extensão.

5.2.2 Morfometria da Necrose

A análise do gráfico com os valores médios das profundidades de necrose obtidas mostrou que o grupo tratado 1, que recebeu irradiação laser com intensidade de 100 W/cm^2 foi o que apresentou melhor desempenho, seguido pelos grupos tratado 3 e grupo tratado 2 (figura 36).

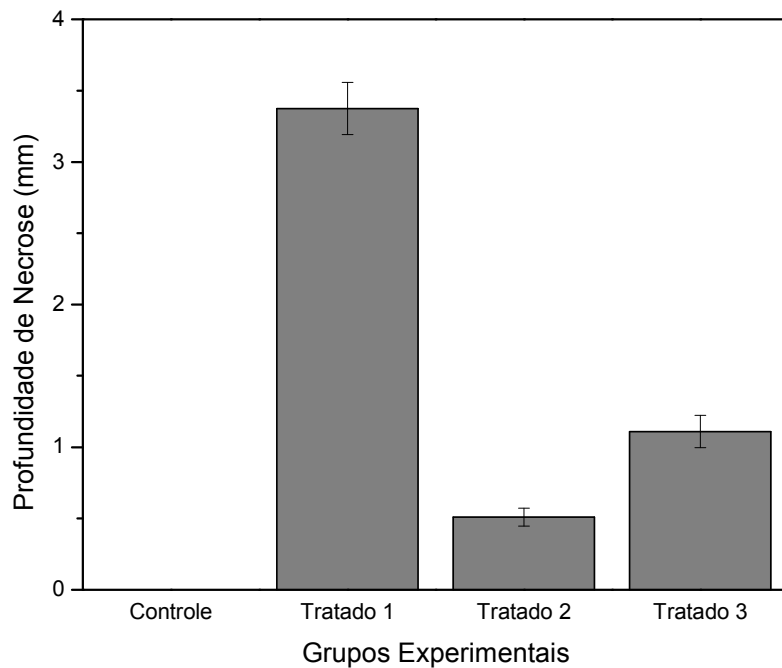


Figura 36: Gráfico com as médias de profundidade de necrose obtidas para os grupos tratados 1, 2 e 3.

5.2.3 Histopatologia da Necrose

A análise histopatológica foi realizada com a finalidade de comparar a intensidade da necrose resultante do tratamento nos diferentes grupos estudados.

Com base nos aspectos microscópicos foi realizada uma classificação subjetiva do grau de severidade da necrose observada.

A tabela 9 apresenta a classificação histopatológica de cada grupo experimental, após avaliação das principais lesões observadas nos animais experimentais.

Tabela 9: Descrição das lesões histopatológicas observadas em cada grupo experimental

Grupos Experimentais	Tipos de Lesões					Total
	NP	H	Ed	Ef	I	
Grupo Controle	0	0	0	0	0	0
Grupo Tratado 1	3	3	3	2	3	14
Grupo Tratado 2	2	2	2	1	2	9
Grupo Tratado 3	1	1	2	1	2	7

* ausente - 0 , leve - 1, moderada - 2 e grave - 3

** NP - necrose parenquimatosa; H - focos de hemorragia intersticial; ed – edema intersticial difuso; ef - edema intersticial focal e; I - focos inflamatórios

O grupo controle apresentou mínimas alterações histológicas na superfície do tecido, porém não houve presença de necrose parenquimatosa, bem como hemorragia, edema e focos inflamatórios. Todos os vasos mantiveram-se completamente preservados.

Nos animais dos grupos tratados, foram observadas algumas alterações histológicas características, com variações desde inflamação e edema brandos à necrose e hemorragia extensas graves. As alterações básicas foram: vazamento microvascular causando edema; reação inflamatória aguda; destruição do parênquima hepático e destruição dos vasos sanguíneos com subsequente hemorragia intersticial.

Assim, serão descritas a seguir as principais alterações observadas em cada grupo experimental.

Grupo Tratado 1

Os animais destes grupos mostraram extensa lesão por necrose, muitas vezes associada a edema intersticial bem evidente. Esta área de necrose apresentou focos hemorrágicos e presença de infiltrado neutrofilico, indicando processo inflamatório, algumas vezes evidente também ao redor das vênulas hepáticas e espaço porta. O endotélio das vênulas hepáticas, veia centrolobular e espaço porta foram completamente ou parcialmente necrosados (Figuras 37 a 40).

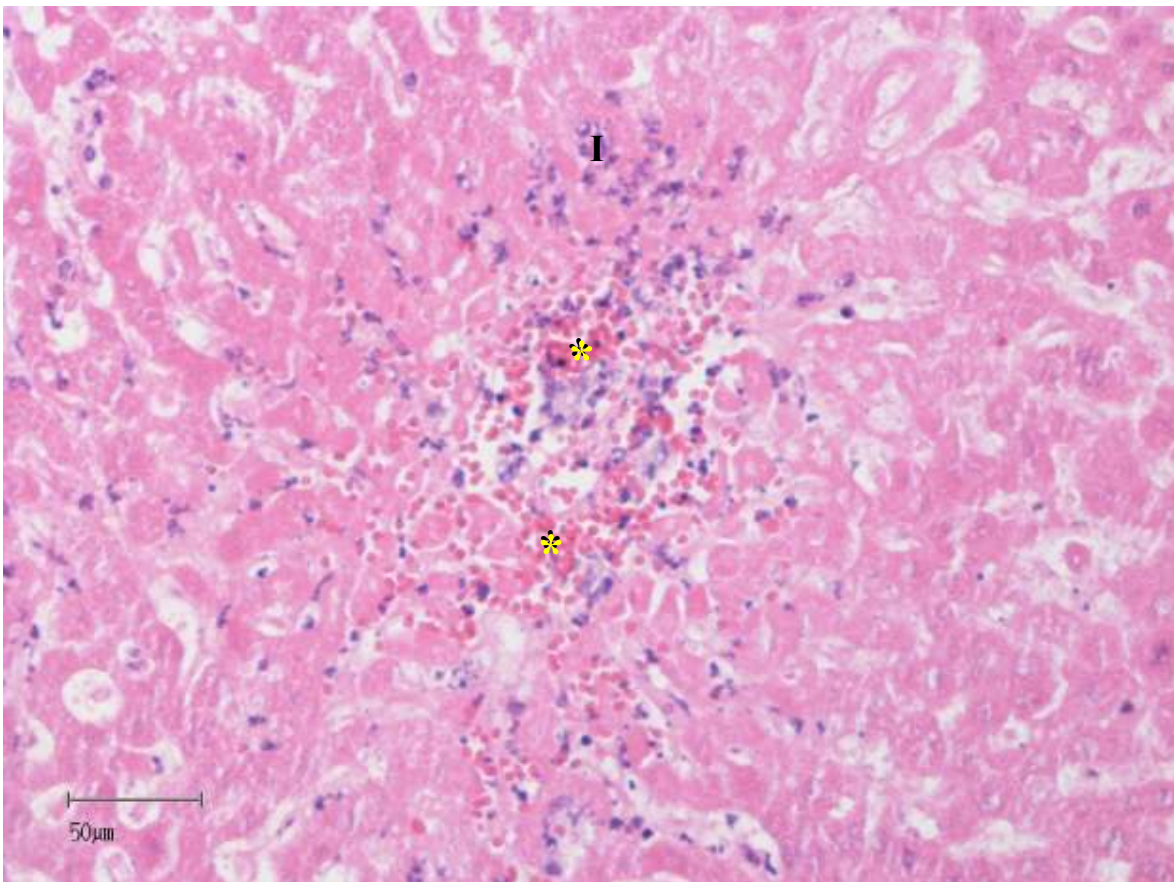


Figura 37: Fotomicrografia mostrando um detalhe da extensa área de necrose com focos de hemorragia (*) e infiltrado inflamatório (I), HE 400x.

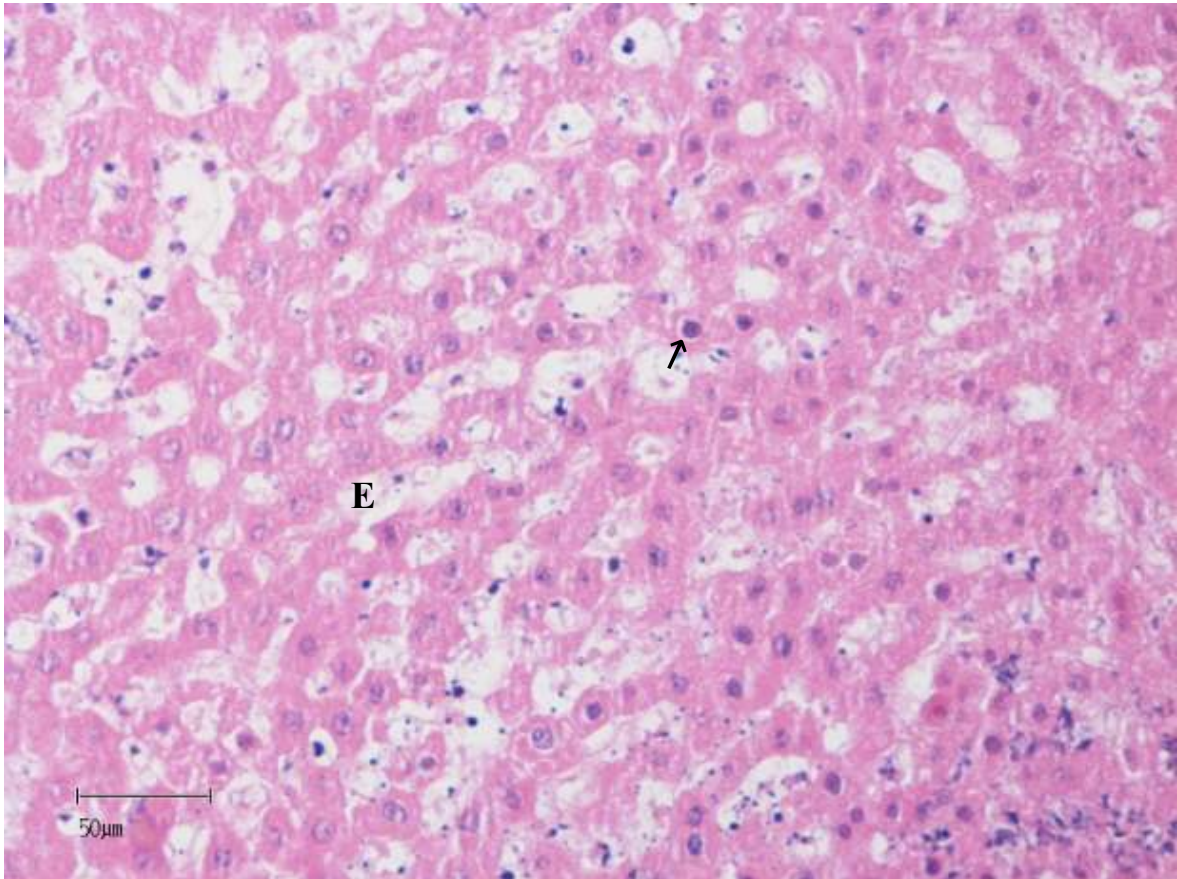


Figura 38: Fotomicrografia da extensa área de necrose mostrando em detalhe a presença de edema intersticial e hepatócitos com perda da basofilia e alguns núcleos picnóticos (↑). HE, 400x.

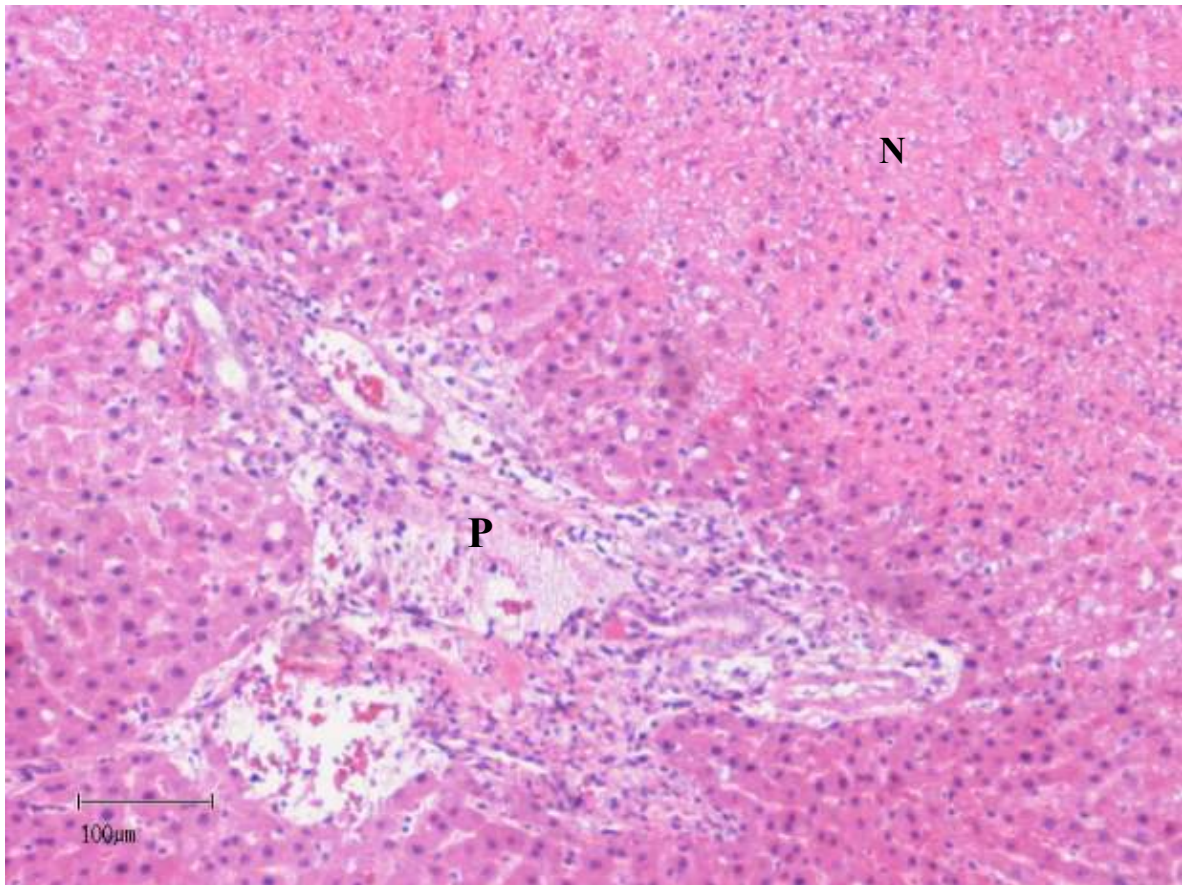


Figura 39: Fotomicrografia mostrando extensa área de necrose e espaço porta com alterações no epitélio na região de transição entre necrose (N) e tecido hepático normal (H). HE, 100x.

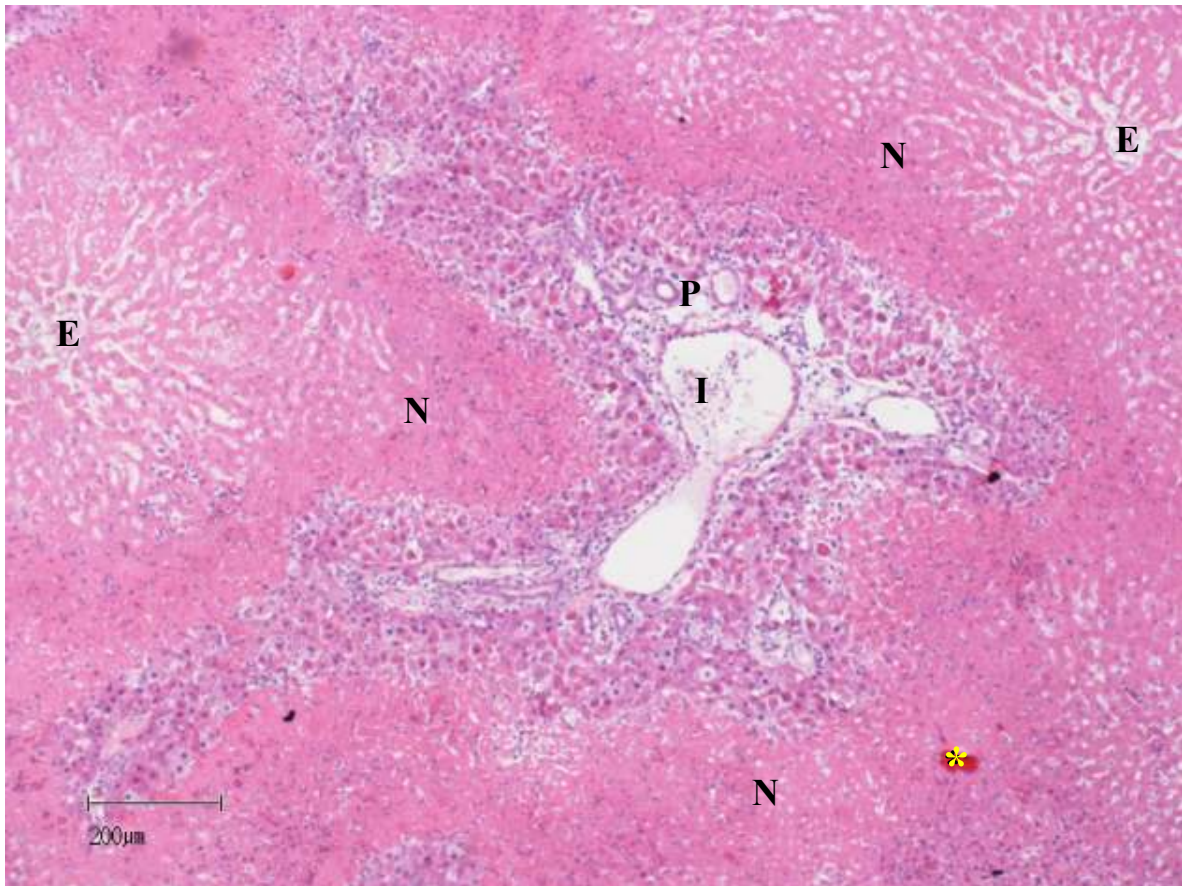


Figura 40: Fotomicrografia mostrando área necrosada (N) com presença de edema intersticial difuso e sinusoidal (E), focos hemorrágicos (*) e detalhe do espaço porta (P) circundado por necrose e infiltrado inflamatório (I) no lúmen, HE, 50x.

Grupo Tratado 2

Neste grupo observou-se predominância de necrose menos extensa e mais superficial, com presença de infiltrado inflamatório, focos hemorrágicos e edema intersticial (Figura 41), porém menos intensos que no grupo Tratado 1.

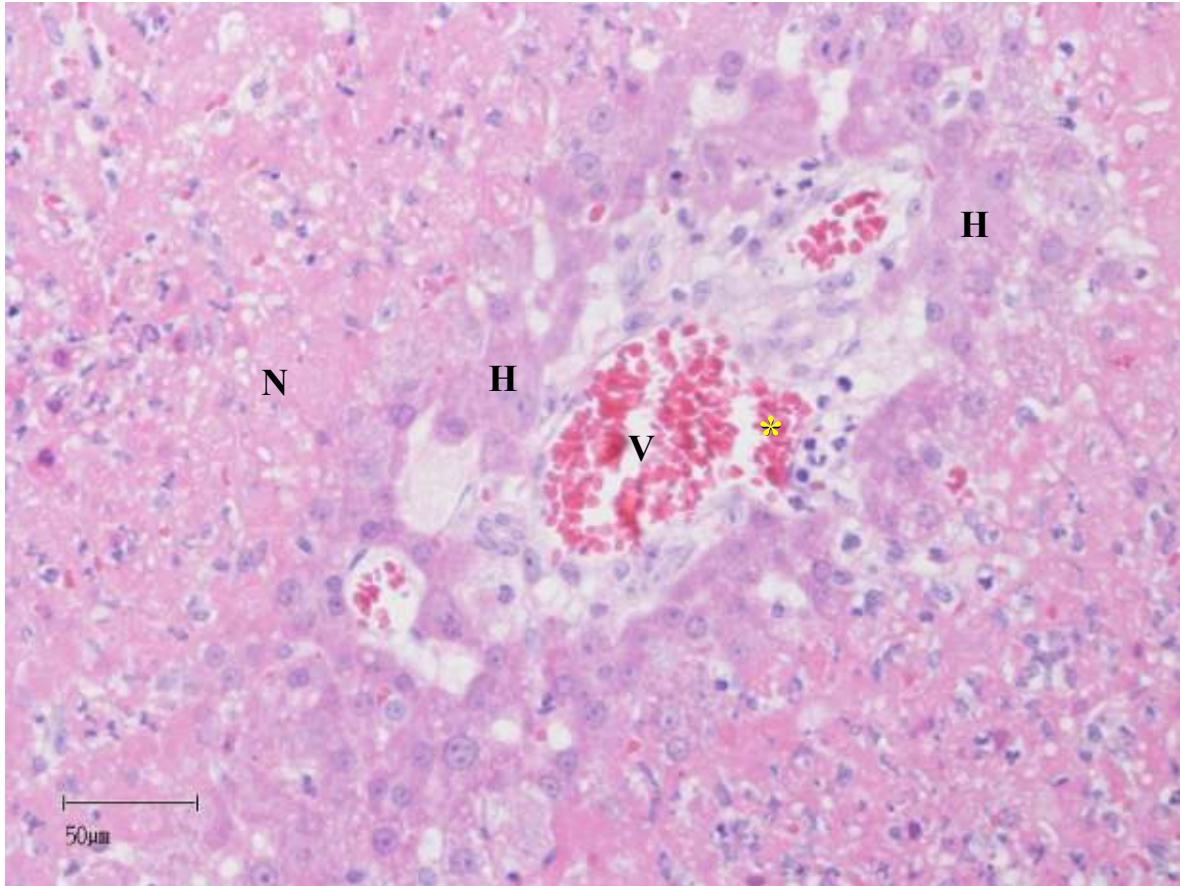


Figura 41: Fotomicrografia mostrando detalhe da vênula hepática (V) na região necrótica (N), circundada por tecido normal (H) com extravasamento de hemácias (*). HE, 400x.

Grupo Tratado 3

A análise histológica deste grupo mostrou características similares ao grupo Tratado 2 com necrose mais branda e menos extensa. Observou-se presença de infiltrado inflamatório, focos hemorrágicos e edema intersticial, porém com menor frequência que o grupo Tratado 1. Algumas vênulas hepáticas tiveram seu endotélio alterado, porém a veia centrolobular e espaço porta mantiveram-se íntegros (Figura 42).

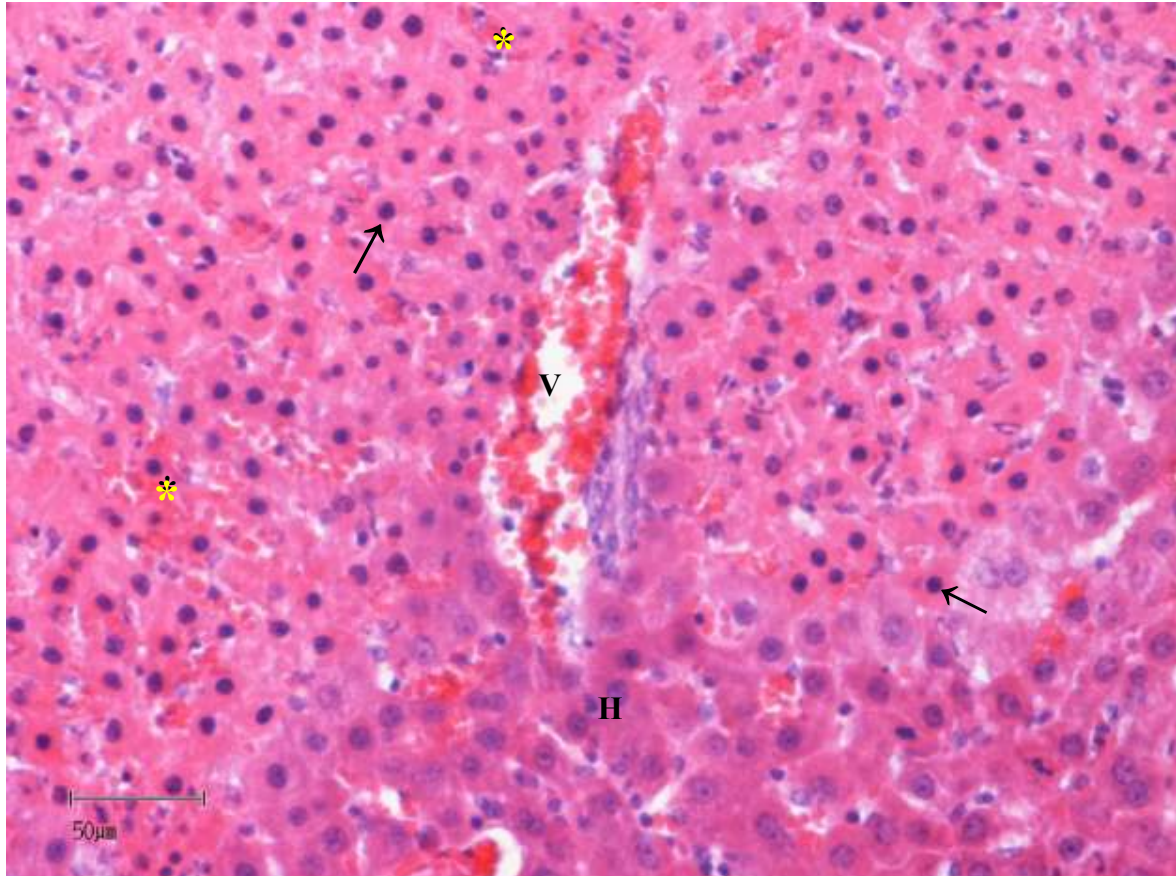


Figura 42: Fotomicrografia da região de transição entre o tecido normal (H) e a necrose (N) com presença de hepatócitos com núcleos picnóticos (↑), focos hemorrágicos (*) e vênula hepática (V). HE, 400x.

5.3 DISCUSSÃO

A necrose é o resultado desejado em TFD. Assim, a fotorreação provocada está correlacionada com a eficiência do tratamento. Portanto, no presente trabalho foi realizado um estudo da necrose resultante da TFD em fígado fotossensibilizado com Luzitin[®] a fim de se estabelecer as melhores condições para realização do tratamento.

De modo geral, o grupo controle não apresentou alterações evidentes tanto em nível macroscópico quanto microscópico. Kramer-Marek et al. [133], em seu estudo com TFD em diferentes linhagens de células incubadas em bacterioclorinas derivadas de porfirinas, concluiu que nenhum dos compostos analisados apresentaram citotoxicidade no escuro nas condições estudadas.

Em relação à análise macroscópica, notou-se que a área de necrose no grupo Tratado 1 foi superior a área irradiada. Esse fenômeno pode ser explicado pela forma de irradiação. Como não foi possível irradiar o fígado de forma perpendicular, provavelmente houve espalhamento da luz gerando uma área necrótica superior a área irradiada.

A análise do gráfico com os valores de profundidade de necrose obtidas no presente estudo mostrou que, dentre as condições estudadas, a que mostrou melhores resultados foi o grupo tratado 1, no qual foi utilizado uma quantidade de FS de 2,0mg/Kg e fluência do laser de 100J/cm².

Com isso, notou-se que um aumento na quantidade do fotossensibilizador não resultou em melhora na resposta fotodinâmica. Possivelmente, a concentração de 2,6 mg/Kg de Luzitin[®] esteja além do valor de saturação. Esses achados corroboram com os estudos de Ferreira [20], que analisou a resposta fotodinâmica em ratos fotossensibilizados com Photogem[®] e observou que as concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mg/Kg superavam o valor de saturação, portanto, não apresentaram diferenças significativas com relação à eficiência do tratamento.

Dessa forma, os resultados de profundidade de necrose sugerem que a eficácia da TFD quando se utiliza o Luzitin[®] como agente fotossensibilizador está diretamente relacionado com a intensidade utilizada, ou seja, este é um fator determinante para a promoção da necrose tecidual. Por isso, quando se reduziu a intensidade utilizada, houve uma resposta fotodinâmica significativamente inferior, resultando em uma necrose com menor extensão e mais branda.

De acordo com Kramer-Marek et al. [133], a sobrevivência das células é dependente da intensidade utilizada. Em seus estudos com células, os mesmos autores observaram que uma redução na intensidade resultou em significativa redução na morte celular.

Outros estudos realizados em animais mostraram a importância da intensidade na TFD. Rego [115], em seu estudo com derivados de hematóporfinas, no qual foi utilizado fluência do laser de 20, 50, 100 e 200J/cm² com irradiação direta no fígado do rato, notou que, quanto maior a intensidade, melhor a resposta fotodinâmica ao tratamento.

Além disso, outro estudo, também realizado em fígado de ratos com irradiação direta, mostrou que, utilizando o Photogem como FS, houve necrose a partir da fluência de 20 J/cm² e a acima de 100 J/cm² não houve alteração na profundidade de necrose. Para o Photofrin, na concentração de 1,0 mg/Kg houve necrose a partir de 100 J/cm², enquanto para a concentração de 2,0 mg/Kg houve necrose a partir de 50 J/cm². Para o Photosan, notou-se necrose a partir de 50 J/cm², para ambas as concentrações e observou-se uma tendência a não existir aumento na profundidade de necrose a partir de 200 J/cm² para as concentrações analisadas [20].

A análise histológica mostrou uma qualidade de necrose relativamente homogênea, com presença de focos hemorrágicos, edema intersticial e infiltrado inflamatório para todos os grupos estudados. Porém, as extensões das lesões variaram principalmente com a intensidade da radiação luminosa e, em menor escala, com a dose do fotossensibilizador, reafirmando assim, que a intensidade do laser é o principal fator para a eficiência do tratamento.

5.4 CONCLUSÕES

O estudo realizado indica que a TFD com Luzitin® tem uma dependência maior da intensidade aplicada do que da concentração de fotossensibilizador administrado.

Além disso, os resultados encontrados mostraram que melhor combinação de parâmetros para a TFD em fígado de rato fotossensibilizado com Luzitin® foi de 100 J/cm² de intensidade e 2,0 mg/kg de concentração do FS.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a TFD seja uma técnica para o tratamento do câncer com inúmeras vantagens em relação a técnicas convencionais, apresenta certa limitação no que diz respeito a sua profundidade de penetração. Por isso, este trabalho pretendeu buscar recursos que viabilizem o aumento da penetração da TFD.

A combinação desta terapia com a cirurgia a laser é uma proposta que permite um maior alcance do tumor. Alguns trabalhos na literatura mostram resultados clínicos positivos da combinação entre cirurgia a laser e TFD. Porém, nenhum deles analisa diferentes condições de associação entre estas técnicas. Portanto, o presente estudo vem a contribuir para se estabelecer um protocolo adequado de associação entre cirurgia a laser e TFD, de modo a obter melhores efeitos no tratamento de tumores maiores e mais profundos. No entanto, vale ressaltar que a escolha do protocolo mais adequado depende de cada caso clínico.

A TFD com o FS Luzitin[®] é também uma sugestão para se aumentar a penetração da técnica. Além disso, a irradiação externa mostrou que é possível atingir um tumor interno sem que haja a necessidade de um procedimento mais invasivo.

Os resultados desta tese foram apresentados no 19th International Laser Physics Workshop (apresentação oral, Foz do Iguaçu, Brasil, 2010), na SPIE Photonics Europe 2010 (apresentação em pôster, Brussels, Belgium, 2010) e no 13th Congress of Society for Photobiology and the 2nd Conference of the European Platform of Photodynamic Medicine (apresentação oral, Wroclaw, Poland, 2009). Ademais, o manuscrito intitulado “In vivo study of necrosis on the liver tissue of wistar rats: A combination of Photodynamic Therapy and Carbon Dioxide laser ablation” está em vias de submissão para revista internacional “Laser Physics”.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira, G. da Silva, J. Ferreira, C. Grecco, V. S. Bagnato, D. Salvadori, N. Rocha - Influence of photodynamic therapy on BCL-2, BAX and HER-2 in breast carcinogenesis - *Cancer Science*. 2012.
2. Grecco C., Moriyama L. T., Cosci A., Pratavieira S., Bagnato V. S., Kurachi C.- Necrosis response to photodynamic therapy using light pulses in the femtosecond regime - *Lasers In Medical Science* 2012, DOI: 10.1007/s10103-012-1216-y.
3. Paolillo F. R., Corazza A. V., Ferraresi C., Aquino Jr., Bagnato V. S. - Phototherapy Applied to Orofacial and Body Motricity: New Perspectives - *Implant News*, v. 9, p. 62-67, 2012.
4. Araujo N. C., Fontana C. R., Gerbi M. E., Bagnato V. S. - Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin - *Photomedicine and Laser Surgery*, Volume 30, Number 2, Pp. 96-101 (2012).
5. L. F. Tirapelli, M. Morgueti, D. P. C. Tirapelli, V. S. Bagnato, J. Ferreira, F. S. Neto, F. M. Peria, H. F. Oliveira, C. G. Junior - Apoptosis in glioma cells treated with PDT - *Photomed Laser Surg* 2011; 29(5):305-309.
6. Inada, N. M. da Costa M. M., Guimarães O. C. C., Ribeiro E. D., Kurachi C., Quintana S. M., Lombardi W., Bagnato V. S. - Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices - *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, p. 1-9, 2011.
7. Pope, A.J. and Bown, S.G. Photodynamic therapy. *Br J Urol*, v.68, n.1, p. 1-9, 1991.
8. Karrer, S.; Szeimies, R.; Houenleutner, U.; Heine, A.; Landthaler, M. Unilateral localized Basaliomatosis – Treatment with Topical Photodynamic Therapy after Application of 5- aminolevulinic acid. *Dermatology*, v. 190, n.3, p.218-222, 1995.
9. Morton, C.A. topical photodynamic therapy in dermatology. *South African medical journal*, v.91, n.8, p.634-637, 2001.
10. Wolf, p.; Kerl, H. Photodynamic therapy with 5aminolevulinic acid – a promising concept for the treatment of cutaneous tumors. *Dermatology*, v. 190, n.3, p.183-185, 1995.

11. Simplício, F.; Maionchi, F.; Hioka, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, v.25, n.5, p. 801-807, 2002.
12. Fisiopatologia do Câncer. Capítulo 2. Políticas públicas de saúde. In: _____. Ações de enfermagem no controle do câncer. Disponível em www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf. Acessado em 21/05/2011.
13. Colussi, VC. Intensificação da Terapia Fotodinâmica do Câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas, p.1-100, 1997
14. Instituto Nacional de Câncer/INCA. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: 2007.
15. World Health Organization. Cancer. Fact sheet n° 297. Feb 2006. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; c2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>. Acessado em 14/06/2011
16. Facina, T. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 57,n.4, p.557, 2011
17. Informes Técnicos Institucionais. Integração de informações dos registros de câncer brasileiros. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde. *Rev. Saúde Pública*. v.41, n.5, p. 865-68, 2007.
18. Instituto Nacional de Câncer/INCA. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, Ministério da Saúde. 2003.
19. Brown, S.B., Brown, E.A.; Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet. Oncol.*, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.
20. Ferreira, J. Estudo da Correlação de Diferentes Derivados de Hematoporfirina e Clorinas no Processo de Terapia Fotodinâmica. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2007.
21. Carvalho, V.C.M. Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo: São Carlos, 2001.

22. Colussi, V.C., Nicola, E.M, Nicola, J.H. Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers. *Rev. Assoc. Med. Bras.* v.42, n.4, p. 229-236, 1996.
23. Gomes, C.N.L., Estudos sinérgicos de novos derivados de ftalocianina de zinco contendo grupamentos quelantes para íons cálcio aplicados na Terapia Fotodinâmica: Avaliação fotofísica e fotobiológica. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto. p. 154, 2004.
24. Sternberg, E. and Dolphin, D. Pyrrolic photosensitizers. *Current Medicinal Chemistry*, v.3, n.4, p. 239-272, 1996.
25. Henderson, B.W. and Dougherty, T.J. How Does Photodynamic Therapy Work. *Photochemistry and Photobiology*, v.55, n.1, p. 145-157, 1992.
26. Photodynamic Therapy. The mechanism in cells. Disponível em: <<http://www.chestsurg.org/pdtphoto.htm>>. Acesso em: 1 jun. 2006.
27. Bonnett, R., Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. *Chemical Society Reviews*. v.24, n.1, p. 19-33, 1995.
28. Dalla Via, L. and S.M. Magno, Photochemotherapy in the treatment of cancer. *Current Medicinal Chemistry*. v.8, n.12, p. 1405-1418, 2001.
29. Sternberg, E.D., Dolphin, D., Bruckner, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. v.54, n.17, p. 4151-4202, 1998.
30. Menezes, P.F.C., Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com Laser. , in Instituto de Química de São Carlos. 2001, Universidade de São Paulo: São Carlos.
31. Menezes, P.F.C., Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com Laser. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo: São Carlos, 2006.
32. Rússia. Ministério dos serviços públicos de saúde da Federação Rússia. Certificado de Registro do medicamento Photogem de nº 47. *Farmacopéia Russa*, n. 42-3199-98, p. 1-6, 10, 1999.
33. Mironov, A.F.; Nizhnik, A.N.; Nockel, A.Y. Haematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 4, p. 297-306, 1990.

34. Chissoy, V. I.; Skobelkin, O. K.; Mironov, A. F.; Smirnov, V. V.; Sokolov, V. V.; Sukhin, G. M.; Filonenko, E. V.; Litvin, D. G.; Stranadko, E. F.; Kolobanov, A. S.; Astrakhankina, T. A.; Nokel, A. Y.; Zharkova, N. N. Photodynamic therapy and fluorescent diagnosis of malignant tumors using preparation Photogem. *Khirurgiia (Russia)*, n. 12, p. 3-6, 1994.
35. Sokolov, V. V.; Stranadko, E. F.; Zharkova, N. N.; Iakubovskaia, R. I.; Filonenko, E. V.; Astrakhankina, T. A. The photodynamic therapy of malignant tumors in basic sites with the preparations Photohem and Photosens (the results of 3 years of observations). *Vopr. Onkol (Russia)*, v. 41, n. 2, p. 134-148, 1995.
36. Yoon SH, Han KT, Kim GN, Lee SI. Effect of Photodynamic Therapy in Lung Cancer. *Tuberc Respir Dis.* v.57, n.4, p.358-363, 2004.
37. Stranadko, E. P.; Skobelkin, O. K.; Litwin, G.; Astrakhankina, T. A. Clinical photodynamic therapy of malignant neoplasms . *Proc. SPIE, State Research Ctr. for Laser Medicine (Russia)*, v. 2325, p.240, 1995.
38. Ferreira, J. Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós-terapia fotodinâmica – estudo in vivo. Dissertação de Mestrado. Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2003.
39. Torezan, L.A.R. Avaliação da Eficácia da Terapia Fotodinâmica com Ácido 5-Delta Aminolevulínico (ALA) Tópico no Carcinoma Basocelular. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2000.
40. Felicio, L. B. A. de. A terapia Fotodinâmica como modalidade de tratamento das neoplasias cutâneas não – melanoma. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2005.
41. Kloek, J., Akkermans, W. and van Henegouwen, G.M.J.B. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: Enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochemistry and Photobiology.* v. 67, n. 1: p. 150-154, 1998.
42. Rud, E., et al., 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochemistry and Photobiology.* v.71, n. 5, p. 640-647, 2000.
43. Kloek, J. and vanHenegouwen, G.M.J.B. Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology.* v.64, n.6, p. 994-1000, 1996.

44. Gaullier, J.M., et al., Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Research*. v.57, n.8, p. 1481-1486, 1997.
45. Schacht, V., Szeimies R.M.; Abels, C. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces distinct microcirculatory effects following systemic or topical application. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v.5, p.452–458, 2006.
46. Datta, S.N., et al., Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolaevulinic acid induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, v.78, n.8, p. 1113-1118, 1998.
47. Radakovic-Fijan, S., et al., Topical aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy as a treatment option for psoriasis? Results of a randomized, observer-blinded study. *British Journal of Dermatology*, v.152, n.2, p. 279-283, 2005.
48. Szeimies, R.M., Sassy, T. and Landthaler, M. Penetration Potency of Topical Applied Delta-Aminolevulinic-Acid for Photodynamic Therapy of Basal-Cell Carcinoma. *Photochemistry and Photobiology*, v.59, n.1, p. 73-76, 1994.
49. Dijkstra, A.T., et al., Photodynamic therapy with violet light and topical 6-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v.15, n.6, p. 550-4, 2001.
50. Kalka, K., Merk, H. and Mukhtar, H. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v.42. n.3, p. 389-413, 2000.
51. Stockfleth, E. and Sterry, W. New treatment modalities for basal cell carcinoma. *Recent Results Cancer Res*. v.160, p. 259-68, 2002.
52. Kennedy, J.C., R.H. Pottier, and D.C. Pross, Photodynamic Therapy with Endogenous Protoporphyrin IX. Basic Principles and Present Clinical-Experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. v. 6, n. 1-2, p. 143-148, 1990.
53. Cairnduff, F., M. R. Stringer, E. J. Hudson, D. V. Ash, and S. B. Brown. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *Br J Cancer*, v. 69, n.3, p. 605-8, 1994
54. Bissonnette, R., et al., Systemic photodynamic therapy with aminolevulinic acid induces apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques. *Journal of Investigative Dermatology*, v.119, n.1 p. 77-83, 2002.

55. Morton, C.A., et al., Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: Effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. *Archives of Dermatology*, v.134, n.2, p. 248-249, 1998.
56. Peng, Q., et al., 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy - Clinical research and future challenges. *Cancer*, v.79, n.12: p. 2282-2308, 1997.
57. Wolf, P., Rieger, E. and Kerl, H. Topical Photodynamic Therapy with Endogenous Porphyrins after Application of 5-Aminolevulinic Acid - an Alternative Treatment Modality for Solar Keratoses, Superficial Squamous-Cell Carcinomas, and Basal-Cell Carcinomas. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.28, n.1, p. 17-21, 1993.
58. Calzavara-Pinton, P.G., Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolevulinic acid as an appropriate approach to the route treatment of superficial non-melanoma acid: a promising concept for the treatment of cutaneous skin tumors. *J Photochem Photobiol B*, 29: p. 53-57 1995.
59. Fijan, S., H. H. and Ortel, B. Photodynamic Therapy of Epithelial Skin Tumors Using Delta-Aminolevulinic-Acid and Desferrioxamine. *British Journal of Dermatology*, v.133, n.2, p. 282-288, 1995.
60. Machado, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas, *Química Nova*, v.23, n. 2, 2000.
61. Josefsen L. B.; Boyle, R. W. *Brit. J. Pharmacol.* 2008, 154, 1. [CrossRef],
62. Awan, M. A; Tarin, S. A. *Surgeon*, 4, 231. 2006 [Link],
63. Matos, A. P. A.; Santos, A. R. S.; Caeiro, M. F.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A.C.; Cavaleiro, J. A. S. *Microscopy and Microanalysis*, 14, S3, p.137-138, 2008.
64. Galezowski, M.; Gryko, D. T. *Curr. Org. Chem.* 2007, 11, 1310. [CrossRef],
65. Pandey, R. K.; Zheng, G.; Em *The Porphyrin Handbook- Applications: Past, Present and Future*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., ed.; Academic Press: New York, vol. 6, 2000.
66. Strachan, J. -P.; O'Shea, D. F.; Balasubramanian, T.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 3160. [CrossRef]).
67. Wilkinson G. (Ed.), *Comprehensive Coordination in Chemistry - The Synthesis, Reactions, Properties and Applications of Coordination Compounds*, Vol. 2. Oxford: Pergamon Books, 1987.

68. Holten D., Biswas P., Bocian , Dutton, P. L., Lindsey J, Moser C., Shreve A. Bioinspired Antennas: Design & Characterization. Photosynthetic Antenna Research Center | Washington University in St. Louis. Disponível em <http://parc.wustl.edu/research/themes/bioinspired>. Acesso: 30/05/2012.)
69. Pereira, M.M.; Monteiro, C.J.P; Simões, A.V.C; Pinto, S.M.A.; Arnaut, L.G.; Sá, G.F.F.; Silva, E.F.F.; Rocha, L.B.; Simões, S.; Formosinho, S.J. Syntesis and photophysical properties of amphiphilic halogenated bacteriochlorins: new oportunities for phtodynamic therapy of câncer. *J. Porphirins Phtalocyanines*. v.13, p. 568-73, 2009.
70. Dąbrowski, J. M., Arnaut, L. G., Pereira M. M., Urbańska K., Stochel, G. Improved biodistribution, pharmacokinetics and photodynamic efficacy using a new photostable sulfonamide bacteriochlorin. *MedChemComm*. v. 4, 2012.
71. American Cancer Society. Cancer prevention & early detection facts & figures 2007. Atlanta: 2007.
72. Gans, Z. Using the CO₂ Laser for Veterinary Soft Tissue Surgery. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v.62, n.3-4, 2007.
73. Lucroy, M. D.; Bartels K.E.: Using biological lasers in veterinary practice. *Vet Med*. 95 (suppl. 10), p. 4-9; 2000.
74. Crane, S.W. Surgical Lasers. Textbook of small animal surgery, 2nd Ed. (D.H. Slatter Ed) W.B. Saunders, Philadelphia, Pa., p. 197-203, 2001.
75. Bartels, K.E.: Curreent techniques in small animal surgery, 4th Ed. (M.J. Bajorab et al). Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md, p. 45-52, 1998.
76. Ribeiro, A. C. Terapia endodôntica associada à radiação do canal radicular com laser de Diodo: avaliação térmica, morfológica, microbiológica e da infiltração marginal apical. Tese de doutorado. São Paulo: Faculdade de odontologia da USP; 2006.
77. Goldman L. Biomedical aspects of the Laser. New York: Springer Verlag, p.1-8, 1967.
78. Fritzpark, R.E.; e Goldman, M.P. Advances in carbon dioxide laser surgery. *Clinics in Dermatology*, v.13, p. 35-47, 1995.
79. Slutzki S, Shafir R, Bornstein LA. Use of the carbon dioxide laser for large excisions with minimal blood loss. *Plast Reconstr Surg*, v.60, p.250-5, 1977.
80. Goldman L, Rockwell R J Jr. Lasers in medicine. New York: Gordon and Breach, 1971.

81. Goldman L. Laser surgery in skin cancer. NY State J Med; v.12, p.1897-1900, 1977.
82. Kaplan I, Sharon U, Ger R. The carbon dioxide laser in clinical surgery. In: Wolbamht M, editor. Laser applications in medicine and biology. New York: Plenum Press, v.2, p.295-308, 1974.
83. Gamaleja NF, Polischuk EI. The experience of skin tumours treatment with laser radiation. Panminerva Med, v. 17, p.238-40, 1975.
84. Stellar S, Levine N, Ger R, Levenson S. Laser excision of acute third-degree burns followed by immediate autograft replacement: An experimental study in the pig. J Trauma;13:45-53, 1973.
85. Stellar S, Meijer R, Walia S, Marnoun S. Carbon dioxide laser debridement of decubitus ulcers: Followed by immediate rotation flap or skin graft closure. Ann Surg;79:230-7, 1974.
86. Kaplan I, Sharon V. Current laser surgery. Third conference on the laser. Ann NY Acad Sci, v.267, p.247-53, 1976.
87. Kaplan I, Labandter H. Onychogryphosis treated with the CO₂ surgical laser. Br J Plast Surg, v.29, p.102-3, 1976.
88. Kaplan I, Peled I. The CO₂ laser in the treatment of superficial telangiectases Br J Plast Surg, v.28, p.214-5, 1975.
89. Zezell, D. M.; Maldonado, E.P. ; Ribeiro, M.S. : Interação da luz com a matéria, Mestrado Profissionalizante de Laser em Odontologia, 2006.
90. Patel, C.K.N. - Interpretation of CO₂ optical laser experiments. (Letter) Physiol Ver 12: 588, 1964.
91. Polanyi, T.G.; Bredemeier, H.C.; Davis, T.W. – A CO₂ laser for surgical research. Med Biol Eng Comput, v.8, p.541, 1970.
92. Yahr, W.Z. & Strully, K.J. - Blood vessels anastomosis and other biomedical applications. J Assoc Adv Med Instrum v.1, p. 28, 1966.
93. Wilder-Smith P, Arrastia AM, Liaw LH, Berns M. Incision properties and thermal effects of three CO₂ lasers in soft tissue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. v.79,n.6, p.685-91, 1995.
94. Gans, Z. Using the CO₂ Laser for Veterinary Soft Tissue Surgery. Israel Journal of Veterinary Medicine, v.62, p.3-4, 2007.
95. Thomsen, S. Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. Photochem. Photobiol. V.53, p.825-35, 1991

96. Aschler P, Ingolitsch E, Walter G, Oberhauer RW. Ultrastructural Endings in CNS tissue with CO₂ laser. In: Kaplan I, editor. Laser surgery II. Jerusalem: Academic Press, p. 81-5, 1976.
97. Ben-Bassat M. , Ben-Bassat M. Kaplan I. A study of the ultrastructural features of the cut margin of skin and mucous membrane specimens excised by carbon dioxide laser. *Journal of Surgical Research*. V.21, n. 2, p. 77–84 1976.
98. Whitaker, I. S. et al. CO₂ Laser and Photodynamic Therapy for Nodular Basal Cell Carcinomas. *Annals of Plastic Surgery*. v. 59, n. 5, 2007
99. Rosa Maria Bernacchio, Quantificação de miofibroblastos em tecido cutâneo de ratos submetidos à incisão cirúrgica com lasers de CO₂ e diodo, bisturi elétrico e convencional. Dissertação mestrado profissionalizante lasers em odontologia. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo, 2007.
100. Romanos GE, Laser applications in implantology. State of the art. In: abstracts of the 1st congress of the European Society for oral applications. Esola, 17-20, Viena, Austria. ESOLA, v.200, p. 21. Abst 54., 2001.
101. Moritz A., Gutknecht N., Goharkay K., Schoop U., Wernisch J., Sperr W. In vitro irradiation of infected root canals with diode laser. Results of microbiologic, infrared spectrometric and stain penetrations examination. *Quintessence International*, v.28, p205-9, 1997a.
102. Moritz A., Gutknecht N., Schoop U., Goharkay K., Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo. Results of microbiological examination. *Laser Surg Med*. V 21, p221-6, 1997b
103. Trevisan. M. S.F. Avaliação da dor e da reparação clínica em pacientes submetidos à frenectomia com lasers de diodo (808 Nm) ou Er,Cr:Ysgg ou por técnica convencional. Dissertação mestrado profissionalizante lasers em odontologia. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Faculdade de odontologia da universidade de são Paulo, 2010.
104. Silva et al. O uso do Laser em Cirurgia Vascular, , *Revista Ciências em Saúde* v1, n 3, 2011.
105. Quinto Jr J. Estudo in vitro do esmalte dental irradiado com laser de diodo de alta potencia de 960nm: análise morfológica da superfície dental pós irradiada e análise do comportamento térmico da câmara pulpar devido a aplicação do laser. Dissertação mestrado profissionalizante lasers em odontologia. São Paulo:

- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Faculdade de odontologia da universidade de são Paulo, 2001.
106. Gutknecht N., Franzen R. O laser: função, interação e segurança. In: Gutknecht, N., Eduardo, C.P. A Odontologia e o Laser atuação do Laser na Especialidade Odontológica 1. ed. São Paulo: Quintessence, p.25-60, 2004.
 107. Horch H.H.; Deppe H. Lasers in oral and maxillofacial surgery. *Med Laser Appl.* 20, p.47-59, 2005.
 108. Alves, M.A.V. Expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico no tecido periodontal de ratos irradiados com laser de diodo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia. Universidade de São Paulo, p.1-79, 2009.
 109. Leicester RJ - Diode laser in gastroenterology. *Gastroenterology*, v.11, n.1, p.1-3, 1996.
 110. Yamashita Y, Sakai T, Watanabe K, et al. - Dye-enhanced selective laser ablation for surgical mucosectomy. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, n.6, p.387-391, 1999.
 111. Romanos GE, Henze M, Banihashemi S, Parsanejad HR, Winckler J, Nemtwig GH. Removal of epithelium in periodontal pockets following diode (980nm) laser application in the animal model: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* V.22, n.3, p.177-83, 2004.
 112. Curnow, A.; Mcllroy, B.W.; Postle-Hacon, M.J.; MacRober, A.J.; Bown, S.G. Light Dose Fractionation to Enhance Photodynamic Therapy Using 5-Aminolevulinic Acid in the Normal Rat Colon. *Photochemistry and Photobiology*, p. 71-76, v.69, n.1,1999
 113. Hua, Z.; Gibson, S.L.; Foster, T.H.; Hilf, R.. Effectiveness of o-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin as a Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Vivo. *Cancer Research* 55, 1723-1731, April 15, 1995.
 114. Amelink, A.; van der Ploeg van den Heuvel, A.; Wolf, W.J.; Robinson, D.J.; Sterenborg, H.J.C.M. Monitoring PDT by means of superficial reflectance spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* v. 79, n.3, p.243-251, 2005.
 115. Rego RF. Estudo comparativo de precursores da Protoporfirina IX (ALA e MAL) utilizados topicamente em Terapia Fotodinâmica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2008.

116. Hædersdal M, Sakamoto FH, Farinelli WA, Doukas AG, Tam J, Anderson RR. Fractional CO₂ Laser-Assisted Drug Delivery. *Lasers Surg. Med.* v.42, p.113–122, 2010.
117. Letada PR, Shumaker PR, Uebelhoer NS, Philip RL, Peter RS, Nathan SU. Demonstration of protoporphyrin IX (PpIX) localized to areas of palmar skin injected with 5aminolevulinic acid (ALA) and pretreated with a fractionated CO₂ laser prior to topically applied ALA. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* V.7, p. 120-122, 2010.
118. Mariuzzo AAC. Estudo histológico comparativo de lesões provocadas em músculo estriado de rato pelo laser de CO₂ aplicado em condições de energia constante variando tempo e potência. Master Thesis. Universidade Estadual de Campinas, 1997.
119. Niemz, M. H. Laser-tissue interactions. fundamentals and applications. 2nd ed. Berlin: Springer, 2002.
120. Hall RR, Beach AD, Baker E, Morison PCA. Incision of tissue by carbon dioxide laser. *Nature.* V.232, p. 131-132, 1971.
121. Mihashi S, Jako GJ, Strong MS. Laser surgery in otolaryngology: interaction of laser and soft tissue. *Ann. NY Acad. Sci.* v.267, p. 263-294, 1976.
122. Tichy M, Jansa P, Hucacek J, Ticha V. Healing of experimental laser wound in the skin and auricle. *Acta Univ Palacki. Olomuc.*120: p. 169-78, 1988.
123. McKenzie AL. Physics of thermal process in laser tissue interaction. *Phys. Med. Biol.* V.35, p.1175-1209, 1990.
124. Waldow SM, Dougherty TJ. Interaction of hyperthermia and photoradiation therapy. *Radiat. Res.* V.97, p.380–385, 1984.
125. Kimel S, Svaasand LO, Hammer-Wilson M, Gottfried V, Cheng S, Svaasand E, Berns MW. Demonstration of synergistic effects of hyperthermia and photodynamic therapy using the chick chorioallantoic membrane model. *Lasers Surg. Med.* v.12,p. 432-40, 1992.
126. Lin DL, He LF, Li YQ. Rapid and simultaneous determination of coproporphyrin and protoporphyrin in faces by derivative matrix isopotential synchronous fluorescence spectrometry. *Clin. Chem.*v.50, p.1797– 803, 2004.
127. Juzėnienė A, Juzėnas P, Kaalhus O, Iani V, Moan J. Temperature effect on accumulation of protoporphyrin IX after topical application of 5-aminolevulinic

- acid and its methylester and hexylester derivatives in normal mouse skin. *Photochem. Photobiol.* V.76, p.452–6, 2002.
128. Moan J, Sommer S. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res.*v. 45, p. 1608–10, 1985.
 129. Niemz M. *Laser tissue interactions: Fundamentals and applications.* Berlin: Springer, 1996.
 130. Janda, P., Sroka, R., Mundweil, B., Betz, C. S., Baumgartner, R. and Leunig, A. Comparison of thermal tissue effects induced by contact application of fiber guided laser systems. *Laser Surg Med*, v.33, n.2, p. 93-101, 2003.
 131. Damante, C. A.; Marques, M. M.; Micheli, G. Terapia com laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas-revisão de literatura. *RFO*, v.18, n.3, p.88-93, 2008
 132. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy, photomed. *Laser Surg.* n.23, p.355–61, 2005.
 133. Kramer-Marek G., Serpa C., Szurko A. e colaboradores, Spectroscopic Properties and Photodynamic Effects of New Lipophilic Porphyrin Derivatives: Efficacy, Localization and Cell Death Pathways. *J. Photochem, Photobiol. B: Biol*, n.84, v.1, p. 1-14, 2006.