



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA AO  
CLAREAMENTO ÓPTICO NO TRATAMENTO DO MELANOMA  
CUTÂNEO**

**Letícia Palombo Martinelli \***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Profa. Dra. Cristina Kurachi

***Co-orientador:***

Prof. Dr. Vanderlei Bagnato

\* bolsista CNPq-131695/2018-5

**São Carlos - SP  
2020**

Letícia Palombo Martinelli

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA AO CLAREAMENTO ÓPTICO  
NO TRATAMENTO DO MELANOMA CUTÂNEO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Profa. Dra. Cristina Kurachi

BANCA EXAMINADORA

*Profa. Dra. Cristina Kurachi*

Departamento - UFSCar

*Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira*

Departamento Química - UFSCar

*Dra. Ana Gabriela Salvio*

Departamento de Pele – Hospital Amaral Carvalho, Jaú

São Carlos

2020

Palombo Martinelli, Leticia

AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA AO  
CLAREAMENTO ÓPTICO NO TRATAMENTO DO MELANOMA  
CUTÂNEO / Leticia Palombo Martinelli. -- 2020.

72 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São  
Carlos, São Carlos

Orientador: Cristina Kurachi

Banca examinadora: Profa. Dra. Cristina Kurachi, Prof. Dr. Kleber Thiago  
de Oliveira, Dra. Ana Gabriela Salvio

Bibliografia

1. Melanoma. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Agentes Clareadores Ópticos.  
I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Letícia Palombo Martinelli, realizada em 18/02/2020:

*Cristina Kurachi*

---

Profa. Dra. Cristina Kurachi  
IFSC/USP

*Kleber Thiago de Oliveira*

---

Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira  
UFSCar

*[Signature]*

---

Profa. Dra. Ana Gabriela Salvio  
HAC

Dedico este trabalho à minha avó  
Therezinha e à minha família, que me  
incentivou e apoiou até o fim, e também à  
todos que serão beneficiados por esta  
pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela maneira que me presenteou com meu mestrado e por ter sido fiel até o fim.

Aos meus pais Rogéria e José, por me conduzirem, sustentarem, auxiliarem, doarem e se privarem a meu favor. A não só por estenderem as mãos para mim, mas também por serem o que eu precisei. Que o orgulho que vocês sentem por mim, aumente cada dia mais. Amo vocês!

A professora Cristina Kurachi, por ser uma orientadora fantástica e ter aberto as portas para mim. Obrigada por seus ensinamentos e oportunidades, pela sua atenção, disponibilidade, ajuda e por trilhar junto comigo esse caminho.

As minhas amigas Natasha e Carol, companheiras de graduação e para toda a vida, por sempre estarem ao meu lado!

A Michelle, que se disponibilizou em me ensinar quando mais precisei e continua me ajudando. Obrigada Mi, por ter esse coração tão lindo e aberto, sempre pronto quando preciso.

A Eva, que foi minha companheira ucraniana nas medidas do Raman e por sempre enriquecer meu trabalho, que também é dela.

A Lili, por ser sempre disposta e pronta a me ajudar e ensinar, dando dicas preciosas que só beneficiaram meu mestrado.

A Layla, por permitir que eu continuasse um trabalho tão importante, em que ela foi pioneira.

Ao Instituto de Física de São Carlos – IFSC e a equipe do CEPOF (Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica) que me forneceu toda a estrutura e suporte para a realização da minha pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por me conceder apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

**Marie Curie**

Palombo Martinelli, Letícia. **Avaliação da Terapia Fotodinâmica associada ao clareamento óptico no tratamento do melanoma cutâneo**. 2020. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFSCar, São Carlos, 2020.

## RESUMO

O melanoma é um grande problema de saúde pública, pois, apesar da baixa incidência, apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade quando diagnosticado em estágios mais avançados. Dessa maneira, existe a necessidade do desenvolvimento de opções terapêuticas. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica baseada no uso de um composto denominado fotossensibilizador (FS), da luz em comprimento de onda adequado para a excitação do fotossensibilizador e do oxigênio presente no tecido tumoral. A reação fotodinâmica para indução da morte celular ocorre principalmente pela produção do oxigênio singlete, uma espécie altamente reativa e oxidativa. No caso do melanoma cutâneo, em decorrência da alta concentração de melanina ser um dos principais absorvedores biológicos, a terapia fotodinâmica apresenta uma pobre resposta pela grande limitação da penetração da luz no tumor. Os agentes clareadores ópticos (“*Optical Clearing Agents*”, OCAs) vêm sendo utilizados para inibir a atenuação da luz nos tecidos, especialmente em amostras biológicas para microscopia confocal. Nossa estratégia foi usar a TFD associada ao pré-tratamento do melanoma com agentes clareadores para otimizar a irradiação do tumor. O FS utilizado foi Photodithazine (PDZ) e os clareadores PEG400 e 1,2-propanodiol foram associados na proporção 19:1. Foi realizada análise por espectroscopia Raman e análise histopatológica, a fim de avaliar a modificação da terapia fotodinâmica baseada nas alterações bioquímicas e morfológicas induzidas no tumor. Os grupos experimentais foram controle, TFD e OCA+ TFD. A TFD foi realizada depois de 2h30min da administração do PDZ via intraperitoneal. Na análise Raman, as principais modificações ocorreram em ligações proteicas, lipídicas e de ácidos nucleicos. Analisando em profundidade, os OCAs diminuíram a atenuação da luz para regiões entre 225 e 325  $\mu\text{m}$ , bem como tornaram o tumor mais opticamente homogêneo em todas as profundidades. Além disso, a resposta fotodinâmica foi otimizada, uma vez que se apresentou mais homogênea demonstrando uma mais efetiva distribuição da luz no tumor. Nas análises macroscópicas e histológicas, tanto com uma sessão de TFD como com duas, os grupos com pré-tratamento com OCA apresentaram maior dano no tumor e maior efetividade da terapia.

Palavras-chave: Melanoma. Terapia Fotodinâmica. Agentes clareadores ópticos.



Palombo Martinelli, Letícia. **Evaluation of photodynamic therapy associated with optical clearing in the treatment of cutaneous melanoma.** 2020. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFSCar, São Carlos, 2020.

### **ABSTRACT**

Melanoma is a major public health problem because, despite its low incidence, it has high rates of morbidity and mortality when diagnosed in more advanced stages. Thus, there is a need to develop therapeutic options. Photodynamic therapy (PDT) is a technique based on the use of a compound called photosensitizer (FS), light at an appropriate wavelength to excite the photosensitizer and the oxygen present in the tumor tissue. The photodynamic reaction to induce cell death occurs mainly by the production of singlet oxygen, a highly reactive and oxidative species. In the case of cutaneous melanoma, due to the high concentration of melanin being one of the main biological absorbers, photodynamic therapy has a poor response due to the great limitation of the penetration of light into the tumor. Optical clearing agents (OCAs) have been used to oppose the attenuation of light in tissues, especially in biological samples for confocal microscopy. Our strategy was to use PDT associated with pretreatment of melanoma with clearing agents to optimize tumor irradiation. The FS used was Photodithazine (PDZ) and the clearing agents PEG400 and 1,2-propanediol were associated in a 19: 1 ratio. Analysis by Raman spectroscopy and histopathological analysis was performed in order to evaluate the modification of photodynamic therapy based on biochemical and morphological changes induced in the tumor. The experimental groups were control, TFD and OCA + TFD. PDT was performed after 2h30min of the administration of the PDZ via intraperitoneal. In the Raman analysis, the main changes occurred in protein, lipid and nucleic acid bonds. Analyzing in depth, the OCAs decreased the attenuation of light for regions between 225 and 325  $\mu\text{m}$ , as well as making the tumor more optically homogeneous at all depths. In addition, the photodynamic response was optimized, since it was more homogeneous, demonstrating a more effective light distribution in the tumor. In macroscopic and histological analyzes, both with one PDT session and with two, the groups with pretreatment with OCA showed greater damage to the tumor and greater effectiveness of therapy.

Keywords: Melanoma. Photodynamic Therapy. Optical clearing agents.

## LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO .....	12
Capítulo 2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
Figura 2.1: Fotografia do camundongo com melanoma cutâneo pigmentado (região delimitada em vermelho) dois dias após a indução.....	25
Figura 2.2: A- Estrutura química da molécula Photodithazine e B - Espectro de fluorescência do PDZ de 600 a 800 nm. ....	26
Figura 2.3: Ilustração da medida de fluorescência da sonda de investigação na superfície da pele que cobre o melanoma. ....	26
Figura 2.4: Ilustração da irradiação da luz a 660 nm no melanoma cutâneo pigmentado após 2h30min da administração do PDZ para realização da TFD. ....	27
Figura 2.5: Fotografia Microscopia Raman das medidas dos espectros em profundidade. Os espectros foram obtidos em triplicata, em 3 pontos diferentes, mas numa mesma profundidade. A primeira foi em 25 $\mu\text{m}$ , com incrementos de 100 em 100 $\mu\text{m}$ a partir daí. ....	29
Capítulo 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
Figura 3.1: Espectros de fluorescência em função do tempo após a fotossensibilização do animal com PDZ dos 3 animais.....	31
Figura 3.2: Monitoramento da amplitude da banda de emissão do PDZ em função do tempo após a administração intraperitoneal. ....	33
Figura 3.3: Intensidade de fluorescência PDZ normalizada em função do tempo para pele normal (preto) e melanoma (vermelho). ....	34
Figura 3.4: Estrutura química do A-PEG-400 e B-1,2-propanodiol. ....	35
Figura 3.5: Espectro Raman do agente clareador óptico (PEG-400 e 1,2-propanodiol). ....	36
Figura 3.6: Vários espectros Raman do tumor, mostrando a heterogeneidade de um mesmo melanoma a uma profundidade de 225-325 $\mu\text{m}$ . ....	37
Figura 3.7: Espectro Raman da região de 25-125 $\mu\text{m}$ do melanoma após a aplicação do OCA comparado com o controle.....	38
Figura 3.8: Zoom da região de 760 a 900 $\text{cm}^{-1}$ da Figura 3.7. ....	39
Figura 3.9: Espectro Raman da região de 225-325 $\mu\text{m}$ do melanoma após a aplicação do OCA comparado com o controle.....	40

Figura 3.10: Espectro Raman da região de 525-725 $\mu\text{m}$ do melanoma após a aplicação do OCA comparado com o controle. ....	41
Figura 3.11: Espectro Raman da região de 25 a 125 $\mu\text{m}$ do melanoma com e sem OCA após a TFD. ....	44
Figura 3.12: Espectro Raman da região de 225 a 325 $\mu\text{m}$ do melanoma com e sem OCA após a TFD. ....	45
Figura 3.13: Espectro Raman da região de 525 a 725 $\mu\text{m}$ do melanoma com e sem OCA após a TFD. ....	46
Figura 3.14: Espectros Raman da parte mais profunda do melanoma com e sem OCA após a TFD, mostrando pouca variação dos espectros com OCA. ....	47
Figura 3.15: Espectro Raman da região de 25 a 125 $\mu\text{m}$ do melanoma com e sem OCA após 7 dias de TFD. ....	49
Figura 3.16: Espectro Raman da região de 225 a 325 $\mu\text{m}$ do melanoma com e sem OCA após 7 dias da TFD. ....	50
Figura 3.17: Espectro Raman da região de 525 a 725 $\mu\text{m}$ do melanoma com e sem OCA após 7 dias da TFD. ....	52
Figura 3.18: Imagens dos tumores sem (A- preto) e com (B- vermelho) clareador após a TFD, por um período total de 7 dias. ....	53
Figura 3.19: Imagens dos tumores sem (A- preto) e com (B- vermelho) clareador após 2 sessões de TFD, por um período total de 7 dias após a segunda sessão. ....	55
Figura 3.20: Imagem obtida pelo programa CaseViewer do tumor de melanoma cutâneo controle (sem tratamento). A-Tumor inteiro, B-Zoom da região selecionada em A, em que 1 é epiderme, 2 a derme e 3 o tumor. As regiões 2 e 3 se mesclam porque o tumor está intradérmico. ....	56
Figura 3.21: Tumores A e B após 7 dias de TFD, sem e com OCA, respectivamente. C e D após 3 dias de TFD, sem e com OCA, respectivamente. ....	57
Figura 3.22: Zoom da Figura 3.21B, em que A é da região central do tumor com maior dano (*) e B da região sem dano (#). ....	58
Figura 3.23: Tumores A e B após 7 dias da segunda sessão de TFD, sem e com OCA, respectivamente. C e D após 3 dias da segunda sessão de TFD, sem e com OCA, respectivamente. ....	59
Capítulo 4 - CONCLUSÕES .....	60

## LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO .....	12
Capítulo 2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
Tabela 2.1 – Grupos experimentais controle, OCA e OCA+TFD. O grupo controle é o animal com melanoma sem tratamento; o grupo OCA é o animal com melanoma com aplicação apenas do OCA, sem o tratamento com TFD; e o grupo OCA+TFD é o animal com melanoma, em que foi feita a injeção do PDZ, com a aplicação do OCA, e por fim o tratamento com TFD. ....	27
Tabela 2.2 – Grupos de tratamento analisados na Microscopia Raman.....	30
Capítulo 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
Tabela 3.1 - Picos Raman dos grupos com e sem clareador logo após a TFD e após 7 dias de TFD para a região de 225 a 325 $\mu\text{m}$ do melanoma.....	51
Capítulo 4 - CONCLUSÕES .....	60

## SUMÁRIO

Resumo .....	05
Abstract .....	06
Lista de Figuras .....	07
Lista de Tabelas.....	09
Capítulo 1 - INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Terapia Fotodinâmica (TFD) .....	14
1.2. Agentes Clareadores Ópticos (OCAs) .....	18
1.3. Espectroscopia Raman.....	19
1.4. Objetivos .....	23
Capítulo 2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
2.1. Linhagem celular .....	24
2.2. Modelo Animal .....	24
2.3. Agentes clareadores ópticos.....	25
2.4. Cinética do Photodithazine (PDZ) .....	25
2.5. Protocolo Terapia Fotodinâmica.....	26
2.6. Protocolo Terapia Fotodinâmica 2 doses .....	28
2.7. Avaliação da resposta da Terapia Fotodinâmica .....	28
2.7.1. Microespectroscopia Raman .....	29
2.7.2. Análise Macroscópica .....	30
2.7.3. Análise Histológica .....	30
Capítulo 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
3.1. Cinética do Photodithazine (PDZ) .....	31
3.2. Análise do melanoma por Espectroscopia Raman.....	34
3.2.1. Análise Raman dos tumores com e sem OCAs .....	35
3.2.2. Análise Raman dos tumores com e sem OCAs logo após TFD .....	44

3.2.3.	Análise Raman dos tumores com e sem OCAs após 7 dias de TFD .....	48
3.3.	Análise Macroscópica após a TFD.....	53
3.3.1.	Com uma sessão.....	53
3.3.2.	Com duas sessões.....	54
3.4.	Análise Histológica após a TFD.....	56
3.4.1.	Com uma sessão.....	57
3.4.2.	Com duas sessões.....	59
Capítulo 4 - CONCLUSÕES .....		60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		61
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....		67



## Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

O melanoma é um tumor pigmentado que se origina dos melanócitos, de células pigmentadas presentes no corpo produtoras de melanina, incluindo a pele e a íris. Tais células se localizam na camada inferior da epiderme, podendo se desenvolver em qualquer região do corpo. De acordo com o *National Cancer Data Base* (NCDB-US), aproximadamente 91,2% dos melanomas se originam na pele; 5,2% nos olhos ou nos tecidos ao redor; 1,3% na mucosa e 2,2% em tecidos não conhecidos [1].

O câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no Brasil, correspondendo cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). O melanoma representa, porém apenas 3% das neoplasias malignas do órgão. Mesmo sua porcentagem sendo pequena, é o tipo mais grave de câncer de pele, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase (disseminação do câncer para outros órgãos). O melanoma tipo cutâneo é o mais agressivo e é caracterizado por lesões pigmentadas com alta taxa de invasão dos tecidos.

Anualmente cerca de 2-3 milhões de câncer do tipo não melanoma e 132 mil de câncer de pele de melanoma são esperados em todo o mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Embora o melanoma seja responsável por apenas 5% de todos os tipos de câncer de pele, ele representa cerca de 80% a 85% de todas as mortes por câncer de pele [2]. Estima-se que em 10 à 15 anos a incidência do melanoma cutâneo dobre e que a sobrevida seja cerca de 69%, considerando o valor médio mundial e de 56% para os países em desenvolvimento[3].

Segundo o INCA, o melanoma cutâneo pode surgir por exposição prolongada ao sol, principalmente na infância e adolescência, devido aos raios ultravioletas (UV); exposição de câmeras de bronzamento artificial; ter pele e olhos claros, cabelos ruivos ou loiros e ser albino; ter histórico na família ou pessoal de câncer de pele. A exposição à radiação UV é amplamente considerada o principal fator de risco, com cerca de 80% de todos os casos de melanoma atribuídos a danos causados pelo sol na pele sensível. As vias causais parecem ser diferentes para os principais subtipos. O risco aumenta significativamente se o indivíduo tiver deficiência imunológica ou disposição genética [4].

O melanoma cutâneo pode ser classificado em 4 subtipos: melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentiginoso acral e lentigo maligno melanoma. Esses quatro tipos são considerados por alguns autores entidades clínico-patológicas distintas que diferem uns aos



outros em relação à etiologia, propriedades biológicas e prognóstico. As características do melanoma extensivo superficial é o aspecto irregular da forma e múltiplas cores, sendo assimétrico e enegrecido e mais comum em indivíduos de pele clara (70%). O melanoma nodular é caracterizado por nódulo enegrecido que pode surgir em qualquer parte do corpo. O lentiginoso acral é caracterizado por lesão enegrecida localizada normalmente nas extremidades do corpo, como pés e mãos. É o segundo tipo clínico mais comum. Por fim, o lentigo maligno melanoma é caracterizado por mancha em áreas mais foto expostas, como o rosto, podendo surgir de lesões precursoras das sardas. Aparece mais na população idosa, com evolução lenta[5]–[7].

A detecção precoce do melanoma possibilita maiores chances de tratamento, aumentando significativamente o prognóstico do paciente, com altas possibilidades de cura. Os diagnósticos de primeira linha incluem análise clínica das lesões, principalmente suas características macroscópicas, conhecidas como ABCDEs, os quais são avaliados em termos de assimetria, bordas irregulares, mais de uma cor ou distribuição desigual de cor, diâmetro superior a 6 mm e progressão da lesão (evolução). A biópsia excisional de lesões com margens de 1-2 mm de pele normal deve ser realizada em pacientes com lesões suspeitas e o diagnóstico confirmado pelo exame histopatológico [8]. Depois dessa análise mais visual, é feito um exame clínico, normalmente pelo dermatologista. Para isso é necessário, às vezes, a utilização da dermatoscopia, que é um exame em que o aparelho permite visualizar camadas da pele não vistas a olho nu, e também a biópsia, que é um exame mais invasivo.

A principal abordagem/tratamento para o melanoma cutâneo, nos dias de hoje, é a cirurgia, com excisão ampla, mapeamento linfático e biópsia de linfonodo sentinela e dissecação de linfonodo. No entanto, a taxa de recorrência varia de 7 a 51%, de acordo com o estágio do tumor [3-4]. O melanoma apresenta 4 estágios do tumor, variando a profundidade da lesão, a presença de ulceração e metástase. No estágio 0, os melanócitos são anormais e encontrados na epiderme (região mais externa da pele), se limitando a uma área específica, não crescendo em camadas mais profundas da pele. No estágio 1, o tumor é menor que 1 mm com ou sem ulceração, mas não se espalha para outros tecidos. No estágio 2, o tumor tem entre 1 e 4 mm de espessura, com ulceração, mas também não se espalha para outras regiões. No estágio 3, o tumor pode ter qualquer espessura, com ou sem ulceração, porém o câncer já se espalhou para áreas próximas como gânglios linfáticos e linfonodos, ou para outros lugares da pele próximo ao tumor primário. No estágio 4, também conhecido como melanoma metastático, o câncer já se espalhou

para órgãos internos, como pulmão, fígado, cérebro, osso, trato gastrointestinal, ou para diversas regiões da pele [10], [11].

Para os casos ou estágios mais avançados do tumor, o plano de tratamento pode variar e depender de outros fatores como a idade e saúde da pessoa, o local do tumor e número de metástases, presença de mutações genéticas específicas, e as preferências do paciente. Quando o câncer já é metastático também são utilizadas a quimioterapia paliativa, radioterapia e imunoterapia adjuvante, mas essas técnicas têm efeito limitado com relação à expectativa de vida dos pacientes.

A quimioterapia e radioterapia não funcionam tão bem para o melanoma quanto para outros tipos de câncer, mas podem ajudar a aliviar dores e evitar a recidiva do tumor. A imunoterapia tem obtido avanço no tratamento do melanoma metastático, utilizando alguns medicamentos, como anti-CLTA-4 (ipilimumab), que ativa as células T de defesa do organismo e elas passam a atacar o câncer. Alguns dados mostram que essa droga pode curar o melanoma metastático em 20% dos casos. Alguns medicamentos imunoterápicos tem sido aprovados desde 2011 para tratamento dos diversos estágios do melanoma, como pembrolizumab (anti-PD-1), nivolumab (anti-PD-1) e a combinação de ipilimumab/ nivolumab, dentre outros, mostrando avanço e a importância de novas terapias para tratamento do melanoma [12]–[14].

A falta de opções terapêuticas bem sucedidas e o aumento da incidência do melanoma tornam crítico o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico precoce, de preferência não invasivas, bem como de tratamentos mais eficazes.

### **1.1. Terapia Fotodinâmica (TFD)**

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade baseada na interação entre a luz e o fotossensibilizador (FS), na presença de oxigênio, induzindo a morte celular. A técnica se baseia em reações fotoquímicas da interação do FS excitado com substratos orgânicos e/ou moléculas circundantes que geram espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxil - “mecanismo tipo I”, promovendo a oxidação de biomoléculas. Outro mecanismo é a transferência de energia entre o FS e o oxigênio presente na célula [15]. O fotossensibilizador excitado transfere energia principalmente para o oxigênio molecular. Então, o oxigênio é excitado para o estado singlete, altamente reativo e citotóxico, gerando a oxidação das estruturas celulares, como mitocôndrias e membranas - “mecanismo tipo II”[16]. Dentre os

fotossensibilizadores aprovados para uso clínico em TFD, o mecanismo tipo II constitui a principal via de ação fotodinâmica.

A TFD tem sido amplamente utilizada para tratamento localizado de vários tipos de câncer, como o colo uterino, esôfago, estômago, bexiga e pele não melanoma [17]–[19]. Os testes clínicos da TFD no carcinoma de basocelular apresentam taxa de resposta de 85% [20]. Para melanomas, não há muitos ensaios que certificam a eficácia da técnica. Na maioria dos estudos, a terapia fotodinâmica reduz o volume da lesão, mas não o elimina, resultando em efeitos prejudiciais para o paciente, portanto atualmente não existe aprovação para seu uso.

Alguns estudos recentes têm buscado novos fotossensibilizadores para diminuir a resistência do melanoma à Terapia Fotodinâmica. No trabalho de Pawel Mroz et al. foi sintetizada novas bacterioclorinas com potencial de superação dessa resistência, mas não houve a eliminação por completo do tumor in vivo [21]. Estudos feitos por Barbara Pucelik et al. mostram o desenvolvimento de uma nova formulação incorporando redaporfina (derivado de bacterioclorina sulfonamida fluorada) em Pluronic P123. Os resultados demonstraram alcançar uma alta taxa de cura a longo prazo de camundongos portadores de tumor B16F10 [22].

J.P. Tardivo et al. tem realizado estudos para tratamento do melanoma utilizando a terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador azul de metileno. Os resultados mostraram que após 17 dias da indução do tumor nos animais, houve diferenças marcantes entre os grupos controle e com a TFD. O grupo TFD com azul de metileno apresentou uma diminuição acentuada no crescimento do tumor em comparação com o grupo não tratado. O grupo controle tinha tumores de crescimento rápido, onde eram grandes, cerca de um terço do tamanho do animal, proeminentes e bem delineados, enquanto que os tumores no grupo tratado eram menores e superficiais, mostrando nenhum crescimento vertical. O grupo tratado teve uma diminuição de 99% no volume do tumor em comparação com os camundongos não tratados. Em suma, o tratamento de tumores melanoma com azul de metileno pode ser um tratamento alternativo útil em casos de múltiplos locais metastáticos na pele, podendo ser usada após a cirurgia para diminuir as chances de futuras metástases, devido ao seu potencial para reduzir a invasão tumoral [23].

Outros estudos de J.P. Tardivo et al. foram realizados em humanos, utilizando da TFD e do azul de metileno como FS. O azul de metileno foi injetado localmente em um paciente com múltiplas lesões de melanoma cutâneo não considerado bom candidato à cirurgia. Trinta

segundos após a injeção, foi aplicada a fonte de luz RL50® com fluência de  $18 \text{ J / cm}^2$  por 3 minutos, durante cinco sessões, a cada duas semanas. Após o tratamento foi observado o desaparecimento em cinco dos seis tumores, e redução de pelo menos 50% no volume do outro tumor. Portanto, usando a terapia fotodinâmica e azul de metileno, foi possível obter resultados bem interessantes e promissores [24].

De modo geral, em estudos realizados em animais, a TFD tem sido associada a diferentes protocolos de FS e irradiação em células de melanoma humano e de camundongos. Isso induz apoptose significativa, regressão, parada do crescimento do tumor, necrose tumoral e sobrevivência prolongada dos animais. No entanto, a TFD raramente alcançou remissão completa do melanoma experimental *in vivo*; a maioria dos relatos mostrou remissão parcial e/ou foi seguida por recorrência de melanoma. Na oncologia humana, a TFD é usada para tratar principalmente melanomas oculares. Contudo, ainda existe uma resposta limitada da TFD no melanoma cutâneo [25].

De acordo com Huang et al. 2013, a resposta da TFD no melanoma é limitada principalmente devido à interferência óptica da melanina, efeito antioxidante da melanina, sequestro de FS dentro dos melanossomas, defeitos nas vias apoptóticas e efluxo de FS pela ligação ATP cassette [26].

A interferência óptica é causada pela melanina, um pigmento produzido pelos melanossomas com alta absorção em todo o espectro visível. A melanina pode ser dividida em duas classes principais: eumelanina, um material insolúvel de preto a marrom escuro, encontrado em cabelos pretos e na retina dos olhos, e feomelanina, um material alcalisolúvel de amarelo a marrom-avermelhado encontrado em cabelos ruivos e penas vermelhas [27], [28].

A melanina se acumula dentro das células em grânulos com diferentes tamanhos, o que implica não apenas um componente absorvedor como também espalhador. Essas características limitam a penetração da luz em profundidade, restringindo qualquer técnica óptica às camadas mais superficiais do tumor.

Ela também desempenha um papel significativo na fotoproteção celular, atuando como um composto antioxidante, evitando danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio induzidas por quimioterapia [21]. Essa característica também está relacionada ao sequestro de FS pelos melanossomas. Durante a TFD, o FS absorve a luz e passa para um estado tripleto excitado, e então transfere energia para o oxigênio presente na célula. O oxigênio é excitado

para o estado singleto que é altamente reativo, causando oxidação das organelas, membranas, proteínas, e assim induzindo a morte da célula. Se o fotossensibilizador é sequestrado pelos melanossomas, as espécies reativas de oxigênio produzidas serão neutralizadas pela melanina, reduzindo o efeito da TFD. Essas características do melanoma que limitam a resposta à TFD podem ser superadas com estratégias para alterar as propriedades ópticas do tecido, a combinação de fotossensibilizadores e talvez novos regimes de irradiação de luz, como a excitação de 2 fótons.

A maioria dos FSs usados na terapia do câncer é baseada em uma estrutura de tetrapirrol, semelhante à da protoporfirina contida na hemoglobina. O fotossensibilizador deve ter um pico de absorção alto entre 600 e 800 nanômetros nm, já que a absorção de fótons com comprimentos de onda maiores que 800 nm não fornecem energia suficiente para excitar o oxigênio ao seu estado singleto e formar um rendimento substancial de espécies reativas de oxigênio. A maioria dos FSs são clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas [29], [30].

O primeiro FS a ser empregado clinicamente na terapia do câncer foi uma mistura solúvel em água de porfirinas, denominada derivado de hematoporfirina (HPD), cuja forma purificada se tornou mais tarde conhecida como Photofrin. Embora esse FS seja o mais amplamente empregado, o produto apresenta algumas desvantagens, incluindo uma fotossensibilidade da pele de longa duração e uma absorvância relativamente baixa no 630 nm. Sendo assim, há um grande esforço entre os químicos medicinais para descobrir novos fotossensibilizadores com potencial útil para a TFD no tratamento dos diversos tipos de câncer [30].

Alguns FS estão em processo de aprovação para uso clínico, enquanto outros estão sendo testados ainda. Um dos fotossensibilizadores em estudo, é o Photoditazine (PDZ). Na Rússia, Radachlorin e Photoditazine têm sido utilizados em estudos clínicos de TFD em tumores malignos da pele, cavidade oral, laringe, estômago, brônquio, brônquio, esôfago e outros. Resultados do estudo mostram resposta completa em 53,7% e resposta parcial em 46,3% dos casos. Pacientes em tratamento utilizando a TFD com PDZ não apresentaram complicações sistêmicas e locais, e o tratamento teve bons resultados com baixa fotossensibilização da pele [29], [31].

O PDZ foi desenvolvido por Stranadko et al., sendo um derivado de glucosamina da clorina e6, solúvel em água. Foi produzido comercialmente na VETAGRAND Company (Moscou, Rússia) com base em derivados de clorofila A. Photodithazine tem uma banda de absorção na

região vermelha, com  $\lambda_{\text{max}} = 663\text{-}668$  nm, podendo penetrar profundamente nos tecidos biológicos [32].

Uma das principais vantagens da TFD com PDZ é uma fototoxicidade da pele a curto prazo, cerca de três dias. Também o uso de Photodithazine como um fotossensibilizador para TFD permite concluir o procedimento de tratamento em 2 a 3 horas. Isso é especialmente importante para os pacientes que podem ser tratados em uma clínica ambulatorial. Os estudos da TFD com PDZ estão em andamento e num estado inicial. Contudo, essa combinação é muito promissora, mas mais pesquisas são necessárias para estimar doses adequadas de fármaco e de luz para vários tipos de tumores [31].

### 1.2. Agentes Clareadores Ópticos (OCAs)

Uma abordagem para aumentar a eficiência do TFD seria mudar as características ópticas do melanoma, especialmente relacionadas à absorção e ao espalhamento, e melhorar a penetração da luz em profundidade. Uma maneira de atingir esses objetivos é utilizar os agentes clareadores ópticos (“*Optical Clearing Agents*”, OCAs).

Os OCAs são agentes hiperósmicos não tóxicos como glicerol, polietilenoglicol 400 (PEG-400), sacarose, sulfóxido de dimetilo (DMSO) e outros. Possuem índice de refração próximo ao da pele (aproximadamente 1,4). Assim, quando aplicado à pele, eles efetivamente diminuem o alto espalhamento de luz causada por microinterfaces de tecido. Além desse efeito, os agentes clareadores ópticos promovem a desidratação osmótica local, onde ocorre a saída da água da célula mais rapidamente do que a entrada dos OCAs após a aplicação. Conseqüentemente, é extraída água das células e/ou fibras de colágeno. Esses processos fornecem um efeito adicional de correspondência do índice de refração devido à redução do conteúdo de água no espaço intersticial, além de reduzir a espessura geral do tecido e torná-lo mais denso (mais ordenado), fazendo com que haja empacotamento do colágeno e elastina [33],[34].

Todos os efeitos citados acima aumentam a transmitância óptica do tecido. Os OCAs, portanto, reduzem a atenuação da luz e aumentam a penetração da luz em profundidade [35]. Também são usados principalmente para melhorar a imagem do tecido usando microscopia confocal e de 2 fótons e também a tomografia de coerência óptica [35], [36].

Nosso grupo foi o pioneiro na associação dos OCAs e TFD para o tratamento do melanoma cutâneo [37]. Nesse estudo, obtivemos um resultado bastante favorável quando empregado o

uso combinado do OCA e a terapia fotodinâmica com dois fotossensibilizadores, no entanto, os mecanismos envolvidos não foram elucidados.

Neste estudo presente, foi avaliado o efeito do uso de OCAs para reduzir a atenuação da luz no melanoma cutâneo, avaliando a modificação da terapia fotodinâmica baseada nas alterações bioquímicas e morfológicas induzidas no tumor. Para isso foi utilizada como técnica óptica a espectroscopia Raman e análises histológicas para analisar mudanças morfológicas decorrentes do uso dos OCAs.

### 1.3. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é um método óptico para determinar a composição química de diferentes amostras orgânicas e inorgânicas, e também a distribuição de certos compostos em uma amostra. Mudanças significativas nos espectros Raman são geradas por alterações bioquímicas em células e tecidos, podendo ou não ser causadas devido a uma doença, como por exemplo, mudança na intensidade relativa de um pico, mudança conformacional de proteínas, gerando novos picos ou mudança de intensidade dos picos, etc. Essa técnica pode ser usada para diagnósticos, prognósticos ou como uma ferramenta para avaliar novas terapias, como a TFD [38].

Quando um objeto ou amostra é irradiado pela luz, ela pode ser refletida, absorvida ou espalhada. No espalhamento, a maioria dos fótons são espalhados elasticamente. Esses fótons dispersos elasticamente têm a mesma energia (frequência) e, portanto, o mesmo comprimento de onda que os fótons incidentes. Se a dispersão é elástica, o processo é chamado de dispersão Rayleigh. No entanto, uma pequena fração de luz (aproximadamente 1 em  $10^7$  fótons) é espalhada em frequências ópticas diferentes e, geralmente, mais baixas que a frequência dos fótons incidentes. Esse processo não é elástico, levando a uma dispersão inelástica. Tal dispersão é denominada efeito Raman. O espalhamento Raman pode ocorrer com uma mudança na energia vibracional, rotacional ou eletrônica de uma molécula [39], [40].

Quando a frequência da radiação incidente é maior que a frequência da radiação dispersa, as linhas de Stokes aparecem no espectro Raman. Mas quando a frequência da radiação incidente é menor que a frequência da radiação dispersa, as linhas anti-Stokes aparecem no espectro Raman. As bandas Raman deslocadas por Stokes envolvem as transições dos níveis vibracionais de energia mais baixa para a mais alta e, portanto, as bandas Stokes são mais intensas que as bandas anti-Stokes[39], [41].

O modelo clássico de espectroscopia considera uma molécula simples como um oscilador harmônico. Forças atrativas e repulsivas são equilibradas no estado de equilíbrio. A radiação monocromática se propaga através da amostra e exerce uma força sobre as cargas. Essa força deforma as ligações da amostra, fazendo com que a molécula não esteja mais em equilíbrio e sim, polarizada. O efeito Raman depende da mudança na distribuição de carga que dá origem a essa polarização. As deformações periódicas acionam transições vibracionais e rotacionais da ligação que vibram em uma frequência característica, excitando a molécula para um estado virtual. Uma pequena fração dos fótons que interagem com a molécula experimentará uma transferência de energia e induzirá uma mudança no estado vibracional de uma molécula. A radiação emitida pelas moléculas polarizadas oscilantes será de diferentes frequências que descreve a excitação de fótons para estados virtuais de energia e a perda resultante (Stokes) ou ganho (anti-Stokes) de energia que ocorre devido à interação da luz com os modos vibracionais associados com ligações químicas na amostra [40], [41].

Uma molécula pode absorver e emitir energia interagindo com fótons que podem excitar moléculas para estados vibracionais mais altos. Essas vibrações são quantizadas e são chamadas de modos normais de vibração da molécula. Uma molécula linear com  $N$  átomos possui  $3N-5$  modos normais, enquanto uma molécula não linear possui  $3N-6$  modos normais. O movimento que caracteriza cada modo normal pode ser: movimento de ligação entre três átomos conectados por duas ligações, alongamento de movimento entre dois átomos ligados, modos de deformação fora do plano que alteram uma estrutura planar para uma não-planar [40]–[42].

O espectro vibracional de uma molécula é composto por bandas que representam algumas vibrações normais ativas. O espectro depende das massas dos átomos da molécula, da força de suas bandas químicas e do arranjo atômico. Sendo assim, moléculas diferentes têm espectros vibracionais diferentes ou “impressões digitais” (“finger prints”), ou seja, cada molécula tem um espectro Raman único. Os espectros vibracionais são úteis para elucidar a conformação / estrutura molecular. Por exemplo, a frequência de alongamento das ligações fósforo-fósforo varia de 460 a 610 a 775  $\text{cm}^{-1}$  para os casos de ligação simples, dupla e tripla, respectivamente [40], [41].

A interpretação do espectro se torna mais difícil com moléculas mais complexas que podem assumir numerosas conformações e também em tecidos e amostras mais complexas que possuem mais de uma molécula.



Um espectro Raman é apresentado como uma mudança de intensidade versus comprimento de onda. Os espectros Raman podem ser registrados em um intervalo de 4000 a 10  $\text{cm}^{-1}$ . No entanto, os modos normais ativos de vibração de moléculas orgânicas de Raman ocorrem na faixa de 4000-400  $\Delta\text{cm}^{-1}$  [39].

A espectroscopia Raman apresenta um método de análise de amostra com um alto grau de flexibilidade, permitindo que os dados sejam registrados a partir de uma variedade de tipos de amostras, como células e tecidos fixos, frescos ou vivos. A aplicação da microscopia Raman à caracterização de materiais biológicos é um campo em rápida expansão e tem sido utilizada na farmacologia, microbiologia, toxicologia, ciência vegetal e biologia humana [42].

Vários pesquisadores relataram a espectroscopia Raman de tecidos biológicos, que inclui investigações em ossos, córnea, tecido cervical, tecido epitelial, pulmão, mama, pele, tecido gastrointestinal, cérebro, tecido oral, fígado, proteína heme, artérias coronárias humanas, linfócitos, glóbulos vermelhos humanos, células cancerígenas mistas, células vivas humanas, microbianas células, células individuais, saliva, DNA, etc [43].

Avanços consideráveis foram feitos, principalmente em relação ao diagnóstico e prognóstico do câncer. A espectroscopia Raman em conjunto com outras técnicas e análises, podem classificar neoplasias, por exemplo, no cérebro, mama, bexiga, colorretal, laringe, pulmão, linfonodo, tecidos esofágicos, próstata, uterinos e cervicais [42].

Sigurdsson et al. pesquisou sobre a detecção de câncer de pele utilizando espectros Raman. Foi relatada uma classificação correta de 80,5 + 5,3% para melanoma maligno e 95,8 + 2,7% para carcinoma basocelular (BCC), o que é excelente e semelhante ao de dermatologistas treinados. Os resultados mostraram-se reprodutíveis, e pequenas bandas distintas no espectro, correspondentes a lipídios e proteínas específicos, também mostraram informações discriminantes que foram usadas para diagnosticar lesão cutânea [44].

O diagnóstico do câncer de pele mais comum, o carcinoma basocelular foi realizado por Gniadecka et al. utilizando a espectroscopia Raman. Biópsias de BCC histopatologicamente verificadas e pele normal foram colhidas e analisadas por espectroscopia NIR-FT Raman usando um laser de 1064 nm Nd: YAG como fonte de radiação. Os resultados indicaram alterações na estrutura de proteínas e lipídios em amostras de câncer de pele. Alterações espectrais foram observadas nas bandas de proteínas, amida I (1640-1680  $\text{cm}^{-1}$ ), amida III (1220-1300  $\text{cm}^{-1}$ ) e alongamento de ligação C-C (provavelmente nos aminoácidos prolina e

valina, 928–940  $\text{cm}^{-1}$ ) e nas bandas característica dos lipídios, vibração CH<sub>2</sub> (1420-1450  $\text{cm}^{-1}$ ) e - (CH<sub>2</sub>) vibração de torção em fase em torno de 1300  $\text{cm}^{-1}$ . A análise das intensidades da banda nas regiões de 1220 a 1360, 900 a 990 e 830 a 900  $\text{cm}^{-1}$  permitiu uma separação completa entre o BCC e os espectros normais da pele. Em conclusão, os espectros Raman do BCC diferiram consideravelmente dos da pele normal e a técnica pode ser vista como uma ferramenta promissora para o diagnóstico de câncer de pele [45].

Para os diferentes tipos de câncer, alguns picos são mais pronunciados que outros, ou menos intensos, possibilitando a diferenciação de um câncer de pele para outro. Por exemplo, o espectro Raman do melanoma é caracterizado pelo aumento da intensidade da banda vibracional lipídica em 1310  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto no carcinoma basocelular, o aumento da intensidade da banda é observado em torno de 1330  $\text{cm}^{-1}$ . Em certos tipos de câncer, também são observados níveis mais altos de hidratação da pele [41], [46].

Características de espectros de componentes de tecidos como melanina, colágeno tipo I e III, actina, trioleína e DNA também foram usadas para configurar modelos, a fim de comparar sua sensibilidade em relação à separação de BCC, melanoma e tecido normal. O colágeno e a actina do tipo III tiveram um bom desempenho na separação do BCC do tecido normal e do melanoma. As características do DNA foram de maior intensidade para o BCC em comparação com o tecido normal e ainda mais altas para o melanoma. Isso é esperado na transformação maligna devido ao aumento das taxas de replicação celular [41], [47].

O espectro Raman da pele apresenta alguns picos ou regiões características, que correspondem a determinadas moléculas. Na faixa de 3200 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ , o espectro Raman da pele mostra uma banda larga associada às vibrações (OH) da água do tecido e às vibrações (NH) das proteínas. Uma banda intensa e assimétrica com o máximo em 2938  $\text{cm}^{-1}$  é a banda correspondente a vibrações de alongamento das cadeias laterais dos aminoácidos CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, bem como as cadeias lipídicas, enquanto uma banda intensa com o máximo em torno de 1450  $\text{cm}^{-1}$  corresponde às suas vibrações de deformação [46].

Na faixa de 1200–1700  $\text{cm}^{-1}$ , são observadas as bandas de amidas associadas às vibrações das ligações amidas nas cadeias polipeptídicas. A banda amida I é dominada pelas vibrações (C = O), enquanto a banda amida III pelas vibrações (C – N) e (N – H). No espectro Raman da epiderme humana, o máximo da banda de amida I está localizado em torno de 1652  $\text{cm}^{-1}$ , o que é típico de queratinas de mamíferos com a conformação principalmente alfa-helicoidal. No

espectro Raman de toda a pele, o máximo dessa banda é observado em números de onda mais altos de aproximadamente  $1658\text{ cm}^{-1}$ . Essa banda corresponde principalmente ao colágeno tipo I [46].

Dentro da banda de amida III, existem dois máximos observados no espectro da pele:  $1271\text{ cm}^{-1}$  (atribuído a fragmentos não polares com alto conteúdo de prolina que formam uma hélice tripla de colágeno típica) e  $1244\text{ cm}^{-1}$  (atribuído a fragmentos polares de colágeno caracterizados por baixo conteúdo de prolina). As vibrações observadas na região de  $1050$  a  $1150\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas principalmente aos modos (C – C) dos componentes lipídicos do tecido. As bandas de  $935$  e  $817\text{ cm}^{-1}$  surgem das vibrações C – C esqueléticas das proteínas. As características espectrais na região de  $450$ - $1050\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas aos aminoácidos:  $1003\text{ cm}^{-1}$  à fenilalanina,  $919\text{ cm}^{-1}$  à prolina,  $877\text{ cm}^{-1}$  à hidroxiprolina e triptofano,  $855\text{ cm}^{-1}$  à prolina e tirosina. As vibrações de alongamento das ligações S-S da cistina são visíveis na região  $510$ - $545\text{ cm}^{-1}$  [46].

Haishan Zeng et al. realizou um estudo, em que foi obtido o espectro Raman *in vivo* de melanina da pele humana usando um espectrômetro Raman rápido de infravermelho próximo (NIR). Os sinais Raman da melanina cutânea *in vivo* foram semelhantes aos observados nas eumelaninas naturais e sintéticas. O espectro da melanina Raman é dominado por dois picos intensos e amplos de  $1580$  e  $1380\text{ cm}^{-1}$ , que podem ser interpretados como originários do alongamento no plano dos anéis aromáticos e do alongamento linear das ligações C-C nos anéis, ao longo com algumas contribuições das vibrações de CH nos grupos metil e metileno. Variações nas frequências de pico e largura de banda desses dois sinais Raman foram observadas, devido a diferentes ambientes biológicos circundantes da melanina. Também foi observado variações na posição de pico e largura de banda dessas duas bandas Raman devido a diferentes condições patológicas na pele, bem como a diferentes ambientes biológicos em amostras de diferentes fontes [27].

#### 1.4. Objetivos

O objetivo principal do presente estudo é avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica associada ao clareamento óptico para o tratamento do melanoma cutâneo em modelo animal.

Objetivos específicos:

2. Avaliar a modificação da interação da luz empregando a espectroscopia de fluorescência no melanoma cutâneo com a aplicação de agentes clareadores ópticos.

3. Avaliar a resposta fotodinâmica no melanoma cutâneo com e sem o uso de clareadores ópticos a partir da análise das alterações bioquímicas (espectroscopia Raman) e morfológicas (histopatologia).

## Capítulo 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Linhagem celular

A linhagem de células de melanoma pigmentado utilizada foi a B16F10, adquirida da *American Type Cell Collection* (ATCC), cultivada em meio “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina-estreptomicina, mantidas a 37 °C em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Modelo Animal

Os camundongos utilizados foram os da linhagem balb/c nude com 6 semanas de vida, adquiridos do Biotério Central de Medicina da USP, unidade de São Paulo. Foram mantidos sob iluminação em um ciclo claro escuro de 12 horas, alimentados com ração e água autoclavadas, com alojamento com exaustão de ar rack ventilado Alesco e injeção individuais e direta de ar. Para a realização dos procedimentos, os camundongos foram anestesiados usando 5% de isoflurano para indução e 2% para manutenção. A lesão do melanoma foi induzida por uma injeção intradérmica de 10<sup>6</sup> células B16F10 em 30 µL de PBS nas regiões do flanco direito, utilizando uma agulha 30G. Os tumores foram avaliados a cada dia pela medição de seu tamanho e aspectos macroscópicos. Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Física de São Carlos (USP - São Carlos / Brasil), documento número 5500080618 (anexo 1). Os animais foram examinados diariamente, avaliando especialmente se apresentavam letargia excessiva, postura curvada ou anormal e convulsão, sendo realizada a morte quando necessário. Uma fotografia exemplificando o tumor cutâneo de desenvolvimento típico a 2 dias após a indução é mostrada na Figura 2.1.



Figura 2.1: Fotografia do camundongo com melanoma cutâneo pigmentado (região delimitada em vermelho) dois dias após a indução.

Fonte: Elaborada pela autora

### 2.3. Agentes clareadores ópticos

Foram investigados, em um trabalho anterior do grupo [37], os efeitos de diminuição da atenuação da luz em pele usando várias misturas de OCA, envolvendo glicerol em diferentes concentrações e soluções de mistura de PEG-400, 1,2 propanodiol. Glicerol, PEG-400 e 1,2-propanodiol foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®. Os índices de refração de glicerol 70%, PEG-400 e 1,2-propanodiol são 1,42, 1,46 e 1,43, respectivamente (índice de refração semelhante ao índice de pele de 1,4). A solução que apresentou melhores resultados foi da associação entre PEG-400 e 1,2-propanodiol na proporção de 19:1, respectivamente. Ela foi escolhida para ser usada em todos os seguintes experimentos da TFD. Além disso, a solução OCA (aproximadamente 300  $\mu\text{L}$ ) foi aplicada topicamente massageando a região por 15 minutos antes da irradiação de luz e reaplicada quando necessário.

### 2.4. Cinética do Photodithazine (PDZ)

O fotossensibilizador utilizado na TFD para o estudo presente foi o Photodithazine. O PDZ é um sal comercial de glucosamina da clorina e6, sendo solúvel em água e uma molécula anfifílica, que em meio biológico apresenta carga negativa, como porfirinas. Foi produzido comercialmente na VETAGRAND Company (Moscou, Rússia) de solução estoque de concentração 5mg/mL, possuindo uma banda de absorção na região vermelha, com  $\lambda_{\text{max}} = 663\text{-}668\text{ nm}$  e alta penetração nos tecidos biológicos (Figura 2.2) [48], [49].

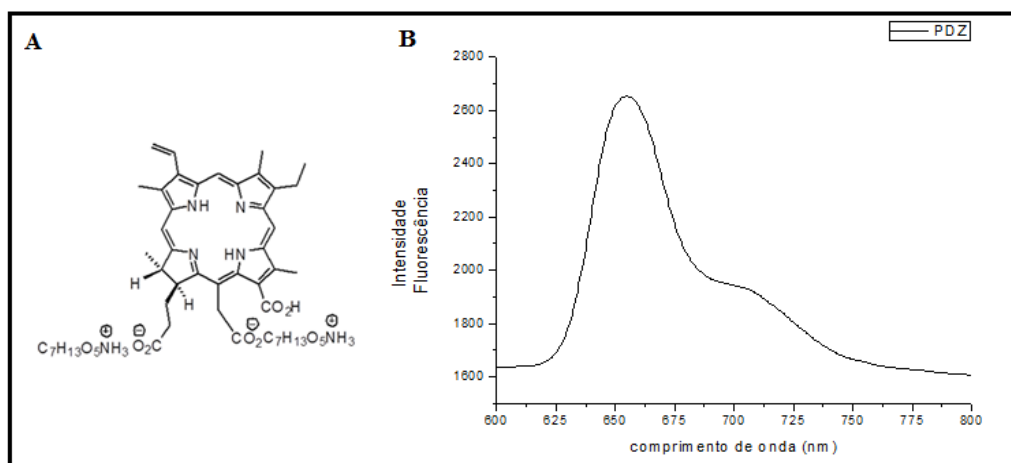


Figura 2.2: A- Estrutura química da molécula Photodithazine e B - Espectro de fluorescência do PDZ de 600 a 800 nm.

Fonte: A- Adaptada de Layla Pires [48], B- Elaborada pela autora

A cinética do PDZ foi feita usando o sistema de espectroscopia de fluorescência, onde um espectrofotômetro USB2000 (Ocean Optics®, EUA) é acoplado a um computador portátil, pertencente ao grupo CePOF, do Instituto de Física de São Carlos –IFSC/USP. A fluorescência foi medida de maneira não invasiva posicionando a sonda de investigação na superfície da pele que cobre o melanoma e a fonte de excitação de luz utilizada foi de 532 nm (Figura 2.3).



Figura 2.3: Ilustração da medida de fluorescência da sonda de investigação na superfície da pele que cobre o melanoma.

Fonte: Elaborada pela autora

O espectro de fluorescência foi obtido no tumor antes e após a injeção com PDZ em função do tempo (de 0 a 24 horas), nos intervalos de tempo de 30 em 30 minutos até 3h30min, depois de 1 em 1 hora até 7h30min, com uma última medida em 24h. O PDZ foi administrado via intraperitoneal na dose de 9 mg/kg em 3 camundongos balb/c nude após 2 dias de crescimento do tumor melanoma.

## 2.5. Protocolo Terapia Fotodinâmica

Após a indução do tumor, esperou-se 2 dias até que o crescimento atingisse 1 mm de espessura e foi realizada, posteriormente a TFD. Os animais foram anestesiados com isoflurano inalado 5% para indução e 2% para manutenção. O fotossensibilizador utilizado foi o

Photodithazine (PDZ) a uma concentração de 9,0 mg/Kg, sendo injetado por via intraperitoneal. A irradiação foi realizada 2h30min, tempo definido pela cinética avaliada, após a injeção de PDZ. O OCA foi aplicado topicamente com massagem leve na lesão durante um período de 15 min antes da irradiação. Para o PDZ mediado pela TFD, foi usado um laser diodo a 660 nm como fonte de luz, a irradiação a 100 mW/cm<sup>2</sup> e energia de 100 J/cm<sup>2</sup> (Figura 2.4).

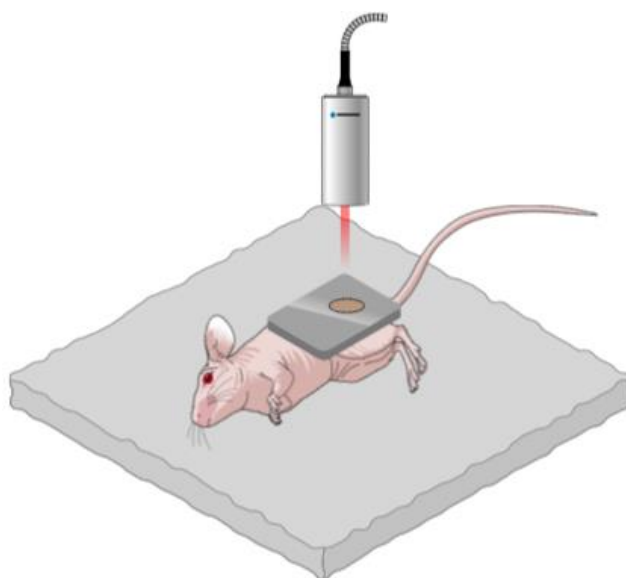


Figura 2.4: Ilustração da irradiação da luz a 660 nm no melanoma cutâneo pigmentado após 2h30min da administração do PDZ para realização da TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Durante a irradiação foi feita uma máscara de papel alumínio para proteção dos tecidos normais adjacentes com um orifício que envolvia o tumor. A descrição geral dos grupos experimentais é apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Grupos experimentais controle, OCA e OCA+TFD. O grupo controle é o animal com melanoma sem tratamento; o grupo OCA é o animal com melanoma com aplicação apenas do OCA, sem o tratamento com TFD; e o grupo OCA+TFD é o animal com melanoma, em que foi feita a injeção do PDZ, com a aplicação do OCA, e por fim o tratamento com TFD.

Grupos Experimentais	Número de animais
Controle	6
OCA	6
OCA +TFD	6

Fonte: Elaborada pela autora

Foram obtidos espectros de fluorescência do tumor antes e após a administração do fotossensibilizador e após a irradiação da TFD, a fim de monitorar a distribuição e intensidade

relativa do fotossensibilizador no tumor, tanto no grupo com ou sem tratamento prévio com OCA.

Os animais foram mortos por overdose anestésica via inalatória, sendo confirmada a morte pela ausência de batimentos cardíacos, movimentos respiratórios, palidez de mucosas, temperatura corpórea e ausência de reflexos. Logo após a morte dos animais, foi feita a coleta do tecido irradiado logo após a TFD para a análise da espectroscopia Raman. Também foi feita a coleta depois de 3 e 7 dias após a TFD para análise histológica. Para a espectroscopia Raman, a amostra foi congelada em Tissue Tek OCT, enquanto para análise histológica, o tumor foi retirado e colocado em formol para posterior emblocamento em parafina. Para ambas as análises o corte da lesão foi feito com uma margem de tecido normal.

## **2.6. Protocolo Terapia Fotodinâmica 2 doses**

Os mesmos parâmetros anteriormente descritos foram utilizados para a TFD com 2 doses, assim como os mesmos grupos experimentais. Para a primeira sessão, a concentração do PDZ foi de 9,0 mg/Kg, sendo injetado por via intraperitoneal. A irradiação foi realizada 2h30min após a injeção de PDZ e o OCA foi aplicado topicamente com massageamento leve na lesão durante um período de 15 min antes da irradiação. A fonte de luz foi o laser diodo a 660 nm, a irradiação a 100 mW/cm<sup>2</sup> e energia de 100 J/cm<sup>2</sup>.

A segunda sessão da TFD foi feita após 3 dias da primeira sessão. Esse tempo foi escolhido, porque, do terceiro ao quarto dia após a terapia, o tumor volta a crescer. Sendo assim, novamente foi realizada a terapia sob as mesmas condições da primeira, ou seja, mesma concentração do PDZ, mesmo tempo de espera para irradiar o tumor, aplicação do OCA durante 15 minutos antes da irradiação, com mesma energia e irradiância.

O mesmo monitoramento por espectroscopia de fluorescência foi feito para esse protocolo. Após a segunda sessão de TFD, foi feita a coleta do tecido irradiado após 3 e 7 dias para análise histológica. A preparação das amostras foram as mesmas descritas anteriormente para 1 sessão.

## **2.7. Avaliação da resposta da Terapia Fotodinâmica**

Foram realizadas medidas empregando técnicas ópticas de espectroscopia Raman, avaliando as alterações bioquímicas induzidas pela TFD associada ou não ao OCA, como também análise histológica.



### 2.7.1. Microespectroscopia Raman

Na instrumentalização da espectroscopia Raman, de um modo geral, o espectrômetro Raman está acoplado a um microscópio óptico. A luz laser incide na amostra numa região com poucos micrômetros de diâmetro através da lente objetiva do microscópio, retornando para a lente até o filtro holográfico e apenas os fótons de comprimento de onda alterados alcançam a fenda de entrada do espectrômetro. Tais fótons sofrem dispersão por uma grade e detectados pela câmera CCD[16-17].

O equipamento utilizado foi um sistema Microscopia Raman Confocal pertencente ao Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos –IFSC/USP. O sistema WITec Alpha 300 RAS (Alemanha) possui dois lasers de trabalho, um em 532 nm e o outro em 785 nm, além de várias objetivas de 20, 50, 63 e 100x de aumento.

Depois de feita a indução do tumor, foi esperado 4 dias para que ele atingisse 2 mm de espessura e posteriormente feita sua extração. Logo em seguida, o tumor foi colocado no líquido Tissue Tek OCT para congelamento em nitrogênio líquido. No dia seguinte ao congelamento, o tumor foi cortado transversalmente no criostato pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e aderido a uma lâmina de vidro. A análise dos tumores foi feita em 785 nm na objetiva de aumento de 20x. Os espectros foram medidos em triplicata para cada profundidade, sendo que as medidas foram feitas entre 25  $\mu\text{m}$  a no máximo 2000  $\mu\text{m}$ , de 100 em 100  $\mu\text{m}$  da superfície da epiderme (Figura 2.5).

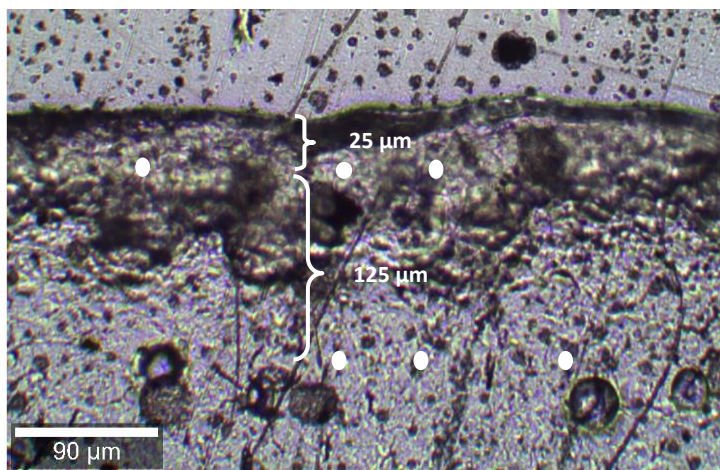


Figura 2.5: Fotografia Microscopia Raman das medidas dos espectros em profundidade. Os espectros foram obtidos em triplicata, em 3 pontos diferentes, mas numa mesma profundidade. A primeira foi em 25  $\mu\text{m}$ , com incrementos de 100 em 100  $\mu\text{m}$  a partir daí.

Fonte: Elaborada pela autora

Os grupos analisados são descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Grupos de tratamento analisados na Microscopia Raman

<b>Grupo de Tratamento</b>	<b>Número de animais</b>
Controle	3
OCA	3
TFD	3
OCA + TFD	3

Fonte: Elaborada pela autora

Os dados foram processados pelo programa Project-FOUR-4.1, da WITec software (Ulm, Alemanha) e Origin 9.1 (USA).

Para tirar o sinal de fundo de fluorescência de cada espectro, foi criada uma linha de base manualmente, em que foram escolhidos alguns pontos mínimos, a fim de criar uma curva suave de grau polinomial 2. Depois de criada a linha de base, foi feita a subtração desta com os dados do espectro original, gerando os espectros a serem analisados.

As análises dos espectros Raman foram realizadas inicialmente de maneira qualitativa para a identificação de modificações entre os grupos controle e tratados (com ou sem OCA), ou seja, de alterações do espectro, especialmente de deslocamento de pico, supressão ou aparecimento de picos, intensidades relativas de regiões espectrais de interesse. Posteriormente à identificação dessas alterações, foi realizada a correlação com as ligações químicas e consequentes biomoléculas de interesse.

### **2.7.2. Análise Macroscópica**

Os animais foram monitorados diariamente, desde o primeiro dia de indução do tumor, até o último dia após o tratamento, sendo esse dia o terceiro dia ou o sétimo dia, tanto após a primeira sessão de TFD como após a segunda sessão. Foram monitoradas as lesões de maneira macroscópica e tiradas fotos dos tumores.

### **2.7.3. Análise Histológica**

Depois de 3 e 7 dias após o tratamento, foram retirados os tumores e colocados em cassetes no formol, a fim de serem emblocados em parafina, cortados e corados em H&E (hmatxilina e eosina). Também foi realizada a remoção do tumor após 3 e 7 dias da segunda sessão de TFD. O processo de emblocamento, corte e coloração foi feito em colaboração com o Departamento de Odontologia da UNESP-Araraquara.

As lâminas foram escaneadas e digitalizadas num dispositivo escaneador de lâminas histológicas (Panoramic DESCK, 3DHISTECH, Hungria) pertencente ao grupo do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da UFSCar.

## Capítulo 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Cinética do Photodithazine (PDZ)

Foram realizadas 3 medidas de fluorescência em cada tumor, para cada tempo escolhido, variando primeiramente de 30 em 30 minutos até 3h30min, depois de 1 em 1 hora até 7h30min, com uma última em 24h. A Figura 3.1 apresenta os espectros de fluorescência para os animais investigados. Cada curva do gráfico, representa a média das 3 medidas e dos 3 animais. A curva em cor preta (t0) representa a autofluorescência do tumor com baixa emissão na região entre 650 e 700 nm. A emissão de fluorescência característica do PDZ sob excitação em 532 nm é uma banda entre 650 e 700 nm, com maior amplitude em 667 nm. Na Figura 3.1 é possível observar como a intensidade de fluorescência ao redor de 667 nm apresentou uma variação em função do tempo após a administração do fotossensibilizador, com o aumento de intensidade com o aumento do tempo de medida.

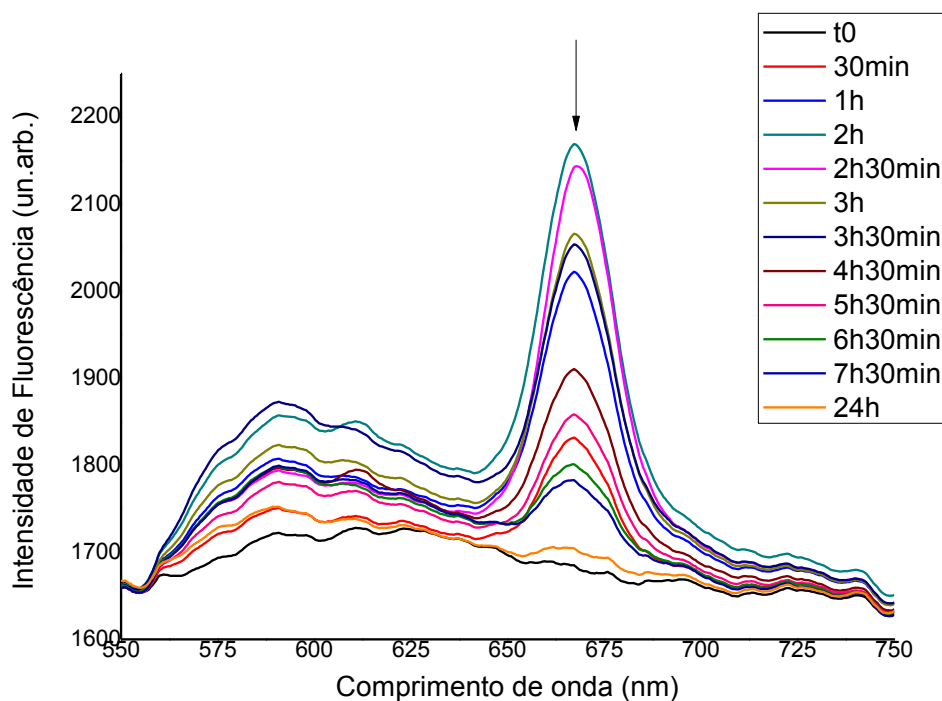


Figura 3.1: Espectros de fluorescência em função do tempo após a fotossensibilização do animal com PDZ dos 3 animais.

A intensidade relativa da emissão do PDZ pode ser utilizada como uma medida indireta da distribuição e concentração relativa desse fotossensibilizador, ou seja, quanto maior a intensidade de fluorescência, maior a concentração no tecido investigado. Esse tipo de análise vem sendo empregada em estudos para definição de protocolo e avaliação da eficiência para TFD [52]. Vollet Filho et al. relata que a detecção e quantificação da presença do fotossensibilizador no tecido por espectroscopia de fluorescência oferece duas vantagens: ela pode ser usada como uma técnica não invasiva para lesões tóxicas e também permite a coleta de informações em tempo real devido à rápida resposta de fluorescência das moléculas excitadas [53]. Alessandra Lima et al. realizou a cinética da Protoporfirina IX (PpIX) também por fluorescência para criar novos protocolos na aplicação clínica do medicamento 5-ALA e MAL, já comercialmente utilizado e produzido na PDTPharma, Brasil [54],[55]. Hilde Buzzá et al. também realizou estudos de cinética de diferentes fotossensibilizadores utilizando a espectroscopia de fluorescência na membrana corioalontóica [56].

Um dos principais fatores para uma efetiva reação fotodinâmica é a distribuição homogênea e uma quantidade suficiente do fotossensibilizador em todo o tumor a ser tratado. Dessa forma, se busca a irradiação no tempo de concentração máxima do FS. Sendo assim, inicialmente foi realizada a normalização pela amplitude em  $t_0$  e, posteriormente, calculada a razão da amplitude da fluorescência no pico de 667 nm, pela amplitude da autofluorescência em 667 nm ( $t_0$ ) para cada tempo e para cada animal. A Figura 3.2 apresenta a média dos 3 animais.

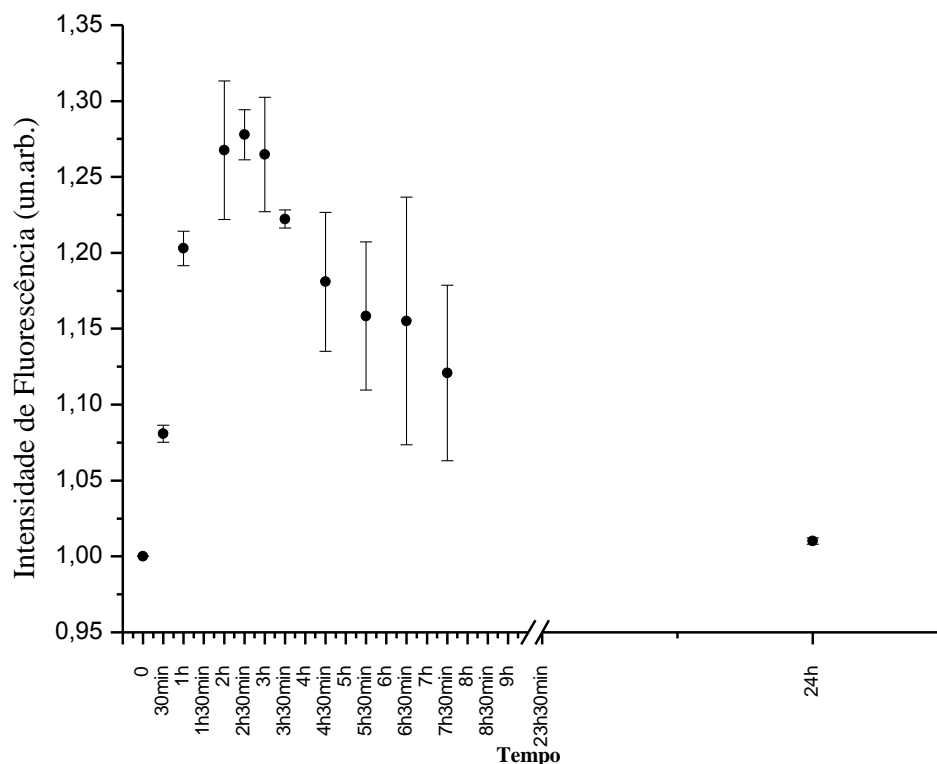


Figura 3.2: Monitoramento da amplitude da banda de emissão do PDZ em função do tempo após a administração intraperitoneal.

Fonte: Elaborada pela autora

As variações do maior tempo de acúmulo do fotossensibilizador que ocorrem entre os animais são esperadas, uma vez que a cinética e os mecanismos de concentração do fármaco no tumor dependem da vascularização do local, assim como de características metabólicas e teciduais do tumor, propriedades individuais e inerentes. Além disso, o próprio desenvolvimento do tumor não é completamente similar, ocorrendo variações no volume e bioquímica no tumor induzido. Todos esses fatores não são controláveis ao longo do experimento.

A concentração do PDZ no tumor atingiu seu máximo no tempo de 2h30min. Esse tempo, portanto, foi o escolhido como tempo ótimo para realização da TFD. A fluorescência ainda foi medida para o período de 24h depois da administração do PDZ. Praticamente todo fotossensibilizador já havia sido eliminado pelo tumor. Contudo pouca seletividade foi vista quando comparado ao tumor e a pele normal (Figura 3.3). Vale aqui ressaltar, que no presente modelo de indução tumoral, existe uma espessura de pele normal sobre o melanoma cutâneo, induzido subcutaneamente. Esse fator, contribui para o sinal final do espectro de fluorescência

medido, ou seja, o sinal de fluorescência considerado do tumor é a soma do sinal da pele normal acima do tumor com o sinal do tumor em si.

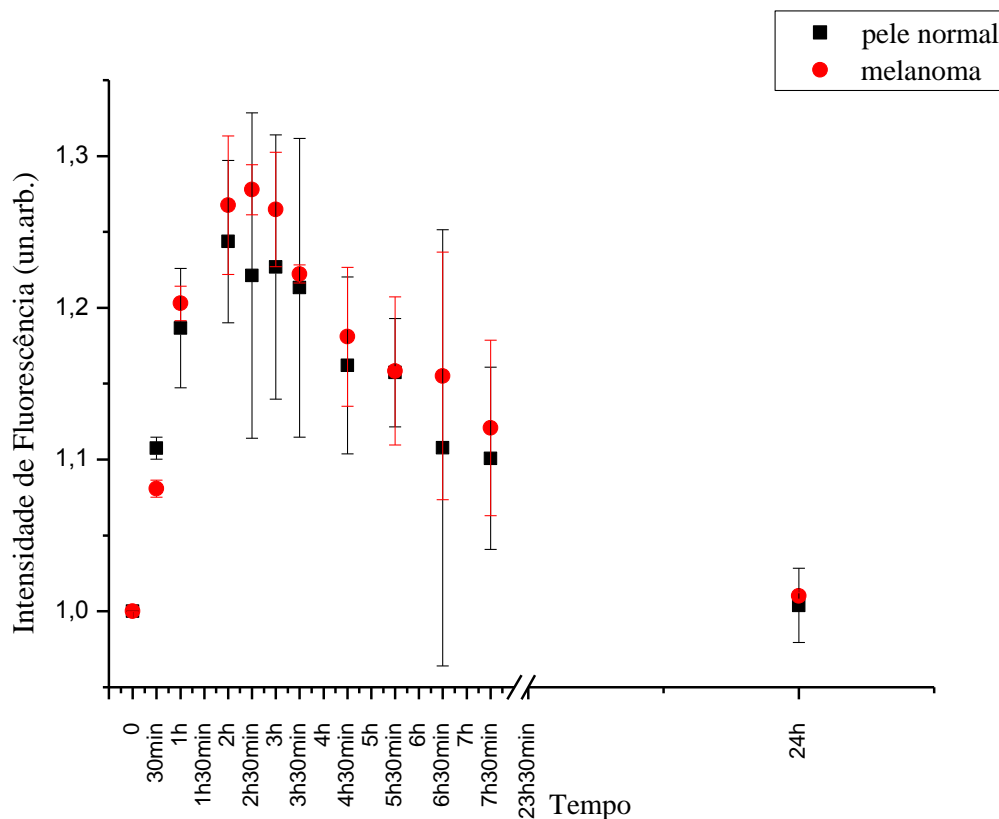


Figura 3.3: Intensidade de fluorescência PDZ normalizada em função do tempo para pele normal (preto) e melanoma (vermelho).

Fonte: Elaborada pela autora

### 3.2. Análise do melanoma por Espectroscopia Raman

Não existe ainda um conhecimento completo da ação dos agentes clareadores em pele *in vivo* ou em melanoma. Por esse motivo, inicialmente buscou-se verificar que modificações são ocasionadas no melanoma pelos OCAs, assim como até que espessura os agentes penetram após a administração tópica.

Os tumores foram observados e medidos após a indução das células até atingirem a espessura desejada. Para a análise por Microscopia Raman com e sem clareador, a espessura foi de 2 mm e para a análise após a TFD de 1 mm. O tamanho do tumor foi maior para a primeira análise, uma vez que não era conhecido até que profundidade os agentes clareadores poderiam

penetrar, sendo este um dos principais descobertas dados a serem encontrados nesse estudo. Já para análise após a TFD, o tamanho foi mantido segundo o protocolo estabelecido pelo trabalho anteriormente feito pelo grupo. O crescimento do tumor se apresentou rápido, de aproximadamente 4 dias para a espessura de 2 mm e de 2 dias para a de 1 mm. Mesmo com o crescimento rápido, não foram detectados efeitos colaterais ou reação dolorosa nos animais.

Para avaliar as características bioquímicas no melanoma cutâneo previamente tratado com agentes clareadores ópticos foi feita a análise dos espectros Raman.

### 3.2.1. Análise Raman dos tumores com e sem OCAs

Quimicamente, as moléculas PEG-400 e 1,2-propanediol da solução do agente clareador, apresentam grupos metila, álcool e ligações C-C, sendo cadeias poliméricas, como pode ser visto na Figura 3.4.

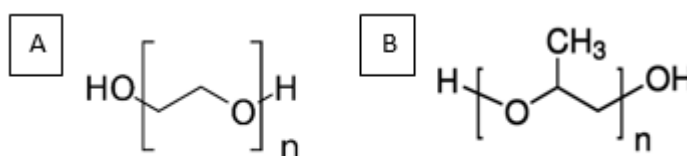


Figura 3.4: Estrutura química do A-PEG-400 e B-1,2-propanediol.

Fonte: Elaborada pela autora

Sabendo as características químicas dos compostos do agente clareador, foi obtido o espectro Raman dessa solução, que apresentou picos bem característicos, como pode ser visto na Figura 3.5.

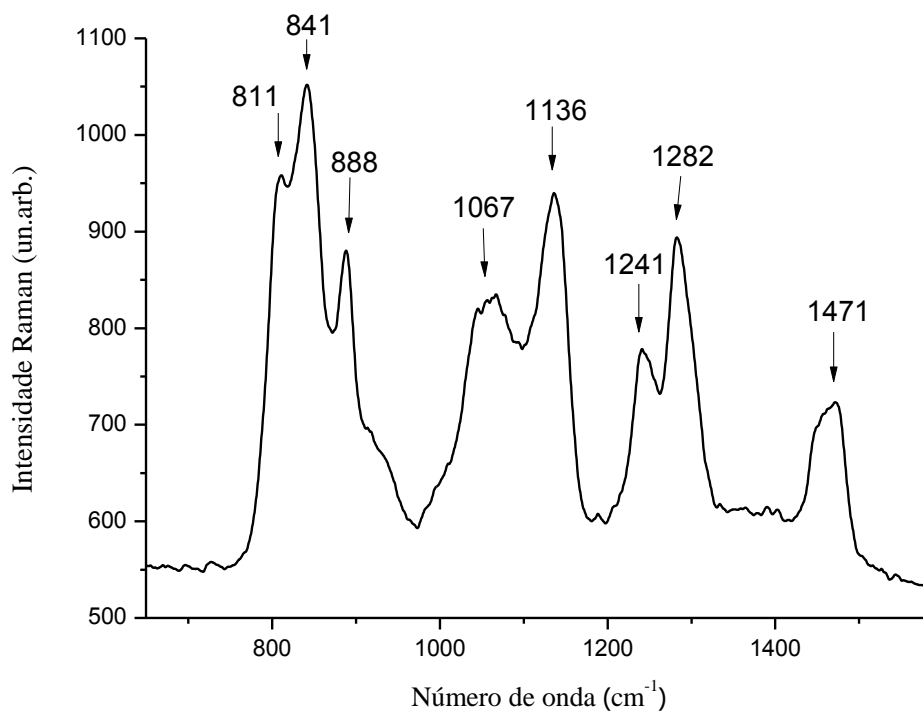


Figura 3.5: Espectro Raman do agente clareador óptico (PEG-400 e 1,2-propanediol).

Fonte: Elaborada pela autora

O pico de  $888\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração do grupo metila presente no 1,2-propanediol e o  $1136\text{ cm}^{-1}$  à conformação C-C do esqueleto de ambas as moléculas. Além disso, o espectro do PEG400 encontrado na literatura corrobora com o obtido[57].

A seguir foram obtidos os espectros dos tumores controle e dos tumores com OCA e comparados entre si.

A Figura 3.6 apresenta os espectros coletados entre  $225\text{--}325\text{ }\mu\text{m}$  da superfície do tumor, normalizados no pico da fenilalanina, e com a presença do sinal fluorescência. Em uma análise qualitativa, pode-se observar ausência de picos estreitos e pronunciados. Esse tipo de espectro é característico de investigação de tecidos biológicos, uma vez que devido à grande variedade de moléculas presentes e consequente grande variedade de grupos químicos, o sinal resultante coletado é composto pela contribuição de todas as biomoléculas presentes. Além disso, as interações da luz com o tecido são bem mais complexas quando comparadas com as que ocorrem em células ou soluções.

Os espectros foram tirados desde a superfície do tumor até seu interior. A primeira informação importante vista nos espectros, é que para uma mesma profundidade, o tumor apresentou espectros variados, confirmando sua heterogeneidade, como mostra a Figura 3.6.



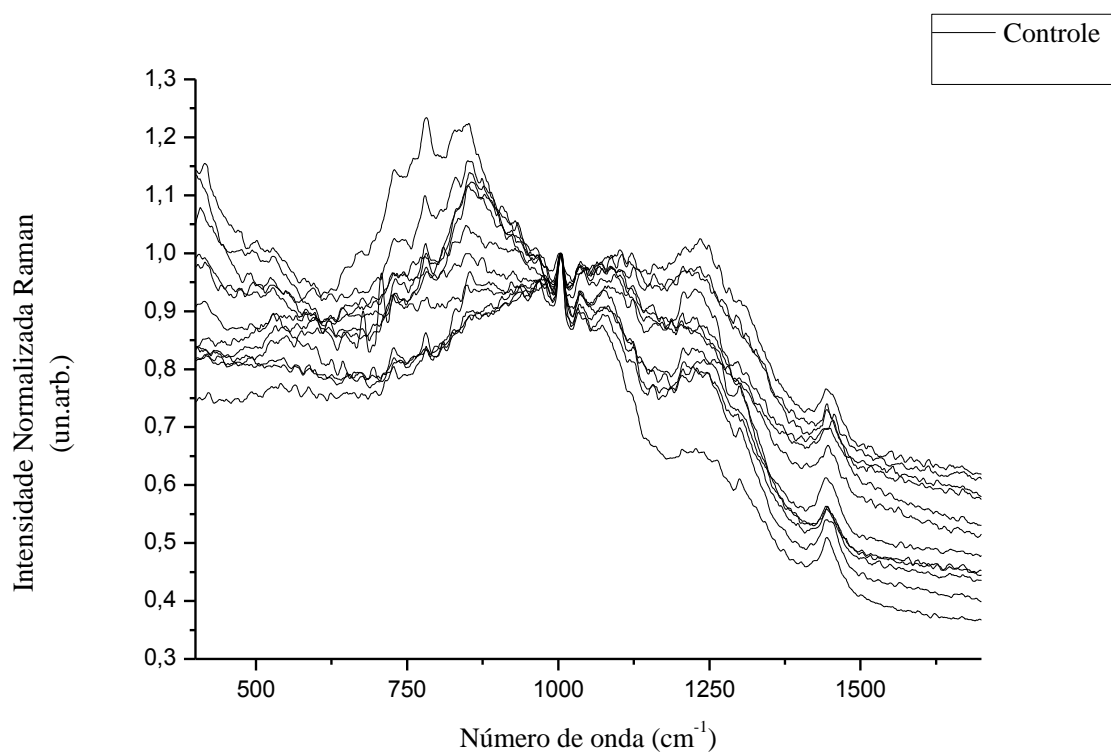


Figura 3.6: Vários espectros Raman do tumor, mostrando a heterogeneidade de um mesmo melanoma a uma profundidade de 225-325  $\mu\text{m}$ .

Fonte: Elaborada pela autora

Para serem feitas as análises e possíveis comparações, verificou-se quais picos sempre eram presentes nos espectros, mesmo com a heterogeneidade do tumor. Sendo assim, foram escolhidos dois espectros representativos, tanto para o tumor apenas, como para o tumor com clareador.

Na Figura 3.7 é possível ver os espectros da região mais superficial do tumor (25-125  $\mu\text{m}$ ).

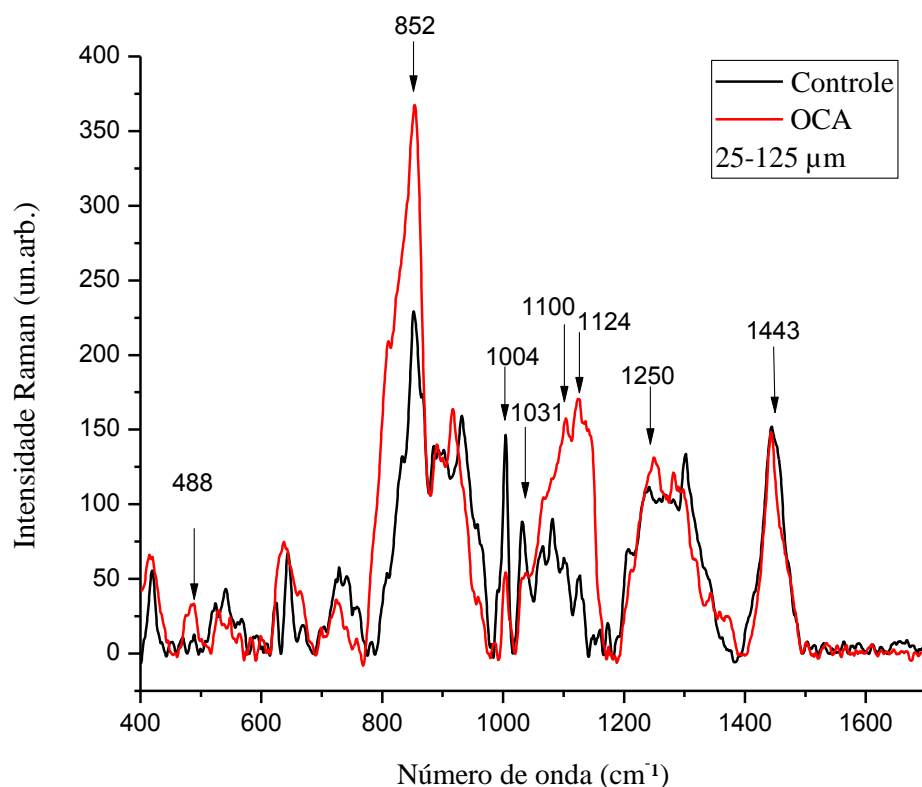


Figura 3.7: Espectro Raman da região de 25-125  $\mu\text{m}$  do melanoma após a aplicação do OCA comparado com o controle.

Fonte: Elaborada pela autora

Os picos mais característicos tanto do controle quanto do tumor com OCA para a região mais superficial foram 488-90  $\text{cm}^{-1}$ , 850-854  $\text{cm}^{-1}$ , 1004  $\text{cm}^{-1}$ , 1031  $\text{cm}^{-1}$ , 1100  $\text{cm}^{-1}$ , 1124  $\text{cm}^{-1}$ , 1250  $\text{cm}^{-1}$  e 1443  $\text{cm}^{-1}$ . O pico em 488-90  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao polissacarídeo glicogênio, uma das moléculas responsáveis pela reserva energética das células. A região 850-854  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibrações de estiramento de ligação simples dos aminoácidos, e polissacarídeos; tirosina e a respiração do seu anel (proteínas); estiramento C-C do anel de prolina; (C-O-C) modo esquelético de anômeros. Os picos de 1000-1004  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a ligações da fenilalanina. Em 1004  $\text{cm}^{-1}$  é a ligação C-C no anel, principalmente do colágeno. Em 1031  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a ligação C-H da fenilalanina; resíduos de colágeno; ligação C-N de proteínas. Os picos em 1100  $\text{cm}^{-1}$  e 1124  $\text{cm}^{-1}$ , se referem às ligações C-C de lipídeos e ácidos graxos. Em 1250  $\text{cm}^{-1}$  à amida III; guanina e citosina (NH<sub>2</sub>). E, por fim, em 1443  $\text{cm}^{-1}$ , à deformação de CH<sub>2</sub> de lipídios e proteínas; triglicerídeos (ácidos graxos) e colesterol [43], [47], [58]–[61].

Não foi observado nenhum pico referente apenas ao espectro do agente clareador. Contudo, se for considerada a banda de 750 à 875  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3.8), o pico 841  $\text{cm}^{-1}$  do agente

clareador e o pico do tumor em  $854\text{ cm}^{-1}$  estão na mesma região. Sendo assim, o aumento relativo de intensidade dos picos nessa região pode ser devido ao efeito do agente clareador.

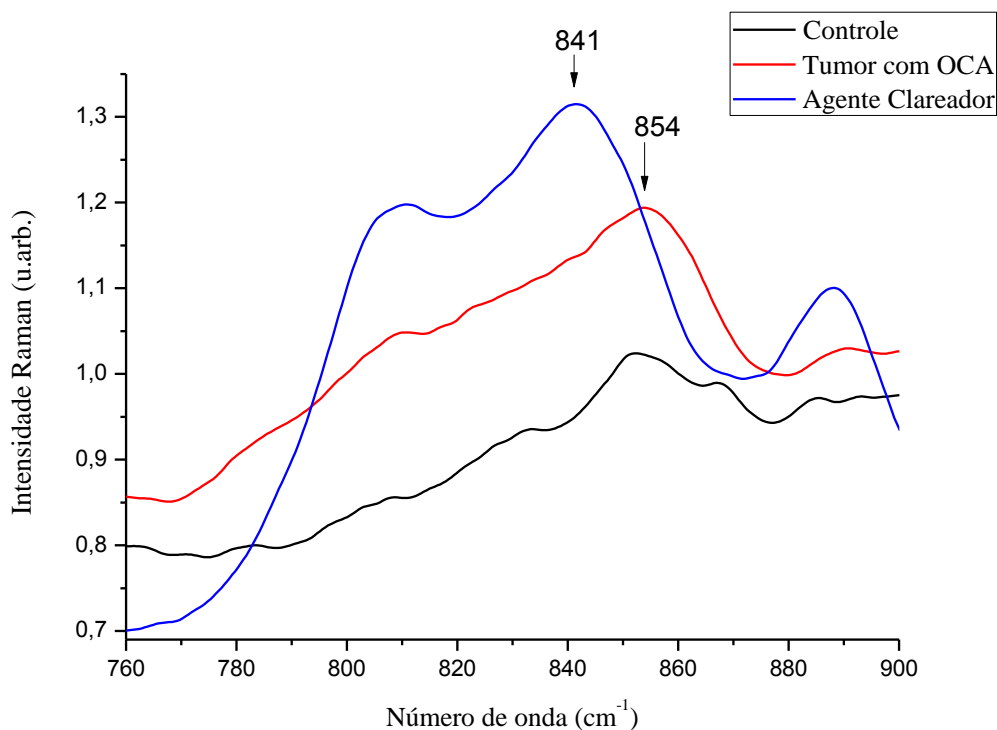


Figura 3.8: Zoom da região de 760 a 900  $\text{cm}^{-1}$  da Figura 3.7.

Fonte: Elaborada pela autora

A maior mudança, portanto, ocorreu na região de  $850\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$ , onde estão localizados os picos de Raman do núcleo C-C das proteínas e lipídios, indicando que as vibrações do esqueleto de proteínas e lipídios juntamente com a conformação de proteínas (colágeno) e vibrações de C-H de lipídios estão entre os mais afetados após a aplicação de clareamento óptico.

Já na região mais central do tumor ( $225$  e  $325\ \mu\text{m}$ ), é possível ver, além dos picos anteriormente citados, outros picos, que surgem com maior ou menor intensidade (Figura 3.9).

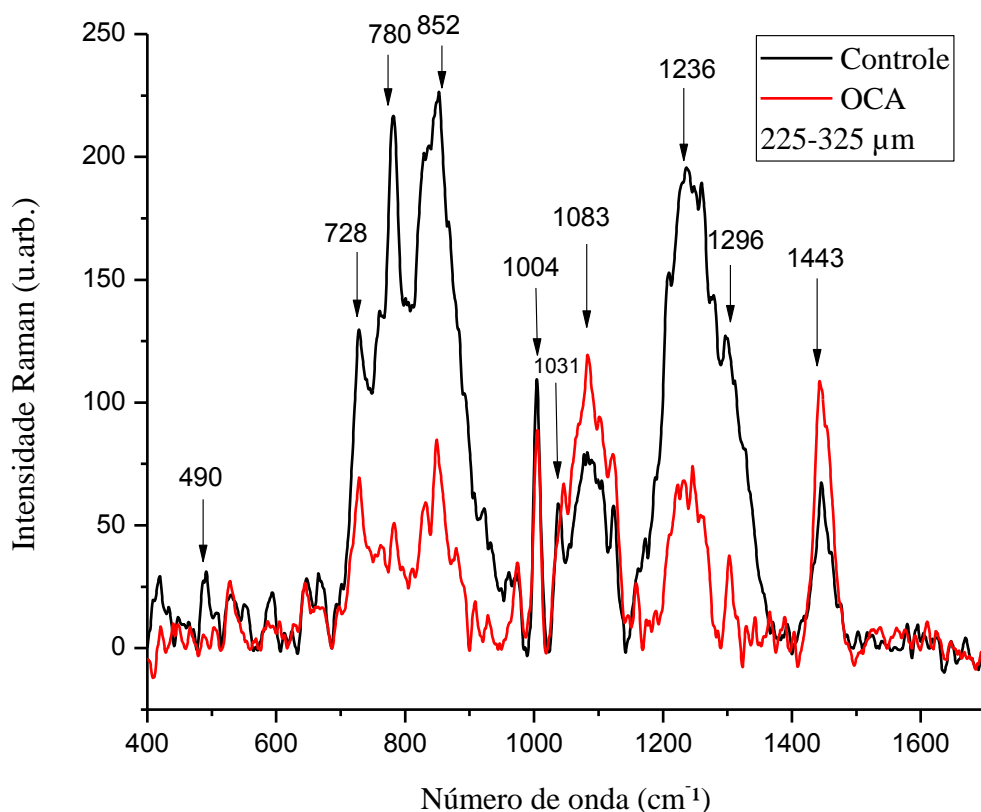


Figura 3.9: Espectro Raman da região de 225-325  $\mu\text{m}$  do melanoma após a aplicação do OCA comparado com o controle.

Fonte: Elaborada pela autora

Dentre eles estão o  $728\text{ cm}^{-1}$ ,  $780\text{ cm}^{-1}$ ,  $1083\text{ cm}^{-1}$ ,  $1236\text{ cm}^{-1}$  e  $1296\text{ cm}^{-1}$ . O primeiro pico em  $728\text{ cm}^{-1}$  corresponde à ligação C-C da prolina do colágeno e ao aminoácido alanina. O pico em  $780\text{ cm}^{-1}$ , aos modos de respiração dos anéis das bases no DNA / RNA. O pico em  $1032\text{ cm}^{-1}$ , corresponde às ligações  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  de colágeno e fosfolipídios. Em  $1083\text{ cm}^{-1}$ , à ligação C-N de proteínas e lipídeos. Em  $1236\text{ cm}^{-1}$ , amida III e, por fim, em  $1296\text{ cm}^{-1}$  à deformação  $\text{CH}_2$ . Os picos na região de  $1235$  a  $1245\text{ cm}^{-1}$  também se referem a conformações de colágeno / elastina de beta-folha e *random coil* [43], [47], [58]–[61]. As diferenças de intensidade entre os picos podem ser devidas às mudanças conformacionais no colágeno, sendo que a quantidade de alfa-hélices pode estar diminuindo e a proporção de conformações de folha-beta e *random coil* estar aumentando. Os agentes clareadores aparentam causar uma expansão nos biotécidos e a dissociação das fibrilas de colágeno em microfibrilas, mudando, portanto, o empacotamento de colágeno no tumor [12, 19, 20].

Por fim, na região entre 525  $\mu\text{m}$  e 725  $\mu\text{m}$  (Figura 3.10) outros picos, anteriormente não vistos e pouco pronunciados, apresentaram intensidade maior e mais pronunciada.

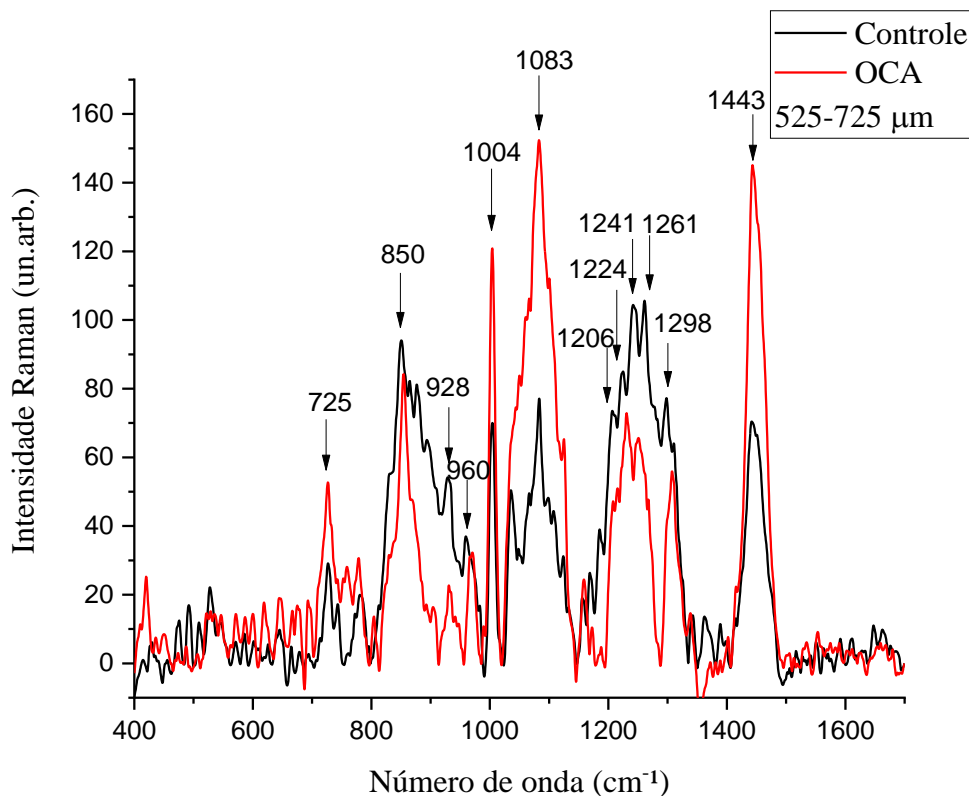


Figura 3.10: Espectro Raman da região de 525-725  $\mu\text{m}$  do melanoma após a aplicação do OCA comparado com o controle.

Fonte: Elaborada pela autora

São eles 928, 960, 1206, 1224, 1241, 1261, 1298  $\text{cm}^{-1}$ . O pico em 928  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à ligação C-C de aminoácidos como prolina e valina. O pico em 960  $\text{cm}^{-1}$ , à vibração  $\text{PO}_4^{3-}$ . Em 1206  $\text{cm}^{-1}$ , à hidroxiprolina e tirosina. Em 1224  $\text{cm}^{-1}$  à amida III de folhas  $\beta$ . Em 1241  $\text{cm}^{-1}$  ao fosfato assimétrico  $\text{PO}_2$  originado dos grupos fosfodiésteres de ácidos nucleicos em tecidos malignos. Em 1261  $\text{cm}^{-1}$  à amida III e ligação  $\text{CH}_2$  de lipídeos. Em 1298  $\text{cm}^{-1}$  à deformação e torção da ligação  $\text{CH}_2$  de lipídeo [43], [47], [58]–[61].

As regiões do espectro Raman que mais sofreram mudanças se referem a proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Tanto na região de 225-325  $\mu\text{m}$  como a 525-725  $\mu\text{m}$ , picos referentes à ácidos nucleicos são mais evidentes do que na região mais superficial. Isso ocorre devido ao fato que, no interior do tumor, existe uma quantidade muito grande de células e elas estão, em sua maioria, no processo de necrose (identificado na microscopia Raman e nas

lâminas de histologia). Sendo assim, grande parte do material genético está aglomerado e exposto em regiões mais profundas do tumor, amplificando o sinal Raman.

A partir da profundidade de 725  $\mu\text{m}$ , os espectros apresentaram pouca diferença quando comparados o controle com o tumor com clareador. Devido ao fato da diferença entre os espectros ser pouco significativa, isso pode indicar que o clareador provavelmente não penetrou até essa profundidade e causou pouco ou nenhum efeito no tumor e, por consequência, no caminho da luz.

Para todas as profundidades, é possível observar mudanças em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os aminoácidos como prolina, tirosina, valina e fenilalanina foram os mais afetados na presença do agente clareador. Isso pode ter acontecido, porque os OCAs substituem a água presente do tecido/tumor, podendo então interferir na estrutura desses aminoácidos ou na torção ou rotação de algumas ligações químicas.

Dentre os picos referentes à mudanças em proteínas, algumas ligações são específicas para determinada proteína, como por exemplo, ao colágeno, enquanto outras aparecem em diversas proteínas. Contudo, algumas proteínas existem no melanoma em maior quantidade que outras, sendo o pico Raman provavelmente devido às ligações dessas proteínas. As proteínas, portanto, que possivelmente sofreram alguma mudança com a presença dos agentes clareadores, são fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e proteases, colágeno, integrinas, lamininas, fibronectina, tenascina e tirosina quinases.

Dois fatores de crescimento produzidos por células de melanoma estimulam a proliferação da própria célula originadora: os fatores de crescimento autócrinos, como bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básicos) e os fatores de crescimento parácrinos, como PDGF (Platelet-derived growth factor) e também o VEGF (Vascular endothelial growth factor), que modulam o microambiente promovendo o crescimento e invasão tumoral. Os efeitos parácrinos incluem proliferação de fibroblastos, angiogênese e inflamação. Outros fatores de crescimento derivados do melanoma com potencial indutor de estroma são o TGF $\beta$ , que é um fator de crescimento transformante  $\beta$ ; o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-I) e a insulina, sendo IGF-I um fator de motilidade para células de melanoma e produzido por fibroblastos [64].

As moléculas de adesão celular (CAMs) permitem que as células se classifiquem em grupos e formem estruturas complexas e, portanto, são importantes na organogênese e na

reconstrução tecidual. As com maior expressão no melanoma são CAM-1 intracelular (ICAM-1) e MUC18. As células do melanoma também secretam as proteases, que se acredita estarem envolvidas na invasão e metástase. Pelo menos cinco grupos de proteases podem ser encontrados nos sobrenadantes de cultura de células de melanoma, incluindo ativadores de plasminogênio do tipo tecido e urocinase, colagenases tipo IV, estromeolisina, heparanase, catepsinas e fator tecidual [64], [65].

As membranas basais são compostas de diversos tipos de colágeno. Dentre eles, as moléculas de colágeno tipo IV tem relação direta com o melanoma. Essas moléculas são heterotrímeros compostos de três cadeias  $\alpha$ , que existem em seis formas geneticamente distintas,  $\alpha 1$  (IV) a  $\alpha 6$  (IV). A adesão de células de melanoma à cadeia  $\alpha 1$  (IV) já foi bem documentada, sendo que a primeira sequência da  $\alpha 1$  (IV) se liga à integrina  $\alpha 3\beta 1$ . A cadeia  $\alpha 3$  (IV) também promove a adesão das células do melanoma [66]–[68].

As Integrinas são heterodímeros com uma subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  e são divididas em subfamílias definidas pela subunidade  $\beta$  expressas na superfície da célula. Podem transmitir informações fornecidas por colágenos dérmicos através da membrana plasmática. Uma subfamília são as integrinas  $\alpha v\beta 3$  que se ligam a um grande número de proteínas da matriz extracelular, incluindo vitronectina, fibrinogênio, trombospondina, fibronectina, osteopontina e colágeno. Sua expressão está diretamente ligada à progressão neoplásica e à tumorigenicidade no melanoma maligno [64], [69], [70].

As lamininas são uma família de glicoproteínas heterotriméricas  $\alpha\beta\gamma$ , comumente encontradas nas membranas basais. Têm funções adesivas, promotoras de migração e sinalização. Estas moléculas promovem adesão celular e migração via integrinas, assim como o colágeno, e outros receptores de superfície celular [71].

Fibronectina e tenascina são duas proteínas da matriz extracelular também secretadas por melanomas. A fibronectina é uma grande glicoproteína com massa molecular de 440.000 daltons. Possui diversas ligações dissulfureto, mas algumas das sequências contêm grupos sulfidrilo livres. Ela interage com colágeno, fibrinogênio, fibrina, glicosaminoglicanos, etc. A secreção de tenascina, por sua vez, está associada à progressão tumoral [64], [72]–[74].

Por fim, as células de melanoma também expressam as proteínas tirosina quinases, que são receptores transmembrana ou quinases citoplasmáticas, sendo frequentemente implicadas na transdução de sinal e incluem EPH, FGF-R, INS-R, TYRO-3, NF-R, CSK e FES [64].

Os clareadores também demonstraram modificar estruturas lipídicas. À medida que o melanoma progride, as células tumorais passam da derme para o tecido subcutâneo, que é amplamente preenchido com adipócitos. As células de melanoma também entram em contato direto com adipócitos quando se metastatizam e secretam fatores lipolíticos. Além disso, os adipócitos liberam lipídios e várias adipocinas, como a leptina, que podem impulsionar o crescimento do melanoma. A oxidação de ácidos graxos nas células de melanoma sugerem que elas podem influenciar o metabolismo das células de melanoma [75]. Portanto, sendo o melanoma rico em lipídeos, foi possível ver, pela espectroscopia Raman, mudanças nas estruturas lipídicas causadas pelos OCAs.

### 3.2.2. Análise Raman dos tumores com e sem OCAs logo após TFD

Foram também obtidos espectros de microscopia Raman para a análise dos grupos após a TFD. Segue abaixo os espectros da região mais superficial do tumor (Figura 3.11).

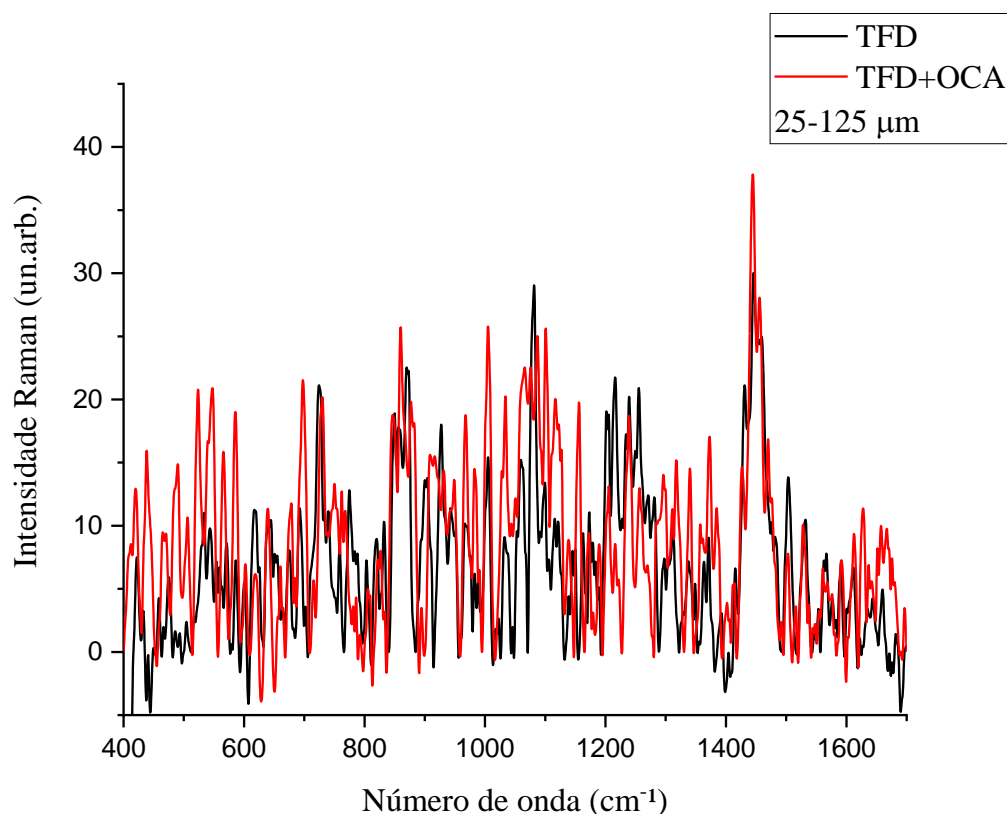


Figura 3.11: Espectro Raman da região de 25 a 125  $\mu\text{m}$  do melanoma com e sem OCA após a TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Uma diferença pouco evidente foi notada nos espectros dos tumores com e sem clareador após a TFD para a região mais superficial. Isso pode ter ocorrido, uma vez que na



parte mais superficial do tumor não existe diferença da distribuição da luz e conseqüentemente vai ocorrer maior morte ou dano celular do que em regiões mais profundas. Nesse caso, como nessa camada não existe o efeito da atenuação da luz, não se observa modificação da resposta fotodinâmica, com ou sem o tratamento com os OCAs.

Para a região entre 225  $\mu\text{m}$  e 325  $\mu\text{m}$ , os espectros apresentaram mudanças bem relevantes (Figura 3.12).

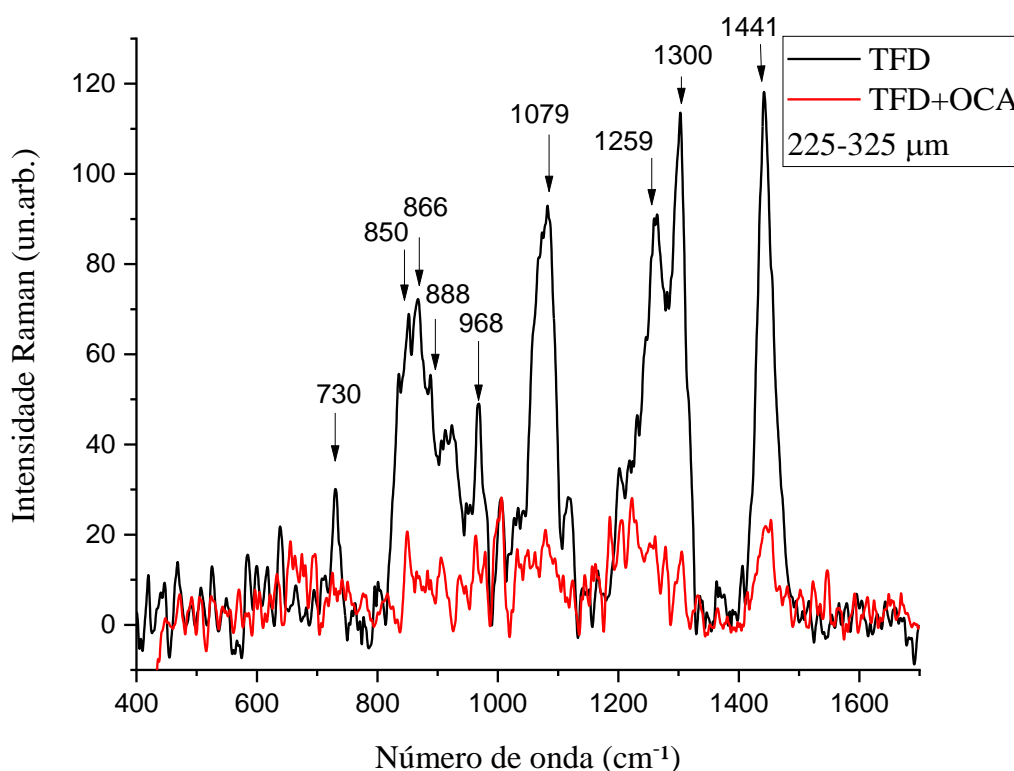


Figura 3.12: Espectro Raman da região de 225 a 325  $\mu\text{m}$  do melanoma com e sem OCA após a TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Os picos 730, 850, 1301 e 1441  $\text{cm}^{-1}$  já eram evidentes nos espectros sem a aplicação da TFD (Figura 3.9) para a mesma profundidade. Contudo, outros picos importantes que exibiram algum tipo de mudança de ligações ou conformações foram 866, 888, 968, 1259 e 1079  $\text{cm}^{-1}$ . O pico 866  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração da ribose no RNA; o 888  $\text{cm}^{-1}$  à bandas de proteínas, modos proteicos estruturais de tumores e  $\beta$ -anômeros; o 968  $\text{cm}^{-1}$  à lipídeos; o 1259

à guanina e citosina e o  $1079\text{ cm}^{-1}$  à fosfolipídios, estiramento C-C ou C-O lipídico, C-C ou estiramento PO<sub>2</sub> de ácido nucléico e ao colágeno [43], [47], [58]–[61].

É possível observar que todos os picos descritos anteriormente apresentaram sua intensidade diminuída quando houve a aplicação do agente clareador antes da TFD. Isso indica que a maior mudança ocorreu em proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. Esse espectro se assemelha aos espectros coletados na parte mais superficial do tumor, indicando que o OCA minimizou o efeito da atenuação da luz.

Para a região mais profunda do tumor, entre  $525\text{ }\mu\text{m}$  e  $725\text{ }\mu\text{m}$ , os picos mais expressivos foram os mesmos citados anteriormente (Figura 3.13).

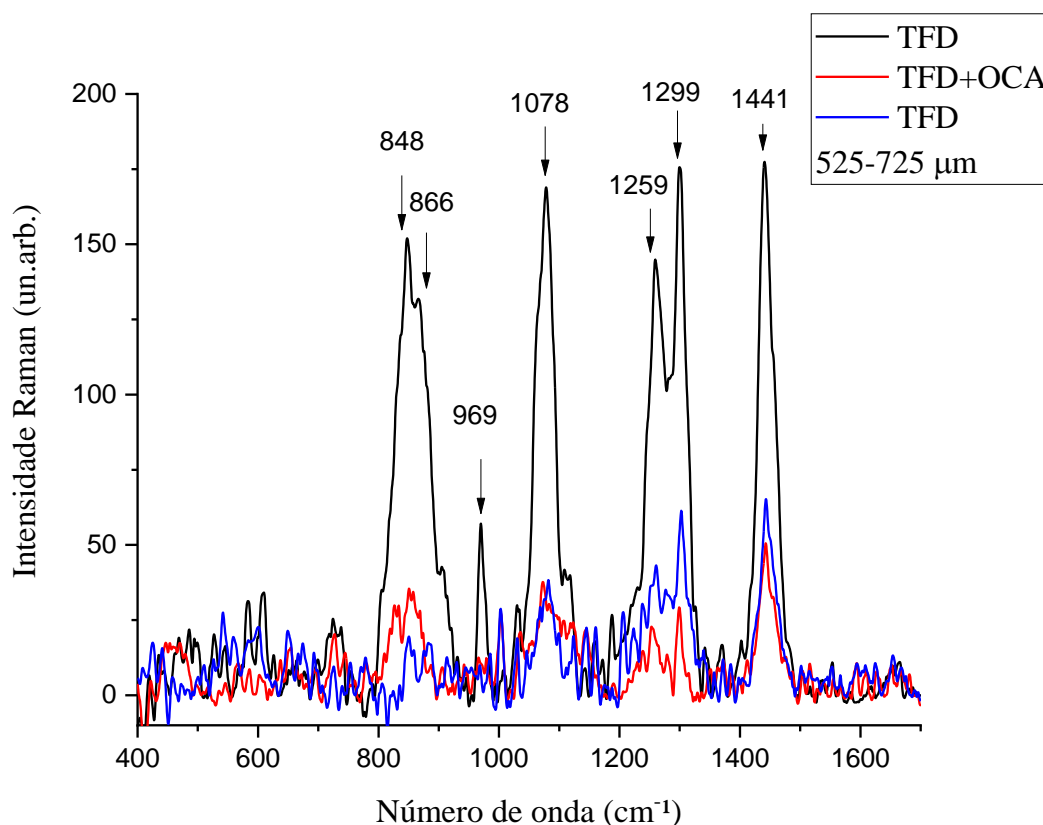


Figura 3.13: Espectro Raman da região de  $525$  a  $725\text{ }\mu\text{m}$  do melanoma com e sem OCA após a TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Foram observados também espectros muito semelhantes, tanto no tumor com clareador, como no sem clareador após a TFD. Em sua maioria, os espectros foram semelhantes entre os dois grupos. Mas também foram observados espectros semelhantes aos das regiões superficiais e aos de com OCA na espessura entre  $225\text{ }\mu\text{m}$  e  $325\text{ }\mu\text{m}$ , evidenciando uma resposta

fotodinâmica. A variação espectral é decorrente à heterogeneidade tumoral, mas também da heterogeneidade da resposta fotodinâmica em maiores profundidades. Espectros mais semelhantes entre o grupo com e sem a aplicação do clareador, demonstram uma resposta fotodinâmica mais homogênea, enquanto que espectros com uma maior variação de intensidades, demonstram uma resposta menos homogênea.

Foi observado, também, que o agente clareador em todas as profundidades tornou o tumor mais opticamente homogêneo, bem como a resposta fotodinâmica, já que não houve grandes variações nos espectros do tumor com o clareador mesmo em diferentes pontos, como pode ser visto na Figura 3.14. Esse é um resultante relevante, uma vez que a heterogeneidade de irradiação tumoral é um dos efeitos mais importantes que resultam em um tratamento falho, uma vez que ilhas de células tumorais permanecem vivas [22, 23]. Como o tratamento com os OCAs vem demonstrando o potencial de tornar o tumor mais “opticamente homogêneo”, a consequente resposta fotodinâmica deverá ser otimizada.

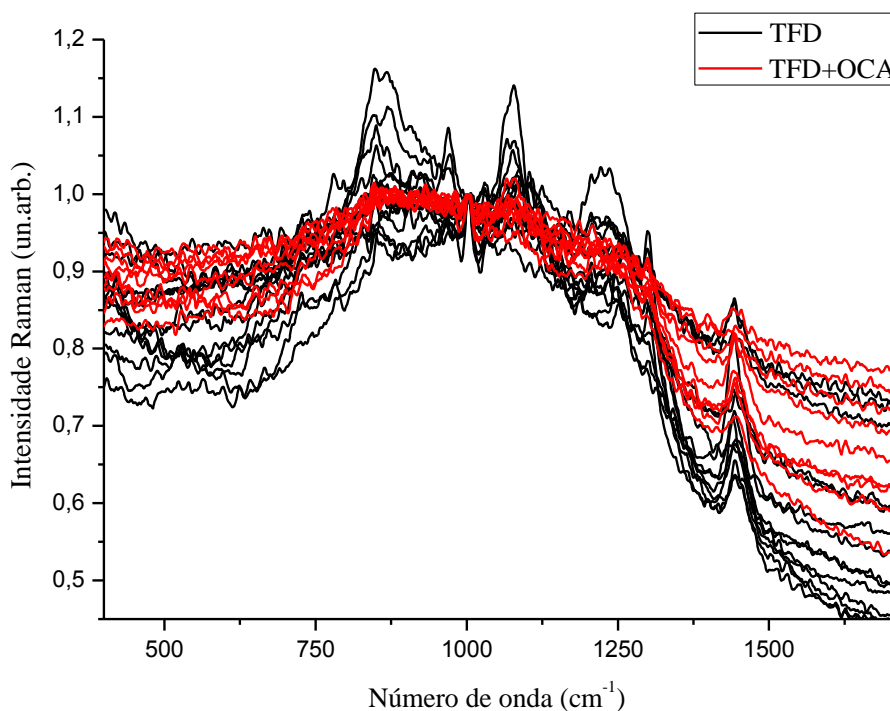


Figura 3.14: Espectros Raman da parte mais profunda do melanoma com e sem OCA após a TFD, mostrando pouca variação dos espectros com OCA.

Fonte: Elaborada pela autora

Os espectros Raman apresentam um sinal de fluorescência, como mostrada na Figura 3.14. Esse sinal pode também possuir certa importância, uma vez que ela muda após o tratamento com a terapia e os agentes clareadores. Três principais aminoácidos apresentam fluorescência: triptofano, tirosina e fenilalanina. Se as proteínas contêm um deles ou todos, elas apresentam fluorescência devido à presença desses aminoácidos. Alterações nos espectros de emissão de fluorescência, geralmente ocorrem em resposta a transições conformacionais, associação de subunidades, ligação ao substrato ou desnaturação. Essa fluorescência também muda se o meio que o envolve possui mais ou menos água, por exemplo, se ele está ligado com outras moléculas além do substrato, como íons, ou outros aminoácidos [78]. No caso do melanoma, após a TFD com os OCAs, a fluorescência mudou, tornando os espectros mais semelhantes entre si e com menor fluorescência, quando comparados aos espectros sem OCAs. Isso, portanto, é também um indicativo que houve mudanças conformacionais ou desnaturação de proteínas e que tornou o tumor, assim como a TFD, mais homogêneo.

### **3.2.3. Análise Raman dos tumores com e sem OCAs após 7 dias de TFD**

Com apenas uma sessão de TFD e utilizando a dose de PDZ de 9 mg/Kg, houve a diminuição do tumor nos primeiros dias, mas também seu recrescimento. A fim de ver se o recrescimento apresentava modificações estruturais e bioquímicas, foi feita a análise Raman após 7 dias da terapia fotodinâmica. Na Figura 3.15 é possível ver os espectros da região mais superficial do tumor (25-125  $\mu\text{m}$ ).

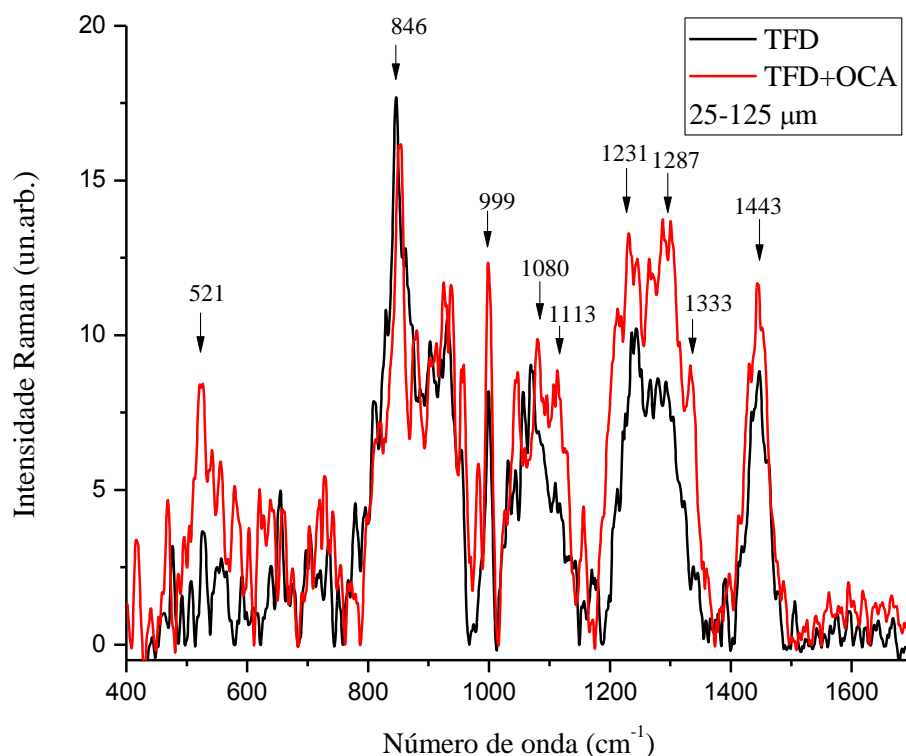


Figura 3.15: Espectro Raman da região de 25 a 125  $\mu\text{m}$  do melanoma com e sem OCA após 7 dias de TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Nesse gráfico é possível ver alguns picos e regiões já vistos anteriormente, com apenas algumas mudanças no valor corresponde ao pico, podendo apenas estar um pouco deslocado.

Comparando a Figura 3.11 com a 3.15, por serem espectros da mesma região do tumor (25-125  $\mu\text{m}$ ), não há tanto ruído no espectro após 7 dias de TFD, como no referente à logo após a terapia. Como já descrito anteriormente, as análises logo após a TFD apresentaram tais espectros na parte mais superficial do tumor, por ser a região que recebe maior quantidade de luz e conseqüentemente por ocorrer maior morte ou dano celular, além de não existir o efeito da atenuação da luz. Após 7 dias, a camada de pele que cobre o tumor e até mesmo o tumor, já se refizeram ou reconstruíram, eliminando as células mortas da região mais superficial. Por esse motivo, os espectros não são tão ruidosos, como na Figura 3.11.

Além disso, as maiores mudanças ocorreram em regiões dos espectros, que já haviam sido vistas anteriormente, sendo as principais de 800-1000  $\text{cm}^{-1}$ , 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$  e 1440-1444  $\text{cm}^{-1}$ . Portanto, para regiões mais superficiais do tumor recrescido, não houve diferença significativa.

Para a região mais central do tumor (225 e 325  $\mu\text{m}$ ) foi tirado os espectros Raman (Figura 3.16).

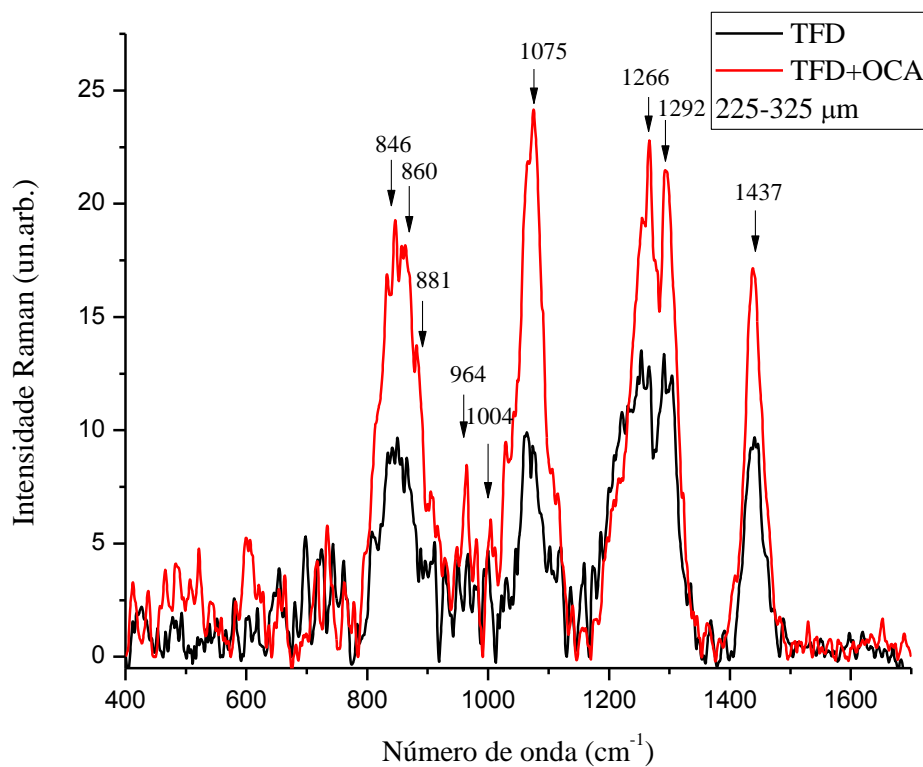


Figura 3.16: Espectro Raman da região de 225 a 325  $\mu\text{m}$  do melanoma com e sem OCA após 7 dias da TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Comparando a Figura 3.12 com a 3.16, é possível ver que os picos mais evidentes são os mesmos ou um pouco deslocados (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Picos Raman dos grupos com e sem clareador logo após a TFD e após 7 dias de TFD para a região de 225 a 325  $\mu\text{m}$  do melanoma

<b>Picos dos Tumores com e sem OCA logo após TFD (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Picos dos Tumores com e sem OCA logo após 7 dias de TFD (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>
730	-
850	846
866	860
888	881
968	964
1004	1004
1079	1075
1259	1266
1300	1292
1441	1437

Fonte: Elaborada pela autora

Não houve, entretanto, um padrão na intensidade com e sem OCA, ou seja, na Figura 3.12, o espectro com maior intensidade foi sem o clareador, enquanto que na Figura 3.16 foi com o OCA. Mesmo assim, a intensidade relativa (razão entre intensidades) permanece próxima ou a mesma. Por conseguinte, as mudanças bioquímicas que ocorreram na região de 225-325  $\mu\text{m}$  foram as mesmas.

Por fim, segue abaixo os espectros da região mais profunda do tumor, 525-725  $\mu\text{m}$  (Figura 3.17).

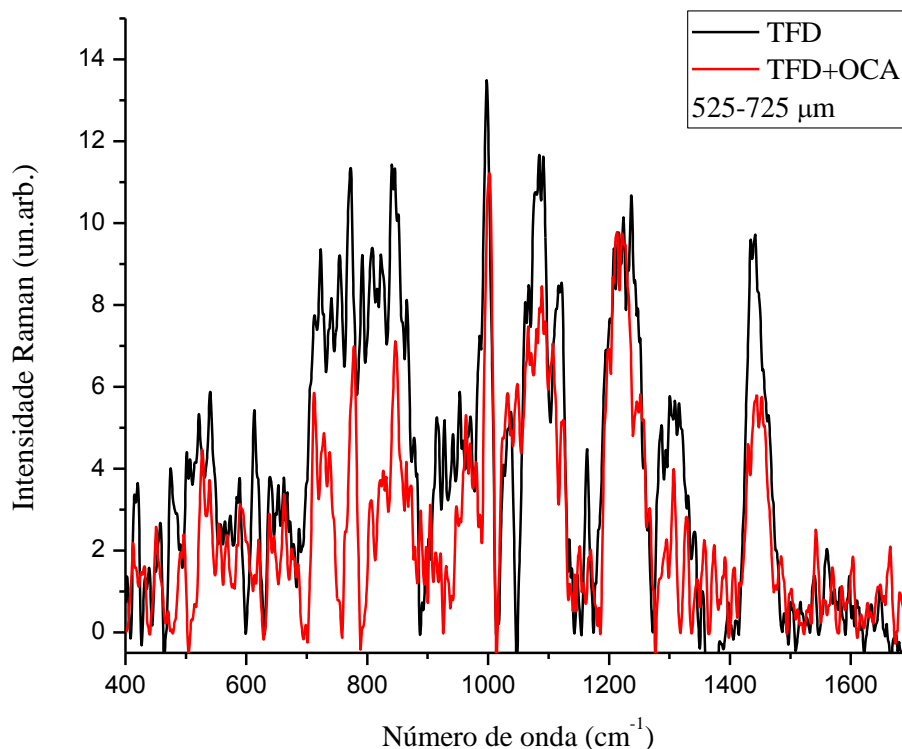


Figura 3.17: Espectro Raman da região de 525 a 725  $\mu\text{m}$  do melanoma com e sem OCA após 7 dias da TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Para a região mais profunda do tumor, os espectros apresentaram mais ruído e também maior semelhança com e sem os agentes clareadores. Na Figura 3.13, alguns espectros foram semelhantes entre si, com e sem OCA, mas também houve espectros com maior variação de intensidade. Isso exprimi uma heterogeneidade da resposta fotodinâmica em maiores profundidades. No caso da Figura 3.17, não houve tanta discrepância entre os espectros. Contudo, essa semelhança entre os espectros, não se dá pela maior efetividade da TFD. Nesse caso, existe o recrescimento do tumor, e, portanto, a região mais interna tem mais células em necrose e maior aglomerado de células, o que, provavelmente faz com que a presença do agente clareador não chegue nessa região ou tem pouco efeito, tornando os espectros semelhantes e ruidosos.

O recrescimento do tumor, não gerou grandes mudanças bioquímicas estruturais, o que é vantagem, uma vez que a ideia não é provocar alterações no tumor após a TFD com agentes clareadores, e sim, aumentar a penetração de luz no tumor pela presença dos OCAs, tornando a TFD mais efetiva e homogênea.



### 3.3. Análise Macroscópica após a TFD

Foram feitas análises macroscópicas do tumor, depois da terapia fotodinâmica para os grupos com e sem clareador, tanto para com uma sessão de TFD, como para duas sessões. As fotos foram tiradas por um período de 7 dias em 3 animais diferentes para cada grupo. Para apenas uma sessão de terapia, a primeira foto corresponde ao tumor após 24 horas da TFD e a última, depois de 7 dias. Para duas sessões, a primeira foto se refere ao tumor 24 horas após a segunda sessão da TFD (3 dias depois da primeira sessão).

#### 3.3.1. Com uma sessão

Segue abaixo a Figura 3.18.

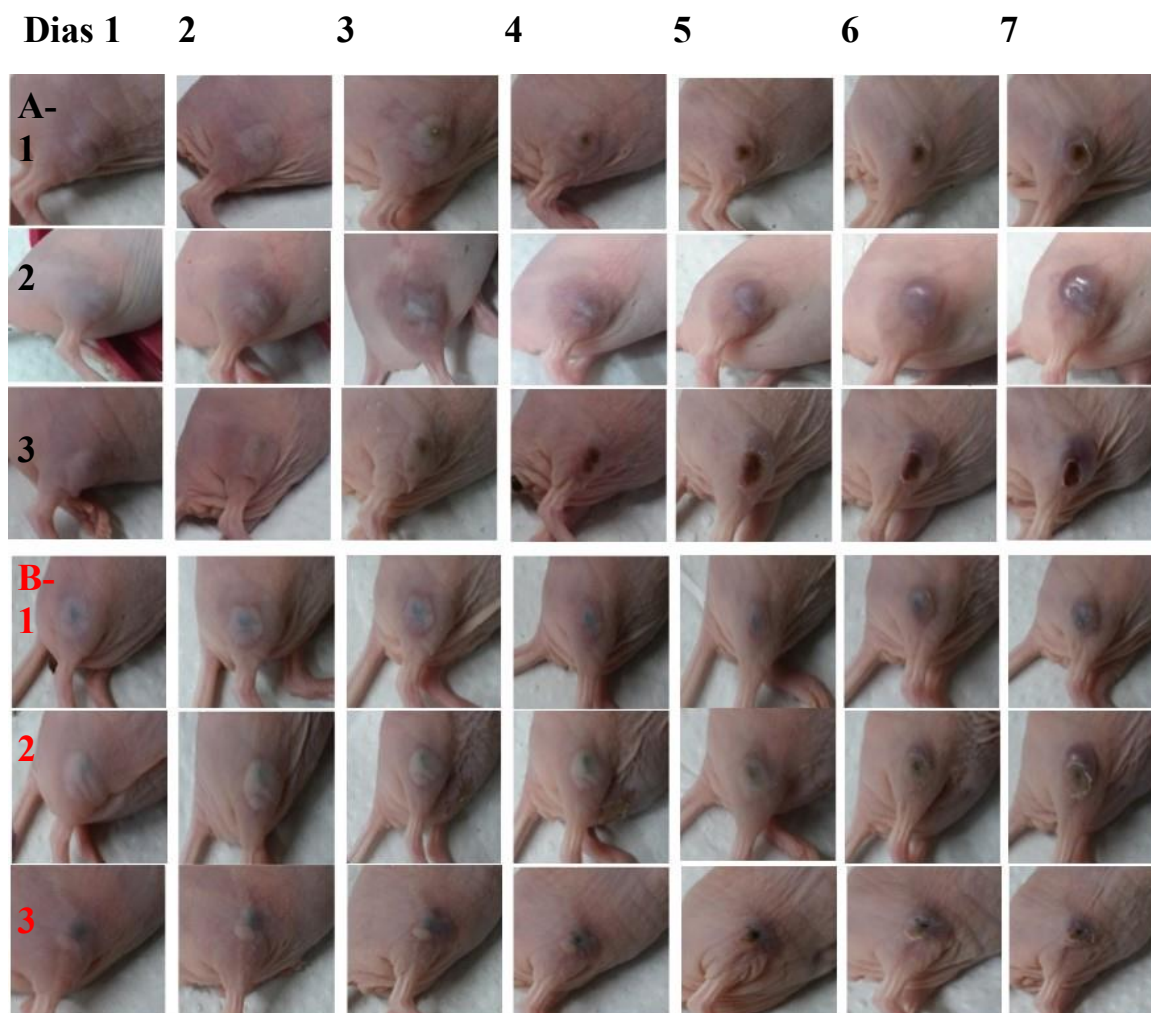


Figura 3.18: Imagens dos tumores sem (A- preto) e com (B- vermelho) clareador após a TFD, por um período total de 7 dias.

Fonte: Elaborada pela autora

É possível observar em todos os animais a presença de um halo esbranquiçado ao redor do tumor nos primeiros dias após a TFD. Isso acontece, principalmente devido ao rompimento

de vasos sanguíneos nessa região, provocado pela terapia. Houve a formação, na maioria dos animais, de uma crosta na pele acima do tumor. Ela é formada principalmente pelo efeito da terapia e são as células que sofreram necrose na região mais superficial do tumor.

Novamente é possível ver a variedade da resposta da TFD de cada animal, como por exemplo, diferença no tamanho, cor, aspecto do tumor e a presença de crosta em dias diferentes. Contudo as mesmas características são possíveis de serem visualizadas em cada animal, sendo, portanto, a essa resposta fotodinâmica similar de modo geral. Com apenas uma sessão da terapia fotodinâmica, o tumor apresenta uma regressão em seu tamanho, mas depois de alguns dias ele volta a crescer e se desenvolver normalmente. No 7º dia, o tamanho do tumor sem clareador após a TFD é menor do que o tumor sem tratamento nesse mesmo período de tempo, sendo o tumor tratado com clareador ainda menor.

### **3.3.2. Com duas sessões**

Para duas sessões foram tiradas fotos depois de 24h da segunda sessão até 7 dias. Segue abaixo a Figura 3.19.

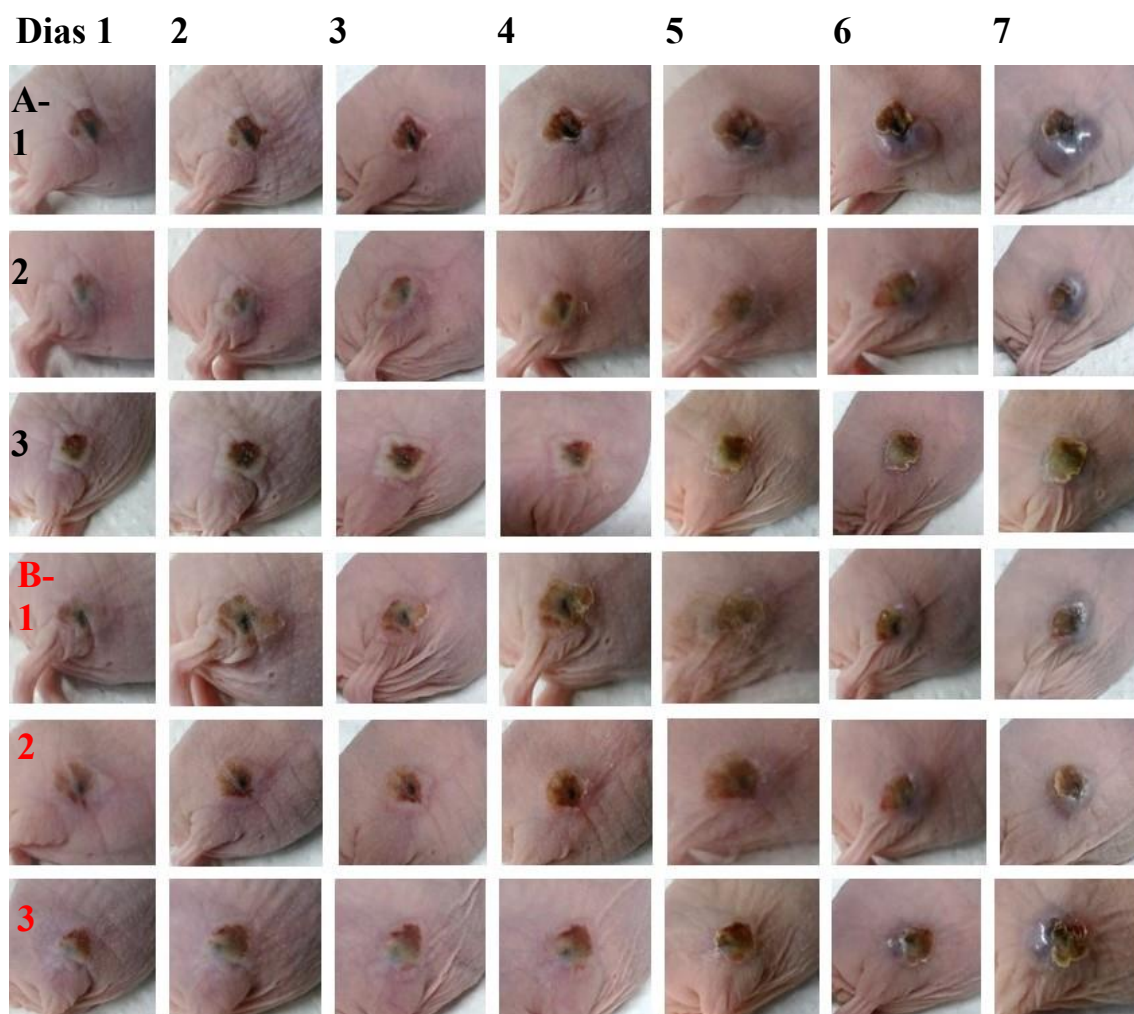


Figura 3.19: Imagens dos tumores sem (A- preto) e com (B- vermelho) clareador após 2 sessões de TFD, por um período total de 7 dias após a segunda sessão.

Fonte: Elaborada pela autora

Como já explicado anteriormente, após a primeira sessão de terapia, há a formação de uma crosta na pele acima do tumor. Ela é mais evidente em alguns animais que outros, mas sempre a pele fica mais escura e danificada, já que essa região já sofreu um dano da primeira TFD. Quando foi feita a segunda sessão, não foi feito raspagem nem nenhum procedimento no tumor para a retirada das células mortas. Esse pode ser um dos motivos dessa região ficar ainda mais escura com o passar dos dias e mais espessa, como visto na figura acima.

Mesmo com duas sessões de TFD, houve o recrescimento do tumor, tanto sem ou com os OCAs. Há um boom no crescimento do 5 ao 7º dia após a segunda sessão. Isso pode ter ocorrido por alguns fatores: o fotossensibilizador talvez não tenha chegado ao melanoma como antes, uma vez que essa região já foi danificada na primeira sessão; talvez a segunda sessão deveria ser feita antes de 3 dias após a primeira. Devido à presença da crosta na pele, a luz irradiada pela segunda vez não penetre tanto quanto anteriormente, sendo mais uma barreira a ser



transposta por ela. Pode ser que nesse caso, a luz tenha sido um estímulo para o crescimento do tumor. Se a distribuição da luz não fosse apenas na vertical e sim multilateral, talvez esse problema diminuiria.

### 3.4. Análise Histológica após a TFD

As amostras para a análise histológica foram coletadas 3 e 7 dias após a TFD e também após 2 doses de TFD nesse mesmo período de tempo. Para possíveis comparações, foram feitas lâminas do tumor controle, sem tratamento algum, e escolhida uma representativa (Figura 3.20).

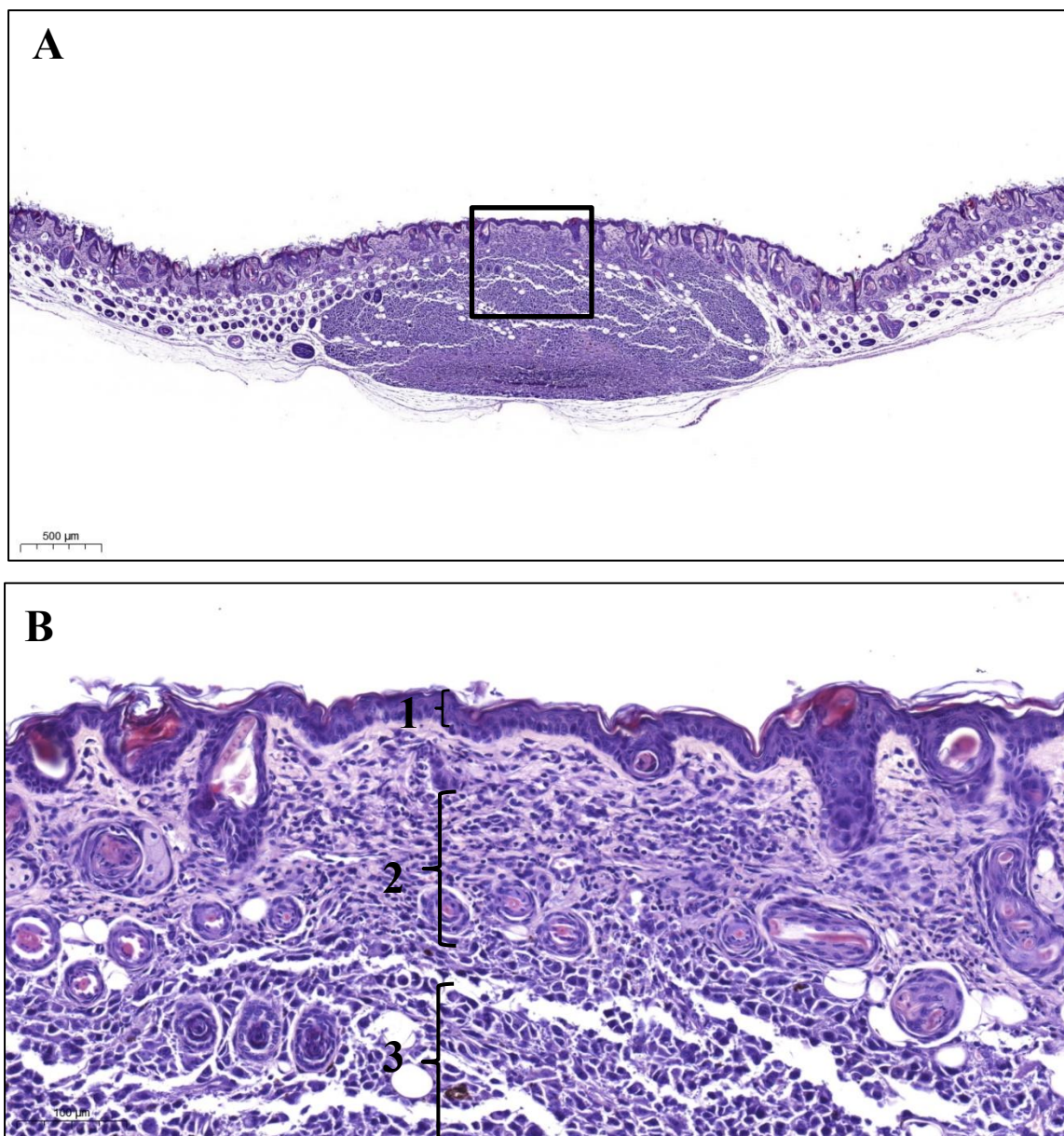


Figura 3.20: Imagem obtida pelo programa CaseViewer do tumor de melanoma cutâneo controle (sem tratamento). A-Tumor inteiro, B-Zoom da região selecionada em A, em que 1 é epiderme, 2 a derme e 3 o tumor. As regiões 2 e 3 se mesclam porque o tumor está intradérmico.

Fonte: Elaborada pela autora

É possível notar que existe uma camada de pele acima do tumor, como já discutido anteriormente, além de ser distinguível a epiderme da derme e do tumor.

### 3.4.1. Com uma sessão

A Figura 3.21 A e B se referem aos grupos tratados sem e com os OCAs após 7 dias de TFD, respectivamente. A Figura 3.21 C e D correspondem aos grupos tratados sem e com os OCAs após 3 dias de tratamento.

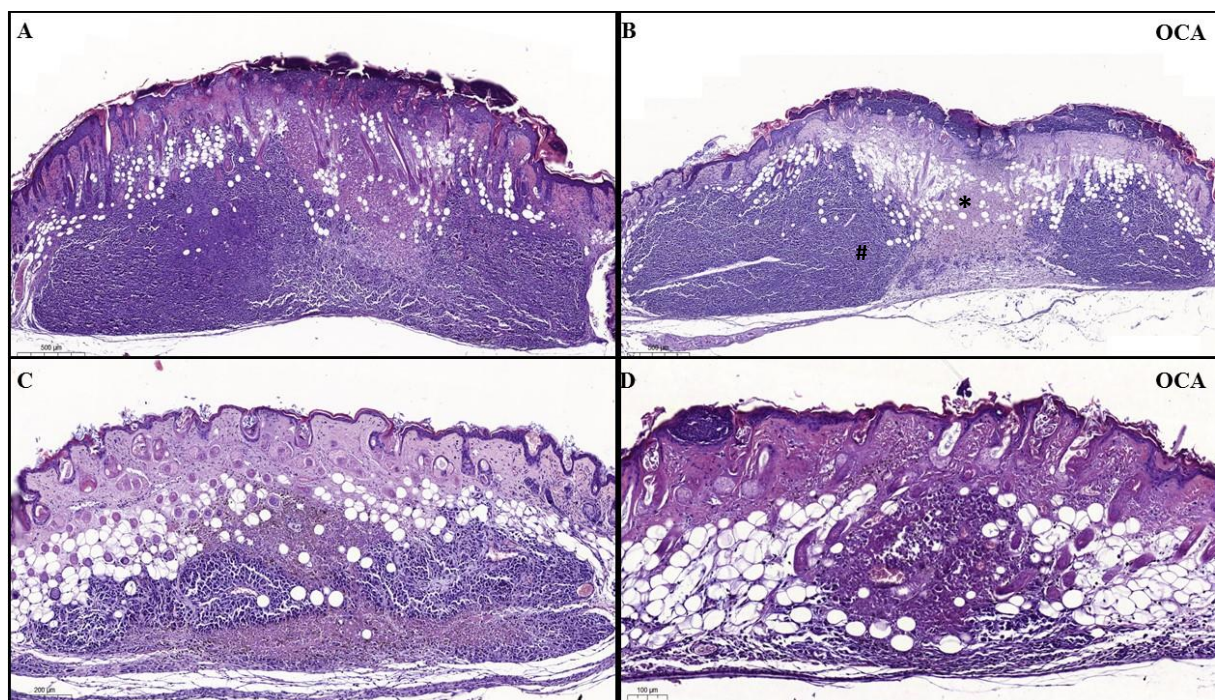


Figura 3.21: Tumores A e B após 7 dias de TFD, sem e com OCA, respectivamente. C e D após 3 dias de TFD, sem e com OCA, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

Após 7 dias de tratamento, é possível ver o estrato córneo (região mais superficial, acima da epiderme, com coloração mais escura), que é uma camada de células mortas que protegem o tecido. A presença dessa camada também é decorrente da TFD, já que houve a irradiação das células fotossensíveis e, por consequência, sua morte. Como já descrito anteriormente na análise macroscópica, há formação de uma crosta acima do tumor, causando maior dano na superfície, do que em mais profundas do tumor. Para os tumores com clareador, o tamanho foi reduzido em comparação aos tumores sem OCAs, contudo, por serem muito heterogêneos de um animal para outro, não é possível quantificar de maneira exata quanto foi essa diminuição. Para ambos os casos, houve recrescimento do tumor, todavia era necessário que isso acontecesse, a fim de ser feita a visualização do efeito dos agentes clareadores.



Na Figura 3.21B, o tumor com clareador apresentou uma região central onde parece haver mais dano celular do que a Figura 3.21A. Isso pode ser melhor visto dando um zoom nessa região (Figura 3.22A).

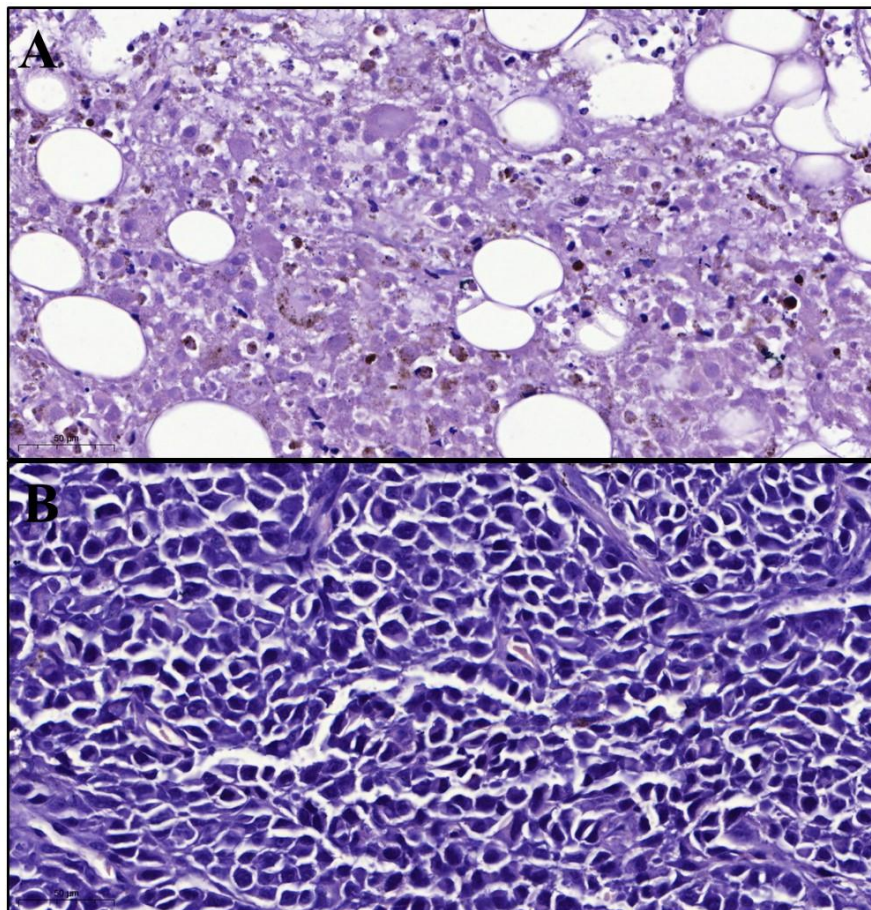


Figura 3.22: Zoom da Figura 3.21B, em que A é da região central do tumor com maior dano (\*) e B da região sem dano (#).

Fonte: Elaborada pela autora

A maior parte das células não apresenta estrutura definida ou conservada, não possuindo núcleo bem demarcado, enquanto que em outras regiões do tumor (Figura 3.22B), as células são bem organizadas, definidas, e mais bem estruturadas. Essas diferenças evidenciam que houve um dano maior na região tanto superficial do tumor, como na região central em profundidade. Esse fato pode significar que o clareador aumentou a penetração de luz no tumor, e por consequência, o efeito da terapia fotodinâmica também foi mais eficaz. As células necróticas não só estavam presentes na região mais superficial do tumor, com também em regiões mais profundas, podendo ser devido a resposta da TFD ser mais homogênea, em razão da melhor distribuição de luz no tumor. Esses fatos corroboram com os resultados obtidos por Microespectroscopia Raman, fortalecendo as conclusões precedentes.

Após 3 dias de tratamento (Figura 3.22 C e D), o tumor regrediu de tamanho e apresentou uma diminuição ainda maior com a presença dos OCAs. Houve maior presença de células necróticas do que vivas, quando comparados após 7 dias de tratamento, porque a irradiação de luz e o processo de morte celular eram mais recentes. Observa-se um tumor menor com a presença dos OCAs, indicando mais uma vez o potencial dos clareadores em melhorar a penetração da luz no melanoma.

Com uma sessão de terapia, portanto, tanto após 3 como 7 dias, o clareador mostrou melhorar o efeito da TFD e aumentar a homogeneidade do tumor, diminuindo seu tamanho e causando maior dano em profundidade.

### 3.4.2. Com duas sessões

Análises histológicas após duas sessões também foram realizadas. Segue abaixo a Figura 3.23.

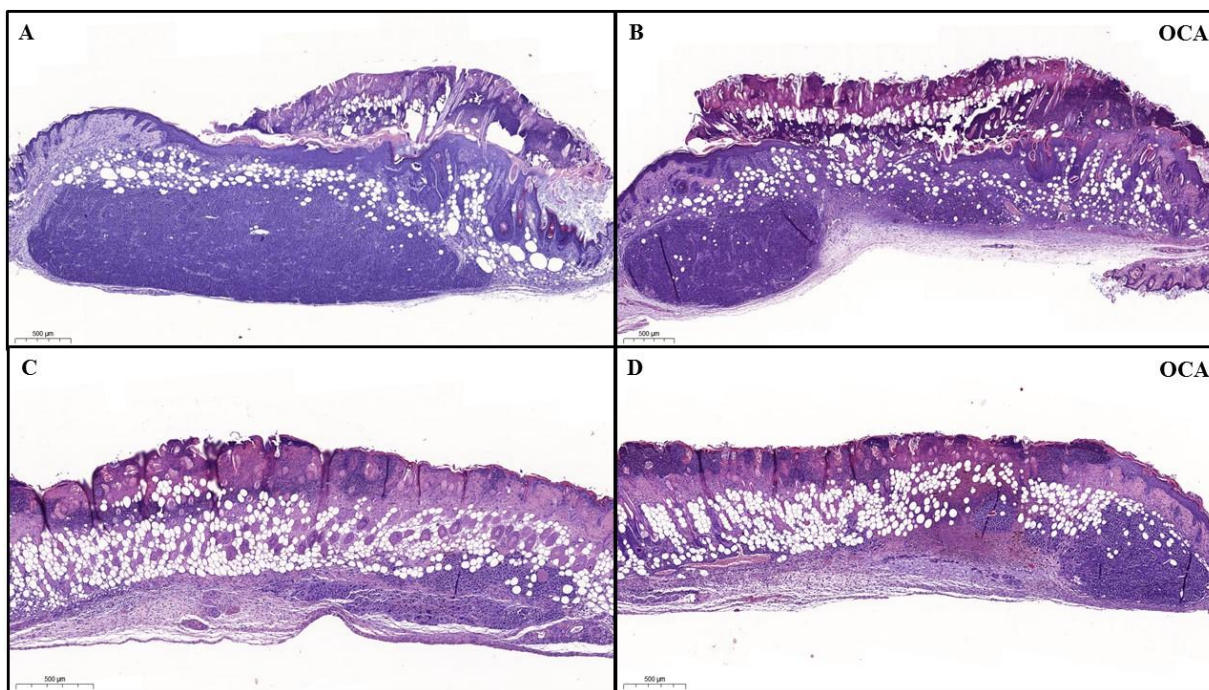


Figura 3.23: Tumores A e B após 7 dias da segunda sessão de TFD, sem e com OCA, respectivamente. C e D após 3 dias da segunda sessão de TFD, sem e com OCA, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 3.23 A e B se referem aos grupos tratados sem e com os OCAs após 7 dias da segunda sessão de TFD, respectivamente. A Figura 3.23 C e D correspondem aos grupos tratados sem e com os OCAs após 3 dias de tratamento da segunda sessão.

Após 7 dias de tratamento (Figura 3.23 A e B), é possível ver além do estrato córneo, algo acima dele com um aspecto diferente das camadas da pele ou do tumor, sendo isto a crosta, que é bem mais espessa devido as duas sessões de TFD. Com apenas uma sessão, ocorre o aparecimento da crosta fina, entre terceiro e quarto dias. Como a segunda sessão foi feita depois de 3 dias após a primeira, essa crosta se manteve e ficou mais espessa com o passar do tempo, o que é consistente, já que o dano foi maior depois de duas sessões da terapia fotodinâmica. Mesmo já existindo uma pequena crosta decorrente da primeira sessão, os tumores com clareador diminuíram de tamanho em comparação com os tumores sem OCAs. Pode-se dizer que a fina crosta não foi um impedimento para a penetração dos clareadores no tumor nem da luz, uma vez que seu efeito desejado foi gerado.

Após 3 dias de tratamento (Figura 3.23 C e D), o tumor regrediu de tamanho e apresentou uma diminuição ainda maior com a presença dos OCAs, mais até que com apenas uma sessão (Figura 3.22 C e D). Esse grupo, portanto, para análise de 3 dias, foi o que apresentou melhores resultados se comparados aos demais, no que diz respeito a diminuição do tamanho dos tumores e aumento da efetividade da terapia fotodinâmica. Contudo, mesmo matando maior número de células malignas, as células remanescentes conseguiram se multiplicar e continuar se desenvolvendo, até atingirem tumores como os da Figura 3.23 A e B.

Com duas doses e duas aplicações dos OCAs, no tempo de análise de 3 dias, os resultados foram melhores, já que os tumores ficaram menores, manifestando seu efeito e poder ao aumentar a penetração da luz no tumor e potencializar a resposta fotodinâmica. Contudo após 7 dias não houve diferença entre os grupos com ou sem os OCAs. Portanto, o protocolo para duas sessões da TFD não mostrou efetividade no tratamento do melanoma.

#### **Capítulo 4 - CONCLUSÕES**

O presente estudo mostrou por análise Raman, que as maiores mudanças bioquímicas detectadas, causadas pelos agentes clareadores no tumor foram em ligações de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Além disso, na análise em profundidade, os clareadores tornaram o tumor mais opticamente homogêneo. Considerando os tumores com e sem clareador após o tratamento com a TFD, além do tumor ter se tornado mais homogêneo opticamente, a resposta fotodinâmica apresentou uma efetividade maior com a presença dos agentes clareadores. Esse é um resultado importante, já que a heterogeneidade de irradiação tumoral gera um tratamento ineficaz. Essa limitação pode ser minimizada com os OCAs, e o tumor, sendo mais “opticamente homogêneo”, pode otimizar a resposta fotodinâmica.



Tanto pela análise macroscópica, como pela histológica, com uma sessão de terapia, o clareador mais uma vez, mostrou melhorar o efeito da TFD, podendo isso ser visto pela diminuição do tumor e aumento do dano em profundidade. Esse efeito foi presente tanto após 3 dias como 7 dias após o tratamento, fortalecendo e consolidando os resultados obtidos pela Microscopia Raman.

Os agentes clareadores aumentaram a homogeneidade do tumor, e isso, por sua vez, fez com que a efetividade da resposta fotodinâmica fosse maior, além de fazer com que a luz penetrasse em maior profundidade no tumor, causando maior dano.

Os próximos passos desse projeto ou ideias para estudos futuros são estudar mais a fundo o efeito dos OCAs no tratamento do melanoma cutâneo utilizando outras técnicas além da Microsespectroscopia Raman, como o OCT (Optical Coherence Tomography). Além disso, para aumentar a efetividade da terapia fotodinâmica, será necessário tratar o melanoma com outros fotossensibilizadores ou com uma composição de mais de um FS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. E. Chang, L. H. Karnell, and H. R. Menck, “The National Cancer Data Base Report on Cutaneous and Noncutaneous Melanoma,” *Cancer*, vol. 83, no. 8, pp. 1664–1678, 1998.
- [2] A. M. Costa Pinheiro, H. Friedman, A. L. Santos Veiga Cabral, and H. Abe Rodrigues, “Melanoma cutâneo: Características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas no Hospital Universitário de Brasília entre Janeiro de 1994 e Abril de 1999,” *An. Bras. Dermatol.*, 2003.
- [3] M. Regina Terra, M. Gorete Nicollete Pereira, and R. Sterza da Silva, “O MELANOMA MALIGNO CUTÂNEO E O ESTRESSE OXIDATIVO.”
- [4] S. Gandini *et al.*, “Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors,” *Eur. J. Cancer*, vol. 41, no. 14, pp. 2040–2059, Sep. 2005.
- [5] A. G. Sálvio, IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTADIAMENTO DO MELANOMA FINO.2006.129f.Tese em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- [6] V. J. McGovern, “The classification of melanoma and its relationship with prognosis,” *Pathology*, vol. 2, no. 2, pp. 85–98, 1970.
- [7] W. Weyers, M. Euler, C. Diaz-Cascajo, W.-B. Schill, and M. Bonczkowitz, “Classification of Cutaneous Malignant Melanoma A Reassessment of Histopathologic Criteria for the Distinction of Different Types,” 1999.
- [8] C. Garbe and T. K. Eigentler, “Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: State

of the art 2006,” in *Melanoma Research*, 2007.

- [9] U. Leiter *et al.*, “Hazard rates for recurrent and secondary cutaneous melanoma: An analysis of 33,384 patients in the German Central Malignant Melanoma Registry,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2012.
- [10] Clark, W. H., From, L., Bernardino, E. A., & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research*, 29(3), 705-727.
- [11] Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery*, 172(5), 902.
- [12] R. J. Sullivan *et al.*, “An update on the Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumor immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma: Version 2.0,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 6, no. 1, May 2018.
- [13] A. M. M. Eggermont, A. Testori, M. Maio, and C. Robert, “AntiCTLA-4 antibody adjuvant therapy in melanoma,” *Semin. Oncol.*, vol. 37, no. 5, pp. 455–459, 2010.
- [14] A. M. Di Giacomo *et al.*, “Therapeutic efficacy of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with metastatic melanoma unresponsive to prior systemic treatments: Clinical and immunological evidence from three patient cases,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 58, no. 8, pp. 1297–1306, Aug. 2009.
- [15] M. Ochsner, “Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997.
- [16] S. Le, P. So, N. An, and D. B. Mbatha, “Solubilization of meso-Tetraphenylporphyrin Photosensitizers by Substitution with Fluorine and with 2,3-Dihydroxy-1-propyloxy Groups,” *J. Pharm. Pharmacol. J. Pharm. Pharmacol*, vol. 52, pp. 1361–1367, 2000.
- [17] Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korblik, M., ... & Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *JNCI: Journal of the national cancer institute*, 90(12), 889-905.
- [18] D. W. Felsher, “Cancer revoked: Oncogenes as therapeutic targets,” *Nature Reviews Cancer*. 2003.
- [19] D. P. Ramirez *et al.*, “Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: Preliminary results of a national Brazilian project,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2014.
- [20] M. A. Calin and S. V. Parasca, “Photodynamic therapy in oncology,” in *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2006, vol. 8, no. 3, pp. 1173–1179.
- [21] P. Mroz *et al.*, “Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy,” *FASEB J.*, 2010.
- [22] B. Pucelik, L. G. Arnaut, G. Stochel, and J. M. Dabrowski, “Design of Pluronic-Based Formulation for Enhanced Redaporfin-Photodynamic Therapy against Pigmented Melanoma,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 34, pp. 22039–22055, Aug. 2016.
- [23] M. Wagner *et al.*, “Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma

- decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases,” *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 37, no. 5, pp. 527–533, Jul. 2012.
- [24] J. P. Tardivo, A. Del Giglio, L. H. C. Paschoal, A. S. Ito, and M. S. Baptista, “Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 4, pp. 345–346, Dec. 2004.
- [25] I. Baldea and A. Filip, “Photodynamic Therapy in Melanoma-An Update Article in Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society,” 2012.
- [26] Y.-Y. Huang, D. Vecchio, P. Avci, R. Yin, M. Garcia-Diaz, and M. R. Hamblin, “Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights,” *Biol. Chem.*, 2013.
- [27] Z. Huang, H. Lui, X. K. Chen, A. Alajlan, D. I. McLean, and H. Zeng, “Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 9, no. 6, p. 1198, 2004.
- [28] Hill, H. Z. (1992). The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays*, 14(1), 49-56.
- [29] J. Ferreira, P. F. C. Menezes, C. Kurachi, C. Sibata, R. R. Allison, and V. S. Bagnato, “Photostability of different chlorine photosensitizers,” *Laser Phys. Lett.*, vol. 5, no. 2, pp. 156–161, Feb. 2008.
- [30] P. Agostinis *et al.*, “Photodynamic therapy of cancer: An update,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 4, pp. 250–281, Jul. 2011.
- [31] E. P. Stranadko *et al.*, “<title>First experience of photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors</title>,” 2000, pp. 138–144.
- [32] L. Y. Wen, S.-M. Bae, J. H. Do, K.-S. Park, and W. S. Ahn, “The effects of photodynamic therapy with Photodithazine on HPV 16 E6/E7 associated cervical cancer model,” *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 15, no. 03, pp. 174–180, Mar. 2011.
- [33] S. R. Millon, K. M. Roldan-Perez, K. M. Riching, G. M. Palmer, and N. Ramanujam, “Effect of optical clearing agents on the in vivo optical properties of squamous epithelial tissue,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 38, no. 10, pp. 920–927, Dec. 2006.
- [34] D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing,” *Laser Photonics Rev.*, vol. 7, no. 5, pp. 732–757, Sep. 2013.
- [35] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin, and V. V. Tuchin, “Optical clearing of skin under action of glycerol: Ex vivo and in vivo investigations,” *Opt. Spectrosc.*, 2010.
- [36] K. V. Larin, M. G. Ghosn, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, N. A. Trunina, and V. V. Tuchin, “Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion,” *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*. 2012.
- [37] L. Pires. Optical strategies for diagnosis and treatment of melanoma. 2018.159f. Tese Mestrado em Física - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- [38] K. Kong, C. Kendall, N. Stone, and I. Notingher, “Raman spectroscopy for medical

diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection,” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015.

- [39] G. S. Bumbrah and R. M. Sharma, “Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse,” *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, vol. 6, no. 3. Egyptian Forensic Medicine Authority, pp. 209–215, 01-Sep-2016.
- [40] Hinrichs, R., & Vasconcellos, M. A. Z. (2014). Espectroscopia micro-Raman. *Técnicas instrumentais não destrutivas aplicadas a gemas do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: IGeo/UFRGS, 2014. p. 145-157.*
- [41] C. Yorucu, Raman analysis of tissue engineered normal skin and melanoma. 2015. 158f. Tese Doutorado em Engenharia de Materiais - The University of Sheffield, Sheffield, 2015.
- [42] H. J. Butler *et al.*, “Using Raman spectroscopy to characterize biological materials,” *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 4, pp. 664–687, Apr. 2016.
- [43] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, “Raman spectroscopy of biological tissues,” *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 42, no. 5. pp. 493–541, Sep-2007.
- [44] S. Sigurdsson, P. A. Philipsen, L. K. Hansen, J. Larsen, M. Gniadecka, and H. Christian Wulf, “Detection of skin cancer by classification of Raman spectra,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 10, pp. 1784–1793, Oct. 2004.
- [45] M. Gniadecka, H. C. Wulf, N. N. Mortensen, O. F. Nielsen, and D. H. Christensen, “Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman Spectroscopy,” 1997.
- [46] S. Olsztyńska-Janus *et al.*, “Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. part II: Raman spectroscopy,” *Acta Bioeng. Biomech.*, vol. 14, no. 4, pp. 121–133, 2012.
- [47] C. Yorucu *et al.*, “Raman spectroscopy detects melanoma and the tissue surrounding melanoma using tissue-engineered melanoma models,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 51, no. 4, pp. 243–257, Apr. 2016.
- [48] L. Pires, S. D. M. G. Bosco, M. S. Baptista, and C. Kurachi, “Photodynamic therapy in pythium insidiosum - An in vitro study of the correlation of sensitizer localization and cell death,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, Jan. 2014.
- [49] J. C. Silva *et al.*, “Apoptosis-associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 29, no. 4, pp. 1429–1436, 2014.
- [50] R. Hinrichs and M. A. Z. Vasconcellos, “Espectroscopia micro-Raman.”
- [51] S. Jimenez-Sandoval, “Micro-Raman spectroscopy: A powerful technique for materials research,” *Microelectronics J.*, 2000.
- [52] K. C. Blanco *et al.*, “Fluorescence guided PDT for optimization of the outcome of skin cancer treatment,” *Front. Phys.*, vol. 3, Apr. 2015.
- [53] J. D. Vollet-Filho, M. A. Caracanhas, C. Grecco, J. Ferreira, C. Kurachi, and V. S. Bagnato, “Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence

- for photodynamic therapy outcome,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 7, no. 3, pp. 189–200, Sep. 2010.
- [54] A. K. L. Fujita *et al.*, “Fluorescence evaluations for porphyrin formation during topical PDT using ALA and methyl-ALA mixtures in pig skin models,” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 15. Elsevier B.V., pp. 236–244, 01-Sep-2016.
- [55] P. G. S. Rodrigues *et al.*, “Assessment of ALA-induced PpIX production in porcine skin pretreated with microneedles,” *J. Biophotonics*, vol. 8, no. 9, pp. 723–729, Sep. 2015.
- [56] H. H. Buzzá, A. C. Zangirolami, A. Davis, P. A. Gómez-García, and C. Kurachi, “Fluorescence analysis of a tumor model in the chorioallantoic membrane used for the evaluation of different photosensitizers for photodynamic therapy,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 19, pp. 78–83, Sep. 2017.
- [57] H. Rachmawati, B. M. Haryadi, K. Anggadiredja, and V. Suendo, “Intraoral Film Containing Insulin-Phospholipid Microemulsion: Formulation and In Vivo Hypoglycemic Activity Study,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 16, no. 3, pp. 692–703, Jun. 2015.
- [58] H. Lui, J. Zhao, D. McLean, and H. Zeng, “Real-time raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 10, pp. 2491–2500, May 2012.
- [59] N. Kourkoumelis, I. Balatsoukas, V. Moulia, A. Elka, G. Gaitanis, and I. D. Bassukas, “Advances in the in vivo Raman spectroscopy of malignant skin tumors using portable instrumentation,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 7. MDPI AG, pp. 14554–14570, 26-Jun-2015.
- [60] E. Brauchle, S. Noor, E. Holtorf, C. Garbe, K. Schenke-Layland, and C. Busch, “Raman spectroscopy as an analytical tool for melanoma research,” *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 39, no. 5, pp. 636–645, 2014.
- [61] M. Gniadecka *et al.*, “Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks: Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 122, no. 2, pp. 443–449, 2004.
- [62] A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, “Reversible Dissociation of Collagen in Tissues,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 121, no. 6, pp. 1332–1335, 2003.
- [63] J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, “Collagen solubility correlates with skin optical clearing,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, no. 4, p. 040501, 2006.
- [64] E. R. Sauter and M. Herlyn, “Molecular biology of human melanoma development and progression,” in *Molecular Carcinogenesis*, 1998.
- [65] D. Ruiter, T. Bogenrieder, D. Elder, and M. Herlyn, “Melanoma-stroma interactions: Structural and functional aspects,” *Lancet Oncology*. 2002.
- [66] M. D. Shoulders and R. T. Raines, “Collagen Structure and Stability,” 2009.
- [67] S. Pasco, B. Brassart, L. Ramont, F. X. Maquart, and J. C. Monboisse, “Control of melanoma cell invasion by type IV collagen,” *Cancer Detection and Prevention*. 2005.

- [68] M. K. Chelberg, E. C. Tsilibary, A. R. Hauser, and J. B. McCarthy, "Type IV Collagen-mediated Melanoma Cell Adhesion and Migration: Involvement of Multiple, Distinct Domains of the Collagen Molecule," *Cancer Res.*, 1989.
- [69] A. M. P. Montgomery, R. A. Reisfeld, and D. A. Cheresh, "Cell Biology Integrin 4383 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen," 1994.
- [70] B. Felding-Habermann, R. Habermann, E. Saldívar, and Z. M. Ruggeri, "Role of  $\beta 3$  integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow," *J. Biol. Chem.*, 1996.
- [71] M. Patarroyo, K. Tryggvason, and I. Virtanen, "Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis," *Seminars in Cancer Biology*. 2002.
- [72] E. Ruoslahti, E. Engvall, and E. G. Hayman, "Fibronectin: current concepts of its structure and functions," *Top. Catal.*, 1980.
- [73] J. Lacovara, E. B. Cramer, and J. P. Quigley, "Fibronectin Enhancement of Directed Migration of B16 Melanoma Cells," *Cancer Res.*, 1984.
- [74] Proctor, R. A. (1987). Fibronectin: a brief overview of its structure, function, and physiology. *Reviews of infectious diseases*, 9(Supplement\_4), S317-S321.
- [75] M. Zhang *et al.*, "Adipocyte-derived lipids mediate melanoma progression via FATP proteins," *Cancer Discov.*, 2018.
- [76] N. A. Mayr *et al.*, "Characterizing tumor heterogeneity with functional imaging and quantifying high-risk tumor volume for early prediction of treatment outcome: Cervical cancer as a model," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 83, no. 3, pp. 972–979, Jul. 2012.
- [77] A. Pribluda, C. C. De La Cruz, and E. L. Jackson, "Intratumoral heterogeneity: From diversity comes resistance," *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 13, pp. 2916–2923, Jul. 2015.
- [78] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 2006.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



**COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da terapia fotodinâmica associada ao clareamento óptico no tratamento do melanoma cutâneo", protocolada sob o CEUA nº 5500080618, sob a responsabilidade de **Leticia Palombo Martinelli e equipe; Cristina Kurachi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo (CEUA/IFSC) na reunião de 01/08/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of photodynamic therapy associated with optic clearing in the treatment of cutaneous melanoma", utilizing 32 Heterogenics mice (32 females), protocol number CEUA 5500080618, under the responsibility of **Leticia Palombo Martinelli and team; Cristina Kurachi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Physics Institute of São Carlos - São Paulo University (CEUA/IFSC) in the meeting of 08/01/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2018](#) a [12/2019](#)

Área: [Grupo de Óptica / Fcm](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [3 a 6 semanas](#)

N: [32](#)

Linhagem: [balb/c nude](#)

Peso: [10 a 15 g](#)

Local do experimento: Laboratórios do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos □ IFSC/USP

São Carlos, 03 de agosto de 2018

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

São Carlos, 12 de fevereiro de 2019  
CEUA N 5500080618

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Letícia Palombo Martinelli  
Área: Grupo De óptica / Fcm  
Cristina Kurachi (orientador)

Título da proposta: "Avaliação da terapia fotodinâmica associada ao clareamento óptico no tratamento do melanoma cutâneo".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IFSC

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 14/janeiro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "A proposta dada anteriormente era o protocolo seguido no item 3.5 com os grupos de tratamento: controle, OCA, OCA + (PDZ+VIS) e OCA + (PDZ+TFD + VIS+TFD). Queremos fazer uma mudança para os grupos utilizando somente um fotossensibilizador, fazendo com que os grupos passam a ser: controle, OCA, OCA + (PDZ) e OCA + (PDZ+TFD). Além disso, era esperado fazer as análises do item 3.4.2 seguindo o mesmo protocolo. O que ocorreu é que a maneira do preparo da amostra para análise de espectroscopia Raman é diferente da preparação da amostra para avaliação da resposta à Terapia Fotodinâmica, não sendo possível utilizar a mesma amostra para ambas as análises. Devido a isso, solicitamos mais 30 animais, já que são 4 grupos com 6 animais cada e também porque apresentam alta mortalidade e grande variabilidade óptica do tumor experimental."

Comentário da CEUA: "Após apreciação por parte dos relatores da CEUA/IFSC, e na ausência de objeções, a solicitação foi aprovada ad referendum pelo Presidente da Comissão."

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo