



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (EVZ)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL (PPGCA)

ISIS DE CARVALHO RODRIGUES SANTANA LEMES

**Efeitos vasculares do fotossensibilizador porfirínico meso-
tetrametilpiridil na terapia fotodinâmica em modelo de
membrana corioalantoide**

GOIÂNIA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Isis de Carvalho Rodrigues Santana Lemes

3. Título do trabalho

Efeitos vasculares do fotossensibilizador porfirínico meso-tetrametilpiridil na terapia fotodinâmica em modelo de membrana corioalantoide

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;

- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ISIS DE CARVALHO RODRIGUES SANTANA, Discente**, em 16/12/2022, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3397738** e o código CRC **4173CE6F**.

ISIS DE CARVALHO RODRIGUES SANTANA LEMES

Efeitos vasculares do fotossensibilizador porfirínico meso-tetrametilpiridil na terapia fotodinâmica em modelo de membrana corioalantoide

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica (CiPAC)

Linha de pesquisa: Técnicas e modelos experimentais em clínica, cirurgia e anestesiologia animal

Orientador: Professor Doutor Guilherme Rocha Lino de Souza

Coorientadoras: Professora Doutora Marina Pacheco Miguel e Doutora Vilma Ferreira de Oliveira

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lemes, Isis de Carvalho Rodrigues Santana

Efeitos vasculares do fotossensibilizador porfirínico meso tetrametilpiridil na terapia fotodinâmica em modelo de membrana corioalantoide [manuscrito] / Isis de Carvalho Rodrigues Santana Lemes. - 2020.

xiv, 65 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza; co orientadora Dra. Marina Pacheco Miguel; co-orientador Dr. Vilma Ferreira de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras.

1. angiogênese. 2. vascularização. 3. fotossensibilização. 4. porfirina catiônica. 5. TMPP. I. Souza, Guilherme Rocha Lino de, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **556** da sessão de Defesa de Dissertação de **Isis de Carvalho Rodrigues Santana Lemes**, que confere o título de Mestre(a) em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica**.

Aos **seis dias do mês de agosto de dois mil e vinte** a partir das **14h00min**, por meio de videoconferência realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“Efeitos vasculares do fotossensibilizador porfirínico meso-tetrametilpiridil na terapia fotodinâmica em modelo de membrana corioalantoide”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof.ª Dr.ª Vanessa de Sousa Cruz (PPGCA)**, membro titular interno; **Prof.ª Dr.ª Luciane Madureira de Almeida (UEG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **seis dias do mês de agosto de dois mil e vinte**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Sem alteração



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Madureira de Almeida, Usuário Externo**, em 14/12/2022, às 04:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa de Sousa Cruz, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código



verificador **3397287** e o código CRC **22D33581**.

Referência: Processo nº 23070.030390/2020-76

SEI nº 3397287

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por sempre guiar meu caminho e me dar forças para seguir em frente.

Não há palavras que façam jus à toda a gratidão que tenho pela minha família. Obrigada pelo apoio incondicional e palavras de força nas horas difíceis!. Aos meus pais, minha irmã, meu marido, meu cunhado e minha afilhadinha Sofia, por se fazerem sempre presentes em todas as etapas da minha vida pessoal e profissional. Obrigada pela compreensão das ausências e por todos os pequenos gestos de amor e carinho diários, sempre me dando força pra continuar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza por acreditar em mim e pela disponibilidade em colaborar com este trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel por todo o apoio e injeção de ânimo, quando pensei que “estava tudo perdido”! Obrigada por permitir “te usar”!

À minha co-orientadora Dra Vilma Ferreira Oliveira, pela parceria de sempre e por abrir as portas do Hospital Veterinário da UFG para o projeto inicial.

Aos professores Pablo José Gonçalves e Luciane Madureira de Almeida pelo compartilhamento de ideias e por todo auxílio.

Aos colegas de laboratório pela companhia e boas conversas. Um agradecimento especial ao Eli por toda a disponibilidade em ajudar e pelos ensinamentos de química.

Aos amigos de trabalho pela compreensão e disponibilidade nas frequentes trocas de plantão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da UFG pelo comprometimento com a ciência e pela oportunidade que me foi concedida.

À todos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Histórico.....	17
2.2. Radiação eletromagnética e fontes de luz	18
2.3. Reação fotodinâmica.....	20
2.4. Fotossensibilizadores	22
2.5. PDT como estratégia terapêutica vascular	25
2.6. Modelo experimental <i>in vivo</i> de membrana corioalantóica.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
4. HIPÓTESE.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1. Local de desenvolvimento.....	31
5.2. Delineamento experimental.....	31
5.3. Preparo da membrana corioalantoide.....	32
5.4. Preparo do fotossensibilizador	34
5.5. Irradiação luminosa e obtenção das imagens	34
5.6. Processamento e análise das imagens digitais.....	36
5.7. Preparo das amostras e análise histológica.....	39
5.8. Análise estatística.....	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Viabilidade dos ovos	41
6.2. Efeito vascular quantitativo.....	42
6.3. Efeitos vasculares macroscópicos	46
6.4. Efeitos vasculares microscópicos.....	52
7. DISCUSSÃO.....	57
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS	66
ANEXO.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Diagrama adaptado do espectro de radiação eletromagnética, com ênfase no espectro de luz visível e seus respectivos comprimentos de onda.	18
FIGURA 2 - Diagrama de Jablonski adaptado.....	21
FIGURA 3 - Representação esquemática da estrutura química da porfirina meso-tetrametilpiridil (TMPP).....	23
FIGURA 4 - Espectro de absorção do fotossensibilizador TMPP..	24
FIGURA 5 - Representação esquemática das membranas extraembrionárias em embrião de galinha.	27
FIGURA 6 - Primeira etapa de preparo da membrana corioalantoide..	33
FIGURA 7 - Procedimentos da segunda etapa de preparo da membrana corioalantoide.	33
FIGURA 8 - Procedimento da terceira etapa de preparo da membrana corioalantoide e irradiação luminosa da membrana corioalantoide.....	35
FIGURA 9 – Obtenção das imagens da membrana corioalantoide com estereomicroscópio acoplado a câmera fotográfica através do software ISCapture.....	35
FIGURA 10 – Etapas do processamento das imagens através do software Photoshop®.	37
FIGURA 11 - Etapas do processamento das imagens no software ImageJ.	38
FIGURA 12 - Comparação da viabilidade dos ovos.....	41
FIGURA 13 - Redução vascular na membrana corioalantoide ao longo do tempo experimental após tratamento com a solução do fotossensibilizador TMPP e submetidas a irradiação luminosa (PDT). .	42
FIGURA 14 - Redução vascular na membrana corioalantoide ao longo do tempo experimental após tratamento a PDT (G1), PS (G2), luz (G3) e solvente (G4).	43
FIGURA 15 - Redução vascular total calculada pela diferença entre os valores obtidos no tempo 300 minutos e basal.	45
FIGURA 16 - Imagens processadas ilustrativas da redução da área vascular (%) em amostras submetidas ao tratamento com a PDT (A), PS (B), luz (C) e solvente (D).....	44
FIGURA 17 - Avaliação macroscópica por escore quanto a presença de trombos (A) e hemorragia (B) nas imagens obtidas com 300 minutos.....	46
FIGURA 18 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G1 (PDT).....	48
FIGURA 19 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G2 (PS).....	49
FIGURA 20 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G2 (PS).....	50
FIGURA 21 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G3 (luz)	51
FIGURA 22 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras no basal (esquerda) e no T300 (direita) do grupo G4 (solvente).....	52
FIGURA 23 - Avaliação macroscópica por escore quanto a presença de necrose da CAM nas imagens obtidas com 300 minutos.....	53
FIGURA 24 - Micrografia de membranas corioalantoide coradas com hematoxilina e eosina (HE) em objetiva de 10x do G4, tratadas com solvente.....	54
FIGURA 25 - Micrografia de membranas corioalantoide coradas com hematoxilina e eosina (HE) em objetiva de 10x do G3 (A, B e C) e G2 (D, E e F).....	55

FIGURA 26 - Micrografia de membranas corioalantoide coradas com hematoxilina e eosina (HE) em objetiva de 10x do G1 tratadas com PDT.....	56
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PDT	<i>Photodynamic therapy</i> (Terapia fotodinâmica)
PS	<i>Photosensitizer</i> (Fotossensibilizador)
λ	Comprimento de onda (lambda)
nm	Nanômetro
LED	<i>Light emitting diode</i> (Diodo emissor de luz)
PS ₀ ou ¹ PS	Fotossensibilizador em estado fundamental (singleto)
¹ PS*	Fotossensibilizador em estado fundamental singleto excitado
³ PS*	Fotossensibilizador em estado tripleto excitado
³ O ₂	Oxigênio em estado fundamental (tripleto)
¹ O ₂	Oxigênio em estado singleto
¹ O ₂ *	Oxigênio em estado singleto excitado
ERO	Espécies reativas de oxigênio
CIS	Cruzamento intersistema
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado de hematoporfirina
ALA ou 5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
PpIX	Protoporfirina IX
m-THPC	m-tetrahidroxifenilclorina
BPD	Derivado de benzoporfirina
Pc4	Ftalocianina de silício
HPPH	<i>2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide</i>
EDD	<i>Embryonary development day</i> (Dia de desenvolvimento embrionário)
CAM	<i>Chorioallantoic membrane</i> (Membrana corioalantoide)
TMPP	<i>meso-tetrametilpiridil porfirina</i>
PBS	Tampão fosfato-salino

RESUMO

A terapia fotodinâmica baseia-se na administração de uma substância fotossensibilizadora sob ativação luminosa através da emissão de comprimento de onda adequado na presença de oxigênio molecular. As reações fotoquímicas e fotofísicas desencadeiam na destruição do tecido irradiado, seja pela lesão celular ou vascular. Sendo assim, as principais aplicações terapêuticas da terapia fotodinâmica são a terapia oncológica e o tratamento de distúrbios relacionados à neovascularização. Para o desenvolvimento de protocolos que possam ser utilizados na prática clínica, utiliza-se o modelo experimental da membrana corioalantoide de embrião de galinha. Diante disso, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito vascular da terapia fotodinâmica, com o uso da porfirina meso-tetrametilpiridil aplicada pela via tópica na membrana corioalantoide, na dose de 100 μ M. Foram adquiridas imagens antes do tratamento e a cada 30 minutos após a aplicação, até completar cinco horas de avaliação. Essa análise foi baseada na resposta vascular geral, quantificando a área vascular em pixels e obtendo a redução vascular em porcentagem; e na análise visual macroscópica e microscópica. As principais alterações identificadas foram vasoconstrição, formação de trombos, atrofia do mesoderma, fibrose perivascular, hiperemia de capilares ectodérmicos e necrose da membrana corioalantoide. A redução vascular após a terapia fotodinâmica foi de 35%, enquanto que o tratamento com a irradiação luminosa (14%), solvente (5%) e fotossensibilizador (23%) não apresentaram resultados significativos. Sendo assim, apesar de todos os tratamentos terem promovido alterações macroscópicas e microscópicas na membrana, a redução vascular do grupo tratado com a terapia fotodinâmica utilizando a porfirina meso-tetrametilpiridil foi superior em relação aos tratamentos com a luz e com o solvente. Dessa forma este tratamento, nessas condições, apresenta um potencial uso no tratamento de distúrbios que tem como alvo a vascularização.

Palavras-chave: angiogênese, vascularização, fotossensibilização, porfirina catiônica, TMPP

ABSTRACT

Photodynamic therapy is based on the administration of a photosensitizing substance under light activation through the emission of an appropriate wavelength in the presence of molecular oxygen. Photochemical and photophysical reactions trigger the destruction of the irradiated tissue, either by cellular or vascular injury. Therefore, the main therapeutic applications of photodynamic therapy are cancer therapy and the treatment of disorders related to neovascularization. For the development of protocols that can be used in clinical practice, the experimental model of the chorioallantoic membrane of a chicken embryo is used. Therefore, this study aimed to evaluate the vascular effect of photodynamic therapy, with the use of meso-tetramethylpyridyl porphyrin applied topically to the chorioallantoic membrane, at a dose of 100 μ M. Images were acquired before treatment and every 30 minutes after application, until completing five hours of evaluation. This analysis was based on the overall vascular response, quantifying the vascular area in pixels and obtaining the vascular reduction in percentage; and in macroscopic and microscopic visual analysis. The main alterations identified were vasoconstriction, thrombus formation, mesoderm atrophy, perivascular fibrosis, hyperemia of ectodermal capillaries and necrosis of the chorioallantoic membrane. Vascular reduction after photodynamic therapy was 35%, while treatment with light irradiation (14%), solvent (5%) and photosensitizer (23%) did not show significant results. Thus, although all treatments promoted macroscopic and microscopic changes in the membrane, the vascular reduction of the group treated with photodynamic therapy using meso-tetramethylpyridyl porphyrin was superior in relation to treatments with light and solvent. Thus, this treatment, in these conditions, has a potential use in the treatment of disorders that target vascularization.

Keywords: angiogenesis, vascularization, photosensitization, cationic porphyrin, TMPyP

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT – *photodynamic therapy*) é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva que vem, desde o final do século XX, apresentando resultados relevantes em diversas áreas da saúde. A PDT tem sido usada no tratamento oncológico¹⁻⁵ e de doenças vasculares^{6,7,8}, bem como no tratamento de infecções e inativação de microorganismos⁹⁻²⁴. Seus efeitos se baseiam na interação entre um agente fotossensibilizador (PS - *photosensitizer*), oxigênio molecular e irradiação luminosa de comprimento de onda adequado ao PS. Essa interação promove reações físicas e químicas que provocam a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio responsáveis pela toxicidade celular e lesão vascular, bem como reação inflamatória^{25, 29, 102}.

A PDT possui uma característica altamente seletiva devido a preferência do PS pelo tecido proliferativo e pela aplicação da luz diretamente na lesão^{27,102}. As respostas à PDT dependem do agente fotossensível utilizado, do grau de oxigenação do tecido, das condições de iluminação e do tipo de células envolvidas. No entanto, há relatos que mostram a limitação do seu efeito em tumores sólidos, devido a característica hidrofóbica da maioria dos PS e a dificuldade de absorção da droga e da penetração da luz nos tecidos alvos, além da possibilidade de promover angiogênese^{28,29}.

Diante disso, para melhor eficácia terapêutica, tende-se a combinar protocolos de PDT (com diferentes PS e fontes de luz) com outras modalidades de tratamento como quimioterapia, radioterapia, e uso de substâncias antiangiogênicas, por exemplo. Assim, a PDT além de provocar citotoxicidade e potencializar a lesão vascular, também sensibiliza as células aos quimioterápicos ou a radiação ionizante promovendo protocolos mais eficazes com menor dose ou menor exposição, e conseqüentemente, menos efeitos colaterais^{28,29,31}.

Nesse contexto, a PDT vascular vem desta necessidade de aumentar a eficácia da PDT convencional, tendo como alvo os vasos sanguíneos aberrantes ou que nutrem o tecido tumoral. Esta modalidade de PDT promove a morte celular pela ação fotodinâmica direta, bem como pela hipoxia e desnutrição tecidual^{28,29,30}. Estes efeitos são consequência de uma série de eventos vasculares pós-tratamento, como por exemplo, lesão no endotélio, aumento das junções intercelulares endoteliais promovendo formação de trombo, além de vasoconstrição e estase do fluxo sanguíneo⁷²⁻⁷⁵.

Um modelo para estudo dos efeitos vasculares da PDT é a membrana corioalantoide (CAM) de embriões de galinha. É um modelo animal de fácil implementação laboratorial e de baixo custo, que consiste em uma rede vascular bem definida, ampla, transparente e com

reduzida espessura, que dentre outras vantagens, permite a visualização direta e microscópica da vascularização antes, durante e após o tratamento^{76,80,81}. O PS pode ser administrado pela via tópica ou sistêmica (geralmente intraperitoneal ou intravenoso) e após um período de incubação para absorção e biodistribuição, é então submetido a fotoativação^{76,80,81}.

Faz-se necessário o estudo dos efeitos das moléculas fotossensibilizadoras tanto em modelos experimentais quanto em ensaios clínicos, para determinar sua eficácia e assim desenvolver futuros protocolos baseados no seu potencial uso isolado ou em associação. Os efeitos vasculares de diversos PS já foram relatados neste modelo de membrana CAM^{84,106,109,110}. A classe mais estudada é a das porfirinas tetrapirrólicas, devido sua alta efetividade. A porfirina meso-tetrametilpiridil (TMPP) é uma representante, tanto que alguns estudos já estabeleceram doses terapêuticas, viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio a depender da concentração deste PS e condições de iluminação utilizadas^{102,103,105}. No entanto, não foram encontrados relatos da ação da TMPP na PDT vascular em modelo experimental CAM.

O propósito deste trabalho foi investigar as lesões na vascularização induzidas pela ação fotodinâmica da TMPP pela via tópica em modelo *in vivo* de membrana corioalantoide de galinha. Compreender o mecanismo das lesões associado às características do fotossensibilizador e fotoativação, permite otimizar os protocolos de PDT. A investigação macroscópica e microscópica sugere que a PDT vascular utilizando a TMPP como fotossensibilizador tenha um potencial efeito vascular, promovendo principalmente angio-oclusão e/ou vasoconstrição, estase sanguínea, formação de trombos e lesão celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

O uso de componentes que apresentam propriedades terapêuticas quando expostos à luz solar no tratamento de doenças, é documentado há mais de 3000 anos. Civilizações antigas como os egípcios, chineses e indianos já utilizavam a luz solar no tratamento de doenças cutâneas como psoríase, vitiligo e até mesmo o câncer^{25,32}. Porém a atenção da comunidade científica a respeito dessas práticas terapêuticas se deu por volta de 1800 com estudos a respeito das reações químicas e físicas derivadas de diversos comprimentos de onda do espectro eletromagnético. Somente em 1901, o médico dinamarquês Niels Finsen publicou o livro *La Phototherapie*, relatando os primeiros conceitos dos efeitos fisiológicos da luz sobre as células. Além disso, indicou técnicas para o tratamento de infecções cutâneas usando luz monocromática, que foram amplamente utilizadas na prática clínica por médicos da época. Desta forma, tais descobertas lhe renderam o Prêmio Nobel de Medicina em 1903^{25,32,33}.

A introdução do uso de substâncias fotossensibilizadoras na fototerapia ocorreu por volta de 1890. Um estudante de medicina, Oscar Raab percebeu acidentalmente que a associação de luz com o corante laranja de acridina em uma lâmina com *Paramecium*, provocou a morte do protozoário^{33,34}. Em 1904, os pesquisadores alemães Herman von Tappeiner e Albert Jodlbauer perceberam a importância da presença do oxigênio nas reações observadas pelo estudante, criando o termo “reação fotodinâmica”^{25,34}. Alguns anos mais tarde, em 1910, Hausmann demonstrou o potencial anti-angiogênico do fotossensibilizador hematoporfirina em tumores de ratos expostos à luz solar, e suas propriedades menos tóxicas comparadas aos corantes²⁵. A partir de então novos estudos se sucederam e vários pesquisadores demonstraram a capacidade de acumulação seletiva de fotossensibilizadores porfirínicos em tumores obtendo resultados satisfatórios no tratamento do câncer usando a PDT^{25,35}.

O início da terapia fotodinâmica na medicina veterinária foi a partir dos anos 1980, quando Thomas Dougherty publicou o primeiro estudo utilizando tumores sólidos em cães e gatos. A partir de então, diversos estudos foram realizados, com resultados satisfatórios, na tentativa de estabelecer protocolos de tratamento para limitados tipos de neoplasias e espécies²⁵. Apesar do grande potencial como alternativa terapêutica, ainda existem poucos estudos quando comparados com outras áreas da saúde. Tanto que somente em 2016 foi publicado o primeiro livro direcionado à PDT veterinária.

2.2. Radiação eletromagnética e fontes de luz

O mecanismo de ação da PDT consiste na interação de três elementos: um agente fotossensibilizador (PS), uma fonte de luz e oxigênio molecular. O entendimento dos mecanismos da terapia fotodinâmica necessita de conhecimento multidisciplinar. Sabe-se que é necessário que a molécula do fotossensibilizador seja excitada ao absorver um fóton e, ao reagir com o oxigênio molecular provoque a formação de moléculas de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, levando à lesão celular³⁷.

A interação entre matéria e luz, para que ocorra a absorção de fótons, depende do nível de energia emitido e de acordo com o espectro de radiação eletromagnética (Figura 1), a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda³⁷. Radiações com comprimentos de onda maiores, como as ondas de rádio e micro-ondas, penetram mais profundamente nos tecidos, mas não possuem energia suficiente para provocar a excitação de elétrons na camada de valência da matéria. No entanto, os raios X e gama provocam a remoção dos elétrons da camada de valência devido sua alta energia^{32,37} sendo, portanto, utilizados nas radioterapias ionizantes convencionais³⁸.

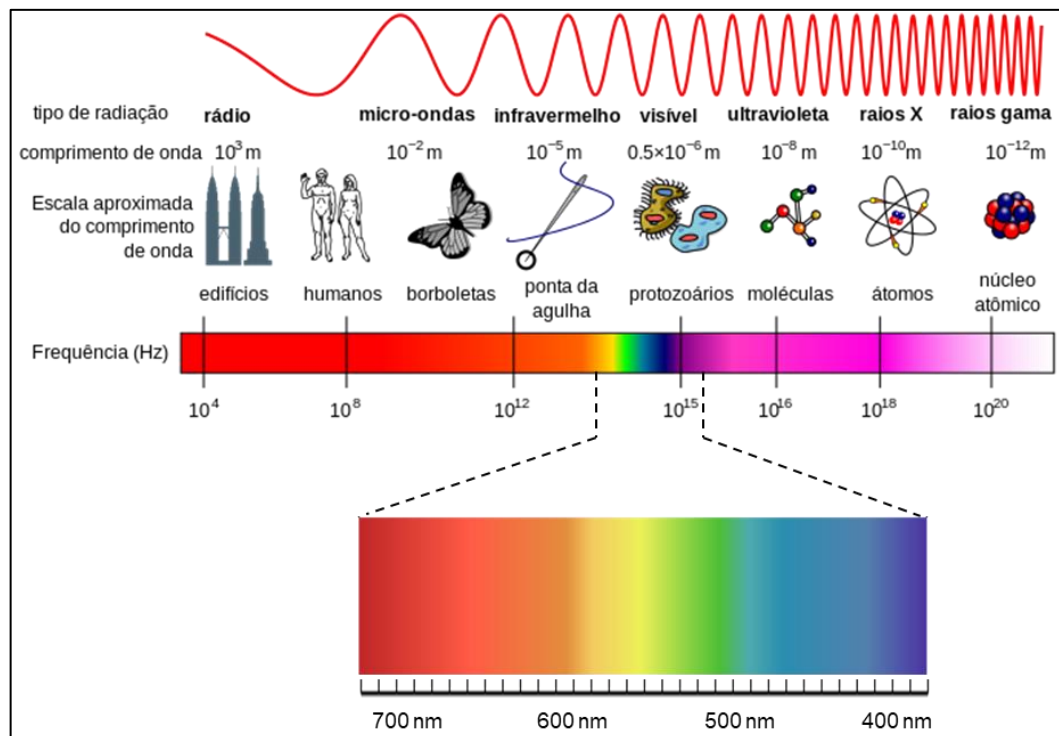


FIGURA 1 - Diagrama adaptado do espectro de radiação eletromagnética, com ênfase no espectro de luz visível e seus respectivos comprimentos de onda
Fonte: elaborado pelo autor com adaptações^{39,40}

Dessa forma, radiações dentro da janela fototerapêutica, com comprimento de onda (λ) entre 300 a 900 nm³⁷ ou segundo outros autores, entre 600 a 800 nm^{32,36} possuem energia suficiente para a excitação eletrônica com precisão e especificidade molecular³⁷, permitindo uma penetração tecidual de até 2 cm³⁶. Portanto, na terapia fotodinâmica são utilizadas fontes de luz que emitem ondas próximas à radiação ultravioleta, espectro de luz visível e ondas próximas a radiação infravermelha³⁷.

Conforme postulado em meados 1890 por Raab, o papel da luz na PDT é inquestionável, tanto quanto o papel do fotossensibilizador^{25,34}. O ideal é que haja uma sobreposição entre o espectro de absorção do PS e o espectro de emissão da fonte de luz. Para a irradiação luminosa são considerados dois principais fatores: a quantificação da potência e fluência de luz aplicada. A potência ou irradiância, expressa em miliwatts por centímetro quadrado (mW/cm²) refere-se à intensidade de luz distribuída; enquanto a fluência é a quantidade de luz aplicada, expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm²). O tempo de tratamento quantificado em segundos deriva da relação entre esses dois fatores, de acordo com a equação^{42,43}:

$$[T = \textit{Fluência}/\textit{Potência}] \quad (1)$$

Para a escolha da fonte de luz ou dispositivo de fibra óptica que distribuirá a radiação, deve-se considerar o espectro de absorção do PS e localização, tamanho, acessibilidade e características do tecido alvo, garantindo uma distribuição suficiente e homogênea^{27,36}. Os lasers, principalmente os lasers de diodo são as fontes de luz do tipo coerente mais utilizadas na PDT^{36,44}. Outra opção de dispositivo inclui os diodos emissores de luz (LED), que ao contrário dos lasers, sua luz não é monocromática. Porém, possui uma largura no espectro de emissão relativamente estreita^{43,44} com comprimentos de onda de saída, variando entre 630 nm a 690 nm³⁶.

Alternativamente, as fontes de luz não-coerentes (lâmpadas convencionais) e a luz solar são amplamente disponíveis. Além disso, possuem baixo ou nenhum custo, respectivamente, e são consideradas uma opção para a irradiação, já que por emitirem o espectro de luz visível, possuem grande diversidade de comprimentos de onda capazes de ativar o PS^{36,41}. Sendo assim, uma dosimetria complexa, que considera a dose total, a intensidade, o tempo e o modo de irradiação da luz, é necessária para controlar os fatores que afetam a eficácia da irradiação e da resposta clínica à PDT³⁶.

2.3. Reação fotodinâmica

Para que a reação fotoquímica aconteça, o comprimento de onda emitido deve enquadrar o espectro de absorção do PS (Quadro 1). Assim, uma molécula em seu estado fundamental (PS_0) assumirá um estado excitado após a absorção de um fóton, desde que a diferença de energia entre esses dois estados seja compatível com a energia presente no fóton absorvido³⁷.

QUADRO 1 – Agentes fotossensibilizadores e seus espectros de absorção

FOTOSSENSIBILIZADOR	COMPRIMENTO DE ONDA
Derivado de hematoporfirina (HpD)	630 nm
m-tetrahidroxifenilclorina (m-THPC)	652 nm
Derivado de benzoporfirina (BPD)	690 nm
Porfirina <i>meso</i> -tetrametilpiridil (TMPP)	480 – 700 nm
Silício ftalocianina (Pc4)	675 nm
Azul de metileno	660 nm
Rosa bengala	540 nm
2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide (HPPH)	665 – 680 nm
Veteporfin	689 – 693 nm
Ácido aminolevulínico (ALA) e seus ésteres	635 nm

Fonte: Li *et al.*³²; Dobson *et al.*³⁶; Agostinis *et al.*⁴⁴; Gonçalves *et al.*⁸⁷

O PS em seu estado fundamental está na forma singleto (1PS_0 ou 1PS) e possui dois elétrons com *spin* opostos em um mesmo orbital na camada de valência. A exposição à luz na PDT o faz absorver um fóton e assumir um estado excitado singleto ($^1PS^*$) por meio da inversão de um *spin* para um orbital mais energético. Esta molécula possui uma característica muito instável, fazendo com que ela libere energia através da emissão de fluorescência ou calor e também realize um cruzamento intersistema (CIS). O CIS é um processo em que não há absorção ou emissão de radiação, no qual uma molécula excitada decai a níveis menos energéticos. Dessa forma, o $^1PS^*$ rapidamente decai, por meio de uma rotação de um dos *spin* de elétron em um dos orbitais, para um estado excitado tripleto ($^3PS^*$) mais estável e com menos energia^{37,44}.

Moléculas em estado tripleto tendem a reagir com outras moléculas no mesmo estado. No entanto, a grande maioria das moléculas existentes possui um estado fundamental singleto, exceto o oxigênio molecular, cujo estado fundamental é o tripleto (3O_2). Como essas duas moléculas tripleto possuem apenas dois elétrons na camada de valência, ocupando orbitais diferentes, e com *spin* na mesma direção, essa relação intermolecular ($^3PS^* - ^3O_2$) é o fator predominante para que ocorra a PDT³⁷.

O diagrama de Jablonski (Figura 2) exemplifica as reações fotofísicas predominantes, através da representação molecular dos níveis de energia. As transições entre os estados excitados (singlete e tripleto) para retornar ao estado fundamental do PS podem ser radiativas e não radiativas. As transições radiativas entre dois estados eletrônicos semelhantes (singlete-singlete) ou diferentes (tripleto-singlete), envolvem a perda de energia através da emissão de fótons por fluorescência ou por fosforescência, respectivamente. Além disso, as transições não radiativas para o estado tripleto (mais estável e de menor energia) do PS ou até mesmo para seu estado fundamental podem ocorrer por liberação de calor, conversão interna ou através de cruzamento intersistema^{37,44}.

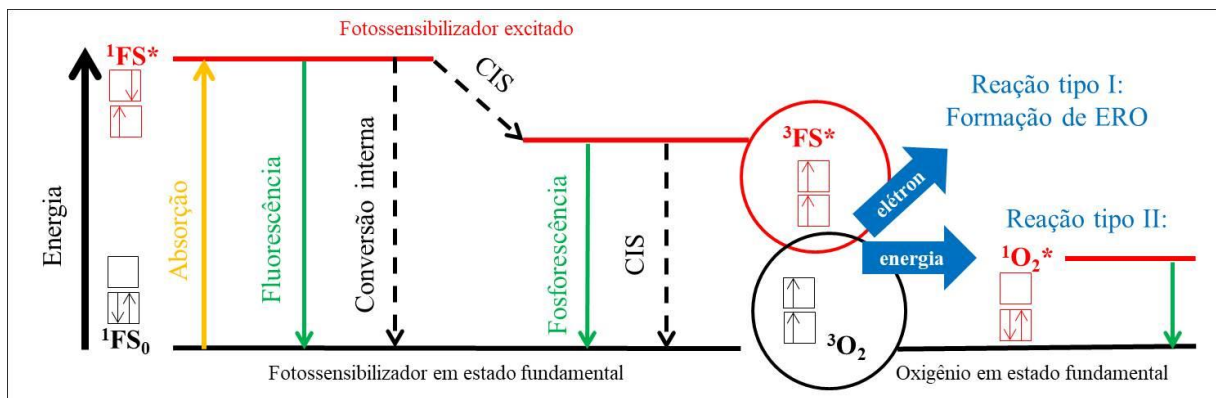


FIGURA 2 - Diagrama de Jablonski adaptado. As setas contínuas (verdes e amarela) representam transições radiativas e as setas tracejadas (pretas) representam transições não-radiativas. Os quadros correspondem aos orbitais da camada de valência e as setas menores representam os spin dos elétrons. As moléculas excitadas estão em vermelho.

Fonte: elaborado pelo autor, adaptado de Sabino & Hamblin³⁷ e Agostinis *et al.*⁴⁴

Essas reações fotofísicas ocorrem muito rapidamente, especialmente entre estados excitados do PS, haja vista que algumas dessas reações ocorrem em escalas de micro a nanosegundos. No entanto, a transição do estado tripleto do PS para seu estado fundamental pode ocorrer em microssegundos a dias. Essa menor velocidade promove um tempo maior para que ocorram as reações químicas e interações moleculares que provocam as lesões celulares desejadas na PDT³⁷.

A base da PDT é a destruição tecidual pelo estresse oxidativo. Portanto, a partir dessa interação entre o ³PS excitado e ³O₂ molecular, podem ocorrer dois tipos de reação: tipo I e tipo II. Na reação tipo I, há a transferência de um elétron do ³PS* para o ³O₂ formando radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, iniciando uma cascata de eventos bioquímicos^{32,36,37}. Na reação tipo II, há a transferência de energia do ³PS* para o ³O₂

e então o $^3\text{O}_2$ passa a assumir um estado excitado singlete ($^1\text{O}_2^*$). Após essa transferência de energia, o $^3\text{PS}^*$ volta ao seu estado fundamental^{37,44}.

Essas espécies reativas de oxigênio (ERO) como radicais livres, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete, por exemplo, possuem propriedades citotóxicas, e são resultado de reações (tipo I e II) que ocorrem simultaneamente. Essas reações dependem das características do PS, assim como das concentrações de oxigênio em seu estado fundamental e outros substratos presentes nessas reações^{32,34}. A maioria dos PS tendem a provocar a reação tipo II, dando ao $^1\text{O}_2$ um papel importante na citotoxicidade desejada da PDT^{34,37,44}. Além disso, relata-se uma reação tipo III, oxigênio-independente, caracterizada pela lesão celular direta pelo PS excitado. O desenvolvimento de PS que preferencialmente direcionem a reação fotodinâmica para os tipos II e III, auxilia no aumento da efetividade da PDT, sobretudo em tumores que apresentem regiões hipóxicas^{41,44}.

2.4. Fotossensibilizadores

O PS é um composto químico capaz de ser fotoativado, e possui maior afinidade pelo tecido tumoral ou por lesões por meio de mecanismos complexos e pouco compreendidos^{32,34,36,50}. No entanto atribui-se essa característica ao fato de que o microambiente tumoral e de doenças vasculares apresentam proliferação endotelial associada a alterações circulatórias como aumento da permeabilidade vascular⁵¹. Assim, a via de aplicação do PS em ensaios ou prática clínica pode ser tópica, sistêmica (oral, intravenosa, intranasal³³), instilados em órgãos ocos³⁶ ou intralesional/intratumoral^{46,52}. Além disso, em modelos experimentais também relata-se a via intraperitoneal¹⁰⁹.

Os PS disponíveis para uso na PDT podem ser classificados de acordo com sua estrutura molecular⁵⁰. A classe mais numerosa, cujas moléculas são as mais utilizadas atualmente é a dos tetrapirróis⁵⁰. Essa estrutura tetrapirrólica é semelhante à protoporfirina encontrada na hemoglobina³⁶. Neste grupo estão inclusos os PS porfirínicos, clorínicos, bacterioclorínicos e ftalocianínicos⁵⁰.

Existe uma diversidade de moléculas fotossensibilizadoras com características variadas, e por isso, a produção comercial de PS é um desafio. Pesquisadores e laboratórios tem preocupado em introduzir componentes e/ou modificar a estrutura das moléculas para (I) permitir a estabilidade uma vez que tendem a se agregar, diminuindo o tempo de vida do seu estado tripleto, e conseqüentemente reduzindo a formação de $^1\text{O}_2$; (II) aumentar a produção de oxigênio singlete; (III) favorecer a distribuição do PS no tecido alvo, (IV) ter afinidade por

alvos subcelulares, (V) não ser tóxico até a sua fotoativação e (VI) ser solúvel em água ou outro solvente biocompatível^{32,33,34,35,36,50}, dentre outras características consideradas ideais.

Levando em consideração essas características, as porfirinas catiônicas são muito estudadas atualmente pois apresentam característica anfifílica. Sendo assim, sua estrutura hidrofílica permite se dissolver em soluções aquosas, e sua porção hidrofóbica permite se ligar a componentes celulares e subcelulares, facilitando sua entrada e acumulação^{103,111}.

A porfirina meso-tetrametilpiridil (TMPP) (Figura 3) apresenta propriedades fotofísicas de interesse para tratamentos clínicos, pois possui característica catiônica, conferindo afinidade pelo tecido tumoral além de alvos subcelulares^{87,88,112}. Possui facilidade de ligação a sítios de carga negativa na membrana celular, favorecendo sua localização lisossômica por endocitose. Por este motivo, após fotoativação, há liberação de enzimas lisossômicas no citosol, promovendo a morte celular e na matriz extracelular provocando liberação de mediadores inflamatórios¹¹⁰.

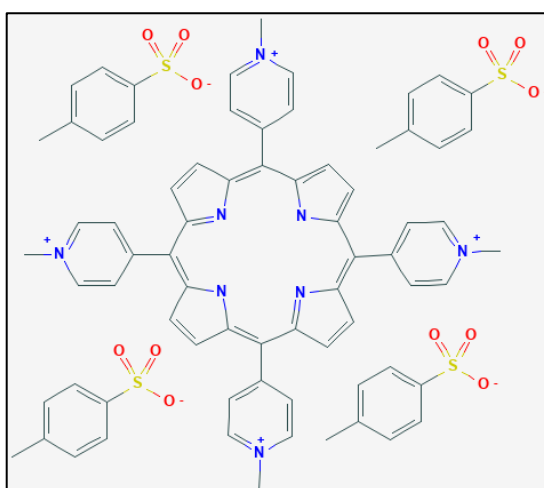


FIGURA 3 - Representação esquemática da estrutura química da porfirina meso-tetrametilpiridil (TMPP).
Fonte: Pubchem¹⁰⁸

Possui alto rendimento quântico de oxigênio singleto no seu estado tripleto (excitado), além de ser capaz de se ligar e interagir com o DNA^{87,88,111,112,113}. Além disso, pode promover morte celular por apoptose ou senescência através da diminuição do telômero e interferências na replicação do DNA. Por isso, tem potencial para tratamento oncológico, mas ainda são necessários estudos profundos para compreender os efeitos biológicos dessas características¹¹⁴. Por apresentar fluorescência, acumulação e lenta eliminação celular além da

ligação aos ácidos nucleicos, a TMPP tem também potencial para uso em exames de imagem diagnósticos para neoplasias^{111,112}.

Outra característica que confere vantagem no uso da TMPP é o transporte da molécula tanto por lipoproteínas de baixa (20%) quanto de alta densidade (80%). Sugere-se uma relação entre o transporte através de lipoproteínas de baixa densidade promover necrose celular, enquanto o transporte por lipoproteínas de alta densidade como a albumina promover lesão vascular¹¹². Sua atividade pós-fotoativação possui ampla variedade de alvos como células tumorais e microorganismos como vírus, protozoários e bactérias – inclusive Gram negativas que sabidamente possuem maior resistência bacteriana^{104,110,115}.

Considerando o espectro de absorção (Figura 4), a TMPP apresenta seu pico de absorção máxima (banda de Soret) em $\lambda=420$ nm. Os picos menores de absorção (bandas Q) correspondem a $\lambda=518$ nm, 553 nm e 586 nm.

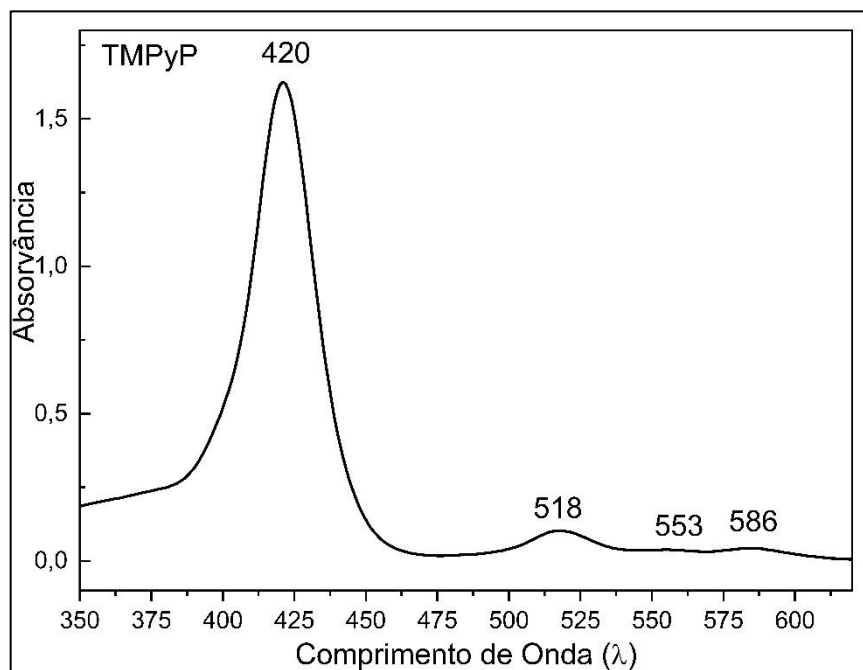


FIGURA 4 - Espectro de absorção do fotossensibilizador TMPP. A banda de Soret (pico de absorção máxima) e as bandas Q estão identificadas com seus respectivos comprimentos de onda em nm.

Fonte: arquivo pessoal.

Apesar de ser hidrofílica, neste estudo foi diluída em PBS a 10% de etanol, para que essa solução pudesse ser avaliada e seus resultados utilizados futuramente em outros estudos com a associação desta porfirina com compostos sabidamente insolúveis em água, como a curcumina.

2.5. PDT como estratégia terapêutica vascular

A vascularização de um tecido, seja ele normal ou patológico, é necessária, dentre outros motivos, para permitir o aporte nutricional e de oxigênio, bem como eliminação de resíduos metabólicos e gás carbônico^{60,61}. No período embrionário, a formação dos vasos acontece através do surgimento de novas células endoteliais que se organizam em forma tubular (vasculogênese), bem como o desenvolvimento de vasos a partir dos já existentes (angiogênese), sob efeito do equilíbrio entre fatores estimulantes e inibitórios deste processo^{60,62}. Dessa forma, os vasos sanguíneos tendem a se manter quiescentes, podendo ser temporariamente estimulados em situações fisiológicas como processos inflamatórios, ciclo reprodutivo feminino e cicatrização de feridas^{60,62}. No entanto, condições patológicas como doenças isquêmicas e inflamatórias como artrite, retinopatia diabética e degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e, principalmente, o câncer^{61,63}, induzem um estímulo contínuo para a angiogênese, o que pode culminar em vasos imaturos, tortuosos, desorganizados, e excessivamente ramificados⁶⁰.

Em processos oncológicos, essa via de interdependência entre a multiplicação celular neoplásica e endotelial⁶⁴ é tão importante para a viabilidade tumoral que a capacidade de angiogênese é considerada uma das dez características biológicas adquiridas pelas células durante o complexo processo de crescimento neoplásico e metastatização^{60,62}.

O conceito de terapia anti-angiogênica foi primeiramente descrito em 1971⁶⁴ sugerindo o potencial uso de anticorpos anti-fator pró-angiogênico. Desde então, diversos grupos de pesquisa tem realizado estudos para o desenvolvimento de moléculas e protocolos a serem utilizados isolados ou principalmente em associação com outras terapêuticas já existentes, como a PDT^{7,10,66}.

O efeito anti-angiogênico pode ser alcançado interferindo na função dos fatores, receptores e sinalização pró-angiogênica, estimulando ou regulando fatores inibitórios ou provocando lesões vasculares diretas⁶³. Como o VEGF é o fator mais amplamente expressado, a maioria dos fármacos existentes para terapia anti-angiogênica tem como alvo a inibição deste fator. O fármaco mais antigo é o bevacizumab, um anticorpo monoclonal recombinante⁶⁰. Além disso já existem estudos e protocolos que envolvem o uso de inibidores de tirosina quinase e outros anticorpos monoclonais que tem como alvo os receptores dos fatores pró-angiogênicos e também o processo de sinalização e síntese^{60,67}. O uso de compostos derivados de plantas com potencial antiangiogênico terapêutico como curcumina, polifenóis, flavonoides, terpenoides, artemisina e tocotrienol também é emergente^{68,69}. No entanto, sob diversos mecanismos, alguns tumores podem apresentar resistência inata ou adaptativa aos fármacos antiangiogênicos⁶⁰.

Além do uso dessas substâncias visando impedir a angiogênese, uma outra possibilidade terapêutica vascular tem como alvo direto o comprometimento de vasos já existentes⁶⁵. Nesta abordagem, os agentes perturbadores vasculares (VDA – *vascular-disrupting agent*)⁶⁵ provocam citotoxicidade e perda da morfologia e coesão celular, desencadeando colapso vascular seletivo e necrose tumoral⁷⁰. O flavonoide DMXAA (vadimezan - *5,6-dimethyl-9-oxo-9H-xanthene-4-acetic acid*) tem sua ação na diminuição do fluxo sanguíneo, provavelmente devido indução de apoptose e liberação de citocinas, enquanto os ligantes de tubulina (fosbretabulina, ombrabulina, plinabulina) provocam a destruição do citoesqueleto e interrupção de mecanismos mitóticos^{70,71}. Mesmo sem um alvo específico, a hipertermia e a terapia fotodinâmica são estratégias terapêuticas que podem ser consideradas como agentes perturbadores vasculares⁶⁵.

Entre as décadas de 1960 e 1980, estudos mostrando os efeitos da PDT sobre os vasos sanguíneos se intensificaram, abrindo possibilidades para o tratamento de doenças oncológicas e vasculares^{72,73}. Dessa forma, terapias que tem a vascularização como alvo apresentam vantagens em relação às terapias convencionais que visam a lesão celular, como maior acessibilidade e eficiência, bem como menor possibilidade de resistência terapêutica⁶¹.

Assim, na PDT vascular, a fotolesão faz com que a célula endotelial se torne mais arredondada alterando as junções intercelulares e expondo o tecido subendotelial. Essa reação desencadeia a cascata de coagulação, levando a agregação plaquetária e formação de trombos que provocam a oclusão vascular e diminuição do aporte sanguíneo^{6,74,75}. Além destes, outros efeitos vasculares comumente relatados são vasoconstrição, hemorragia, hemólise, embolização e reperfusão^{65,72,73,75}. Conseqüentemente, tais alterações vasculares provocam a morte celular por isquemia e hipóxia comprometendo o fornecimento de oxigênio e nutrientes essenciais.

Para provocar tais alterações, o PS deve atingir seletivamente o compartimento vascular, e o faz de forma passiva (a depender de suas características físico-químicas) ou ativa (quando apresenta modificações estruturais ou está ligado a moléculas ou sistemas carreadores que facilitam sua ligação às células endoteliais)⁶¹. O fato dos vasos derivados da angiogênese tumoral serem tortuosos, muito ramificados, e desorganizados, faz com que estes sejam também mais permeáveis, aumentando a pressão intersticial e favorecendo a redução da perfusão sanguínea e oxigenação do tumor. Apesar destas características não impedirem o crescimento tumoral, reduz a ação de fármacos (como na quimioterapia) e sua eficácia⁶⁰. No entanto, essas características vasculares anormais permitem que os vasos sejam mais sensíveis à

fotossensibilização^{61,70} e, por isso, a lesão às células endoteliais é maior quando há um menor intervalo entre a administração do PS e a irradiação luminosa^{27,74}.

2.6. Modelo experimental *in vivo* de membrana corioalantóica

A membrana corioalantoide (CAM), origina-se da fusão do mesoderma do córion e do mesoderma do alantoide, e tem a função de troca gasosa, armazenamento de excretas urinárias, transporte de cálcio da casca para o embrião, equilíbrio ácido-básico e reabsorção de água e eletrólitos^{76,78,79}. É composta por três camadas de tecido embrionário: o epitélio ectodérmico coriônico e o epitélio endodérmico alantóico que revestem o epitélio mesodérmico intermediário. Este último é composto por uma ampla rede vascular e estroma que se desenvolvem juntamente com o desenvolvimento do embrião^{79,80,82} (Figura 5).

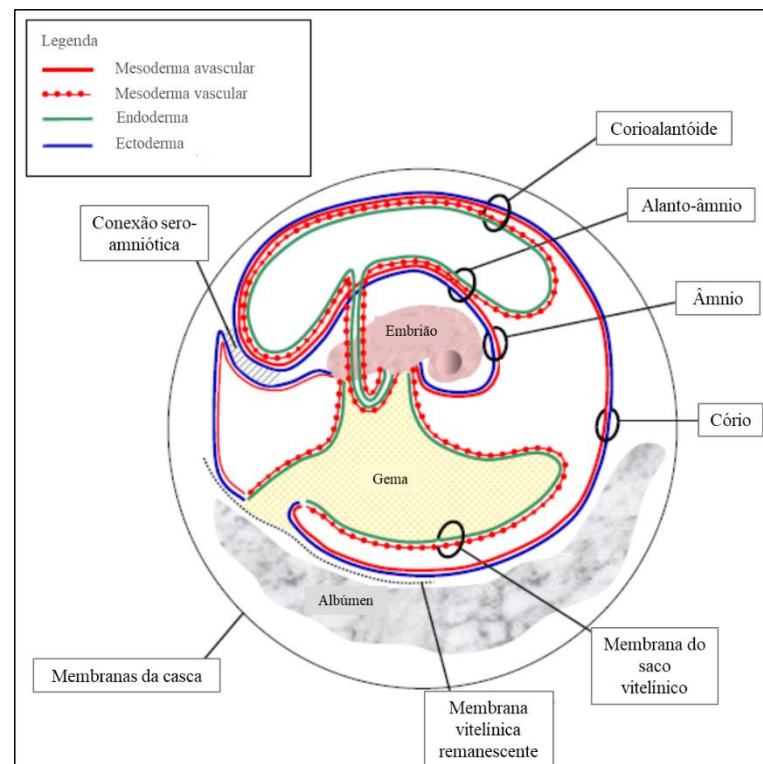


FIGURA 5 - Representação esquemática das membranas extraembrionárias em embrião de galinha. Fonte: adaptado de Baggott⁸²

A estratificação da CAM em três camadas confere a espessura de aproximadamente 200µm. O epitélio mesodérmico é composto por tecido conjuntivo frouxo enquanto no epitélio endodérmico observa-se uma única camada de células cuboides com citoplasma discretamente basofílico^{95,100}. O epitélio coriônico é composto por duas camadas de células cuboides achatadas com citoplasma acidofílico. Essas duas camadas são separadas por um seio capilar

que fica mais evidente a partir do 11º EDD, assumindo uma posição superficial em contato com a membrana interna da casca a partir do 14º EDD¹⁰⁰.

Os vasos da CAM surgem a partir do 3º – 4º dia de desenvolvimento embrionário (EDD – *embryonary development day*) como uma rede de túbulos imaturos e espalhados no mesoderma, com ausência de lâmina basal e células musculares lisas^{76,79,80}. Do 5º ao 10º dia, os vasos inicialmente espalhados dão origem a uma rede capilar intimamente associada ao ectoderma coriônico e diferenciam-se em capilares, arteríolas e vênulas, sendo que a partir do 8º dia já existe um plexo vascular capaz de trocas gasosas^{76,79,81}. O crescimento da CAM e a proliferação vascular se estendem até o 10º dia, com completa diferenciação da hierarquia vascular no 13º dia⁸⁰. A membrana se apresenta em sua morfologia final, com maturação dos vasos, presença contínua de pericitos, células musculares lisas e lâmina basal, e diminuição dos espaços intercapilares, próximo do 18º dia⁷⁶.

O uso da CAM como modelo experimental *in vivo* é um método alternativo que permite estudos dos vasos sanguíneos e seu comportamento biológico sob variadas situações nas diversas áreas da ciência^{29,30,80,83}. A CAM não possui inervação e é estabelecido que até o 14º EDD, o embrião ainda não apresenta receptores associados a percepção de dor. Por isso recomenda-se que os experimentos que utilizam este modelo sejam realizados entre o 11º e o 14º EDD, pois neste período a CAM já está desenvolvida e o estudo será indolor ao embrião⁸¹.

Como a CAM se desenvolve rapidamente e se localiza logo abaixo da casca, possibilita fácil acessibilidade e visualização dos vasos sanguíneos. Além disso, permite reprodutibilidade e possui baixo custo. No entanto, por se tratar de uma rede vascular bem definida, pode provocar dificuldade em diferenciar novos vasos de vasos pré-existentes, além de ser uma membrana sensível a variações ambientais^{80,81}. Esse modelo é amplamente utilizado por exemplo, para estudos de desenvolvimento de fármacos anti e pró-angiogênicos, compreender crescimento tumoral e processos metastáticos, além de permitir avaliar o comportamento vascular frente a terapias como PDT, bem como estudos toxicológicos^{80,81}. Sendo assim, optou-se em utilizar o modelo CAM para avaliação do efeito vascular da PDT com a porfirina TMPP administrada pela via tópica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito vascular da terapia fotodinâmica em modelo de membrana corioalantoide de galinha utilizando o fotossensibilizador porfirínico *meso*-tetrametilpiridil.

3.2. Objetivos específicos

1. Quantificar a redução da área vascular obtida com os tratamentos com a PDT, o PS, a luz e o solvente.
2. Avaliar as alterações macroscópicas dos tratamentos com a PDT, o PS, a luz e o solvente, a partir de imagens digitais da membrana corioalantoide.
3. Analisar as alterações microscópicas na membrana corioalantoide após os tratamentos com a PDT, o PS, a luz e o solvente.

4. HIPÓTESE

A terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador porfirínico TMPP possui potencial efeito vascular e celular em membrana corioalantoide.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFG – protocolo 069/2017).

5.1. Local de desenvolvimento

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Ciência Animal e no Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética do Instituto de Ciências Biológicas II, e o fotossensibilizador foi preparado no Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, campus Samambaia. O processamento das amostras e análise histológica foi realizado no Laboratório de Histotécnica, Morfometria e Inovação (LHiMI) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da mesma instituição, campus Colemar Natal e Silva.

5.2. Delineamento experimental

Foram utilizadas 22 amostras divididas ao acaso em quatro grupos de tratamento (G1, G2, G3, G4). O G1 (n=7) recebeu o tratamento com a PDT, o G2 (n=5) foi tratado somente com o PS, e o G3 (n=5) e G4 (n=5) foram os grupos luz e controle solvente, respectivamente. No G1 e G2, por via tópica, foi aplicado 100 μ L da solução do PS diluído com o solvente PBS a 10% de etanol. Porém somente o G1 foi submetido à irradiação luminosa após a aplicação da solução, caracterizando a PDT. O G3 recebeu a aplicação tópica de 100 μ L do mesmo solvente seguido da irradiação luminosa, enquanto que o G4 recebeu somente a aplicação tópica de 100 μ L do solvente.

Foram estabelecidos 12 tempos experimentais para obtenção das imagens (basal, T0, T30, T60, T90, T120, T150, T180, T210, T240, T270 e T300). O tempo basal corresponde à imagem antes do tratamento, o T0 corresponde à imagem imediatamente após o período de incubação pós-tratamento e os tempos seguintes obtidos em sequência a cada 30 minutos, totalizando 300 minutos de avaliação. A resposta vascular ao longo do tempo e entre os grupos foi avaliada em pixels (%), através do processamento das imagens. Além disso, o comportamento vascular e da CAM foi realizado por análise macroscópica e microscópica.

5.3. Preparo da membrana corioalantoide

Os ovos fertilizados de galinha foram obtidos entre o primeiro e o segundo dia de desenvolvimento do embrião (EDD 1 ou EDD 2). Na primeira etapa do experimento, os ovos foram higienizados com álcool 70% e incubados em incubadora previamente estabilizada, com temperatura entre 37°C e 37,5°C, umidade relativa do ar entre 55% e 60% e programada para viragem dos ovos a cada uma hora. Antes de receber os ovos, a incubadora foi higienizada com álcool 70%, submetida a luz ultravioleta por 15 minutos e mantida em capela de fluxo laminar até o fim das três etapas do experimento, para minimizar risco de contaminação (Figura 6).

Na segunda etapa (EDD 3) foi realizada a abertura da casca para exposição da CAM em desenvolvimento. Esse procedimento deve ser feito preferencialmente no EDD 3 pois a partir do EDD 4, a CAM tende a se anexar à casca para permitir as trocas gasosas e mobilização de cálcio para o embrião, dificultando a técnica⁸⁰. Cada ovo foi submetido à abertura de um orifício na casca na extremidade larga do ovo, com uma tesoura de ponta fina, para retirada de 3 a 4 mL de albúmen com auxílio de seringa e agulha (Figura 7A). Depois desse procedimento, com uma pinça anatômica, uma janela de 4 cm² foi aberta para visualização da membrana interna da casca (Figura 7B). Esta foi então parcialmente retirada para exposição da CAM e do embrião viável (Figura 7C). A janela foi fechada com fita adesiva transparente de 24 mm de largura (Figura 7D). O ovo foi colocado em um suporte (para evitar queda e/ou rotação) e incubado novamente nas mesmas condições de temperatura e umidade, porém sem a rotação automática.

Esta etapa foi realizada na capela de fluxo laminar, e antes da manipulação dos ovos, as pinças e tesouras foram lavadas e autoclavadas. Os outros materiais que foram utilizados dentro da capela foram higienizados com álcool 70% e submetidos a luz ultravioleta por 15 minutos. Entre a abertura de cada ovo, as tesouras e pinças foram mantidas em álcool 70% para minimizar contaminação entre os ovos. Estes procedimentos de preparação da membrana corioalantoide foram previamente descritos por Buzzá *et al.*⁸⁴, com pontuais modificações.



FIGURA 6 - Primeira etapa de preparo da membrana corioalantoide. Manutenção dos ovos higienizados em incubadora dentro da capela de fluxo laminar.

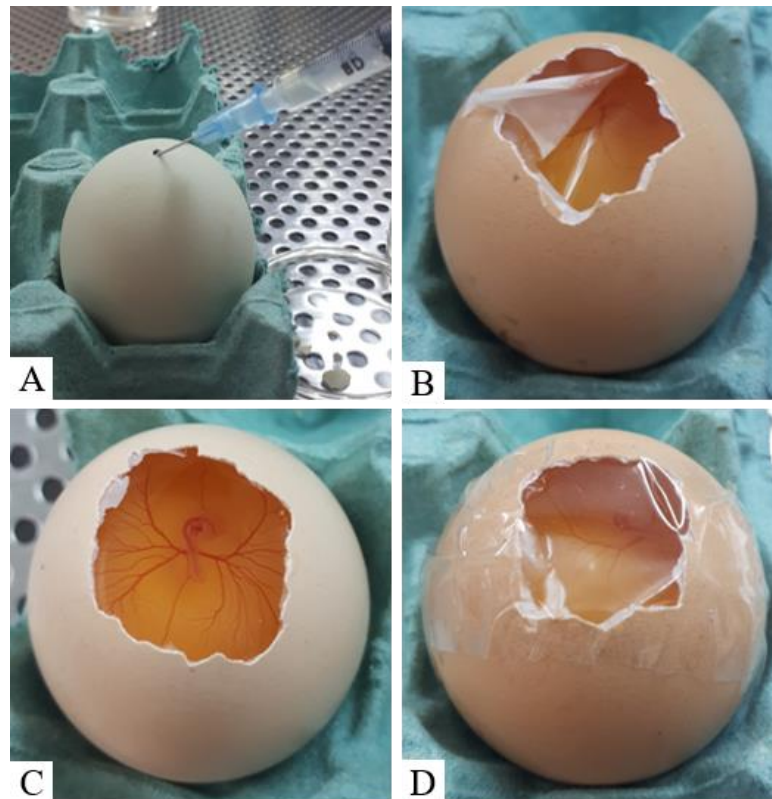


FIGURA 7 - Procedimentos da segunda etapa de preparo da membrana corioalantoide. Embrião no 3º dia de desenvolvimento do embrião. A – Abertura de orifício na casca para retirada de albúmen. B – Abertura da janela para exposição da membrana interna da casca. C – Exposição e inspeção da viabilidade da membrana corioalantoide e embrião. D – Fechamento da janela com fita adesiva para reincubação do ovo.

5.4. Preparo do fotossensibilizador

A porfirina TMPP (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) foi diluída em tampão fosfato-salino (PBS) a pH 7,4 com 10% de etanol na concentração de 100 μ M. Sua concentração e espectro de absorção foram determinados no espectrofotômetro. A solução solvente de PBS a 10% de etanol também foi preparada no mesmo momento. Neste estudo o PS foi diluído em PBS a 10% de etanol para que essa solução pudesse ser avaliada e seus resultados utilizados em outros estudos com a associação desta porfirina com compostos sabidamente hidrofóbicos, como a curcumina.

5.5. Irradiação luminosa e obtenção das imagens

A terceira etapa foi realizada no 11^o EDD. A janela de abertura foi estendida para permitir o posicionamento do anel de teflon (1 mm de espessura e altura e 15 mm de diâmetro interno), utilizado para delimitar a área de tratamento e análise (Figura 8A). Após a aplicação da solução do PS (G1 e G2) e solvente (G3 e G4), os ovos foram novamente incubados (sem cobertura da fita adesiva, nas mesmas condições de temperatura e umidade anteriores) por 40 minutos⁸⁴ no escuro.

Após este período de incubação, as amostras do grupo G1 e G3 foram submetidas a cinco minutos de irradiação luminosa, a uma distância de 12 cm de uma fonte de luz branca, não coerente (lâmpada halógena de 500 W), de baixo custo (Br.Patent: PI 0802369-7 A2, 2008)⁸⁵ (Figura 8B). Esse sistema emite comprimentos de onda entre 470 nm e 750 nm em toda a região visível do espectro eletromagnético⁸⁵, totalizando uma intensidade de 120 mW/cm² e fluência de 36 J/cm². O espectro de emissão da luz branca se sobrepõe ao espectro de absorção do fotossensibilizador porfirínico *meso*-tetrametilpiridil.

O monitoramento fotográfico para avaliação vascular foi realizado através de estereomicroscópio (L20T, Bioptika[®], Ningbo, Zhejiang, China) que contém uma fonte de luz LED de 2W e câmera fotográfica (Figura 9) a partir do *software* ISCapture (versão 3.6.7, China). As imagens digitais foram obtidas antes dos tratamentos de cada grupo (basal), imediatamente após o período de incubação (G2 e G4) e irradiação luminosa (G1 e G3) configurando o T0 e a cada 30 minutos até completar 300 minutos de avaliação, constituindo os tempos experimentais: basal, T0, T30, T60, T90, T120, T150, T180, T210, T240, T270 e T300 minutos⁸⁴. Entre os tempos experimentais, os ovos foram mantidos na incubadora.

Os experimentos do G2 foram conduzidos no período noturno com mínima luz ambiente. Além disso, as amostras foram mantidas no escuro entre as avaliações e submetidas a irradiação luminosa do estereoscópio somente durante a aquisição da imagem. Após o término

da obtenção das imagens, o fragmento da CAM delimitado pelo anel de teflon foi retirado para análise histológica. Este fragmento foi acondicionado em coletor universal com 40 mL de formol a 10%. Os ovos então foram congelados para posterior incineração.

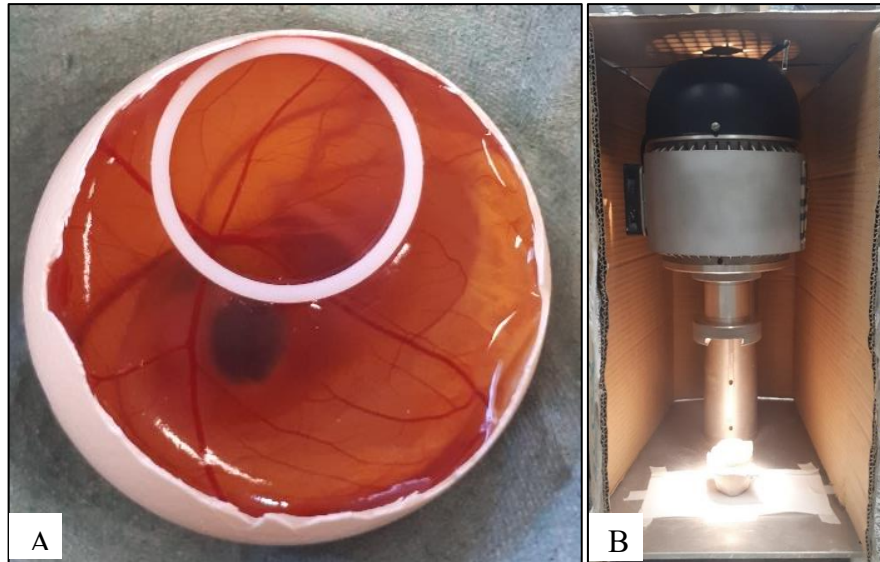


FIGURA 8 – A - Procedimento da terceira etapa de preparo da membrana corioalantoide. Embrião no 11º dia de desenvolvimento do embrião. Posicionamento do anel de teflon para delimitação da área de análise. B –Irradiação luminosa da membrana corioalantoide através de fonte de luz branca.



FIGURA 9 – Obtenção das imagens da membrana corioalantoide com estereomicroscópio acoplado a câmera fotográfica através do software ISCapture.

5.6. Processamento e análise das imagens digitais

Antes da análise quantitativa da resposta vascular, foi realizada uma análise qualitativa geral para identificação das alterações mais comuns, refletindo o comportamento vascular. As amostras cujas imagens apresentavam baixa qualidade ou interferência do embrião foram excluídas dos resultados.

O processamento das imagens selecionadas foi feito pelo *software* de edição Photoshop® (Adobe Systems, versão 21.1.3, Califórnia, EUA). Para padronização do tamanho da área de análise, estabeleceu-se um recorte circular com largura e altura de 1448 pixels, pela ferramenta “Lretreiro elíptico” (Figura 10A). Através dos comandos de teclado Ctrl+C e Ctrl+V, a imagem circular é recortada e isolada após ocultar visibilidade da camada “Plano de fundo” (Figura 10B). O excesso da área externa da imagem foi removido com a ferramenta “Corte demarcado” (Figura 10C). Em seguida, destacou-se os vasos sanguíneos em pixels pretos com o filtro “Fotocópia” e ajuste nos níveis de “detalhe” e “escuro” (Figura 10D). Depois o filtro “Estampa” foi aplicado, juntamente com ajustes nos níveis de “equilíbrio claro/escuro” e “suavidade” (Figura 10E), para atenuar ruídos de fundo de imagem¹⁰¹. Estas etapas de edição foram aplicadas em todas as imagens das amostras selecionadas.

Para obtenção da resposta vascular, considerou-se a contagem (em porcentagem) dos vasos sanguíneos na imagem, dada pela relação entre a quantidade de pixels pretos pela quantidade total de pixels (Equação 2).

$$\%vasos = \frac{n^{\circ} \text{ de pixels pretos}}{n^{\circ} \text{ de pixels total}} 100 \quad (2)$$

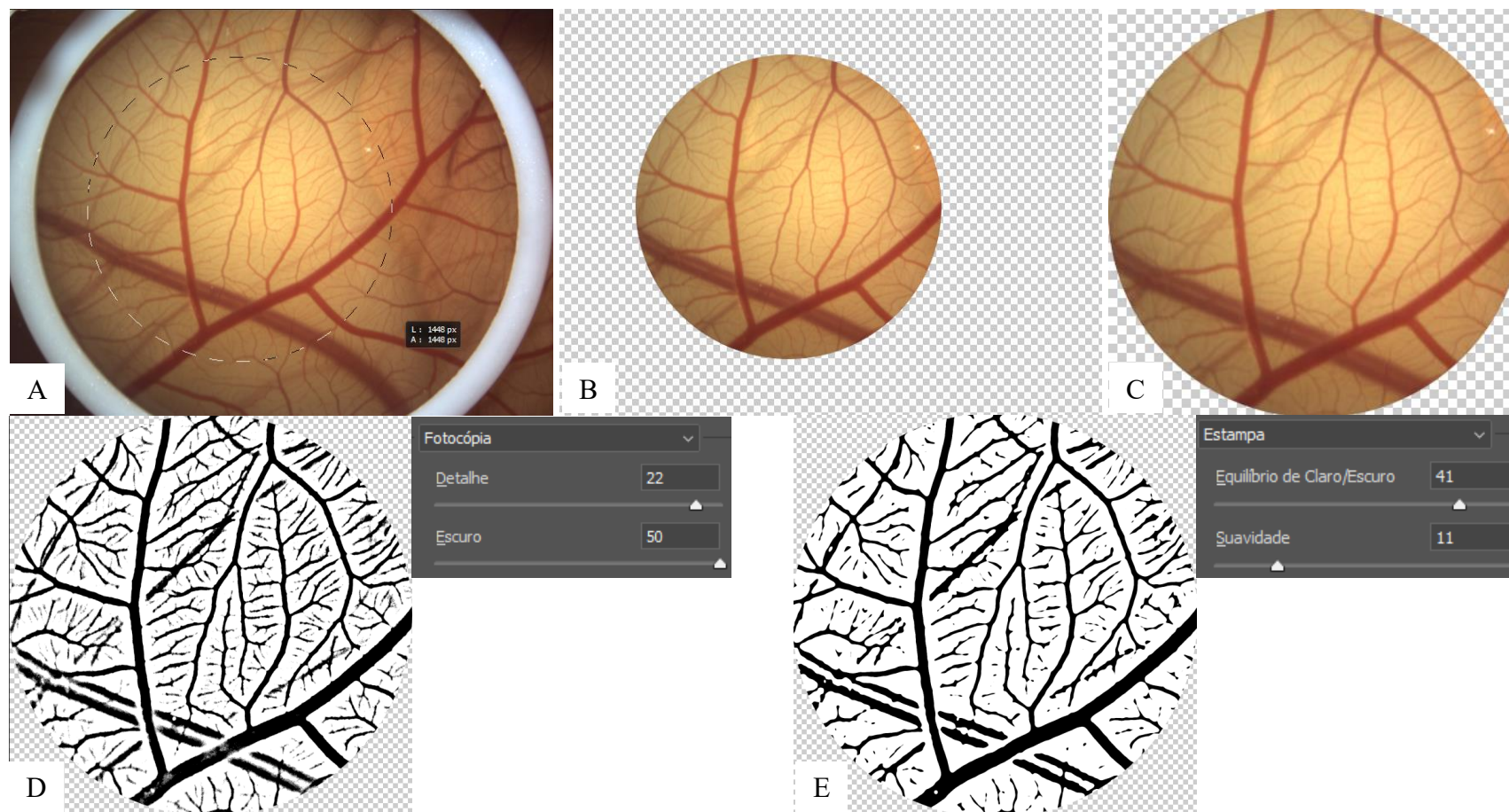


FIGURA 10 – Etapas do processamento das imagens através do software Photoshop®.

Para isso, as imagens foram convertidas em preto e branco pela ferramenta “Make binary” (Figura 11A) e em seguida submetidas à mensuração do parâmetro “%Area” na ferramenta “Measure” (Figura 11B) do *software* Image J® (National Institutes of Health, versão 1.53a, Maryland, EUA). O valor deste parâmetro (%Area), que corresponde à razão da equação, foi submetido ao cálculo da fórmula e o resultado (% vasos) foi normalizado em relação ao valor obtido (pelo mesmo processo) na análise da imagem basal de cada amostra em cada grupo. Desta forma, foi possível quantificar a resposta vascular ao tratamento durante o tempo experimental¹⁰¹. Esses valores foram tabulados e analisados dentro do grupo e entre os grupos ao longo do tempo. Além disso, o valor obtido da diferença entre a resposta vascular no T300 em relação ao basal, de cada amostra, também foi analisado, estabelecendo comparação entre os grupos. Este dado reflete a resposta vascular geral de cada grupo. O cálculo foi baseado na fórmula (Equação 3), modificada; uma vez que os dados obtidos já se encontram em porcentagem. DV se refere à diferença vascular, RVi à resposta vascular inicial (basal) e RVf à resposta vascular final (300 minutos).

$$DV = (RVi - RVf) \quad (3)$$

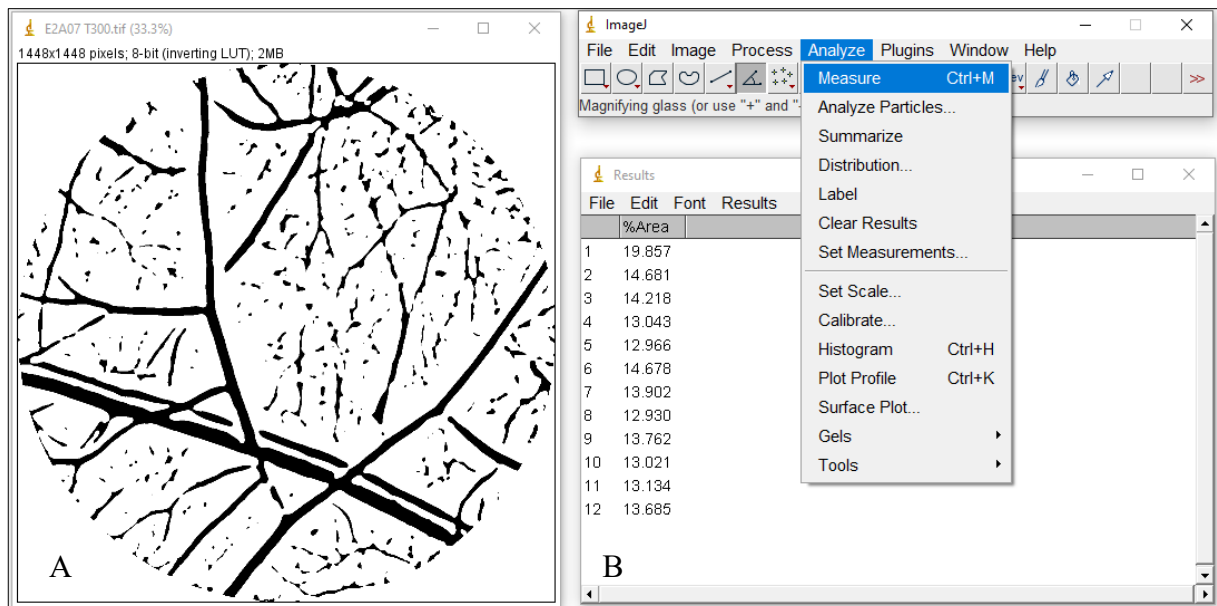


FIGURA 11 – Etapas do processamento das imagens no *software* ImageJ.

Para auxílio na compreensão das alterações vasculares observadas na análise histológica, foi realizada avaliação macroscópica em escore nas imagens obtidas no tempo 300 minutos, em comparação com as imagens nos tempos anteriores. Dessa forma estabeleceu-se um escore de 0 a 3 para ausente, discreto, moderado e acentuado para os parâmetros estase sanguínea, reperfusão vascular, hemorragia e trombo. Considerou-se como discreto quando a alteração observada ocupava 25% da imagem, moderado quando ocupava entre 25% a 50% da imagem e acentuado quando ocupava mais de 50% da imagem avaliada. Para o parâmetro vasoconstrição, o mesmo padrão de escore foi adotado. No entanto, considerou-se discreto quando a constrição vascular foi observada somente em vasos menores, moderado quando vasos menores e medianos foram acometidos, além de perda visual do trajeto desses vasos e acentuado quando a vasoconstrição foi observada em vasos de maior calibre (artérias e veias alantóicas).

5.7. Preparo das amostras e análise histológica

Um fragmento de cada membrana corioalantoide fixado em formaldeído tamponado à 10% foi submetido ao processamento histológico de rotina do laboratório para emblocagem em parafina. Após os fragmentos terem sido submetidos à desidratação, diafanização e infiltração em parafina, os blocos de parafina foram submetidos a cortes em micrótomo automatizado (RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Hessen, Alemanha) em uma espessura de 4 µm. Os cortes histológicos foram preparados para coloração de hematoxilina e eosina, de acordo com a técnica de rotina do laboratório. A análise das lâminas foi realizada por um único observador, pesquisador experiente, através de microscópio óptico com câmera fotográfica (ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Hessen, Alemanha) em objetiva de 40x.

A análise qualitativa incluiu a identificação de oito parâmetros: hiperemia de capilares ectodérmicos, vasodilatação em mesoderma sem hemácias, vasodilatação em mesoderma com hemácias, hemorragia, células inflamatórias no mesoderma, fibrose perivascular em mesoderma, atrofia do mesoderma e necrose de membrana. A vasodilatação mesodérmica sem hemácias é sugestiva de presença de vasos linfáticos ou focos de obstrução do fluxo sanguíneo, enquanto a vasodilatação mesodérmica com hemácias sugere presença de trombos ou hiperemia acentuada. Esses parâmetros foram avaliados em ausente, discreto, moderado e acentuado, atribuindo-se escores de 0 a 3, respectivamente. Considerou-se como discreto quando a alteração observada ocupava 25% da lâmina, moderado quando ocupava entre 25% a 50% da lâmina e acentuado quando ocupava mais de 50% da lâmina avaliada.

5.8. Análise estatística

Os resultados do modelo experimental da CAM foram expressos como média e desvio-padrão e para analisar a diferença entre os tratamentos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey. Na análise do tratamento ao longo do tempo foi utilizada ANOVA para dados pareados seguida de teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A avaliação macroscópica e microscópica qualitativa foi determinada por escore e os resultados foram expressos como mediana e desvio-padrão. A análise da diferença entre os tratamentos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O experimento foi conduzido em quadruplicata e as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism (versão 6, Estados Unidos).

6. RESULTADOS

6.1. Viabilidade dos ovos

Em todo o experimento foram utilizados 216 ovos, e a viabilidade destes para a terceira etapa do experimento foi de 18,5%. Destas amostras, 45% não foram incluídas na análise estatística devido interferência nas imagens obtidas. Assim, ao final do experimento, os dados avaliados foram obtidos pela análise de 10,2% dos ovos incubados (Figura 12).

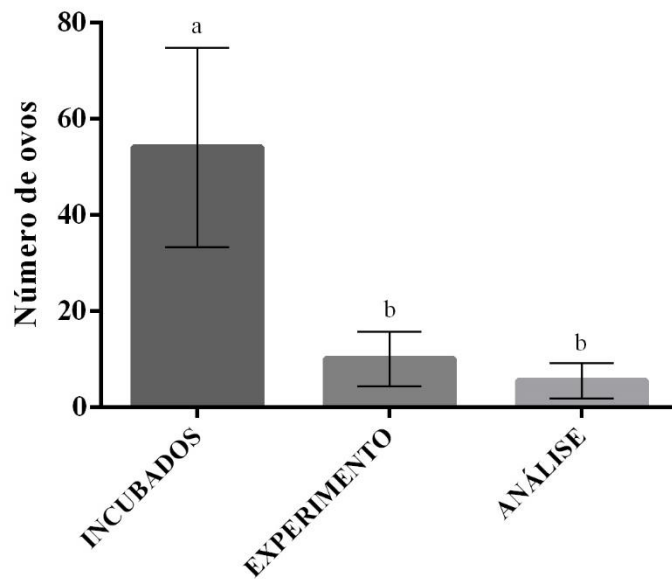


FIGURA 12 – Comparação entre a viabilidade dos ovos na primeira etapa do experimento (incubados), na terceira etapa do experimento (experimento) e após análise qualitativa das imagens que excluiu as amostras com interferência do embrião (análise). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de análise de variância.

6.2. Efeito vascular quantitativo

O comportamento vascular dentro do grupo G1, que recebeu o tratamento com a PDT, revelou diferença estatística entre os tempos basal e 60 minutos (Figura 13).

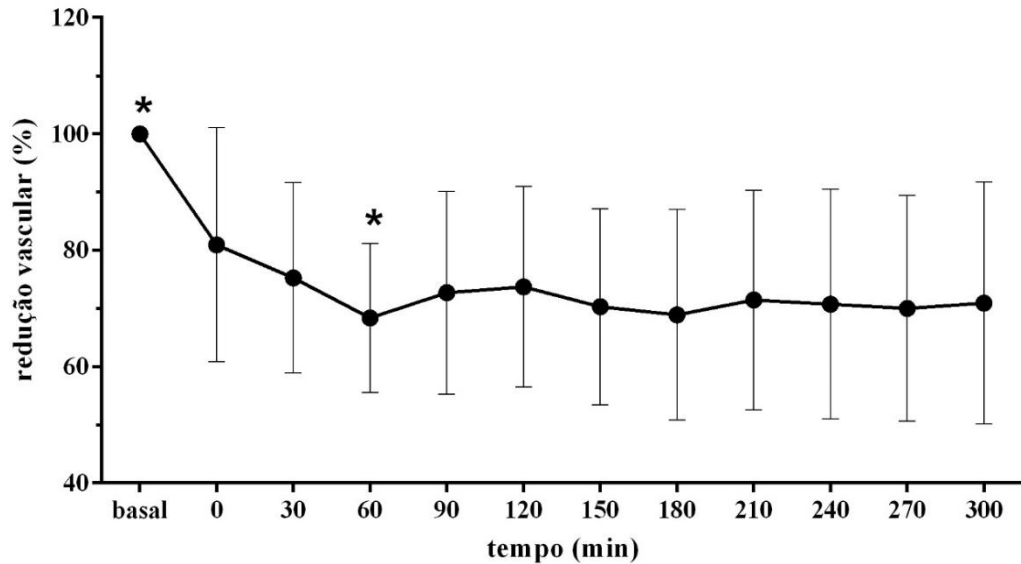


FIGURA 13 – Redução vascular na membrana corioalantoide ao longo do tempo experimental após tratamento com a solução do fotossensibilizador TMPP e submetidas a irradiação luminosa (PDT). O símbolo (*) identifica amostras com diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA para dados pareados seguido do teste de Tukey.

Na comparação entre os grupos, o G1 apresentou diferença estatística com os grupos G3 (somente luz) e G4 (somente solvente) nos tempos 60, 150 e 180 minutos. Também houve diferença estatística entre o grupo G1 e G4 nos tempos 210 e 270 minutos. A Tabela 1 mostra os valores da média e desvio padrão para os grupos ao longo do tempo experimental, e o gráfico (Figura 14) esquematiza esses valores.

TABELA 1 – Médias e desvio-padrão da área vascular (%) ao longo do tempo experimental para os grupos que receberam tratamento com a PDT (G1), PS (G2), luz (G3) e solvente (G4).

Grupos	basal	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
G1	100±0	81±20	75±16	68±13a	73±17	74±17	70±17a	69±18a	71±19a	71±20	70±19a	71±21
G2	100±0	86±6	82±13	76±10	81±11	81±13	80±11	80±14	79±15	84±21	83±20	82±18
G3	100±0	102±13	82±13	91±8b	87±4	95±10	94±9b	92±7b	88±6	88±14	86±5	86±10
G4	100±0	95±7	95±23	90±9b	92±8	83±18	92±7b	96±9b	96±11b	97±6	95±8b	86±20

Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguida de teste de Tukey.

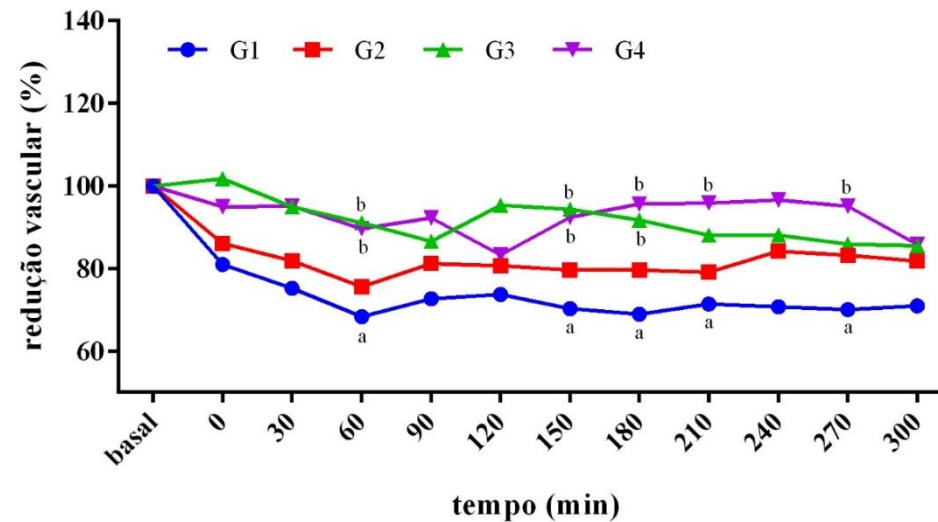


FIGURA 14 – Redução vascular na membrana corioalantoide ao longo do tempo experimental após tratamento a PDT (G1), PS (G2), luz (G3) e solvente (G4). Letras diferentes identificam diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos (G1, G3 e G4) no tempo experimental pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

No grupo G1 a redução vascular total calculada pela equação 3 foi em média, de aproximadamente 35% quando comparado os resultados no tempo basal e 300 minutos. No G2 e G3 essa redução foi próxima a 23% e 14% respectivamente, enquanto no G4 foi equivalente a 5% (Figura 15). Houve diferença estatística entre o G1 e os grupos G3 e G4 (Figura 16). O G2, grupo que recebeu o tratamento somente com a solução do PS, não apresentou diferença estatística tanto dentro do grupo quanto entre os grupos avaliados. Os grupos G3 e G4 também não apresentaram diferença estatística dentro do grupo.

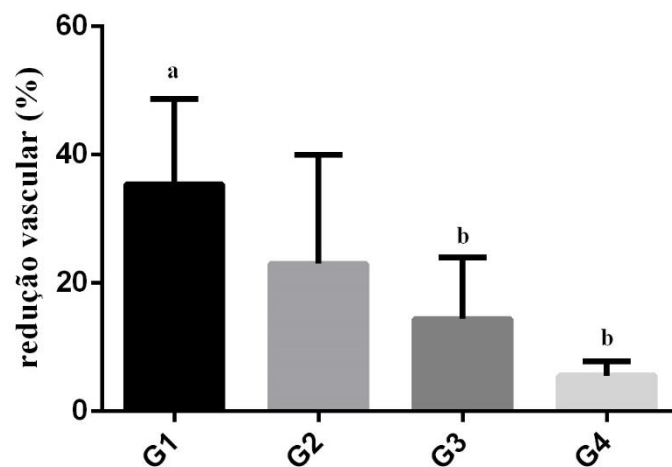


Figura 16 – Redução vascular total calculada pela diferença entre os valores obtidos no tempo 300 minutos e basal. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

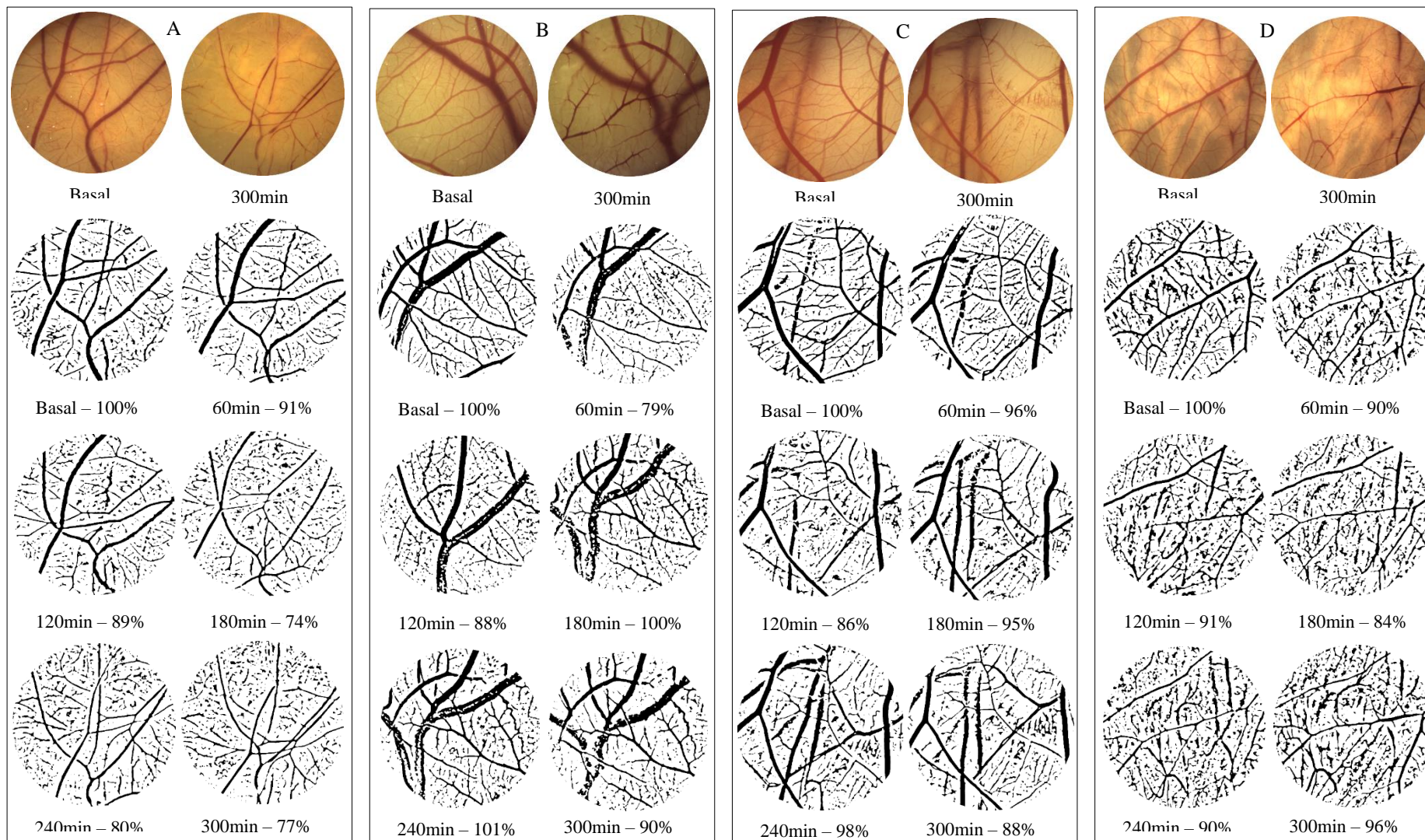


FIGURA 15 – Imagens processadas ilustrativas da redução da área vascular (%) em amostras submetidas ao tratamento com a PDT (A), PS (B), luz (C) e solvente (D).

6.3. Efeitos vasculares macroscópicos

Na avaliação macroscópica das imagens no tempo 300 minutos em comparação com as imagens antes do tratamento, não houve diferença estatística entre os grupos para os parâmetros avaliados no escore (Tabela 2).

TABELA 2 – Análise macroscópica das membranas corioalantoide no tempo 300 minutos. Medianas e desvio-padrão dos parâmetros classificados em um escore de 0 a 3.

Grupos	Vasoconstrição	Estase	Reperusão	Hemorragia	Trombo
G1	2±0,8	2±0,9	0±1,4	0±0,5	0±0,5
G2	2±1	1±0,5	1±0,5	0±0,9	0±0,9
G3	2±0,4	2±0,9	0±1,1	1±1,3	1±1,3
G4	2±0,4	1±1,1	0±0,5	2±1	2±1

Sem diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Todos os grupos apresentaram algum grau de vasoconstrição. Aproximadamente 86% das amostras no G1 mostraram constrição moderada a acentuada, enquanto no G2 foram 60%, no G3 100% e no G4 80%. No entanto a vasoconstrição acentuada foi observada somente no G1 e G2, em aproximadamente 40% das amostras. A estase e a reperusão sanguínea acentuadas foram visualizadas somente no G1. Além disso, a formação de trombo moderada a acentuada ocorreu apenas no G1 e G2 em 42,5% e 80% das amostras, respectivamente (Figura 17A). No entanto, enquanto 57% do grupo G1 e 80% do grupo G2 não apresentaram sinais macroscópicos de hemorragia, 40% do G3 e G4 obtiveram escore máximo para este parâmetro (Figura 17B).

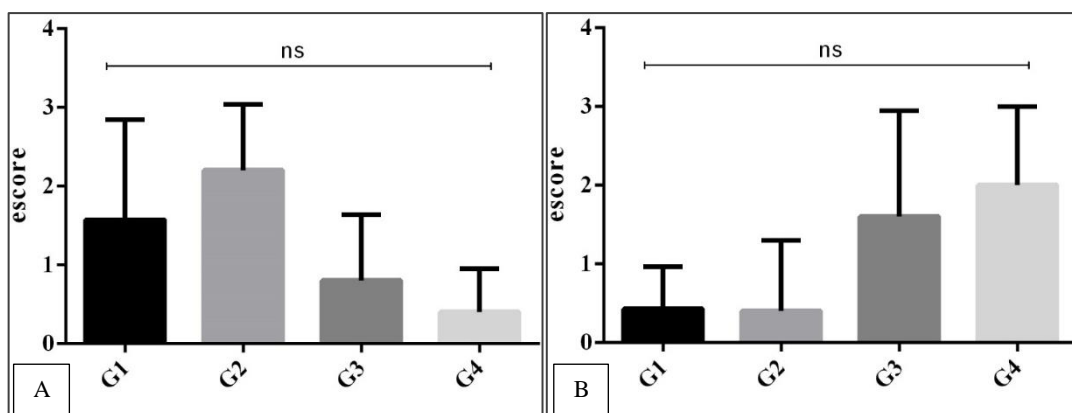


FIGURA 17 – Avaliação macroscópica por escore quanto a presença de trombos (A) e hemorragia (B) nas imagens obtidas com 300 minutos.

Não houve diferença estatística ($p<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

A análise geral das imagens ao longo do tempo para identificação das principais alterações vasculares do G1 (Figura 18) revelou que as membranas se comportaram de forma semelhante entre elas. A partir do T0 e T30 nota-se vasoconstrição seguida de reperfusão e estase vascular nos tempos seguintes, e se mantendo assim durante todo o período experimental. A constrição foi evidente em vasos de maior e menor calibre, e provocando – nestes últimos – perda da capacidade de acompanhar o trajeto vascular. Em alguns casos notou-se também modificação na morfologia vascular, com irregularidades na parede do vaso e assumindo um trajeto mais tortuoso em relação ao basal.

No grupo G2 (Figura 19) notou-se que a constrição de vasos menores, em comparação ao grupo PDT, foi mais discreta ao longo do tempo. No entanto, a estase sanguínea foi a característica mais comum e evidente nas amostras deste grupo em praticamente todo o período experimental. Em alguns casos, a estase foi sucedida por vasodilatação, a partir de 90 minutos. Na maioria dos casos as alterações vasculares evoluíram até aproximadamente 150 minutos e se mantendo estáveis até o término dos 300 minutos. Das cinco amostras, quatro indicaram presença de trombo em pelo menos um tempo experimental; e três apresentaram os primeiros sinais de alteração vascular no T0, logo após o período de incubação do PS (Figura 20).

O comportamento vascular no G3 (Figura 21) e G4 (Figura 22) foi semelhante e as alterações mais comuns foram constrição de vasos menores e estase sanguínea mas também se observou a presença discreta de trombo e focos de hemorragia. No grupo G3 foi observado macroscopicamente, que os primeiros sinais visíveis de alteração vascular são notados entre o T0 e o T60, se mantendo com poucas alterações até o final do tempo experimental. No entanto, o início das alterações no G4 foi variável, ocorrendo em até 120 minutos.

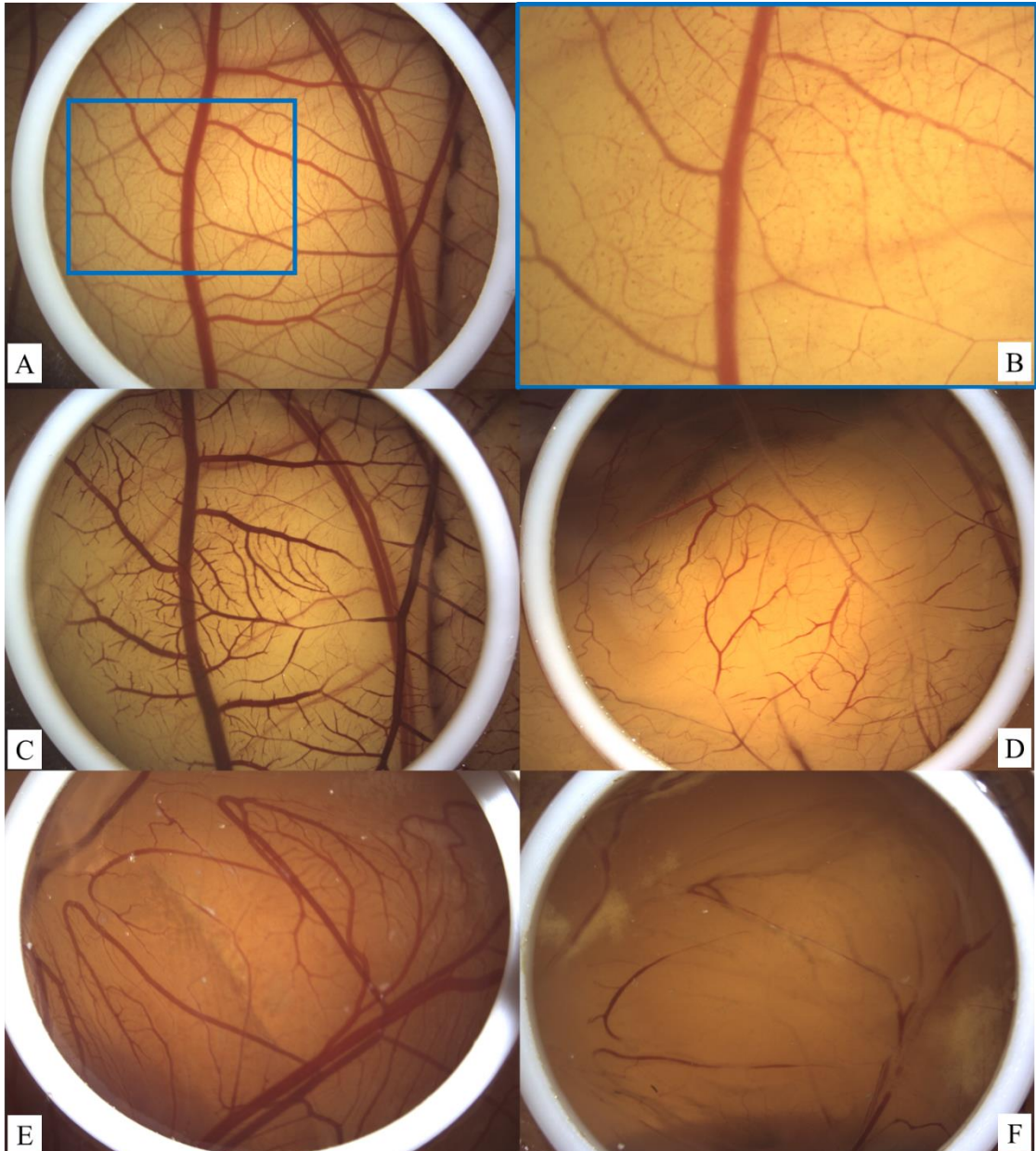


FIGURA 18 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G1 (PDT). Comparação de uma mesma amostra em A (basal), B (T60) e C (T90). B representa um aumento do quadro azul em A para identificação de focos de microhemorragia. Em C observa-se intensa reperusão vascular e estase sanguínea após vasoconstrição nos tempos anteriores. D representa outra amostra evidenciando alteração na morfologia vascular, se apresentando mais tortuosos. Comparação de uma mesma amostra em E (basal) e F (T300) onde é possível visualizar a vasoconstrição mais severa, comum no grupo PDT. Em F identifica-se perda da capacidade de acompanhar o trajeto vascular devido constrição de vasos maiores e menores.

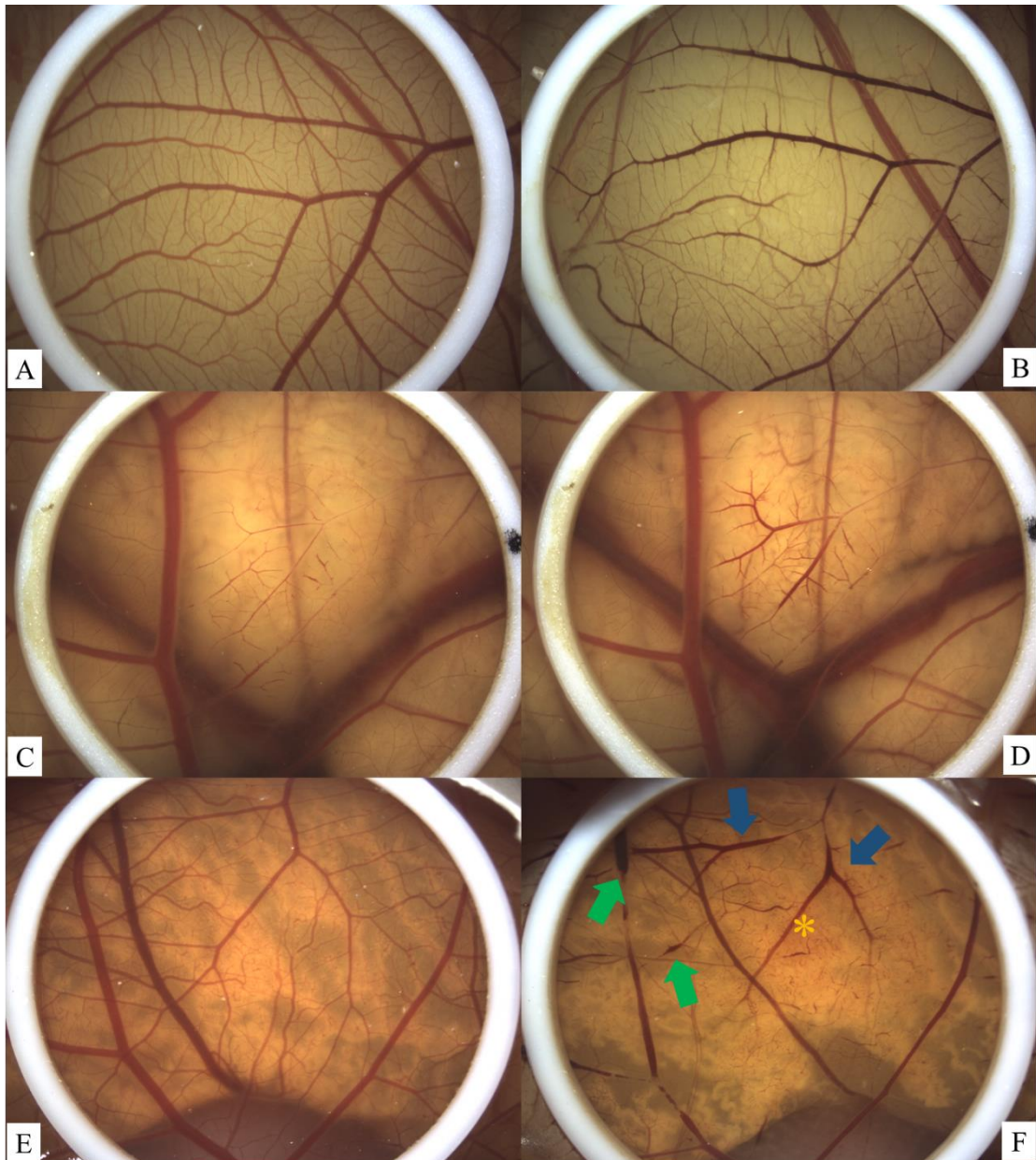


FIGURA 19 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G2 (PS). Comparação de uma mesma amostra em A (basal) e B (T300) onde observa-se o padrão de alterações mais comumente observado: estase e vasoconstrição de vasos menores. Comparação de uma mesma amostra evidenciando vasoconstrição em C (T90) seguida de vasodilatação e estase sanguínea em D (T150). Comparação de uma mesma amostra em E (basal) e F (T240) evidenciando presença de trombos (setas verdes), estase sanguínea (setas azuis) e área de hiperemia (asterisco amarelo).



FIGURA 20 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G2 (PS) no basal (esquerda) e no T0 (direita). Em B nota-se severa vasoconstrição de vasos calibrosos (asterisco amarelo) que permaneceu praticamente inalterada até T300. Em D nota-se presença de grande quantidade de focos hemorrágicos acompanhado de estase sanguínea.

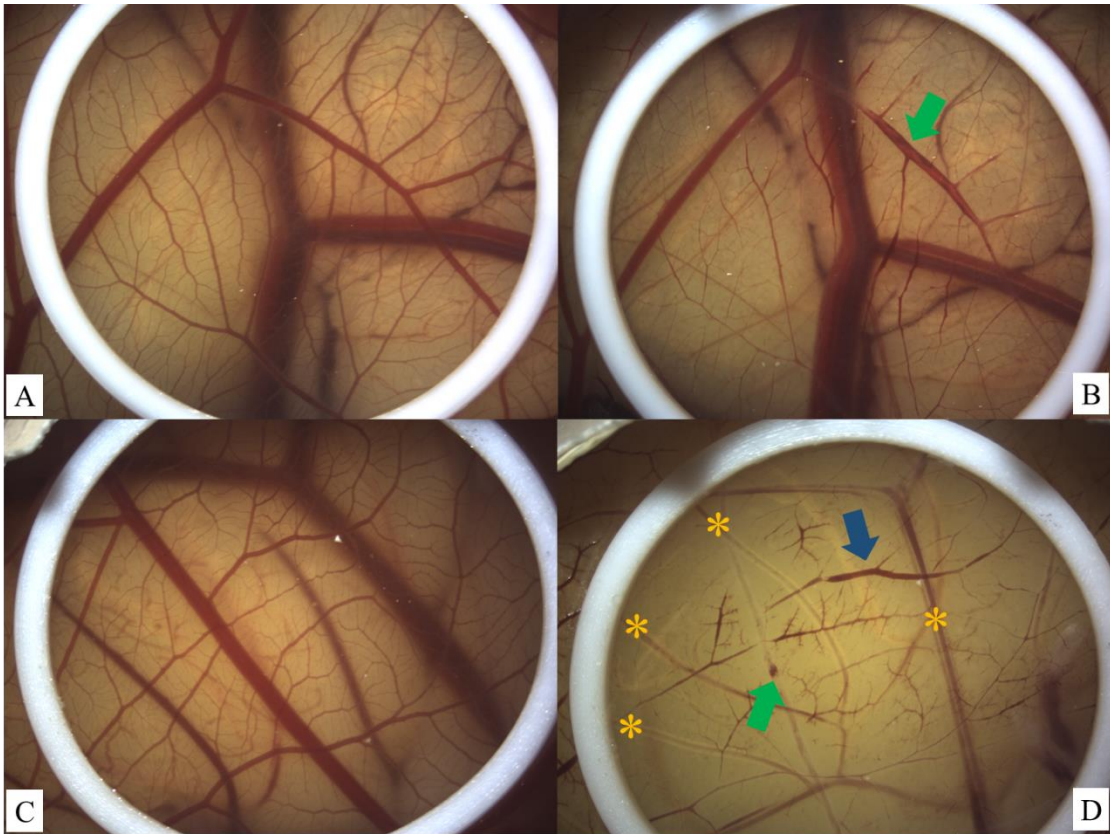


FIGURA 21 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras do grupo G3 (luz) no basal (esquerda), no T60 (B) e no T300 (D). Setas verdes indicam presença de coágulo, seta azul indica estase sanguínea e asteriscos amarelos mostram constrição de vasos maiores.

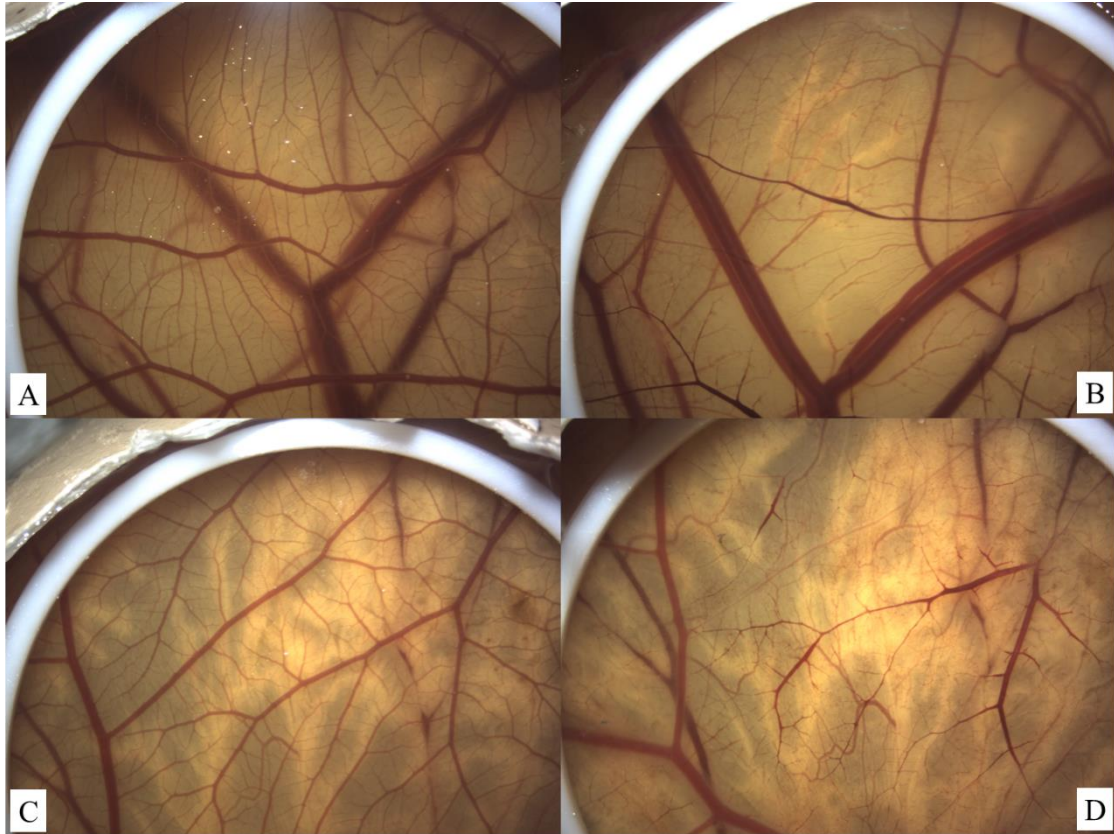


FIGURA 22 - Imagens da CAM obtidas através de estereomicroscópio comparando amostras no basal (esquerda) e no T300 (direita) do grupo G4 (solvente). Notar que a vasoconstrição de vasos menores e discreta estase sanguínea, foram as alterações mais comuns.

6.4. Efeitos vasculares microscópicos

A análise estatística revelou que não houve diferença na avaliação microscópica por escore entre os grupos (Tabela 3). Embora sem diferença estatística, o aspecto necrótico da membrana moderado a acentuado foi visualizado somente em G1 e G2 em 57% e 40% das amostras, respectivamente (Figura 23).

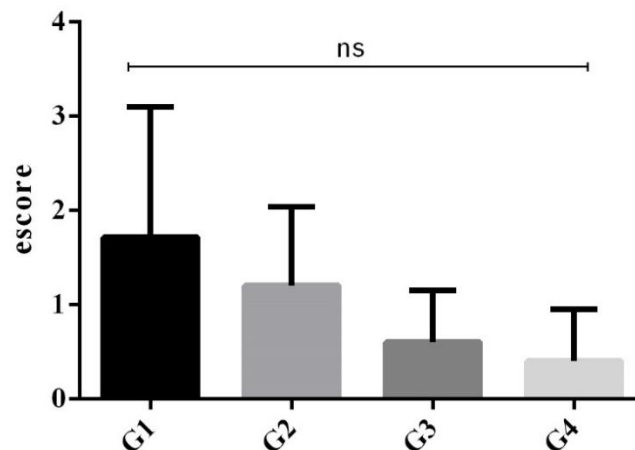


FIGURA 23 - Avaliação macroscópica por escore quanto a presença de necrose da CAM nas imagens obtidas com 300 minutos. Sem diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

As figuras 24 a 26 ilustram as principais alterações microscópicas observadas nos grupos experimentais. A atrofia do mesoderma foi visualizada em mais de 50% das amostras dos grupos G1, G2 e G3, acompanhado por vezes de lise e separação do ectoderma e/ou endoderma. Esta última característica foi observada em 71% e 80% das amostras do G1 e G2, respectivamente. Fibrose perivascular foi moderada a acentuada e visualizada em 60% das amostras do G2 enquanto em G1 e G3 a frequência foi de aproximadamente 20% e em G4 foi discreta a ausente. A presença de células inflamatórias dispersas no mesoderma foi aparentemente uniforme, uma vez que todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório discreto a ausente em no mínimo 60% (no G2) e até 100% (no G3).

As alterações vasculares microscópicas foram avaliadas pelos parâmetros hemorragia, hiperemia de capilares ectodérmicos, vasodilatação em mesoderma com e sem hemácias. A hiperemia moderada a acentuada foi evidenciada em mais de 50% das amostras nos quatro grupos, chegando a 80% no G2 e G4. A vasodilatação sem hemácias discreta a ausente foi mais comum em pelo menos 60% das amostras do G2 e G4 e no mínimo 80% no G1 e G3. Foi observada vasodilatação com hemácias, sugestivo de coágulos focais ou difusos em quantidade moderada a acentuada em aproximadamente 60 a 70% do G1, G2 e G3. No G4 esta frequência foi de 40%. Além disso a hemorragia microscópica foi considerada discreta a ausente em 60%, 80%, 86% e 100% dos grupos G3, G4, G1 e G2 respectivamente.

TABELA 3 - Análise histológica de membranas corioalantoide. *Mean ranks* dos parâmetros histológicos analisados ao término do tratamento (300 minutos) com PDT (G1), PS (G2), luz (G3) e solvente (G4).

Grupos	Hiperemia	Vasodilatação sem hemácia	Vasodilatação com hemácia	Hemorragia	Células inflamatórias	Fibrose perivascular	Atrofia mesodérmica	Necrose
G1	10,50	8,43	12,64	11,07	10,64	10,50	10,29	14,64
G2	14,60	11,60	12,30	8,30	12,70	15,80	14,60	13,10
G3	9,70	11,80	12,30	13,90	9,90	11,40	14,20	9,30
G4	11,60	15,40	8,30	12,90	13,10	8,70	7,40	7,70

Sem diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

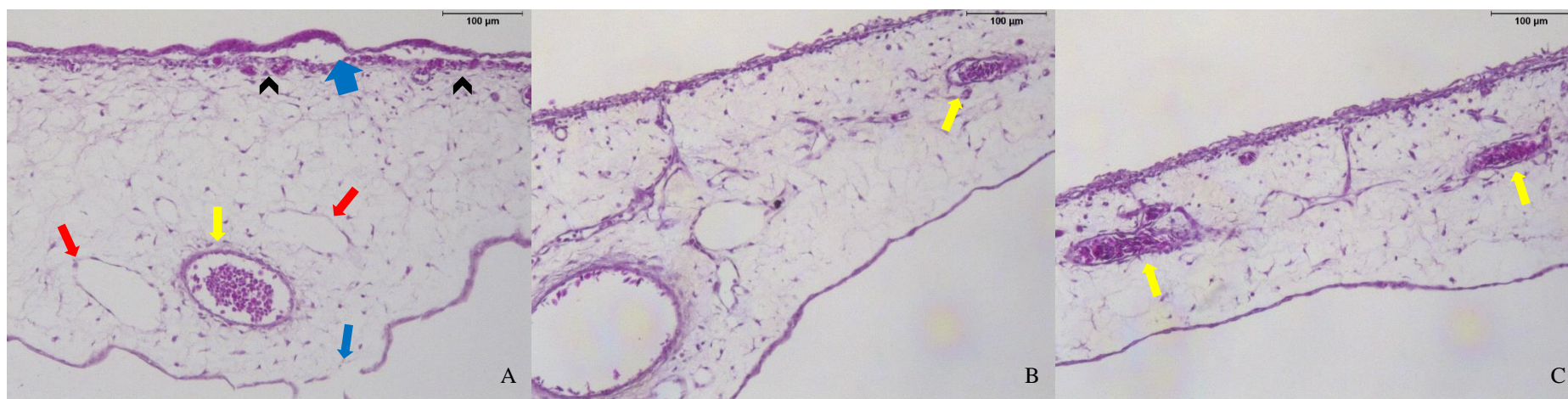


FIGURA 24 – Micrografia de membranas corioalantoide coradas com hematoxilina e eosina (HE) em objetiva de 10x do G4, tratadas com solvente. Observa-se preservação da espessura do mesoderma em todas as imagens. Em A nota-se vasodilatação mesodérmica com hemácias (seta amarela) e sem hemácias (seta vermelha). Cabeças de seta indicam hiperemia de capilares ectodérmicos. Seta azul larga indica separação do ectoderma e seta azul fina indica lise do endoderma. Em B e C observa-se integridade das camadas endodérmicas e ectodérmicas além de vasodilatação mesodérmica com hemácias, sugestiva de formação de trombo (setas amarelas).

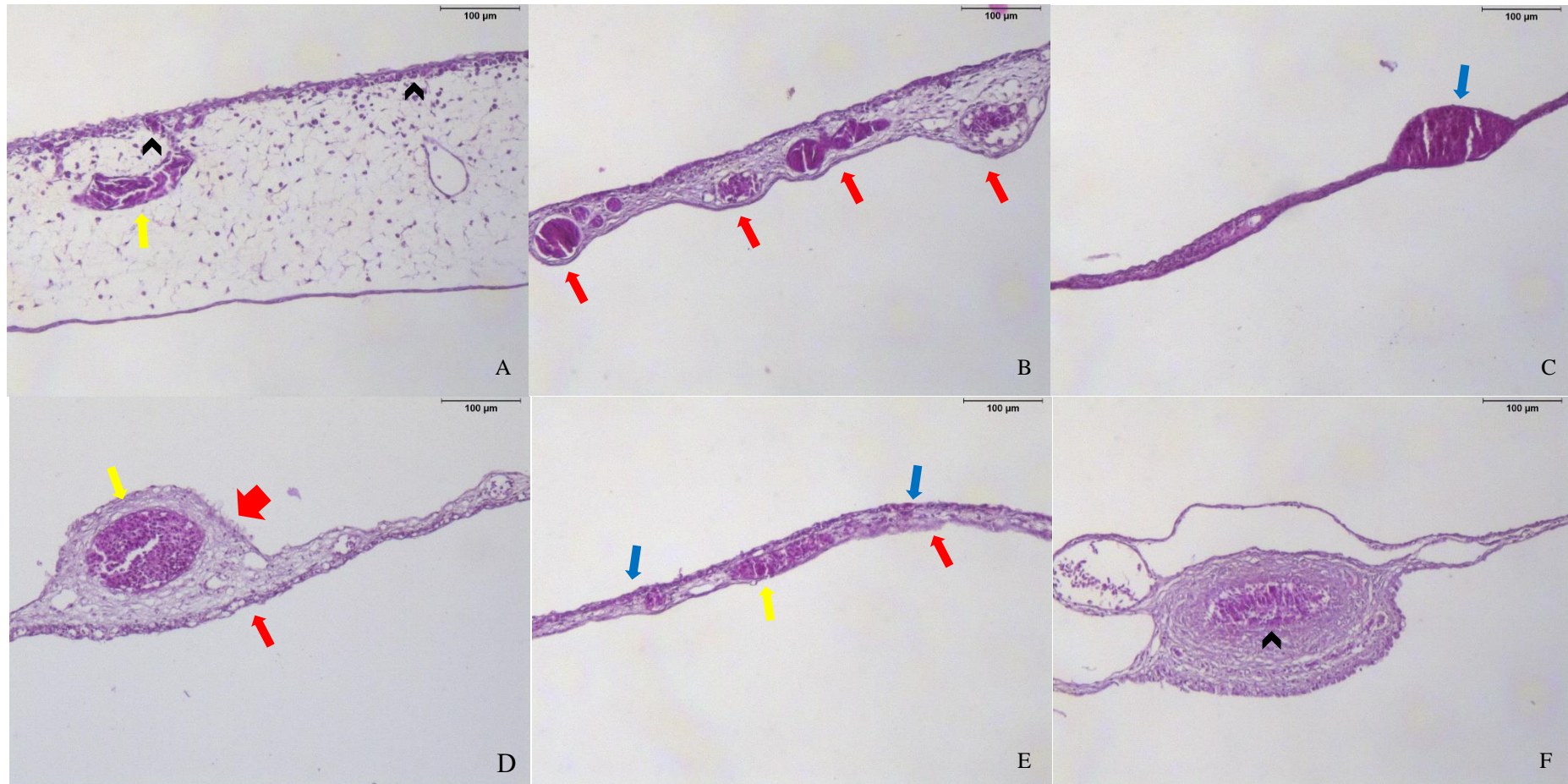


FIGURA 25 – Micrografia de membranas corioalantoide coradas com hematoxilina e eosina (HE) em objetiva de 10x do G3 (A, B e C) e G2 (D, E e F), tratadas com luz e PS, respectivamente. Em A observa-se espessura e camadas da membrana preservadas, com discreta hiperemia de capilares ectodérmicos (cabeça de seta) e vasodilatação mesodérmica com hemácias (seta amarela). Em B nota-se moderada atrofia do mesoderma com vasodilatação mesodérmica com hemácias (setas vermelhas) em toda a extensão da imagem, acompanhada de fibrose perivascular nas áreas mais basofílicas. Em C, observa-se atrofia mesodérmica e fibrose acentuadas em toda a extensão acompanhada de uma área sugestiva de coágulo (seta azul). Em D, E e F observa-se atrofia acentuada do mesoderma. Em D as setas vermelhas indicam áreas de necrose das camadas endodérmica (fina) e ectodérmica (larga). A seta amarela indica trombo em vaso dilatado acompanhado de fibrose perivascular moderada. (continua)

(continuação) Em E as setas azuis indicam hiperemia dos capilares ectodérmicos, enquanto a seta amarela indica vasodilatação com hemácia e a seta vermelha indica uma área de necrose no endoderma. Em F a cabeça de seta indica vasodilatação com hemácia, sugestiva de trombo acompanhada de intensa fibrose perivascular. Nota-se ainda perda da estrutura da membrana, com extensa área de necrose principalmente no mesoderma, além de separação do endoderma.



FIGURA 26 – Micrografia de membranas corioalantoide coradas com hematoxilina e eosina (HE) em objetiva de 10x do G1 tratadas com PDT. Nota-se acentuada atrofia mesodérmica em B e C. Em A observa-se áreas de necrose em toda a extensão da imagem, com vasodilatação com hemácias acompanhada de fibrose perivascular nas áreas basofílicas (setas azuis). Em B as setas vermelhas indicam vasodilatação com hemácias. Em C as cabeças de seta indicam hiperemia de capilares ectodérmicos e a seta vermelha indica vasodilatação com hemácias.

7. DISCUSSÃO

A estatística da viabilidade de ovos é pouco discutida na literatura. As perdas obtidas durante o experimento sugerem ser a razão pela qual o número amostral é pequeno nos ensaios que utilizaram a CAM como modelo experimental. Estudos semelhantes^{30,101} obtiveram viabilidade de 60% dos ovos incubados. No entanto, há a possibilidade de descarte de amostras viáveis devido interferência do embrião nas imagens obtidas¹⁰¹, diminuindo o número amostral para três³⁰ a cinco^{30,84,101} em média, em cada grupo. A viabilidade obtida nesta pesquisa foi seis vezes menor, e embora parte das amostras viáveis também foi excluída da análise, estabeleceu-se grupos experimentais com cinco ou sete amostras.

Essa interferência embrionária poderia ser minimizada utilizando um anel com diâmetro menor que 15 mm. No entanto, os estudos que foram utilizados como referência^{30,84,101} para este, fizeram uso do anel com tamanho semelhante. Além disso, a utilização de um anel com menor diâmetro poderia conseqüentemente diminuir a área de análise, embora alguns estudos relataram resultados positivos utilizando anéis com diâmetro de cinco milímetros^{29,66} ou seis milímetros¹¹⁶.

Outra possibilidade para diminuir essa interferência é adotar o modelo experimental CAM *ex-ovo*, técnica que consiste em cultivar os embriões em placas de Petri e dessa forma possibilita uma maior área de avaliação da CAM sem interferência da casca e do embrião. Um estudo que utilizou esta técnica relatou perda de 50% das amostras devido ruptura da membrana da gema após quebra da casca do ovo, e obteve taxa de sobrevivência de 80% entre o EDD 7 e o EDD 16¹¹⁷. Um outro estudo¹¹⁸ mostrou taxas maiores de sobrevivência dos embriões – aproximadamente 54% entre o 7º EDD e 12º EDD – em experimentos *in ovo* comparando com modelos *ex-ovo*.

Os modelos experimentais *in ovo* e *ex ovo* são utilizados (modificados ou não) há pelo menos 50 anos^{80,81,101,118}, e sua diversidade de técnicas tem o intuito de melhorar a avaliação das alterações, obtenção dos resultados e também diminuir as perdas. Estas são inevitáveis, uma vez que a abertura da casca e modificações nas condições de incubação expõem o embrião, que é sensível, a fatores ambientais e fisiológicos alterados^{80,81}. Há citações sobre limitações da técnica^{80,81}, e mesmo que esse modelo já seja bem estabelecido e reconhecido cientificamente, desconhece-se a taxa de viabilidade dos ovos, dificultando o planejamento e delineamento experimental.

Todos os grupos avaliados promoveram algum grau de redução vascular. Os tratamentos somente com o PS, com a irradiação luminosa e com o solvente não foram capazes

de provocar redução vascular significativa, conforme esperado. A PDT apresentou um comportamento heterogêneo ao longo do tempo. Este fenômeno se deve ao fato de que as amostras possuem um comportamento individual frente ao tratamento recebido, e que no caso deste estudo, contribuiu para obter maior amplitude de variação do desvio padrão em todos os grupos. Dessa forma, a não uniformidade da resposta da PDT se refere aos valores significativos obtidos em alguns tempos (60, 150, 180, 210 e 270 minutos), e não durante todo o período experimental. Mesmo assim, a PDT foi capaz de promover efeito vascular significativo superior aos grupos controle, sugerindo que a porfirina TMPP sob irradiação luminosa promove diminuição da área vascular tratada, com efeito máximo após uma hora da irradiação e sem incremento significativo na redução vascular após esse período.

Não foram encontrados relatos com o uso da PDT com TMPP para avaliação da resposta vascular em modelo CAM. No entanto, a PDT com outro PS porfirínico como derivado de hematoporfirina (Photogem[®]) mostrou eficiência na redução vascular de 60% pela via tópica, com fluência e intensidade luminosa semelhantes a este estudo, porém com dose da porfirina menor³⁰. Outro PS estudado devido seu potencial anti-angiogênico foi a curcumina que após fotoestimulação promoveu redução vascular de 20%⁸⁴ e 30%¹⁰¹ e da associação da curcumina com o azul de metileno de 50%¹⁰¹. Sendo assim, comparando com estes trabalhos que serviram de modelo para o delineamento da análise vascular, nota-se que esse método de avaliação baseado na medição da área vascular e na resposta vascular dada em porcentagem facilita a compreensão dos resultados e a comparação com outros protocolos relatados.

O grupo G2 apresentou efeito vascular semelhante ao G3 e G4; comportamento este similar a um estudo em que tumores expostos somente à TMPP ou somente à luz apresentaram crescimento semelhante aos tumores não tratados¹¹². No entanto, na análise morfológica, foram observadas alterações vasculares evidentes neste grupo ($p > 0,05$), como formação de trombo, vasoconstrição, hiperemia de capilares ectodérmicos, atrofia do mesoderma e fibrose perivascular; e observou-se que três das cinco amostras apresentaram sinais evidentes de alteração vascular no T0, logo após o período de incubação do PS. Pode-se sugerir que esses efeitos vasculares observados podem ter relação com mínimo grau de toxicidade no escuro da TMPP associado a fotoestimulação da luz ambiente residual e da fonte de luz LED durante o período experimental e dose alta da porfirina.

A dose utilizada neste estudo é 50 vezes maior do que a utilizada no relato de Zheng *et al.*¹¹⁴, que considerou 2 μM como alta dose de TMPP, capaz de promover morte de células tumorais após irradiação luminosa. Além disso, apesar da toxicidade no escuro da TMPP ser pouco significativa, esta é proporcional à concentração utilizada. Para essa avaliação,

geralmente considera-se uma dose não-tóxica quando há preservação da viabilidade celular em pelo menos 95%¹⁰⁶. Um estudo que avaliou o potencial citotóxico de cinco porfirinas no escuro mostrou que a TMPP apresentou o maior valor de viabilidade celular (aproximadamente entre 90 e 100%), com concentrações de até 50 μM ¹⁰³. Outro ensaio também com cultivo de células tumorais, manteve as amostras incubadas no escuro por três horas com concentrações de até 2 μM e após esse período não foram observados sinais significativos de citotoxicidade, com média de viabilidade celular em 96%¹¹⁰. No entanto, Strauss *et al.*¹⁰⁶ relatou que a viabilidade de células endoteliais em cultivo diminuiu discretamente (90%) com a incubação de até 100 μM de porfirinas hidrofílicas. Ainda, observou-se que nas células restantes viáveis, houve mudança na morfologia celular passando para uma forma fibroblastóide.

Além disso, é importante considerar que a mínima luz ambiente durante a condução do experimento é capaz de provocar algum grau de fotoativação da porfirina. Um estudo⁸⁹ conduzido em laboratório com três níveis de luminosidade ambiente revelou que a TMPP, na dose de 100 μM , promoveu diminuição da contagem de colônias bacterianas significativamente sob estimulação de duas intensidades luminosas: $55 \pm 6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ e $132 \pm 3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Para fim de compreensão definiu-se que estas intensidades correspondem à luminosidade de uma vela a 50 cm de distância e à luminosidade crepuscular, respectivamente. Dessa forma, é possível considerar que a mínima luz ambiente residual durante o experimento se enquadra nessa faixa de valores.

É esperado que a luz seja capaz de provocar algum grau de alteração celular e/ou vascular, já que a fototerapia tem sido estudada e utilizada desde o século XVIII^{25,32,33}. A dosimetria dos fatores que envolvem o uso da radiação eletromagnética como tratamento tem grande importância, sobretudo na PDT, uma vez que os protocolos utilizados são diversos, permitindo ampla variedade de resultados. No uso do modelo CAM para avaliação da interação da luz com a membrana, a fluência entre 10 e 50 J/cm^2 é capaz de promover angio-oclusão⁸⁴. Sendo assim, esse intervalo é adotado em muitos estudos obtendo semelhança nos resultados não significativos do uso isolado da luz. No entanto, alguns estudos utilizaram fluências maiores^{30,106,119} ou menores³⁰ não obtendo, também, resultados significativos. O mesmo ocorre com a definição da intensidade luminosa, em que não foram observados efeitos isolados da fototerapia com intensidades entre 50 a 330 mW/cm^2 ^{30,84,110,119}.

As alterações vasculares observadas no grupo G3 podem ser devido a maior intensidade (180 mW/cm^2) e fluência (36 J/cm^2) luminosa, mesmo que estes valores estejam dentro dos intervalos discutidos anteriormente. Em comparação, foi relatado visualização de focos de hemorragia após irradiação com intensidade de 70 mW/cm^2 e fluência de 1 e 10 J/cm^2 .

Esses sinais foram minimizados após redução da intensidade para 10 mW/cm²⁹¹. Mesmo sendo visualizadas alterações, estas não foram significativas, pois os efeitos observados neste presente estudo ocorreram no início da análise, imediatamente após a irradiação luminosa até 60 minutos, se mantendo relativamente constantes até 300 minutos.

Na análise estrutural da membrana, foram observadas e avaliadas a presença de atrofia do mesoderma e fibrose perivascular, que juntamente com a presença de células inflamatórias, sugerem que o tratamento possui capacidade de promover alterações teciduais na CAM devido processo inflamatório. Considerando o significado dos parâmetros analisados, todos os tratamentos foram capazes de promover algum grau de reação inflamatória. Em um estudo avaliando a resposta da CAM após implante de biomateriais, foi observado que todo o processo inflamatório – desde identificação do agente, liberação de mediadores locais até migração celular – é semelhante aos mamíferos. Observa-se recrutamento de células inflamatórias como heterófilos (análogo ao neutrófilo de mamíferos), monócitos, macrófagos e trombócitos⁹⁵. A infiltração celular (heterófilos e monócitos) ocorre após seis a 12 horas do início da resposta inflamatória⁹⁵, semelhante ao obtido neste estudo, uma vez que a membrana permaneceu sob ação do PS por aproximadamente 340 minutos. É importante ressaltar que o embrião é naturalmente imunodeficiente, e é incapaz de modular uma resposta imune até o 12º EDD. Apesar de nesta idade possuir células de defesa localizadas nos órgãos linfoides, o embrião promove apenas reações inflamatórias não-específicas, recrutando heterófilos e macrófagos⁸¹.

Nos quatro grupos, foram identificadas vasodilatação mesodérmica sem hemácias e hiperemia ectodérmica além da vasodilatação mesodérmica com hemácias. Esses achados corroboram com o fato que o processo inflamatório envolve a liberação de mediadores que promovem vasodilatação e consequente aumento do fluxo sanguíneo, provocando hiperemia. Juntamente com o aumento da permeabilidade vascular, a hiperemia provoca a agregação de células vermelhas favorecendo a formação de trombos^{106,120}. Esta, é uma alteração esperada e a depender do protocolo, desejada no tratamento de doenças vasculares como a degeneração macular relacionada à idade em humanos. Neste sentido, um trabalho buscou estabelecer um protocolo de PDT com potencial trombótico utilizando veteporfina como PS, irradiado com fluência menor e intensidade luminosa maior do que a utilizada neste estudo¹²¹.

Além disso, a formação de coágulos pode ser secundária a hemorragia. A presença desta alteração sugere lesão endotelial severa, uma vez que houve ruptura da integridade ou aumento da permeabilidade vascular¹²⁰. Nos quatro grupos a hemorragia foi identificada e classificada em sua maioria como discreta a ausente, sugerindo que a formação de trombos ou

coágulos se deve ao somatório de eventos inflamatórios e alterações vasculares que ocorreram na membrana ao longo do tempo. Macroscopicamente, o escore de hemorragia não teve diferença estatística com o escore microscópico, e portanto, essa análise visual da imagem digital corrobora com o visualizado na lâmina histológica. O mesmo ocorreu com a avaliação de trombos e vasodilatação mesodérmica com hemácias.

A hemostasia decorrente desses processos citados, promove vasoconstrição e estase sanguínea e conseqüentemente privação de nutrientes e oxigênio para o tecido, desencadeando processos de morte celular. Além disso, para que a PDT promova uma resposta vascular efetiva é necessário que a dose seja adequada, uma vez que a constrição e oclusão vascular transitórias, resultam em retorno do fluxo sanguíneo¹⁰⁶. Deve-se evitar esse efeito, não utilizando doses subletais, principalmente para terapêuticas oncológicas, uma vez que a erradicação tumoral será prejudicada e poderá haver estímulo para metastatização¹¹⁴.

Neste presente estudo a vasoconstrição, a estase e a reperfusão sanguíneas foram avaliadas macroscopicamente. Embora sem diferença estatística entre os grupos, a vasoconstrição moderada a acentuada e a reperfusão discreta foram observadas em todos os grupos, enquanto que a estase foi maior no G1 e G3. Há indícios que a reperfusão após a vasoconstrição ocorre próximo à formação de novos vasos. Sendo assim, pesquisadores tem avaliado o tratamento combinado da PDT, que possui potencial de promover angiogênese, com agentes sabidamente anti-angiogênicos^{29,101}.

O potencial da PDT no tratamento do câncer também está relacionado à maior afinidade das células endoteliais em proliferação devido os processos de angiogênese característicos do microambiente tumoral. Essa afinidade pode promover níveis maiores de necrose seletiva do tecido neoplásico¹⁰⁶. Ademais, estudos^{105,112} *in vivo* com a TMPP sob irradiação de luz vermelha relataram que células neoplásicas e endoteliais são diretamente afetadas pela fotoatividade da porfirina nas primeiras horas pós-irradiação. Observou-se diminuição no crescimento tumoral, lesões nas células neoplásicas e endotélio vascular (em componentes nucleares e de membrana) e também necrose tumoral. Essas alterações ao longo do tempo promoveu necrose extensa em até 12 horas. Neste presente estudo, microscopicamente, observou-se moderada a intensa presença de necrose da CAM após tratamento com a PDT.

Sinais de acentuada destruição da membrana corioalantoide foram visualizados neste presente estudo, principalmente no G1 e G2. Além da necrose, relata-se atrofia do mesoderma associado ou não à lise e separação do ectoderma e/ou endoderma. Essas alterações indicam ação direta do tratamento bem como indireta através das alterações vasculares que

promoveram hipoxia. Resultados similares, porém mais tardios, foram observados em um estudo que relatou acentuadas necrose hemorrágica e atrofia do tecido glandular prostático nas áreas tratadas sete dias após a PDT com o PS Tookad[®], uma bacterioclorina. O tecido não glandular também foi caracterizado por uma degeneração acentuada, além de pequenas áreas de ruptura epitelial¹²². Essa separação das camadas da CAM pode estar relacionada também à fragmentação de fibras colágenas observada com a utilização de porfirinas hidrossolúveis¹⁰⁶. Correlacionado a esses sinais de destruição da CAM, um estudo mostrou o potencial acentuado da PDT com TMPP em cultura de células tumorais, de induzir desorganização microtubular, aumento do índice mitótico aberrante, paralização do ciclo celular e formação de células redondas com parcial perda da aderência¹⁰².

Baseado nas características físicas e químicas da TMPP, era esperado uma resposta vascular mais proeminente da PDT em comparação aos outros tratamentos. Diversas variáveis devem ser consideradas para estabelecer um protocolo eficaz. O grau de fototoxicidade da porfirina está relacionada à sua habilidade de promover formação de oxigênio singlete, à captação celular da molécula e conseqüentemente à sua localização subcelular. Um estudo com cultura celular tumoral em que a porfirina TMPP se mostrou mais tóxica e eficiente na produção de espécies reativas de oxigênio em comparação a ftalocianina metalada, sugerindo uma dose terapêutica de 1µM, 100 vezes menor do que a utilizada neste estudo; sob fluência luminosa de 5 J/cm², aproximadamente 7 vezes menor do que a fluência utilizada neste estudo¹²³.

Além disso, relata-se que porfirinas hidrofílicas são absorvidas por endocitose e conseqüentemente se acumulam em lisossomos¹⁰⁶. A localização do PS nestas organelas promove a lesão celular, geralmente pelo estímulo da via apoptótica^{35,57}. No entanto, as células endoteliais possuem fraca atividade endocitótica dificultando a absorção do PS, apesar que a matriz extracelular carregada negativamente auxilia na ação da TMPP^{103,106}. A característica catiônica da TMPP permite orientar a molécula para localizações subcelulares importantes, promovendo alterações nas características e funcionamento celular¹⁰⁷, possuindo alta afinidade de ligação com o DNA¹¹¹.

As alterações vasculares observadas no G4 não foram suficientes para promover uma resposta vascular expressiva. O etanol foi utilizado na solução do solvente em todos os grupos e não provocou ressecamento da membrana, assim como observado em outro estudo¹⁰¹. Esse comportamento revela, portanto, que os resultados obtidos não impedem o seu uso em solução com PBS em outros estudos.

Apesar de algumas diferenças no padrão de alteração vascular entre os grupos avaliados, no geral os sinais observados corroboram com os achados na literatura^{65,72,73,74,75,106}

como hemorragia, formação de trombos, vasoconstricção, vasodilatação, hiperemia, estase sanguínea e reperfusão vascular. No entanto, todos os grupos em maior ou menor grau, mostraram similaridade no aspecto geral da CAM após as cinco horas de avaliação: diminuição vascular generalizada e/ou redução no calibre vascular, principalmente de vasos menores⁸⁴.

O uso do modelo de membrana corioalantoide é de fato eficiente para avaliação de efeito nos vasos sanguíneos. Os métodos de avaliação são diversos e dificultam a padronização e comparação da resposta vascular. A contagem de vasos e outras variáveis quantitativas relacionadas tem demonstrado ser um fator preditivo importante, mas não permite avaliar a função vascular. Dessa forma, se faz necessário que os estudos que tem como alvo os vasos sanguíneos, associem métodos de imagem que permitam monitorar a função, garantindo resultados mais robustos para serem extrapolados para ensaios e prática clínica⁶³. Além disso, a avaliação morfológica possui grande importância na análise, permitindo relacionar as alterações macroscópicas e microscópicas, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de lesão vascular.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o tratamento com a PDT utilizando o PS porfirínico TMPP apresenta potencial efeito vascular. Os resultados apresentados aqui indicam que a eficácia fotodinâmica depende, de maneira complexa, de características físico-químicas das variáveis envolvidas na PDT e do tecido tratado. São necessários dados adicionais para que seja possível estabelecer um protocolo viável para ensaios clínicos e uso terapêutico para distúrbios vasculares e neoplásicos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A terapia fotodinâmica é, desde o início do século XX, amplamente investigada para o tratamento de doenças oncológicas, vasculares e infecciosas em humanos e em animais. Sua ação se baseia, principalmente, na destruição celular através do estresse oxidativo causado pela interação de uma fonte de luz e uma substância fotossensibilizadora, ativando-a e reagindo com o oxigênio molecular. A partir dessa reação, são formadas espécies reativas de oxigênio como oxigênio singleto, radicais superóxido e hidroxila e peróxido de hidrogênio.

A PDT vascular é uma modalidade que tem a vascularização como alvo da ação fotodinâmica. Para avaliação do efeito vascular, o modelo experimental CAM utiliza para a membrana corioalantoide de galinha por ser uma membrana transparente, permitindo visualizar a rede vascular que a compõe. É um modelo alternativo ao uso de animais na pesquisa e possui as vantagens de ser simples, de fácil implementação laboratorial e barato. No entanto, houve uma dificuldade em encontrar informações na literatura sobre a viabilidade dos ovos, visto que houve uma perda acentuada de amostras pós-incubação.

A ação da porfirina TMPP após irradiação luminosa permitiu redução vascular de 35%, sendo superior aos resultados obtidos pela análise da luz e solvente isolados. No entanto, a vasoconstrição da TMPP no escuro foi de 23% e portanto, não apresentou diferença significativa com a PDT.

A aplicação tópica é frequentemente usada com o modelo CAM, mas é de interesse apenas para estudos relacionados a lesões superficiais ou distúrbios dermatológicos. Novos estudos utilizando o PS pela via sistêmica são necessários, pois está mais correlacionada à via de administração usada em modelos de mamíferos e na prática clínica.

O método de avaliação das alterações morfológicas por escore não foi sensível para este estudo, pois mesmo sendo observado diferenças subjetivas entre os grupos, não houve diferença estatística. Dentre os parâmetros macroscópicos, a vasoconstrição foi a alteração mais relevante, pois foi observada em mais de 50% das amostras em todos os grupos, principalmente G1, G3 e G4. A estase sanguínea foi mais acentuada em G1 e G3, enquanto a reperfusão vascular foi mais discreta em todos os grupos. A presença de trombo foi mais relevante em G1 e G2, enquanto a hemorragia foi mais evidente em G3 e G4.

Na análise histológica, a atrofia do mesoderma e a necrose da membrana foram os parâmetros que mais se destacaram sobretudo em G1 e G2. Algumas características relacionadas a reação inflamatória como vasodilatação mesodérmica sem hemácia, células inflamatórias no mesoderma, hemorragia e fibrose foram mais discretas. Por fim, a hiperemia

de capilares ectodérmicos e a vasodilatação em mesoderma com hemácias foram visualizadas com mais frequência em todos os grupos. Esses resultados permitiram compreender melhor os efeitos da porfirina TMPP na rede vascular e o comportamento da membrana corioalantoide frente aos tratamentos instituídos. No entanto, adicionar técnicas de imunohistoquímica, de micrografia eletrônica e/ou fazer análises histológicas seriadas em um grupo amostral maior, promoveria maior elucidação das reações vasculares e seus mecanismos ao longo do tempo.

Este estudo teve como objetivo os efeitos vasculares da TMPP sob irradiação luminosa pela via tópica em modelo de membrana corioalantoide. Os resultados obtidos demonstram perspectivas promissoras para a continuação do estudo da PDT com este PS devido seus efeitos celulares e vasculares. Além disso, almejou-se avaliar a capacidade desta porfirina em condição que permita que atue em conjunto com outras substâncias com potencial antiangiogênico. Dessa forma, incentiva-se novas investigações, modulando protocolos para o tratamento multimodal principalmente de doenças vasculares e oncológicas.

REFERÊNCIAS

1. Uebelhoer NS, Dover JS. Photodynamic therapy for cosmetic applications. *Dermatol. Ther.* 2005, 18:242–252.
2. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2010; 26:118–132.
3. Nguyen K, Khachemoune A. An update on topical photodynamic therapy for clinical dermatologists. *J Dermatolog Treat.* 2019; 30:732-744.
4. Tampa M, Sarbu MI, Matei C, Mitran CI, Mitran AI, Caruntu C, Constantin C, Neagu M, Georgescu SR. Photodynamic therapy: a hot topic in dermato-oncology (Review). *Oncol Lett.* 2019; 17: 4085-4093.
5. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature.* 2003; 3:380 – 387.
6. Van Straten D, Mashayekhi V, Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers.* 2017; 9(19):1 – 54.
7. Peng CL, Lin HC, Chiang WL, Shih YS, Chiang PF, Luo TY, Cheng CC, Shieh MJ. Anti-angiogenic treatment (Bevacizumab) improves the responsiveness of photodynamic therapy in colorectal cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 23:111–118.
8. Koh A, Lai TYY, Takahashi K, Wong TY, Chen LJ, Ruamviboonsuk P, Tan CS, Feller C, Margaron P, Lim TH, Lee WK. Efficacy and safety of ranibizumab with or without verteporfin photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy: a randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol.* 2017; 135(11):1206-1213.
9. Blasi MA, Pagliara MM, Lanza A, Sammarco MG, Caputo CG, Grimaldi G, Scupola A. Photodynamic therapy in ocular oncology. *Biomedicines.* 2018; 6(17):1 – 6.
10. Gao Y, Yu T, Zhang Y, Dang G. Anti-VEGF monotherapy versus photodynamic therapy and anti-VEGF combination treatment for neovascular age-related macular degeneration: a meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018; 59:4307–4317.
11. Gursoy H, Ozcakir-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest.* 2013; 17:1113–1125.
12. Lopes CS, Moreira SA, Nícoli GA, Ramirez I, Viola NV. Endodontical treatment of periapical tooth injury with photodynamic therapy: Case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 28:253–255.
13. Qi M, Chi M, Sun X, Xie X, Weir MD, Oates TW, Zhou Y, Wang L, Bai Y, Xu HHK. Novel nanomaterial-based antibacterial photodynamic therapies to combat oral bacterial biofilms and infectious diseases. *Int J Nanomedicine.* 2019; 14:6937–6956.

14. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 33:67–73.
15. Mahmoudi H, Bahador A, Pourhajibagher M, Alikhani MY. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *J Lasers Med Sci.* 2018; 9(3):154-160.
16. Kawczyk-Krupka A, Pucelik B, Międzybrodzka B, Sieroń AR, Dąbrowski JM. Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 23:132–143.
17. Sobotta L, Skupin-Mrugalska P, Mielcarek J, Goslinski T, Balzarini J. Photosensitizers Mediated Photodynamic Inactivation Against Virus Particles. *Mini Rev Med Chem.* 2015; 15(6):503-521.
18. Monjo ALA, Pringle ES, Thornbury M, Duguay BA, Monro SMA, Hetu M, Knight D, Cameron CG, McFarland SA, McCormick C. Photodynamic Inactivation of Herpes Simplex Viruses. *Viruses.* 2018; 10(532):1 – 16.
19. Souza DM, Alves PM, Silva MLF, Paulino TP, Coraspe HO, Mendonça MMS, Ribeiro BM, Silva MV, Rodrigues Júnior V, Rodrigues DBR. 5-ALA-mediated photodynamic therapy reduces the parasite load in mice infected with *Leishmania braziliensis*. *Parasite Immunol.* 2017; 39:e12403.
20. Baptista MS, Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44(1):1-10.
21. Andrade CG, Figueiredo RCBQ, Ribeiro KRC, Souza LIO, Sarmiento-Neto JF, Rebouças JS, Santos BS, Ribeiro MS, Carvalho Jr LB, Fontes A. Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018; 17(4):482-490.
22. Güzel Tunccan O, Kalkanci A, Unal EA, Abdulmajed O, Erdogan M, Dizbay M, Çağlar K. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turk J Med Sci.* 2018; 48: 873-879.
23. Seyed Jafari SM, Cazzaniga S, Hunger RE. Photodynamic therapy as an alternative treatment for mycosis fungoides: a systemic review and meta-analysis. *G Ital Dermatol Venereol.* 2018;153(6):827-832.
24. Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. *J Am Acad Dermatol.* 2019;80:853-67.
25. Sellera FP, Sabino CP, Hamblin MR. History of PDT. In: Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS, editores. *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice.* Chan: Springer; 2016. 228 p.

26. Buchholz J. Clinical applications of cancer PDT. In: Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS, editores. *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*. Chan: Springer; 2016. 228 p.
27. Buchholz J e Walt H. Veterinary photodynamic therapy: A review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10:342-347.
28. Weiss A, Van den Bergh H, Griffioen AW, Nowak-Sliwinska P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826:53–70.
29. Nowak-Sliwinska P, van Beijnum JR, van Berkel M, van den Bergh H, Griffioen AW. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis*. 2010; 13(4):281–292.
30. Buzzá HH, Silva LV, Moriyama LT, Bagnato VS, Kurachi C. Evaluation of vascular effect of Photodynamic Therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol*. 2014; 138:1–7.
31. Kessel D. Apoptosis, paraptosis and autophagy: death and survival pathways associated with photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2019; 95:119–125.
32. Li X, Lee S, Yoon J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev*. 2018; 47:1174-1188.
33. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010; 7:61—75.
34. Zhang J, Jiang C, Longo JPF, Azevedo RB, Zhang H, Muehlmann LA. An updated overview on the development of new photosensitizer for anticâncer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018; 8(2):137–146.
35. Kessel D. Photodynamic Therapy: A Brief History. *J. Clin. Med*. 2019;8(1581):1 – 7.
36. Dobson J, Queiroz GF, Golding JP. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *The Veterinary Journal*. 2018; 233:8–18.
37. Sabino CP e Hamblin MR. Photophysical and Photochemical Mechanisms. In: Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS, editores. *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*. Chan: Springer; 2016. 228 p.
38. Karelitis G, Lioffi S, Makropoulou M. Assessment of singlet oxygen dosimetry concepts in photodynamic therapy through computational modeling. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018; 21: 224–233.
39. Espectro eletromagnético. 2018. [Acesso em: 26 ago 2018]. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_eletromagn%C3%A9tico.
40. Radiação não-ionizante. 2017. [Acesso em 26 ago 2018]. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Radia%C3%A7%C3%A3o_n%C3%A3o_ionizante.

41. Allison RR, Moghissib K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10:331—341.
42. Ribeiro MS, Sabino CP. Multimodality dosimetry. In: Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS, editores. *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice.* Chan: Springer; 2016. 228 p.
43. Rocha M, Longo JPF, Lucci CM, Azevedo RB. Terapia Fotodinâmica em Veterinária. In: Daleck CR e Nardi ABD, autores. *Oncologia em Cães e Gatos.* 2 ed. Rio de Janeiro: Roca; 2017. 766p.
44. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61:250–281.
45. Borgia F, Giuffrida R, Caradonna E, Vaccaro M, Guarneri F, Cannavò SP. Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy. *Biomedicines.* 2018; 6:12.
46. Shafirstein G, Bellnier D, Oakley E, Hamilton S, Potasek M, Beeson K, Parilov E. Interstitial Photodynamic Therapy—A Focused Review. *Cancers.* 2017; 9:12.
47. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013; 1:244-257.
48. Gai S, Yang G, Yang P, He F, Lin J, Jin D, Xing B. Recent advances in functional nanomaterials for light-triggered cancer therapy. *Nano Today.* 2018; 19:146–187.
49. Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Barker SJ, Hyatt J, Nelson JS, Berns MW. *In vivo* tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1990; 52(2):375-385.
50. Hamblin MR e Sabino CP. Photosensitizers. In: Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS, editores. *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice.* Chan: Springer; 2016. 228 p.
51. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90(12): 889-905.
52. Baran TM. Photofrin® Photodynamic Therapy With Intratumor Photosensitizer Injection Provides Similar Tumor Response While Reducing Systemic Skin Photosensitivity: Pilot Murine Study. *Lasers Surg Med.* 2018; 50:476–482.
53. Peavy GM, Krasieva TB, Tromberg BJ, Eusantos ED, Berns MW. Variation in the distribution of a phthalocyanine photosensitizer in naturally occurring tumors of animals. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 1995; 27:271-277.

54. Barnes LD, Giuliano EA, Ota J. Cellular localization of Visudyne[®] as a function of time after local injection in an in vivo model of squamous cell carcinoma: an investigation into tumor cell death. *Vet Ophthalmol.* 2010; 13(3): 158–165.
55. Emilio CR. Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevulínico com a de seu metil éster utilizando-se a terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2008.
56. Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołąb J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica.* 2005; 52(2):339–352.
57. Kessel D, Oleinick NL. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochem Photobiol.* 2018; 94:213–218.
58. Price M, Terlecky SR, Kessel D. Research Note: A Role for Hydrogen Peroxide in the Pro-apoptotic Effects of Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* 2009; 85: 1491–1496.
59. Lobo ACS, Silva LCG, Santos PR, Cabrita A, Rosa MS, Arnaut LG. Immune Responses after Vascular Photodynamic Therapy with Redaporfin. *J. Clin. Med.* 2020; 9(1):104-119.
60. Ramjiawan RR, Griffioen AW, Duda DG. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis.* 2017; 20(2): 185–204.
61. Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, Hasan T. Vascular and Cellular Targeting for Photodynamic Therapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2006; 16(4):279–305.
62. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74.
63. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000. 407(6801):249-57.
64. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285(21):1182-6.
65. Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, Dicker AP, Eskens FALM, Horsman MR, Marme D, LoRusso PM. Differentiation and Definition of Vascular-Targeted Therapies. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:416–420.
66. Nowak-Sliwinska P, Weiss A, van Beijnum JR, Wong TJ, Ballini JP, Lovisa B, van den Bergh H, Griffioen AW. Angiostatic kinase inhibitors to sustain photodynamic angio-occlusion. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16(7):1553-1562.
67. Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist.* 2015;20:660–673.
68. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK, Generali D, Nagaraju GP, El-Rayes B, Ribatti D, Chen YC, Honoki K, Fuji H, Georgakilas AG, Newshean S, Amedei A, Niccolai E, Amino A, Ashraf SS, Helderich B, Yang X, Guha G, Bhakta D,

- Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Halicka D, Mohammed SI, Azmi AS, Bilsland A, Keith WN, Jensen LD, Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Semin. Cancer Biol.* 2015; 35:S224–S24.
69. Shanmugam MK, Warriar S, Kumar AP, Sethi G, Arfuso F. Potential Role of Natural Compounds as Anti-Angiogenic Agents in Cancer. *Curr Vasc Pharmacol.* 2017; 15:503-519.
 70. Spear MA, LoRusso P, Mita A, Mita M. Vascular Disrupting Agents (VDA) in Oncology: Advancing Towards New Therapeutic Paradigms in the Clinic. *Curr Drug Targets.* 2011; 12:2009-2015.
 71. Mita MM, Sargsyan L, Mita AC, Spear M. Vascular-disrupting agents in oncology. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2013; 22(3):317-328.
 72. Castellani A, Pace GP, Concioli M. Photodynamic effect of haematoporphyrin on blood microcirculation. *J Pathol Bacteriol.* 1963; 86:99-102.
 73. Reed MWR, Miller FN, Wieman TJ, Tseng MT, Pietsch CG. The Effect of Photodynamic Therapy on the Microcirculation. *J Surg Res.* 1988; 45:452-459.
 74. Ohlerth S, Lalahová D, Buchholz J, Roos M, Walt H, Kaser-Hotz B. Changes in Vascularity and Blood Volume as a Result of Photodynamic Therapy can be Assessed With Power Doppler Ultrasonography. *Lasers Surg Med.* 2006; 38:229–234.
 75. Fingar VH. Vascular Effects of Photodynamic Therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1996; 14(5): 323-328.
 76. Ribatti D. Chorioallantoic membrane vasculature. In: Ribatti D, editor. *The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis.* Chan: Springer; 2010. 124p.
 77. Ito NMK, Miyaji CI, Miyaji SO. Sistema reprodutor e formação do ovo. In: Macari M, Gonzales E, Patrício IS, Nääs IA, Martins PC, editores. *Manejo da Incubação.* Jaboticabal:FACTA; 2013. 468p.
 78. Bellairs R, Osmond M. Extra-Embryonic Membranes. In: Bellairs R, Osmond M., editors. *The Atlas of Chick Development.* Oxford: Elsevier; 2014. 660p.
 79. Everaert N, Decuypere E. Fisiologia do embrião. In: Macari M, Gonzales E, Patrício IS, Nääs IA, Martins PC, editores. *Manejo da Incubação.* Jaboticabal:FACTA; 2013. 468p.
 80. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis.* 2014; 17:779–804.
 81. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev;* 2016; 141:70–77.
 82. Baggott GK. Development Of Extra-Embryonic Membranes And Fluid Compartments. *Avian Biol Res.* 2009; 2:21 – 26.

83. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int. J. Exp. Path.* 2004; 85:233–248.
84. Buzzá HH, Freitas LCF, Moriyama LT, Rosa RGT, Bagnato VS, Kurachi C. Vascular Effects of Photodynamic Therapy with Curcumin in a Chorioallantoic Membrane Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20:1084-1096.
85. Almeida LM, Zanoelo FF, Castro KP, Borissevitch IE, Soares CMA, Gonçalves PJ. Cell Survival and Altered Gene Expression Following Photodynamic Inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Photochem Photobiol.* 2012; 88:992–1000.
86. Niemistö A, Dunmire V, Yli-Harja O, Zhang W, Shmulevich I. Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Trans. Med. Imaging.* 2005; 24:549–553.
87. Gonçalves PJ, Franzen PL, Correa DS, Almeida LM, Takara M, Ito AS, Zílio SC, Borissevitche IE. Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP). *Spectrochim Acta A.* 2011; 79: 1532– 1539.
88. Lebedeva NS, Yurina ES, Gubarev YA, Syrbu SA. Interactions of tetracationic porphyrins with DNA and their effects on DNA cleavage. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2018; 199: 235–241.
89. Eckl DB, Dengler L, Nemmert M, Eichner A, Bäuml W, Huber H. A Closer Look at Dark Toxicity of the Photosensitizer TMPyP in Bacteria. *Photochem Photobiol.* 2018; 94: 165–172.
90. Makanya AN, Dimova I, Koller T, Styp-Rekowska B, Djonov V. Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. *PLoS ONE.* 2016; 11(4): e0152821.
91. Buzzá HH, Zangirolami AC, Kurachi C, Bagnato VS. Photostimulation Effects on Chicken Eggs Development: Perspectives to Human Newborns Treatment. *J Biophotonics.* 2017; 11(2): e201700046.
92. Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, Shinnars BL. Angiogenesis assays: Problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev.* 2000; 19: 167–172.
93. Shrihari TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancer.* 2017; 11:721-730.
94. Baglo Y, Sorrin AJ, Liang BJ, Huang HC. Harnessing the Potential Synergistic Interplay Between Photosensitizer Dark Toxicity and Chemotherapy. *Photochem Photobiol.* 2019.
95. Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62:273–282.
96. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Silva-Lalucci MPP, Demarchi IG, Aristides SMA, Teixeira JJV, Silveira TGV, Lonardon MVC. Contribution of photodynamic

- therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 21: 294-305.
97. Winter R, Dungal P, Reischies FMJ, Rohringer S, Slezak P, Smolle C, Spindel S, Kamolz LP, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Schicho K. Photobiomodulation (PBM) promotes angiogenesis in-vitro and in chick embryo chorioallantoic membrane model. *Sci Rep.* 2018; 8:17080.
 98. Lemes SR, Júnior LA, Manoel DS, Sousa MAM, Fonseca RD, Lima RS, Noda-Perez C, Reis PRM, Cardoso CG, Silveira-Lacerda EP, Souza MAR, Mendonça CR, Gonçalves PJ, Boni L, Fonseca TL, Silva Junior NJ. Optical properties and antiangiogenic activity of a chalcone derivate. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2018; 204:685–695.
 99. Nicosia RF, Tchao T, Leighton J. Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In vitro.* 1982;18(6):538-550.
 100. Leeson TS, Leeson CR. The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation. *J. Anat., Lond.* 1963;97(4):585-595.
 101. Silva RC. Caracterização do complexo curcumina-azul de metileno e aplicação em terapia fotodinâmica combinada com antiangiogênica [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química; 2018.
 102. Cenklová V. Photodynamic therapy with TMPyP – Porphyrine induces mitotic catastrophe and microtubule disorganization in HeLa and G361 cells, a comprehensive view of the action of the photosensitizer. *J Photochem Photobiol B.* 2017; 173:522–537.
 103. Peng CH, Lai PS, Chang CC, Lou PJ, Shieh MJ. The synthesis and photodynamic properties of meso-substituted, cationic porphyrin derivatives in HeLa cells. *Dyes Pigm.* 2010;84:140–147.
 104. Salmon-Divon M, Nitzan Y, Malik Z. Mechanistic aspects of Escherichia coli photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(N-methylpyridyl)porphine. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:423-429.
 105. Villanueva A, Caggiarib L, Jorib G, Milanese C. Morphological aspects of an experimental with a meso-substituted cationic porphyrin tumour photosensitized. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1994; 23:49-56.
 106. Strauss WSL, Sailer R, Schneckenburger H, Akgün N, Gottfried V, Chetwer L, Kimel S. Photodynamic efficacy of naturally occurring porphyrins in endothelial cells in vitro and microvasculature in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1997;39:176-184.
 107. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 32 (1996) 153-157.
 108. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Substance Record for SID 24859370,

Source: Sigma-Aldrich; [Acesso em 20 jul 2020]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24859370>

109. Kelly KM, Kimel S, Smith T, Stacy A, Hammer-Wilson MJ, Svaasand LO, Nelson JS. Combined Photodynamic and Photothermal Induced Injury Enhances Damage to In Vivo Model Blood Vessels. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2004;34:407–413.
110. Kassab K. Evaluating the antitumor activity of combined photochemotherapy mediated by a meso-substituted tetracationic porphyrin and Adriamycin. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2009;892–899.
111. Tsolekile N, Nelana S, Oluwafemi OS. Porphyrin as Diagnostic and Therapeutic Agent. *Molecules*. 2019;24:2669
112. Villanueva A, Jori G. Pharmacokinetic and tumour-photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra(4methylpyridyl)porphine. *Cancer Letters*. 1993;73:59-64
113. Colombo LL, Vanzulli SI, Villanueva A, Canete M, Juarranz A, Stockert JC. Long-term regression of the murine mammary adenocarcinoma, LM3, by repeated photodynamic treatments using meso-tetra (4-N-methylpyridinium) porphine. *International Journal of Oncology*. 2005;27: 1053-1059.
114. Zheng XH, Nie X, Liu HY, Fang YM, Zhao Y, Xia LX. TMPyP4 promotes cancer cell migration at low doses, but induces cell death at high doses. *Scientific Reports*. 2016;6:26592
115. Angeli NG, Lagorio MG, San Román EA, Dicio LE. Meso-Substituted Cationic Porphyrins of Biological Interest. Photophysical and Physicochemical Properties in Solution and Bound to Liposomes. *Photochem Photobiol*. 2000; 72(1): 49–56
116. Hammer-Wilson MJ, Akian L, Espinoza J, Kimel S, Berns MW. Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 1999;53:44–52
117. Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J. A simple procedure for the longterm cultivation of chicken embryos. *Dev. Biol*. 1974;41:391–394.
118. El-Ghali N, Rabadi M, Ezin M, Bellard ME. New Methods for Chicken Embryo Manipulations. *Microsc Res Tech*. 2010;73(1): 58–66
119. Pegaz B, Debefve E, Ballini JP, Wagnières G, Spaniol S, Albrecht V, Scheglmann DV, Nifantiev NE, van den Bergh H, Konan-Kouakou YN. Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *Europ Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 28:134–140
120. Pereira FEL. Inflamações. In: Brasileiro Filho G, editor. *Bogliolo Patologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2019.

121. Debeve E, Pegaz B, van den Bergh H, Wagnie`res G, Lange N, Ballini JP. Video monitoring of neovessel occlusion induced by photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne), in the CAM model. *Angiogenesis*. 2008; 11:235–243
122. Huang Z, Chen Q, Luck D, Beckers J, Wilson BC, Trncic N, LaRue SM, Blanc D, Hetzel FW. Studies of a Vascular-Acting Photosensitizer, Pd-Bacteriopheophorbide (Tookad), in Normal Canine Prostate and Spontaneous Canine Prostate Cancer. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005; 36:390–397
123. Pizova K, Bajgar R, Fillerova R, Kriegova E, Cenklova V, Langova K, Konecny P, Kolarova H. C-MYC and C-FOS expression changes and cellular aspects of the photodynamic reaction with photosensitizers TMPyP and ClAlPcS2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015;142:186–19

ANEXO



Goiânia, 04 de dezembro de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 069/17

I - Finalidade do projeto de pesquisa (pesquisa/aula prática): PESQUISA

II - Identificação:

- ❑ **Data de apresentação a CEUA:** 13/06/2017
- ❑ **Título do projeto:** Avaliação da ação fotodinâmica vascular em membranas corioalantóicas (CAM).
- ❑ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Rodrigo Costa e Silva / IQ
- ❑ **Pesquisadores Participantes:** Luciane Madureira de Almeida (UEG), Taise Maria dos Anjos Oliveira (EVZ/UFG), João Marcos Gonçalves Barbosa (IQ/UFG)
- ❑ **Médico Veterinário/CRMV:** Taise Maria dos Anjos de Oliveira. CRMV: 06251/GO
- ❑ **Unidade onde será realizado:** Instituto de Física da UFG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

O entendimento da atividade fotodinâmica sobre a membrana corioalantóica (CAM), bem como a avaliação do efeito sinérgico dos fotossensibilizadores na vasoconstrição, pode propiciar o desenvolvimento de novas ferramentas e estratégias para o tratamento e controle de tumores sólidos via terapia fotodinâmica vascular.

O objetivo do estudo é avaliar o efeito vascular da membrana corioalantóica (CAM) frente à ação fotodinâmica de diferentes fotossensibilizadores. De forma específica:

- a) avaliar a eficiência de fotossensibilizadores catiônicos, aniônicos e não-iônicos em provocar a vasoconstrição da membrana corioalantóica;
- b) avaliar o efeito sinérgico da combinação de dois fotossensibilizadores na vasoconstrição.

IV - Sumário do projeto:

- ❑ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Segundo os pesquisadores, esse método em avaliação consistirá em um método alternativo aos métodos tradicionais que requerem o uso de ratos adultos e a remoção da artéria aorta descendente para a avaliação da v-PDT (terapia fotodinâmica vascular) em vasos isolados.
- ❑ **Prevê Projeto Piloto:** Não prevê projeto piloto.
- ❑ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Galinha (*gallus gallus*).
- ❑ **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** Galinha (*gallus gallus*). Fase embrionária. 135 indivíduos.
- ❑ **Fonte de obtenção do animal:** Avicultor autônomo. Sr Altamiro. Rua dos Cravos, Qd 24, lote 15.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO COMISSÃO DE

- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os ovos serão mantidos em chocadeiras com capacidade para 60 ovos, mantidos à uma temperatura de 37°C e umidade de 60%. As chocadeiras estarão localizadas no Instituto de Física da UFV.
- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não serão utilizados.

Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa: Serão avaliados fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica (curcuminóides, azul de metileno, porfirinas, fitalocianinas). Eles serão classificados segundo seu perfil de absorção molecular e característica iônica. Os com bandas de absorção intensas na região do azul (400 a 500 nm) serão denominados FS-1, sendo constituída pela TMPyP (catiônica), TPPS (aniônica) e Curcumina (neutra). Os com bandas intensas na região do vermelho (600 a 700 nm) serão denominados FS-2, sendo constituída pelo AM (catiônico), Carboxi-ZnPc (aniônico) e ZnPc (neutro). A combinação dos FSs será entre os representantes da classe FS-1 com todos os representantes da classe FS-2, ou seja, (FS-1/FS-2): TMPyP(+)/AM(+); TMPyP(+)/Carboxi-ZnPc(-); TMPyP(+)/ZnPc(0); TPPS(-)/AM(+); TPPS(-)/Carboxi-ZnPc(-); TPPS(-)/ZnPc(0); Curcumina(0)/AM(+); Curcumina(0)/Carboxi-ZnPc(-); Curcumina(0)/ZnPc(0). O preparo e análise da membrana corioalantóica consistirá em, no dia 1, fazer a assepsia da casca do ovo com álcool 70% e iniciar a incubação em chocadeira configurada com temperatura de 37,7°C e 60%UR e agitação lenta. Dia 3: Retirar de 3 a 5 mL de albumina com seringa, abertura da janela de visualização da CAM com pinça metálica seguida do fechamento com fita adesiva transparente. Re-incubar os ovos na chocadeira com a mesma configuração anterior, porém, sem agitação. Nos dias 11 a 14 será o período de realização e acompanhamento dos experimentos; A manipulação dos ovos e a realização de todo o experimento será realizado em capela de fluxo laminar a fim de evitar a contaminação e a inviabilização do ovo. Os fotossensibilizadores estudados serão aplicados topicamente (dose de 1,50 e 100 µM/cm²) à membrana e irradiados com fonte de luz de espectro amplo (400 a 700 nm). A avaliação da ação fotodinâmica na CAM será avaliada mediante a aquisição de imagens digitais imediatamente após a irradiação e em intervalos de tempos regulares a fim de acompanhar a vasoconstrição causada pela ação fotodinâmica. A avaliação vascular da CAM será realizada com todas as combinações de FSs (FS-1/FS-2), com todos os FSs isolados, com o branco “FS-sem irradiação” e o branco “sem FS-com irradiação”. Todos os experimentos serão realizados em quintuplicada, totalizando a necessidade de 220 ovos viáveis.

- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Os riscos de desenvolvimento de doenças ou estímulos dolorosos é mínimo, visto que o procedimento será realizado em uma idade (11º a 14º dia de desenvolvimento do embrião) em que as células sensoriais de dor ainda não se desenvolveram. Mas caso seja observado qualquer anormalidade, os embriões serão retirados da pesquisa e eutanasiados.
- ❑ **Grau de invasividade:** I.
- ❑ **Material utilizado em outros projetos:** Não.
- ❑ **Método de eutanásia:** Congelamento por imersão em nitrogênio líquido.
- ❑ **Destino do animal:** Ao final serão eutanasiados (congelamento por imersão em nitrogênio líquido) sendo posteriormente acondicionados em sacos plásticos e mantidos em freezer até serem incinerados.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO COMISSÃO DE

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ❑ **Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFV:** Estão anexados ao processo 1) Formulário de Protocolo da CEUA/UFV, 2) Projeto de Pesquisa em pdf. no CD-Rom, 3) Termo de Responsabilidade assinado por todos os pesquisadores e participantes envolvidos no projeto 4). Certidão de Ata do Conselho Diretor (CD) da Unidade, constando a data de aprovação do projeto na Unidade
- ❑ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Existem riscos mínimos ligados a manipulação de produtos químicos utilizados no laboratório, contudo, os riscos serão minimizados com a utilização de EPI's, como luvas, jaleco e óculos, bem como o treinamento da equipe


VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFV o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de julho de 2023**.

VII - Data da reunião: 04/12/2017.



Coordenador
a da
CEUA/PRPI/
UFV

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

