UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

FRANCISCO DE ASSIS MARTINS GOMES REGO FILHO

ASPECTOS ÓPTICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO USO COMBINADO DE TÉCNICAS CIRÚRGICAS COM TERAPIA FOTODINÂMICA

MACEIÓ – AL

2013

FRANCISCO DE ASSIS MARTINS GOMES REGO FILHO

ASPECTOS ÓPTICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO USO COMBINADO DE TÉCNICAS CIRÚRGICAS COM TERAPIA FOTODINÂMICA

Tese apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências pelo programa de Pós-Graduação em Física.

Orientadora: Dra. Maria Tereza de Araujo

Co-orientador: Dr. Vanderlei S. Bagnato

MACEIÓ – AL

2013

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária responsável: Fabiana Camargo dos Santos

R343a Rego Filho, Francisco de Assis Martins Gomes.
Aspectos ópticos e histopatológicos do uso combinado de técnicas cirúrgicas com terapia fotodinâmica / Francisco de Assis Martins Gomes Rego Filho. – 2013.
189 f. : il.

Orientador: Maria Tereza de Araujo.
Co-orientador: Vanderlei Salvador Bagnato.
Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 176.
Anexos: f. 166.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Bisturis eletrônicos. 3. Lasers cirúrgicos. 4. Biofotônica. I. Título.

CDU: 535.8:616-089.8

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Física
Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL. Brasil
FONE : (82) 3214-1423/FAX 3214-1645

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE

TESE DE DOUTORADO

"Aspectos Ópticos e Histopatológicos do Uso Combinado de Técnicas Cirúrgicas com Terapia Fotodinâmica".

por

Francisco de Assis Martins Gomes Rego Filho

A Banca Examinadora composta pelos professores Maria Tereza de Araújo (orientadora), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Cristina Kurachi, do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, Orlando de Castro e Silva Junior, do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Italo Marcos Nunes de Oliveira, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, e Wagner Ferreira da Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas,consideram o candidato aprovado com grau A.

Maceió, 17 de maio de 2013

Profª. Drª. Maria Tereza de Araújo

Profª. Drª. Cristina Kurachi

Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Junior

Prof. Dr. Italo Marcos Nunes de Oliveira

Prof. Dr. Wagner Ferreira da Silva

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu pai Francisco, minhas mães (Maria Máthia, Tânia e Adriana) e meus irmãos (Daniel, Hugo, Danilo e Patrícia) por todo amor, paciência, confiança e dedicação por todos esses anos. Sem vocês, essa trajetória não seria a mesma.

Dedico este trabalho a minha segunda família, a que eu escolhi de coração, formada por todos os meus grandes amigos. A existência de vocês foi essencial para me manter firme até aqui.

A todos vocês devolvo o meu amor. Incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Maria Tereza,

Por ter depositado sua confiança em todo o trabalho que desenvolvemos juntos ao longo desses últimos 10 anos. Agradeço por cada ensinamento técnico, profissional e ético que a senhora me passou. Não há palavras para medir a honra em trabalhar com alguém tão competente.

Ao Prof. Vanderlei Bagnato,

Pela confiança em ceder seus laboratórios, sua atenção, suas ideias e orientação em várias etapas desse trabalho. Agradeço pelas valiosas discussões e ensinamentos que tem exercido sobre mim grande impacto profissional desde 2008. A minha gratidão é eterna e espero poder retribuir da melhor forma possível nos próximos anos.

Agradecimento especial à professora **Cristina Kurachi**, chefe do laboratório de Biofotônica do Grupo de Ótica do Instituto de Física de São Carlos. Sua atenção durante cada etapa dos trabalhos realizados, em todas as passagens pelo grupo, foi valiosa e enriquecedora em todos os aspectos.

Agradeço imensamente a todos os colegas do laboratório de Biofotônica. Em especial, aos colegas e amigos Didi, Clóvis, Natália, Lili, Mariana, Thiago Moretti, Cíntia, Dilleys, Michelle e Mirian. Vocês são responsáveis por este trabalho também e quero agradecer por tudo que aprendi com cada um.

Agradeço aos professores, colegas e amigos do grupo de Fotônica e Fluidos Complexos do Instituto de Física da UFAL, por todo o aprendizado e ajuda.

Agradecimento especial a Júnior Barros, por ter cedido seu tempo e talento para fazer algumas ilustrações do texto e animações da apresentação.

Aos demais amigos, colegas do programa de Pós-Graduação, professores e funcionários do Instituto de Física.

Ao apoio financeiro: CAPES, CNPq, FAPEAL, PRONEX-NEXO e FAPESP.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica alternativa para o tratamento de tumores e outras lesões. Ela é fruto da combinação de três fatores: um fotossensibilizador (FS), o oxigênio molecular e luz. Esta junção desencadeia reações fotoquímicas que resultam na destruição de células e suas vizinhanças. Pelo fato de o FS apresentar retenção preferencial em tumores, seu efeito torna-se localizado, destruindo seletivamente apenas o parênquima e o estroma tumorais. Contudo, a penetração de luz durante a TFD é limitada, devido à atenuação dos possíveis comprimentos de onda de excitação pelo próprio tecido biológico. Assim, a profundidade de tratamento não é suficiente para garantir o tratamento de lesões extensas. Para superar esta dificuldade, uma estratégia é remover cirurgicamente a maior parte da lesão, aplicando a TFD em seguida no leito cirúrgico. No entanto, desconhecem-se como as alterações provocadas por técnicas cirúrgicas (hemorragia, coagulação, processos inflamatórios, etc.) influenciam nas propriedades ópticas dos tecidos biológicos a ponto de comprometer um subsequente protocolo de TFD. O presente trabalho se propõe a estudar a influência do uso de cirurgia anterior ao protocolo de TFD em um modelo animal. Foram aplicadas quatro ferramentas cirúrgicas (bisturi elétrico, bisturi ultrassônico, laser de Er:YAG de pulsos longos e laser de Ti:Safira de pulsos ultracurtos) com o fim de verificar a mais recomendável para o protocolo combinado de cirurgia + TFD, utilizando o Photogem® como fotossensibilizador. Simularam-se alterações de superfície e sub-superfície no tecido remanescente tratado com tais técnicas. A ordem de aplicação cirurgia-fotossensibilização foi uma das variáveis do estudo. Como técnicas de análise da resposta tecidual foram utilizadas: espectroscopia de fluorescência *in vivo*, microscopia confocal de fluorescência do tecido necrosado (*ex vivo*) e histopatologia. A análise da fluorescência da necrose *ex vivo* tornou possível avaliar os danos provocados nos tecidos biológicos, corroborando com a análise histopatológica. A análise da profundidade de necrose foi determinante para confirmar a geração de efeito fotodinâmico em tecidos anteriormente alterados pelo uso de cirurgia. Testando um protocolo de excisão cirúrgica propriamente dita, verificou-se o mesmo sucesso. Através da fluorescência *in vivo* foi possível detectar a concentração do FS em todas as etapas dos protocolos. Uma hipótese de aumento da condutividade elétrica do tecido fotossensibilizado é proposta para explicar a diminuição do dano térmico observado na excisão. Por fim, foi verificada a viabilidade total da combinação entre cirurgia e TFD, com espaço para sugerir diretrizes para a execução de futuros protocolos que envolvam uso combinado das técnicas estudadas.

PALAVRAS CHAVE: Terapia Fotodinâmica. Bisturis eletrônicos. Lasers cirúrgicos. Biofotônica.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative technique for treatment of tumors and other lesions. It results from the combination of three factors: a photosensitizer (PS), molecular oxygen and light. This combination triggers photochemical reactions that result in the destruction of cells and their neighborhoods. Because the FS presents preferential retention in tumors, its effect becomes localized, selectively destroying the tumor parenchyma and stroma only. However, the penetration of light during PDT is limited due to attenuation of the possible excitation wavelengths by the biological tissue itself. Thus, the depth of treatment is not sufficient to ensure the treatment of extensive lesions. To overcome this difficulty, one strategy is to surgically remove the bulk of the lesion, and then applying the PDT on the surgical bed. However, it is unknown how the alterations caused by surgical techniques (bleeding, coagulation, inflammatory processes, etc.) influence the optical properties of biological tissues as to compromise a subsequent PDT protocol. This work aims to study the influence of using surgical techniques prior to a PDT protocol in an animal model. It was applied four surgical tools (electrocautery, ultrasonic scalpel, long-pulsed Er:YAG laser and ultrashort-pulsed Ti: Sapphire laser) in order to verify the most recommended for a surgery + PDT combined protocol, using Photogem ® as the photosensitizer. Surface and subsurface changes were performed to simulate the remaining tissue properties treated with such techniques. The order of application between photosensitization and surgery was one of the study variables. *In vivo* fluorescence spectroscopy, confocal fluorescence microscopy of the necrotic tissue (*ex vivo*) and histopathology were used as analysis techniques of the tissue response. The analysis of *ex vivo* necrosis fluorescence made possible to assess the damage to biological tissues, supporting the histopathological analysis. Analyzing the depth of necrosis was important to confirm the generation of photodynamic effect in tissues previously modified by the use of surgery. Testing a surgical excision protocol, the same success was obtained. Through *in vivo* fluorescence it was possible to detect the concentration of the PS in all steps of the protocols. A hypothesis of increased electrical conductivity of photosensitized tissue is proposed to explain the decrease in thermal damage observed during excision. Finally, the full feasibility of the combination between surgery and PDT was verified, with space to suggest guidelines for the implementation of future protocols involving combined use of the studied techniques.

KEYWORDS: Photodynamic Therapy. Electronic scalpels. Surgical lasers. Biophotonics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da ablação tecidual por meio de um bisturi elétrico..... **35**

Figura 2: Formas de onda do corte puro e do corte misto..... **39**

Figura 3: Representação esquemática do processo de cavitação ultrassônica..... **43**

Figura 4: Micro-crateras formadas em esmalte (esquerda) e dentina (direita) provocadas pela irradiação com laser de femtossegundos..... **47**

Figura 5: Representação esquemática do processo de ionização em avalanche... **48**

Figura 6: Representação esquemática dos níveis de energia do íon Er^{3+}..... **54**

Figura 7: Mecanismos de interação luz tecido em função da dose de luz (intensidade x tempo)..... **70**

Figura 8: Penetração da luz em tecidos biológicos como função do comprimento de onda e os diversos mecanismos primários de interação luz-tecido..... **76**

Figura 9: Anel porfírico, comum a todos os Derivados de Hematoporfirina (HpD)... **80**

Figura 10: Espectro de absorção do Photogem®..... **80**

Figura 11: Comparação entre os anéis centrais de Porfirina, Clorina e Bacterioclorinas..... **81**

Figura 12: Diagrama de Jablonski descrevendo processos radiativos e não radiativos na TFD..... **86**

Figura 13: Representação esquemática de três tipos de morte celular por TFD..... **89**

Figura 14: Grupos experimentais: MS (G1); FS+MS (G2); FS+LUZ (G3); FS+MS+LUZ (G4); MS+FS+LUZ (G5)..... **99**

Figura 15: Esquema para produção de lesões na superfície do tecido hepático, com áreas designadas para: 1 – bisturi elétrico, 2 – bisturi harmônico, 3 – laser de femtossegundos, 4 – laser de Er:YAG**..... 100**

Figura 16: Representação do contato para modificação de superfície pelo eletrodo ativo de uma unidade eletrocirúrgica. Considerar o fígado como parte do animal, cujo entorno não é mostrado no esquema. Abaixo do animal encontra-se o eletrodo neutro**..... 103**

Figura 17: Aparato de irradiação com laser de femtossegundos. Os animais foram apoiados na mesa XY, controlada por um motor de passo**..... 105**

Figura 18: Esquema de varredura de irradiação com laser de femtossegundos**... 106**

Figura 19: Sistema laser Er:YAG (à esquerda) e detalhe da saída de luz da peça de mão (à direita)**..... 107**

Figura 20: Aparato de iluminação para Terapia Fotodinâmica**..... 109**

Figura 21: Esquema para divisão das peças histológicas. A linha imaginária foi utilizada para dividir as amostras para exposição do dano em profundidade (perpendicular ao plano da imagem)**..... 110**

Figura 22: Imagens de fluorescência de fígado de rato, representativas das técnicas utilizadas no grupo G1: (a) Bisturi elétrico; (b) Bisturi Ultrassônico; (c) Laser Ti:Safira de femtossegundos; (d) Laser de Er:YAG. Aumento: 10x**..... 112**

Figura 23: Imagens de fluorescência de fígado de rato, representativas das técnicas utilizadas no grupo G2: (a) FS + Bisturi elétrico; (b) FS + Bisturi Ultrassônico; (c) FS + Laser de femtossegundos; (d) FS + Er:YAG. Aumento: 10x**..... 114**

Figura 24: Imagens de microscopia confocal de fluorescência de fígado de rato, representativas de cada técnica utilizada no grupo G4 (FS + MS + LUZ): (a) FS +

Bisturi elétrico + LUZ; (b) FS + Bisturi Ultrassônico + LUZ; (c) FS + Laser de femtossegundos + LUZ; (d) FS + Er:YAG + LUZ. Aumento: 10x..... **115**

Figura 25: Imagens de microscopia confocal de fluorescência de fígado de rato, representativas de cada técnica utilizada no grupo G5 (MS + FS + LUZ): (a) Bisturi elétrico + FS + LUZ; (b) Bisturi Ultrassônico + FS + LUZ; (c) Laser de femtossegundos + FS + LUZ; (d) Er:YAG + FS + LUZ. Aumento: 10x..... **117**

Figura 26: Fluorescência da necrose formada no grupo G1, referente unicamente ao dano de modificação de superfície, comparado com o tecido sadio..... **119**

Figura 27: Fluorescência da necrose formada no grupo G2, referente ao dano de modificação de superfície em tecido fotossensibilizado, comparado com o tecido sadio..... **120**

Figura 28: Fluorescência da necrose formada no grupo G4 (FS + MS + LUZ), comparando com o tecido sadio..... **121**

Figura 29: Fluorescência da necrose formada no grupo G5 (MS + FS + LUZ), comparando com o tecido sadio..... **122**

Figura 30: Lâminas histológicas do grupo G1: (a) bisturi elétrico, (b) bisturi ultrassônico, (c) laser de femtossegundos e (d) laser de Er:YAG..... **124**

Figura 31: Lâminas histológicas do grupo G2: (a) FS + bisturi elétrico, (b) FS + bisturi ultrassônico, (c) FS + laser de femtossegundos e (d) FS + laser de Er:YAG..... **125**

Figura 32: Lâmina histológica do grupo controle G3: apenas TFD (FS + LUZ)..... **126**

Figura 33: Lâminas histológicas do grupo G4: (a) FS + bisturi elétrico + LUZ, (b) FS + bisturi ultrassônico + LUZ, (c) FS + laser de femtossegundos + LUZ e (d) FS + laser de Er:YAG + LUZ..... **127**

Figura 34: Lâminas histológicas do grupo G5: (a) bisturi elétrico + FS + LUZ, (b) bisturi ultrassônico + FS + LUZ, (c) laser de femtossegundos + FS + LUZ e (d) laser de Er:YAG + FS + LUZ**..... 128**

Figura 35: Espectro de Fluorescência do Sangue e Hemoglobina**..... 132**

Figura 36: Unidade Eletrocirúrgica HF-120**..... 138**

Figura 37: Representação do dano, em profundidade, causado por uma corrente eletrocirúrgica visto transversalmente**..... 139**

Figura 38: Sistema de coleta de fluorescência *in vivo***..... 140**

Figura 39: Posição aproximada para coleta de fatias de tecido (linha tracejada à esquerda) para produção de lâminas histológicas (à direita)**..... 141**

Figura 40: organização dos grupos experimentais**..... 142**

Figura 41: Sequência de excisão eletrocirúrgica em tecido hepático**..... 143**

Figura 42: Iluminação da superfície de tratamento para TFD**..... 143**

Figura 43: Sistema de imagens multiespectrais de fluorescência**..... 144**

Figura 44: Espectro de fluorescência do tecido normal e após ser fotossensibilizado**..... 145**

Figura 45: Autofluorescência do tecido danificado via eletrocirurgia antes e após ser fotossensibilizado para um único modo de operação**..... 146**

Figura 46: Intensidade de fluorescência do tecido danificado via eletrocirurgia após ser fotossensibilizado como função do modo de operação**..... 147**

Figura 47: Lâmina de corte histológico de fígado de rato tratado submetido ao dano térmico de uma unidade eletrocirúrgica (32x)**..... 148**

Figura 48: Lâmina de corte histológico de fígado de rato tratado submetido à fotossensibilização, seguido de corte eletrocirúrgico e iluminação para TFD (32x)**..... 149**

Figura 49: Superfície de tecido hepático de rato submetido ao corte eletrocirúrgico iluminado com luz branca (à esquerda) e imagem de fluorescência (à direita)**..... 150**

Figura 50: Espectros de fluorescência do tecido normal e após corte eletrocirúrgico**..... 151**

Figura 51: Fluorescência do tecido fotossensibilizado após eletrocirurgia**..... 152**

Figura 52: Fluorescência do tecido após eletrocirurgia e fotossensibilizado em seguida**..... 153**

Figura 53: Corte de lâmina histológica de fígado de rato referente aos 3 grupos-controle: (a) EC, (B) FS + LUZ, ou Grupo TFD e (c) FS + EC**..... 155**

Figura 54: Corte de lâmina histológica de fígado de rato referente aos dois grupos EC + TFD: (a) Grupo 3: EC + FS + LUZ e (b) Grupo 4: FS + EC + LUZ**..... 156**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de fotossensibilizadores aprovados para uso em TFD antitumoral**..... 82**

Tabela 2: relação das reações químicas tipo I que ocorrem durante a TFD**..... 87**

Tabela 3: Distribuição dos animais nos grupos experimentais**..... 100**

Tabela 4: Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com bisturi elétrico**..... 128**

Tabela 5: Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com bisturi ultrassônico**..... 129**

Tabela 6: Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com laser de Ti:Safira no regime de femtossegundos**..... 129**

Tabela 7: Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com laser de Er:YAG pulsado**.....129**

Tabela 8: Danos histológicos (resumo)**..... 157**

LISTA DE ABREVIAÇÕES

TFD – Terapia Fotodinâmica.

PDT – *Photodynamic Therapy*

FS - Fotossensibilizador

HpD – *Hematoporphyrin Derivate* (Derivado de Hematoporfirina)

BpD – *Benzoporphyrin Derivate* (Derivado de Benzoporfirina)

mTHPC - *m-tetrahydroxyphenylchlorin* (m-tetrahidroxifenilclorina)

cm – Centímetro (10^{-2} metro)

mm – Milímetro (10^{-3} metro)

µm – Micrômetro (10^{-6} metro)

nm – Nanômetro (10^{-9} metro)

RF – Radiofrequência

Hz – Hertz (unidade de frequência)

kHz – Quilohertz (10^{3} Hertz)

g – Grama (unidade de massa)

mg – Miligrama (10^{-3} grama)

kg - Quilograma (10^{3} gramas)

mL – mililitro (10^{-3} litro)

s – Segundo (unidade de tempo)

fs – femtossegundos (10^{-15} segundo)

min – minuto (unidade de tempo)

h – hora (unidade de tempo)

ºC – graus centigrados (unidade de temperatura)

UE – Unidade Eletrocirúrgica

BE – Bisturi Elétrico

EC - Eletrocirurgia

BU – Bisturi Ultrassônico

m/s – Metros por segundo

a.C. – antes de Cristo

MOP – Metoxipsoraleno

YAG – *Yttrium Aluminium Garnet* (Granada de Ítrio e Alumínio)

CO_2 – Dióxido de Carbono

Ti:Safira – Titanium:Safira

SGG – *Spark-gap generator*

J – Joule (unidade de energia)

mJ – Milijoule (10^{-3} Joule)

J/cm² - Joule por centímetro quadrado

W – Watt (unidade de potência, equivalente a 1J/s)

W/cm² - Watt por centímetro quadrado

µW – Microwatt (10^{-6} Watt)

LED – *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

UV – Ultravioleta (faixa do espectro electromagnético)

VIS - Visível (faixa do espectro electromagnético)

pH – Potencial hidrogeniônico

aPDT - *Antimicrobial Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana)

CIS – Cruzamento Intersistema

LDL – *Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de Baixa Densidade)

ATP – Adenosina Trifosfato

AIF - *Apoptosis Inducing Factor* (Fator Indutor de Apoptose)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

MS – Modificação de Superfície

NC – Necrose coagulativa

HI – Hemorragia Intersticial

IN – Infiltração Neutrofílica

DH – Degeneração Hidrópica

CW – *Continuous Wavelength*

CCD – *Charge-Coupled Device*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL..... 21

Referências..... 25

2 TÉCNICAS CIRÚRGICAS ABLATIVAS..... 29

2.1 Introdução..... 29

2.2 Eletrocirurgia e Unidades Eletrocirúrgicas..... 29

2.2.1 Histórico e desenvolvimento das unidades eletrocirúrgicas..... **30**
2.2.2 Princípios físicos da interação de correntes elétricas alternadas com tecidos biológicos..... **34**

2.3 Bisturis Harmônicos ou Bisturis Ultrassônicos..... 39

2.3.1 Surgimento, desenvolvimento e aplicações dos BUs..... **40**
2.3.2 Mecanismo de Interação: Cavitação ultrassônica..... **42**

2.4 Laser de Ti:Safira no regime de femtossegundos..... 44
2.4.1 Revisão da literatura sobre o uso cirúrgico do laser de pulsos ultracurtos.... **45**
2.4.2 Mecanismo de Interação: Ablação Induzida por Plasma..... **47**

2.5 Uso cirúrgico do laser de Er:YAG..... 52
2.5.1 Revisão da literatura..... **52**
2.5.2 Mecanismo de Interação: ablação térmica (termoablação)..... **55**

Referências..... 56

3 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)..... 64

3.1 Introdução..... 64

3.2 Histórico da Terapia Fotodinâmica..... 64

3.3 Características ópticas dos tecidos biológicos..... 67
3.3.1 Absorção..... **70**

3.3.2 Espalhamento..... 72

3.4 Dose de limiar de dano fotodinâmico (D_{th})..... 77

3.5 Fotossensibilizadores..... 79

3.6 Reações químicas envolvidas na TFD..... 83

3.7 Aspectos bioquímicos e mecanismos de morte celular..... 87

Referências..... 91

4 MODIFICAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE E SUBSUPERFÍCIE DE TECIDOS BIOLÓGICOS E SUA INFLUÊNCIA NA TFD..... 97

4.1 Introdução e Objetivos..... 97

4.2 Materiais e Métodos..... 98
4.2.1 Procedimentos para uso de Bisturi Elétrico..... 102
4.2.2 Procedimentos para uso de Bisturi Ultrassônico..... 103
4.2.3 Procedimentos de irradiação com laser de femtossegundos..... 104
4.2.4 Procedimentos de irradiação com laser de Er:YAG..... 106
4.2.5 Procedimento experimental para TFD..... 108
4.2.6 Análise Histopatológica..... 109
4.2.7 Microscopia Confocal de Fluorescência..... 110

4.3 Resultados..... 111
4.3.1 Microscopia Confocal de Fluorescência..... 111
4.3.2 Análise Histopatológica..... 123

4.4 Discussões..... 130

Referências..... 134

5 CONJUGAÇÃO DE EXCISÃO ELETROCIRÚRGICA E TERAPIA FOTODINÂMICA..... 136

5.1 Introdução..... 136

5.2 Materiais e Métodos..... 137

5.2.1 Estudo piloto..... 138
5.2.2 Estudo principal: parâmetros de corte e irradiação fixos..... 141

5.3 Resultados..... 144
5.3.1 Estudo piloto..... 144
5.3.2 Estudo principal: parâmetros de corte e irradiação fixos..... 150
5.3.2.1 Fluorescência macroscópica e pontual..... 150
5.3.2.2 Análise histopatológica..... 154

5.4 Discussões..... 158

Referências..... 161

6 CONCLUSÕES..... 162

ANEXOS..... 166

APÊNDICES..... 167

REFERÊNCIAS..... 176

1

Introdução Geral

A Terapia Fotodinâmica (TFD ou PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma promissora terapia alternativa no tratamento de tumores, com alta preservação do tecido sadio das vizinhanças da lesão. A técnica consiste na combinação de três fatores principais: uma fonte de luz, um fármaco fotossensível (ou fotossensibilizador) e oxigênio molecular presente nas células. Respeitando os devidos tempos farmacocinéticos, é possível atingir uma concentração preferencial de moléculas do fotossensibilizador (FS) nas células tumorais, em comparação com células sadias. Nesse ponto, com a adequada excitação óptica, a molécula atinge estados excitados que interagem com o oxigênio molecular (e outras macromoléculas), formando espécies químicas extremamente reativas e oxidativas. Como a maior ocorrência das reações fotoquímicas se dá nos locais onde se encontra o fotossensibilizador, essas espécies reativas acabam por destruir as células do tumor de forma seletiva [1,2].

Para a maioria dos protocolos de TFD é utilizada uma classe de fotossensibilizadores que são derivados de Hematoporfirina (HpD). Esses compostos, quando utilizados de forma a maximizar o volume de tecido tratado, necessitam de uma maior penetração da luz no tecido, sendo assim irradiados com fontes de radiação que emitem luz na região do vermelho (em torno de 630 nm). Essa escolha se dá pelo fato de este ser o comprimento de onda que, entre aqueles absorvidos por esses fotossensibilizadores, possui maior penetração nos tecidos biológicos. No entanto, a absorção e o espalhamento da luz nessa região pelo próprio tecido ainda é expressivo, fazendo com que a efetividade de tratamento seja de poucos milímetros [3,4].

No tratamento de tumores volumosos, existe um risco em usar a TFD como única estratégia terapêutica, uma vez que células neoplásicas das camadas mais profundas podem não sofrer o efeito fotodinâmico e, assim, podem continuar se multiplicando. Outra dificuldade no tratamento de lesões volumosas é que estas apresentam menores taxas de cura quando sujeitas à TFD [5]. Portanto, a estratégia terapêutica mais eficiente para estes casos é combinar alguma técnica cirúrgica para remover a maior parte da lesão e tratar o leito cirúrgico com terapia fotodinâmica. Assim, é possível obter a ablação total da lesão com maior preservação de tecido sadio [6,7]. No caso de um tumor altamente vascularizado, cortes cirúrgicos “frios” não são recomendados. Uma boa opção nesse caso é a utilização de bisturis eletrônicos, como bisturis elétricos (eletrocirurgia), devido à possibilidade de estes produzirem corte e coagulação (hemostasia) simultaneamente. Além disso, os bisturis eletrônicos são ferramentas já amplamente difundidas em ambulatórios e centros cirúrgicos, o que facilita a implantação de protocolos combinados de eletrocirurgia com TFD [8,9].

A Eletrocirurgia é baseada na entrega de correntes elétricas oscilantes de alta frequência (correntes RF- radiofrequência), que aquecem o tecido, via efeito Joule, a ponto de promover ablação ao contato com os eletrodos. A corrente elétrica passa através de um eletrodo de pequeno diâmetro, fazendo com que uma alta densidade de corrente elétrica seja entregue ao tecido. A água presente no interior das células atinge a temperatura de ebulição e, ao sofrer transição para a fase de vapor, faz o volume intracelular aumentar em até 1000 vezes. Neste ponto as membranas plasmáticas se rompem e, uma vez que todas as células em contato e próximas ao eletrodo sofrem o mesmo efeito simultaneamente, produz-se o corte propriamente dito. A corrente deixa o corpo do paciente através de um eletrodo de área grande (a fim de evitar queimaduras na região de contato) e retorna a fonte de corrente, fechando um circuito elétrico completo. Esse processo costuma deixar extensas camadas de tecido coagulado em regiões abaixo àquela em contato com o eletrodo, além de a superfície do tecido remanescente pós-excisão apresentar fortes modificações [10,11].

Outro tipo de bisturi eletrônico é o bisturi ultrassônico, ou bisturi harmônico. Esse tipo de bisturi funciona com uma ponta ativa que oscila em alta frequência,

geralmente na faixa entre 20 e 100 kHz. Essas vibrações são geradas por uma série de cerâmicas piezoelétricas e transmitidas à ponta do bisturi que, em contato com o tecido alvo, corta-o como um serrote. A energia das vibrações pode gerar calor e produz também a quebra de várias ligações químicas, desnaturando proteínas estruturais como o colágeno. O produto final desse processo é uma desintegração maciça de várias células na região de contato, o que produz um corte macroscópico com coagulação simultânea, porém, com uma faixa mais estreita de tecido danificado nas laterais do corte, diferindo do bisturi elétrico ou da excisão a laser [12-14].

Alguns lasers podem também produzir corte cirúrgico por meio de mecanismos de ablação. É o caso do laser de femtossegundos e do laser de Er:YAG. Os mecanismos de corte em cada caso são bastante distintos entre si. O primeiro deles é um tipo de laser que opera produzindo pulsos ultracurtos na região de femtossegundos (10^{-15} s). Os pulsos são gerados em uma cavidade ressonante que, além do aparato básico (espelhos, meio ativo, fonte de alimentação), possui moduladores eletro-ópticos (Q-Switch e Mode-Lock) que amplifica e confina a energia emitida num intervalo de tempo muito curto. O resultado desse processo são pulsos com potência de pico que podem chegar até a ordem de 10^{14} W. Assim, com a produção de altas energias em intervalos que são mais curtos que a maioria dos processos hidrodinâmicos e de interações térmicas, as interações eletrônicas são favorecidas, ionizando vários elétrons de forma localizada, o que produz um plasma induzido por laser. Esse plasma se expande e fornece energia para o tecido rapidamente, quebrando várias ligações e gerando a ablação (corte). Esse mecanismo é conhecido como “Ablação Induzida por Plasma” ou “Ablação Mediada por Plasma”. É um processo que não gera calor e a ablação é dita “fria” [15-17].

No que diz respeito ao laser de Er:YAG, este também produz ablação mas por um mecanismo bastante diferente. Esse laser emite luz num comprimento de onda na ordem de 2,94 μm, que é altamente absorvido pelo modo vibracional da água. Quando incidente em tecidos “moles”, ou seja, com alta composição de água, a absorção linear dessa energia gera um aquecimento local bastante expressivo. A partir deste ponto, o processo é muito semelhante ao bisturi elétrico, onde a vaporização da água expande o volume intracelular e a célula se rompe. Várias

células se rompendo ao mesmo tempo tem como efeito macroscópico o corte. A diferença nesse caso é que o laser, ao gerar as pequenas bolhas de vapor que explodem, gera um jato de vapor e partes do tecido lateral ao corte. Esse jato é responsável pela ejeção da maior parte do calor confinado, mas ainda assim, uma boa parte do calor fica retida no tecido adjacente ao corte, formando uma camada de células danificadas termicamente [18].

As alterações superficiais no tecido após os cortes cirúrgicos por tais técnicas influenciam tanto no acoplamento da luz no tecido quanto na propagação da mesma após penetrar o tecido alvo. Tecidos biológicos submetidos a temperaturas superiores a 45ºC sofrem efeitos de hipertermia. Já as temperaturas entre 60 e 100ºC provocam alterações em diversas estruturas celulares e biomoléculas, como o colágeno, alterando drasticamente os coeficientes de absorção e de espalhamento para os comprimentos de onda da luz visível [19]. Nesse caso, pode haver um aumento no coeficiente de extinção da luz, fazendo com que a intensidade da luz transmitida diminua rapidamente de intensidade como função da profundidade do tecido. Já as alterações de superfície podem aumentar a reflexão difusa dos comprimentos de onda irradiados. Ambos os efeitos são responsáveis por diminuir a profundidade de tratamento.

Ainda no contexto de tumores extensos, outro possível obstáculo seria a ordem em que a cirurgia, a fotossensibilização e a irradiação são aplicadas. Para que a seletividade da destruição de células via TFD seja máxima, é necessário que o efeito fotodinâmico seja eficientemente provocado após a remoção da maior parte do volume da lesão. Porém, se a cirurgia for aplicada antes da fotossensibilização e luz, as alterações patológicas pelo efeito do corte podem diminuir a capacidade de retenção do FS, o que diminuiria a eficiência da técnica. Se aplicado na ordem “fotossensibilizador + eletrocirurgia + luz”, o calor gerado pelo corte ou qualquer outro efeito colateral pode contribuir para degradar localmente a molécula do fotossensibilizador, diminuindo seu efeito na posterior aplicação de luz.

Embora algumas dessas técnicas cirúrgicas sejam extremamente comuns em centros cirúrgicos, foi notada uma carência de dados relativos ao uso combinado destas técnicas com a terapia fotodinâmica, ou sobre suas influências em fotossensibilizadores ou tecidos previamente fotossensibilizados. Alguns estudos

comparam a eficiência da eletrocirurgia e a TFD na remoção e tratamento de tumores de forma independente [20-22]. São encontrados também relatos de uso de técnicas de modificação de superfície (Lasers de CO_2, Er:YAG, microdermabrasão, etc.) para aplicação tópica de fotossensibilizadores para tratamento de câncer de pele [23-29]. Porém, o seu uso se restringe unicamente como auxiliares na penetração do agente fotossensibilizador, sem avaliar o total potencial da combinação das técnicas. Por fim, o efeito da mudança da ordem de aplicação das técnicas juntamente com a TFD ainda é uma variável não explorada na literatura atual.

Por tal razão, utilizando um modelo experimental *in vivo*, o presente estudo pretende analisar de forma sistemática o uso de técnicas cirúrgicas e TFD, avaliando o efeito destas nos tecidos sadios, em tecidos previamente fotossensibilizados, bem como a viabilidade de provocar efeito fotodinâmico no leito das lesões formadas. Além disso, pretende-se avaliar qual a melhor ordem de combinação dos protocolos. Todas as análises foram realizadas sob um ponto de vista físico de propriedades térmicas, ópticas e histopatológicas. Análises como espectroscopia de fluorescência e microscopia confocal de fluorescência também são empregadas no intuito de acompanhar a dinâmica de retenção e degradação do fotossensibilizador durante as etapas dos tratamentos propostos, além de avaliar a qualidade do tecido após o tratamento. O conjunto de todas essas análises trará novos conhecimentos a respeito de quais são as melhores estratégias, melhor excisão cirúrgica a ser combinada com a TFD e os melhores parâmetros de operação, no intuito de futuramente propor protocolos clínicos de *debulking-PDT*.

REFERÊNCIAS

1 Dougherty TJ, et al. Photodynamic Therapy. J Natl Cancer Inst **90**:889-905 (1998).

2 MacCormack MA. Photodynamic Therapy. Arch Dermatol **22**:219-258 (2006).

3 Pope AJ, Bown SG. Photodynamic Therapy. Br J Urol **1**:1-9 (1991).

4 Ferreira J, et al. Necrosis characteristics of Photodynamic Therapy in normal rat liver. Laser Phys **14**:209-212 (2004).

5 Morton CA, MacKie RM, Whitehurst C, Moore JV, McColl JH. Photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. Arch Dermatol **134**:248-249 (1998).

6 Souza CS, et al. Optimized Photodynamic Therapy with systemic photosensitizer following debulking technique for nonmelanoma skin cancers. Dermatol Surg **33**:194-198 (2007).

7 Karakullukcu B, De Boer JP. Van Veen R, Wegman J,Tan B. Surgical debulking combined with photodynamic therapy to manage residual extramedullary plasmacytoma of the nasopharynx. Photodiagnosis Photodyn Ther **8**:264-266 (2011).

8 Bovie WT. New electro-surgical unit with preliminary note on new surgical-current generator. Surg Gynecol Obstet **47**:751-752 (1928).

9 Medtech Insight. US Surgical Procedure Volumes. Medtech Insight LLC Report No A606:1-2 (2007).

10 Brown DB. Concepts, considerations, and concerns on the cutting edge of radiofrequency ablation. J Vasc Intervent Radiol **16**:597-613 (2005).

11 Palanker D, Vankov A, Jayaraman P. On mechanisms of interaction in electrosurgery. New J Phys **10**:2-15 (2008).

12 Payne, Jr JH. Ultrasonic dissection. Surg Endosc **8**:416—418 (1994).

13 Wakako R, Hashimoto M. Development of ultrasonically activated bending scalpel for endoscopic surgery. Proceedings of IEEWRSJ:1415-1420 (2002).

14 Minutolo V, et al. Usefullness of the ultrasonically activated scalpel in laparoscopic cholecystectomy: our experience and review of literature. G Chir **29**:242-245 (2008).

15 Loesel FH, et al. Non-thermal ablation of neural tissue with femtosecond laser pulses. Appl Phys B **66**:121–128 (1998).

16 Stern D, et al. Corneal ablation by nanosecond, picosecond, and femtosecond lasers at 532 and 625 nm. Arch Ophthalmol **107**:587–592 (1989).

17 Frederickson KS, White WE, Wheeland RG, Slaughter DR. Precise ablation of skin with reduced collateral damage using the femtosecond-pulsed, terawatt titanium-sapphire laser. Arch Dermatol **129**:989–993 (1993).

18 Walsh Jr JT, Flotte TJ, Deutsch TF. Er:YAG laser ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. Lasers Surg Med **9**:314-326 (1989).

19 Carruth JAS, Mackenzie AL. Medical Lasers. Bristol, Adam Hilger Ltd. (1986).

20 Ceiley RI, Del Rosso JQ. Current modalities and new advances in the treatment of basal cell carcinoma. Int J Dermatol **45**:489-498 (2006).

21 McIntyre WJ, Downs MR, Bedwell SA. Treatment options for actinic keratosis. Am Family Physician **5**:667-671 (2007).

22 Olson JM, Alam M, Asgari MM. Needs assessment for general dermatologic surgery. Dermatol Clin **30**:153-166 (2012).

23 Shokrollahi K, Marsden NJ, Whitaker IS, James W, Murison MSC. Basal cell carcinoma treated successfully with combined CO_2 laser and photodynamic therapy in a renal transplant patient: a case report. Cases J **2**:7920 (2009).

24 Šmucler R, Vlk M. Combination of Er:YAG laser and photodynamic therapy in the treatment of nodular basal cell carcinoma. Lasers Surg Med **40**:153-158 (2008).

25 Lee W-R, et al. Microdermabrasion as a novel tool to enhance drug delivery via the skin: an animal study. Dermatol Surg **32**:1013-1022 (2006).

26 Thissen MRTM, Schroeter CA, Neumann HAM. Photodynamic therapy with delta-aminolevulinic acid for nodular basal cell carcinomas using a prior debulking technique. Br J Dermatol **142**:338-339 (2000).

27 Fang J-Y, Lee W-R, Shen S-C, Fang Y-P, Hu C-H. Enhancement of topical 5-aminolevulinic acid delivery by Er:YAG laser and microdermabrasion: a comparison with iontophoresis and electroporation. Br J Dermatol **151**:132-140 (2004).

28 Shen S-C, Lee W-R, Fang Y-P, Hu C-H, Fang J-Y. *In vitro* percutaneous absorption and *in vivo* protoporphyrin IX accumulation in skin and tumors after topical 5-aminolevulinic acid application with enhancement using an Er:YAG laser. J Pharm Sci **95**:929-938 (2006).

29 Whitaker IS, Shokrollahi K, James W, Lohana P, Murison MC. Combined CO_2 laser with photodynamic therapy for the treatment of nodular basal cell carcinomas. Ann Plast Surg **59**:484-488 (2007).

2

Técnicas Cirúrgicas Ablativas

2.1 Introdução

Diante do objetivo do presente estudo, esta sessão se deterá em uma introdução breve às técnicas utilizadas. As técnicas de corte como bisturis eletrônicos (elétrico e harmônico), laser de Er:YAG e laser de Ti:Safira no regime de femtossegundos serão apresentadas seguindo um breve histórico do surgimento e desenvolvimento das técnicas, dando enfoque especial ao princípio físico de seus mecanismos de interação com tecidos biológicos.

No capítulo 3 apresentaremos a técnica da terapia fotodinâmica sob um ponto de vista semelhante, desde o seu surgimento até o atual estado da arte, dando enfoque às características físicas e bioquímicas da técnica. Entender como funciona em detalhe cada uma das ferramentas de corte e seus mecanismos de interação, neste capítulo e no próximo, são peças fundamentais para a compreensão e análise dos capítulos 4 e 5, onde são apresentados resultados experimentais do uso dessas técnicas combinadas em um modelo animal.

2.2 Eletrocirurgia e Unidades Eletrocirúrgicas

Esta seção dedica-se a descrever uma das técnicas cirúrgicas mais difundidas em centros médicos: a eletrocirurgia. Será dada atenção especial aos detalhes do funcionamento de unidades eletrocirúrgicas (UEs), conhecidas popularmente como

bisturis elétricos ou bisturis eletrônicos (BEs). Frequentemente é encontrada, na literatura internacional, uma referência aos BEs os chamando de *Bovie*s, fazendo referência ao pesquisador para quem é creditado a construção e o teste *in vivo* da forma atual das UEs.

2.2.1 Histórico e desenvolvimento das unidades eletrocirúrgicas

A técnica de cauterização é conhecida há muitos séculos pelo ser humano. Relatos pré-históricos indicam que o homem já usava pedras aquecidas no seu dia-a-dia com o intuito de produzir efeitos hemostáticos. Com o passar dos séculos esse efeito foi aprimorado das mais diversas formas, como no uso de ferros aquecidos na era medieval para cauterizar ferimentos, até chegar ao que hoje conhecemos por eletrocautério: o uso de eletricidade na Medicina com a finalidade de produzir efeitos de cauterização ou hemostáticos.

Pode-se dizer que para o desenvolvimento inicial do eletrocautério, foram necessários desenvolvimentos e descobertas em dois campos distintos da ciência: Eletromagnetismo e na Eletrofisiologia. No início do século XIX, uma série de descobertas levou ao uso da eletricidade na Medicina. Esse desenvolvimento é geralmente dividido em três fases. A primeira fase é a que compreende a descoberta e o subsequente uso da eletricidade estática. A duração desse período é indeterminada pela falta de relatos consistentes com relação ao seu uso médico, embora a eletrostática seja bastante conhecida há vários séculos. A segunda fase é comumente conhecida como Galvanização, em alusão ao cientista Luigi Galvani e sua descoberta, datada de 1786. Em sua própria residência, Galvani suspendeu alguns sapos usando ganchos de cobre, que por sua vez prendiam-se em balaústres de ferro. Ao polir o balaústre, ele observou espasmos nas pernas dos sapos. Esse experimento deu origem ao campo de estudo da Eletrofisiologia. A terceira fase inicia-se em 1831 com as descobertas do Eletromagnetismo por Henry e Faraday [1].

O século XIX marca o início do desenvolvimento acelerado das teorias ligadas à eletricidade e da engenharia de dispositivos com funcionamento baseado em seus princípios. Em 1827, o trabalho de Ohm [2] estabelece pela primeira vez a relação entre correntes elétricas e o potencial elétrico aplicado num material condutor. Pouco mais tarde, Michael Faraday publica seu trabalho sobre a indução eletromagnética. Trabalhos contemporâneos como o de Ampère e outros cientistas levaram, em 1873, à forma moderna das teorias clássicas do Eletromagnetismo. O trabalho de James Clerk Maxwell, constituído na forma de quatro leis – as leis de Maxwell [3] – constitui-se na forma atual das leis físicas que descrevem os fenômenos eletromagnéticos e eletrodinâmicos. Além disso, foi com o minucioso desdobramento da teoria de Maxwell que se tornou possível entender a natureza eletromagnética da luz.

Em paralelo, a Engenharia Elétrica desenvolveu-se de forma acelerada, impulsionada pela Revolução Industrial. Esses avanços levaram ao desenvolvimento do rotor elétrico [4], que acabou levando ao gerador elétrico industrial. Posteriormente, Elihu Thompson criou o gerador de correntes elétricas alternadas, chegando a testá-lo em si mesmo [5].

Com isso, tornou-se possível a alimentação e o desenvolvimento dos mais diversos dispositivos eletrônicos. Em 1891, o francês Jacques Arsene d'Arsonval iniciou uma série de testes em seres humanos voluntários. Seus estudos mostraram que as correntes aplicadas com frequência acima de 10 kHz falharam em provocar resposta neuromuscular espasmódica [6,7]. Esse efeito já era conhecido desde 1881 por Morton, porém, para uma frequência igual ou superior a 100 kHz [8]. Além disso, d'Arsonval observou que o uso de tais correntes era acompanhado por um aumento tanto no consumo de oxigênio como de um aumento na temperatura local diretamente proporcional ao quadrado da densidade de corrente elétrica.

Ainda na década de 1890, outros cientistas experimentaram aparatos levemente modificados da versão de d'Arsonval. Oudin relatou a geração de um spray de descargas elétricas, que partiam do eletrodo sem contato direto com o tecido alvo, que causaram destruição superficial de tecido biológico [9]. Em 1897, Franz Nagelschmidt realizou a descoberta de que pacientes com problemas circulatórios e articulares poderiam se beneficiar da passagem de correntes elétricas locais

geradas pelo aparato de Oudin. Esse fenômeno foi denominado por ele como *diatermia*.

Na virada do século, o físico francês Joseph Rivière observou o mesmo fenômeno descrito por Oudin, onde as descargas elétricas haviam causado coagulação de tecido da pele. Ele se utilizou desse fenômeno posteriormente para tratar uma úlcera (provavelmente um carcinoma de célula escamosa) localizada no dorso da mão, usando um gerador de faíscas elétricas [10]. Os anos seguintes foram marcadas pelo uso do spray de descargas elétricas para o tratamento de lesões de pele, da cavidade oral, bexiga, hemorroidas e na coagulação de alguns tumores altamente vascularizados. Esse gerador de descargas elétricas (faíscas) emitidas no espaço livre entre o eletrodo e o tecido biológico é denominado de *spark-gap generator* (SGG).

No ano de 1907, Pozzi utilizou-se do SGG para gerar correntes elétricas de alta voltagem, alta frequência e baixa corrente para o tratamento de tumores de pele. No uso de tais correntes, foi observada a carbonização superficial do tecido alvo, a qual ele denominou de *fulguração* [11]. Dois anos mais tarde, Doyen aprimorou a técnica de Pozzi adicionando um segundo eletrodo ao sistema com função passiva no sistema, descarregando a eletricidade estática fazendo com que ela retornasse ao aparato eletrocirúrgico, fechando um circuito junto com o paciente. Com isso, Doyen observou que a corrente entregue penetrava mais profundamente no tecido, resultando em um vasto volume de tecido coagulado com o uso de baixas voltagens. Esse processo foi denominado por ele de *eletrocoagulação* [12]. Esse mecanismo de interação entre correntes elétricas e tecidos, por sua natureza *bipolar* e de baixa voltagem, abriu a possibilidade de tornar os instrumentos eletrocirúrgicos compactos, por “reutilizar” uma parte da corrente elétrica entregue. Nos dias atuais, o termo bipolar está ligado às UEs em que a peça de mão contém ambos os eletrodos (o ativo, de entrega de corrente, e o neutro que coleta a corrente de volta ao gerador). Nesse caso há pouca dispersão da corrente para camadas mais profundas do tecido, reduzindo os efeitos colaterais ligados à sua passagem. Os dispositivos em que o eletrodo neutro é uma placa dispersiva posicionada longe da região de ação são chamados de monopolar, pois a peça de mão contém apenas um dos eletrodos (o ativo).

No intuito de produzir efeitos menos drásticos e mapear um diferente mecanismo de interação eletrofisiológica, William Clark modificou levemente o dispositivo Nagelschmidt de múltiplas descargas. O dispositivo modificado produzia uma única descarga por vez, ainda numa configuração monopolar. Além disso, foram aplicadas voltagens baixas e com amperagens maiores. Com isso, Clark produziu descargas mais suaves do que as descargas espessas e de longa duração do seu antecessor. Fazendo uma análise histopatológica do tecido tratado, ele observou um encolhimento do tecido por desidratação, sem formar camada superficial carbonizada. Esse processo foi denominado por Clark de *dissecação* [13] e passou a ser largamente utilizado por ele no tratamento de tumores de pele, cabeça, pescoço, mama e cervical.

O cenário necessário para o desenvolvimento das UEs da forma que conhecemos hoje fica completo com o trabalho de George A. Wyeth, ainda no início da década de 1920, no qual ele usou correntes elétricas para produzir efeitos de corte. Em seu trabalho, Wyeth usou um tubo de raios catódicos para produzir efeitos de corte em tecidos biológicos, dando a ele o nome de “faca endotérmica” e a técnica de “endotermia eletrotérmica”. Segundo a visão de Wyeth, esse processo trazia inúmeras vantagens em comparação com as cirurgias convencionais, pois, selava vasos sanguíneos e linfáticos, que também contribuíam para o processo de disseminação metastática [14,15].

Com as condições necessárias, William T. Bovie, um físico da Universidade de Harvard, construiu em 1926 a primeira unidade eletrocirúrgica adaptável para salas de cirurgia convencionais. Seu dispositivo combinava conceitos trabalhados por seus antecessores, gerando correntes elétricas que ofereciam tanto a função de corte como as de coagulação e dissecação num único aparelho compacto [16]. Esse dispositivo chamou a atenção de Harvey Cushing, neurocirurgião que acompanhava vários pacientes com tumores considerados inoperáveis, ou operáveis com grande mortalidade. Ao usar o dispositivo desenvolvido por Bovie, Cushing conseguiu remover, em 1926, um mieloma cerebral crescente em um paciente de 64 anos [17]. A partir desse marco, Cushing passou a operar um maior número de tumores cerebrais no intuito de produzir cortes e estabilizar hemorragias simultaneamente.

Além de aumentar a sua operabilidade, a taxa de mortalidade pós-operatória caiu drasticamente, estabelecendo o sucesso da técnica [8,9].

A contribuição de William Bovie para o campo da eletrocirurgia atingiu nos anos seguintes outras áreas além da neurocirurgia oncológica de Cushing, tomando espaço em quase todas as áreas cirúrgicas da Medicina. Assim, as UEs que surgiram nos anos que se seguiram eram apenas versões desse aparato de sucesso, que acabaram recebendo o apelido de “bovie”.

Os dispositivos e UEs descendentes do aparato de Bovie ganharam poucas modificações após essa primeira versão, como na geometria de eletrodos e em correntes que provocam efeitos mistos. A subseção seguinte descreve o mecanismo de interação entre as correntes elétricas em RF e tecidos.

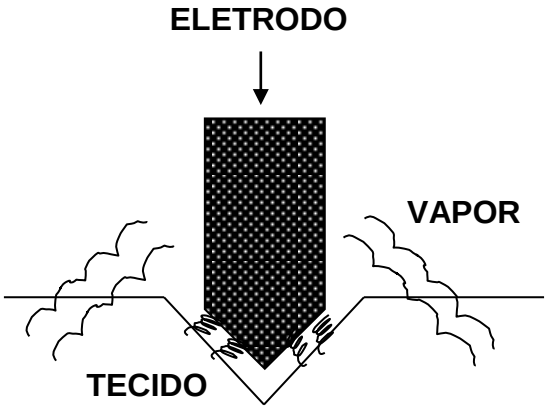
2.2.2 Princípios físicos da interação de correntes elétricas alternadas com tecidos biológicos

Em termos gerais, a eletrocirurgia é uma técnica cirúrgica de excisão tecidual. A técnica consiste na disposição de eletrodos que aplicam diferenças de potencial elétrico (DDP) sistemáticas, promovendo a entrega de correntes elétricas moduladas de alta frequência (em geral, acima de 120 kHz). A passagem de tais correntes elétricas promove o aquecimento local no tecido por efeito Joule. O tecido rapidamente atinge a temperatura de 100°C que, sendo esta a temperatura de vaporização da água, faz com que se forme vapor intracelular, expandindo rapidamente o volume da célula e, por fim, fazendo com que a membrana celular se rompa. Uma vez que a entrega dessa corrente elétrica é feita por eletrodos de extensões macroscópicas, ocorre a ruptura de um número expressivo de células (ablação). A massificação desse efeito no ponto de contato do eletrodo e suas proximidades é o corte macroscópico propriamente dito (Figura 1).

Pelo fato de a ablação ocorrer por meio da geração de calor local, boa parte deste difunde-se para camadas de tecido subjacentes àquelas em contato com o eletrodo. Este fato produz um gradiente de temperatura que se estende por várias

camadas de tecido, causando efeitos de hipertermia e coagulação. Para melhor entender os efeitos patológicos causados pela passagem de correntes elétricas em tecidos biológicos, é necessário descrever fisicamente os fenômenos ocorridos e seus efeitos colaterais, ligados à geração de calor.

Figura 1 - Representação da ablação tecidual por meio de um bisturi elétrico.



Fonte: Autor, 2013.

Usaremos como modelo uma unidade eletrocirúrgica (UE) monopolar que produza correntes elétricas de diversos tipos. Como sabemos, esse tipo de unidade eletrocirúrgica é composta de um eletrodo ativo e um extenso eletrodo dispersivo em contato com o paciente e longe da região de tratamento. Assim, uma diferença de potencial e um campo elétrico são definidos através do paciente, e os elétrons provenientes do eletrodo ativo se aprofundam nas camadas de tecido até atravessarem o corpo do paciente, no sentido do campo estabelecido, até serem coletados pelo eletrodo dispersivo. Por esta razão, o dano histológico provocado pela corrente elétrica de um dispositivo monopolar é mais profundo quando comparado a dispositivos bipolares. Assim, as densidades de corrente se dispersam menos, produzindo densidades de corrente elétrica de maior módulo por um caminho maior.

O termo **corrente elétrica** define o movimento ordenado de portadores de carga elétrica, numa direção e sentido predominante, em um meio específico, pela ação de um campo elétrico externo. Neste contexto, podemos classificar as

correntes elétricas como sendo de dois tipos, em relação aos portadores de carga. No caso de um metal, por exemplo, os portadores de cargas elétricas são elétrons. Quando não especificado, entende-se por corrente elétrica aquela exclusivamente formada por elétrons. Em geral, é esse tipo de corrente que experimenta os efeitos da resistência elétrica quando atravessa um meio, gerando calor por efeito Ohm.

Correntes elétricas podem ser observadas ainda em soluções iônicas, por conta da ação do campo elétrico sobre os íons. O módulo e o sentido da densidade de corrente dependem, nesse caso, da massa do íon e o do sinal de sua carga elétrica. Assim, podemos definir o conceito de *corrente iônica*. Esse tipo de corrente é extremamente importante para a execução de algumas funções das células, como a transmissão de impulsos elétricos nos neurônios e células musculares, ou na bomba de sódio e potássio. É por esse motivo que o estabelecimento de campos elétricos externos pode alterar as correntes iônicas fundamentais em tecidos biológicos, produzindo diversos estímulos (como os espasmos musculares) e influenciando processos a níveis celulares e histológicos. Esses efeitos são o objeto de estudo de Eletrofisiologia e, na maioria das vezes, não produzem danos estruturais permanentes.

Diante do contexto do atual trabalho de tese, o foco da discussão aqui se manterá na descrição dos efeitos colaterais ligados especificamente à geração de calor. Isto se dá, principalmente, por ser o dano térmico o principal responsável pelas mudanças estruturais permanentes num tecido biológico sujeito à ação eletrocirúrgica. Tais efeitos são drásticos a ponto de serem observados macroscopicamente (desnaturação do colágeno, desidratação, carbonização, etc.). Assim, partimos da hipótese de que essas alterações influenciam diretamente na retenção do fotossensibilizador (caso a célula torne-se inviável) e na transmissão de luz (por conta da variação das propriedades de espalhamento e absorção da mesma), vindo a comprometer um posterior protocolo de terapia fotodinâmica.

Os tecidos humanos são formados por células em estruturas específicas, como membranas celulares e citoplasma. A membrana celular funciona eletricamente como um capacitor, contribuindo para a chamada **bioimpedância**. A maior parte do material celular e extracelular é composta de água que, em conjunto com eletrólitos, contribuem para uma maior condutividade elétrica. Podemos também supor, numa

aproximação rude, que os tecidos biológicos sejam homogêneos. Assim, podemos considerar que os tecidos biológicos são condutores, homogêneos, e possuem uma resistência elétrica não desprezível. Assim, o calor gerado pela passagem de correntes eletrocirúrgicas é calculado segundo a lei de Ohm e a energia dissipada pode ser relacionada com a variação de temperatura através de uma relação calorimétrica simples.

A quantidade de calor fornecida para o aquecimento do tecido é aquela gerada pela resistividade elétrica do tecido (*r*). Essa resistividade é, em termos físicos, o inverso da condutividade elétrica (σ). Assim, a resistência elétrica *R* do tecido biológico é dada como sendo:

$$R = r.\frac{l}{A} = \frac{l}{\sigma.A} \qquad (Eq.\ 1)$$

Na equação acima, a resistência é calculada em um setor do tecido equivalente a um cilindro de extensão *l* e seção transversal *A*. A potência dissipada por um resistor desse tipo pode ser calculada através da expressão $P = R.i^2$, onde P é a potência dissipada e *i* é a corrente elétrica. Sabemos que a corrente elétrica é proporcional ao fluxo de corrente, que é calculada como o produto interno entre os vetores densidade de corrente elétrica ($\vec{J}$) e o vetor área ($\vec{A}$), quando a densidade de corrente é constante ao longo da seção transversal de área *A*:

$$i = \vec{J} \cdot \vec{A} \qquad (Eq.\ 2)$$

Tomando o caso simples onde esses vetores sejam paralelos entre si, podemos dizer que, em módulo, temos que $i = J.A$. Assim, a potência dissipada seria dada finalmente por:

$$P = Ri^2 = \frac{l}{\sigma A}.(J^2A^2) = \frac{J^2 lA}{\sigma} \qquad (Eq.\ 3)$$

$$P = \frac{J^2 V}{\sigma} \qquad (Eq.\ 4)$$

Onde assumimos que a potência é gerada pelo volume do resistor (*V*), que no nosso caso é o próprio tecido biológico, que por sua vez é o produto da extensão *l* pela área da seção *A*. O calor total gerado (*Q*) é a energia total dissipada pelo resistor, dado pelo produto da potência pelo tempo de exposição (*t*) à corrente eletrocirúrgica. Assim:

$$Q = P.t = \frac{J^2 V t}{\sigma} \qquad (Eq.\ 5)$$

Substituindo essa expressão na expressão calorimétrica, temos que a variação de temperatura experimentada pelo tecido é:

$$\Delta T = \frac{Q}{mc} = \frac{J^2 V t}{\sigma m c} \qquad (Eq.\ 6)$$

,

onde $\Delta T = T\text{-}T_0$ é a variação de temperatura, *m* é a massa de tecido aquecida e *c* sua capacidade térmica, que é muito próxima do valor da água. Podemos simplificar a expressão acima considerando que o tecido possui uma densidade de massa $\rho = m/V$. Assim, chegamos a:

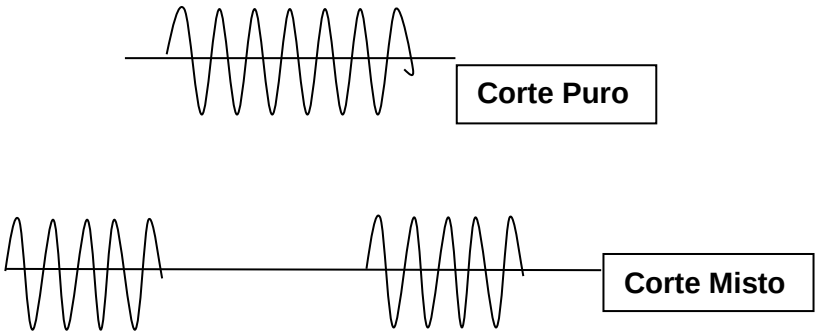
$$T - T_0 = \frac{1}{\sigma \rho c} J^2 t \qquad (Eq.\ 7)$$

A expressão acima é mais indicada no caso que estudamos, pois envolve um maior número de propriedades constantes inerentes ao tecido (condutividade elétrica, densidade de massa e capacidade térmica). Além disto, as variáveis ΔT e *t* são perfeitamente mensuráveis experimentalmente. Essa expressão é mais indicada quando o tipo de eletrodo é o monopolar [18].

Uma característica importante das correntes das unidades eletrocirúrgicas é seu aspecto temporal. Além da frequência natural de oscilação da corrente, esta corrente pode ser entregue de forma contínua ou em forma de pacotes de onda. No primeiro caso, o aquecimento provocado é contínuo: o calor gerado faz o ponto de contato estar sempre a altas temperaturas, produzindo corte puro. Quando a corrente é

entregue em forma de pulsos, a corrente produz corte durante a interação e, no intervalo entre os pulsos, a temperatura decai formando um transiente. Nessa fase, o tecido é submetido a temperaturas entre 60 e 100 ºC, produzindo também o efeito de coagulação. Nessas condições temos o corte misto. A figura 2 representa essas duas condições.

Figura 2 - Formas de onda do corte puro e do corte misto.



Fonte: Autor, 2013

2.3 Bisturis Ultrassônicos ou Harmônicos

Uma tecnologia mais recente do que os bisturis elétricos são os conhecidos bisturis harmônicos ou bisturis ultrassônicos (BUs). Esse tipo de bisturi, embora seja alimentado por eletricidade e também considerado um bisturi eletrônico, não tem seu princípio de interação baseado em eletricidade, e sim no atrito. Ao contrário dos bisturis elétricos, ele provoca corte e coagulação com danos colaterais mínimos aos tecidos adjacentes, tornando-o um forte candidato para cortes cirúrgicos em locais delicados, onde o comprometimento da vizinhança do corte é crucial.

A seguir apresentaremos um breve histórico do desenvolvimento desta técnica de excisão, também conhecida como excisão ultrassônica, passando por suas aplicações e descrevendo detalhadamente o mecanismo de interação com tecidos biológicos.

2.3.1 Surgimento, desenvolvimento e aplicações dos BUs

Por “ultrassom” entende-se a classe de ondas que estão acima do limite superior audível ao ser humano, onde as frequências audíveis estão entre 20 Hz a 20 kHz.

A história do ultrassom inicia-se muito cedo, em 1790, quando o cientista Lazzaro Spallanzani estudou o movimento de morcegos. Sua motivação estava no intrigante fato desses animais conseguirem mover-se precisamente no escuro, inclusive achando suas presas. Em seu experimento, ele percebeu que apenas privando os morcegos de sua audição comprometia seus movimentos, fazendo-os bater em obstáculos a sua frente. A ideia de que os morcegos utilizavam som em frequências inaudíveis para os seres humanos com a finalidade de se moverem foi recebida de forma negativa pela comunidade científica da época [19].

Anos mais tarde, em 1826, o físico e engenheiro suíço Jean-Daniel Colladon realizou um experimento para medir a velocidade do som na água [20]. Em um lago, com a ajuda do matemático Charles-François Sturm, posicionou um sino de igreja embaixo d’água e separam-se a uma distância de 10 milhas. Ao tocar o sino, ele ateou fogo em um pouco de pólvora para que, do outro lado do lago, seu companheiro iniciasse a cronometragem do tempo até que o som fosse coletado por um instrumento parecido com um trompete. A velocidade do som medida na água, de 1435 m/s, é um valor muito próximo do hoje estabelecido.

Após essa fase, outras descobertas levaram ao aprimoramento na detecção do ultrassom. Em 1880, Jacques e Pierre Curie descobriram a relação existente entre voltagem e pressão em um material cristalino, conhecido como efeito piezoelétrico [21]. Era o início do desenvolvimento dos transdutores. Em 1918, Paul Langevin (aluno de doutorado de Currie), durante a primeira guerra mundial, utilizou o efeito piezoelétrico para emitir ultrassom e coletar seu eco embaixo d’água [22]. Sua motivação era a localização de icebergs para evitar acidentes. Essa tecnologia foi um grande impulso para o uso de ultrassom como método diagnóstico nos anos que seguiram. Também foi largamente utilizada durante a Primeira Guerra Mundial com finalidade bélica de localizar frotas inimigas, que futuramente deu origem também aos sonares.

Os anos se passaram e a tecnologia para produzir sons e vibrações acima do limite audível se estabeleceu. Além disso, os transdutores foram aprimorados para que pudessem detectar de forma satisfatória tais ondas. Foi então que o médico austríaco Karl Theorore Dussik, ainda na década de 30, iniciou suas investigações a respeito do uso de tal tecnologia na detecção de tumores cerebrais. Em 1942, Dussik publicou o primeiro trabalho do uso do ultrassom como ferramenta diagnóstica em medicina [23], técnica que futuramente ele nomeou de hiperfonografia [24,25]. Ele patenteou a técnica [26] e prosseguiu seus estudos aplicando a técnica para o diagnóstico de doenças como artrite e esclerose múltipla [27, 28]

Anos mais tarde, com o uso do ultrassom bem estabelecido para fins diagnósticos, surgiram os primeiros trabalhos relatando o seu uso como técnica cirúrgica. Em 1967, Kelman iniciou a utilização de um transdutor ultrassônico para tratamento de cataratas, em um procedimento conhecido hoje como **facoemulsificação**. O procedimento consiste em desintegrar, com o uso do ultrassom, a parte doente do olho diagnosticada com a doença. O fluido resultante é aspirado do local da cirurgia por um segundo instrumento ligado a uma bomba. Em 1969 ele publicou seu primeiro trabalho sobre o tema [29] e em 1973 ele já havia tratado mais de 500 casos com esta técnica. O termo facoemulsificação pode ser interpretado como uma **dissecção ultrassônica** específica das lentes do olho humano. Ainda hoje, esse método é aplicado na cirurgia de cataratas.

O efeito da dissecção ultrassônica passou a ser largamente utilizado em outros procedimentos, como na remoção de tumores. Em 1978, Flamm e Ransohoff utilizaram uma versão mais potente do aparato de Kelman, porém baseando-se no mesmo princípio, para a remoção de tumores cerebrais [30]. Simultaneamente, Hodgson e colaboradores usaram a técnica de dissecção ultrassônica para fulgurar um tumor retal, além da remoção de um adenoma viloso [31]. Os autores demonstraram surpresa do controle de hemorragia em todas as etapas do procedimento, o que torna o procedimento mais seguro e economicamente mais acessível. Nos anos que se passaram, a técnica foi utilizada para procedimentos de biópsia em locais como fígado, baço, estômago, pulmão e rins, pois não comprometia o tecido no leito da lesão removida.

Outras aplicações para a técnica nos anos que se seguiram foram realizadas pelo próprio Hodgson: corte transversal de pâncreas [32], além de 11 procedimentos em fígado, 12 dissecções extensas na região de cabeça e pescoço, além de cinco fulgurações de cânceres no reto, todos com resultados satisfatórios [33]. As aplicações que envolvem cortes precisos do tecido biológico são possíveis quando a ponta de contato da peça de mão tem dimensões pequenas, provocando a ruptura da estrutura de células e tecidos numa pequena região. Assim, a técnica da dissecção ultrassônica estabeleceu-se como efetiva na produção de cortes cirúrgicos, onde o efeito de coagulação está presente. Porém, como as temperaturas atingidas são pequenas, o comprometimento da vizinhança do corte é mínimo. Dessa forma, as aplicações da dissecção ultrassônica atualmente se concentram em procedimentos cirúrgicos que necessitam de um alto controle hemostático além de baixo comprometimento da vizinhança da lesão no local do corte [34-37].

Outra vantagem do uso dos bisturis ultrassônicos é que, ao contrário do bisturi elétrico, não há o estabelecimento de um campo eletromagnético através do corpo do paciente. Essa característica é fundamental em procedimentos com pacientes que possuem marca-passo, uma limitação dos BEs. Por conta desta característica, é fácil encontrar aplicação de BUs em cardiologia [38]. A seguir, veremos em detalhes o princípio físico que permite os cortes cirúrgicos com BUs: a cavitação ultrassônica.

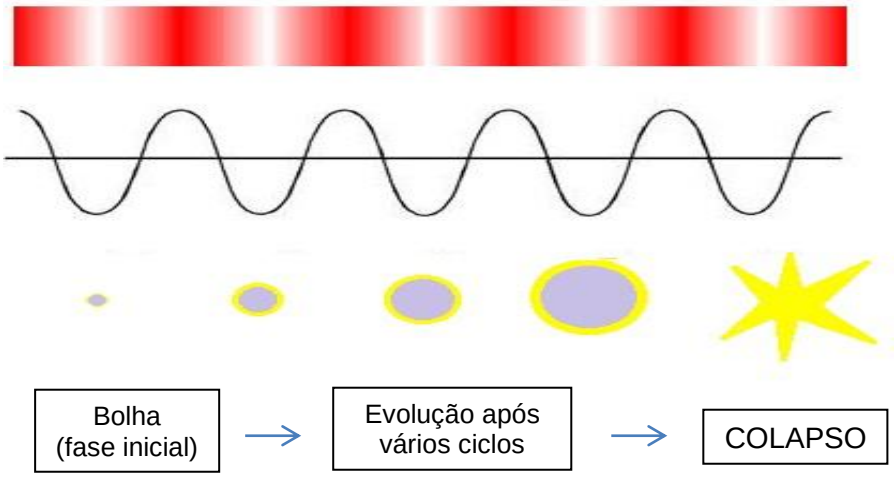
2.3.2 Mecanismo de Interação: Cavitação ultrassônica

O princípio da cavitação ultrassônica baseia-se na resposta que um meio material (no nosso caso, um tecido biológico) apresenta quando ondas sonoras de alta frequência e intensidade passam por ele. Ondas sonoras são ondas longitudinais formadas por oscilações na pressão do meio. Por esse motivo ela é uma onda mecânica que necessita de um meio para se propagar, diferente das ondas eletromagnéticas (como por exemplo, a luz). Quando uma onda sonora atravessa, por exemplo, o ar, as suas moléculas se comprimem numa região do espaço quando a pressão transmitida pela onda sonora está no ponto máximo, ou

pico, e se dispersam dessa mesma região quando a onda está no mínimo de pressão, conhecido também como fase de rarefação.

Transdutores piezoelétricos são capazes de vibrar em frequências acima de 20 kHz. Quando em contato com o tecido biológico, essas vibrações são transferidas e se propagam em forma de ultrassom. O efeito provocado, nesse caso, é o de compressão e rarefação das estruturas que compõem os tecidos. Se a onda for de alta intensidade, formam-se verdadeiros vazios, ou bolhas, na fase de rarefação. A resposta do meio para voltar a sua pressão original é mais lenta na fase de rarefação do que na fase de compressão, fazendo com que a bolha sobreviva por um tempo maior. Quando a intensidade da onda é muito alta, o vazio formado no tecido (bolha) não tem tempo suficiente para voltar a sua configuração original, e passa a acumular esse efeito após vários ciclos. Desta forma, uma bolha de pressão negativa se forma e cresce durante a interação com o transdutor até o ponto que essa bolha colapsa violentamente, provocando a ruptura das estruturas celulares e histológicas a sua volta (figura 3). Se a área de contato com o transdutor for grande o efeito é causado numa grande região, podendo, como no caso da facoemulsificação, formar uma grande massa de tecido desintegrado. Quando a área de contato é pequena, o efeito é provocado numa diminuta região, podendo então ser usada para ablação precisa ou corte de tecidos biológicos.

Figura 3 - Representação esquemática do processo de cavitação ultrassônica.



Fonte: Adaptado de [39].

As próximas duas seções são dedicadas a descrever dois sistemas que produzem corte cirúrgico de forma muito distinta das anteriores e que foram utilizados neste trabalho: os lasers cirúrgicos. A descrição se dedicará exclusivamente a apresentar o sistema laser de Ti:Safira, operando no regime de pulsos ultracurtos (femtossegundos), e um sistema laser de Er:YAG, operando no regime de pulsos longos (microssegundos). Esses dois sistemas provocam ablação de tecidos biológicos através de mecanismos de interação muito distintos entre si, o que também será abordado nas linhas que seguem.

2.4 Laser de Ti:Safira no regime de femtossegundos

Os lasers de pulsos ultracurtos são uma tecnologia muito mais recente se comparadas a qualquer uma das técnicas de corte apresentadas neste capítulo. O aprimoramento do laser desde o seu surgimento na década de 60 foi responsável pela pesquisa em novos materiais para confecção de meios lasers com resposta mais eficiente. Cavidades ressonantes mais aprimoradas e fontes de excitação cada vez mais poderosas, além do aprimoramento da tecnologia de moduladores eletro-ópticos, amplificadores, osciladores ópticos paralelos, entre outros, aumentou ainda mais o “espectro” de fontes de radiação laser disponíveis no mercado, diminuindo cada vez mais a duração do pulso sem que a energia por pulso fosse diminuída. O laser de Ti:Safira, formado por um cristal de Safira dopado com titânio, é um excelente meio laser para produzir pulsos ultracurtos, sendo amplamente aprimorado para trabalhar na escala de femtossegundos (10^{-15} s).

A interação com pulsos ópticos nessa escala temporal induz o surgimento e crescimento de um plasma localizado, por meio de uma avalanche de ionizações das moléculas do tecido alvo. Este plasma é responsável pela quebra de ligações e ejeção de partículas, que tem como efeito final a ablação. O uso deste laser ablação de tecidos duros dentais tem sido amplamente investigado e, mais recentemente, algumas aplicações vêm sendo estudadas para aplicação em tecidos moles.

A seguir será apresentado um breve histórico da produção de pulsos ultracurtos e das suas aplicações em Medicina e Odontologia. A subseção 2.4.2 em seguida será dedicada a detalhar um dos modelos teóricos da ablação por plasma, o modelo de Niemz, com o intuito de entender de forma mais fundamental a formação e crescimento do plasma ionizante.

2.4.1 Revisão da Literatura sobre o uso cirúrgico do laser de pulsos ultracurtos

A produção de pulsos curtos e ultracurtos na engenharia de lasers é tão antiga quanto o próprio surgimento da primeira fonte de radiação dessa natureza [40]. Este primeiro laser tinha como meio ativo um cristal de Rubi e tratava-se de um laser de três níveis, ou seja, que o número de níveis de energia do íon ativo que participava da transição laser era 3, contando com o nível fundamental. Nessa configuração, torna-se difícil manter a inversão de população para produção de um feixe de emissão contínua na saída da cavidade, fazendo com que esse primeiro laser fosse pulsado. A tecnologia para modular a saída do laser nesse caso é conhecida como *Q-Switching* (ou chaveamento-Q, em Português), pois refere-se à modulação do fator de qualidade Q inerente às cavidades ressonantes que formam os lasers. Esse método consiste em, com o uso de um dispositivo eletro-óptico, interromper a saída de luz e confinar a energia produzida durante o bombeamento, até o ponto em que haja uma saturação da população no nível metaestável. Quando a cavidade é liberada, acontece a emissão de um pulso gigante de luz. Essa tecnologia, embora eficiente, é limitada em termos da largura temporal do pulso produzido, pois o tempo de chaveamento da cavidade não poder ser superior ao tempo de vida do nível metaestável da transição laser, uma vez que isso provocaria a perda de população de estado excitado por emissão espontânea de radiação.

Outra técnica de produção de pulsos ainda mais curtos foi desenvolvida, ficando conhecida como *mode lock* (ou travamento de modos, em Português). Essa técnica consiste em favorecer apenas um modo de oscilação da cavidade ressonante, forçando com o passar do tempo que todos os fótons produzidos estejam em fase. Assim, com o auxílio de um dispositivo eletro-óptico, o pulso é liberado com uma

largura temporal da ordem do tempo de viagem do fóton entre os espelhos da cavidade, conseguindo a produção de pulsos ainda mais curtos. Ainda na década de 60, a produção de pulsos curtos já havia sido relatada para diversos meios ativos como cristais [41], semicondutores [42] e meios líquidos [43,44], além do desenvolvimento de técnicas para aumentar a energia do pulso semente, como a amplificação paramétrica [45].

Não demorou muito para que os efeitos, produzidos por lasers com pulsos de duração tão curta, fossem estudados em diversos meios. Um desses efeitos é o chamado *optical breakdown*, que consiste na ionização em avalanche em um meio por conta da exposição do mesmo a campos eletromagnéticos intensos, formando um plasma localizado. Este efeito foi inicialmente reportado em 1949 por Seitz [46] e voltou a ser explorado no contexto de pulsos curtos. Sendo a luz formada também por campos eletromagnéticos, um pulso laser extremamente intenso gera as mesmas condições para ocorrer o *optical breakdown*, e os elétrons provenientes da ionização formam um plasma localizado que provoca a ablação do material irradiado. Os detalhes desse mecanismo de interação serão apresentados mais adiante.

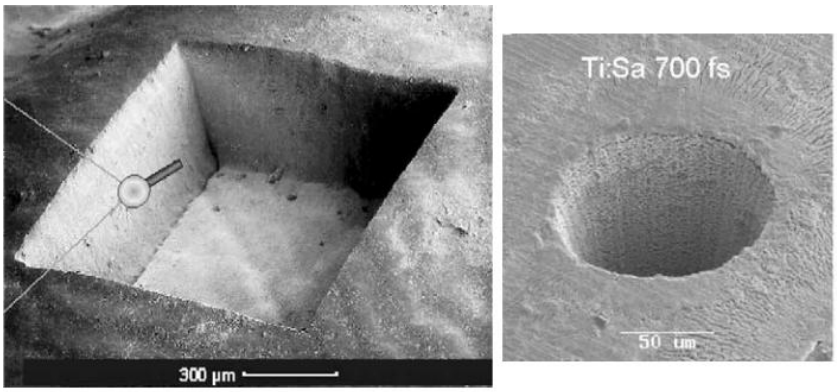
Pelo fato de provocar ablação, o efeito de *optical breakdown* foi extensamente explorado em dielétricos [47-50], se estabelecendo como uma ferramenta extremamente eficaz na microfabricação de circuitos, pois tal efeito tem dano térmico diminuto ou quase inexistente, promovendo assim cortes microscópicos extremamente precisos. Em uma época onde a tecnologia caminha para a construção de estruturas lógicas cada vez menores, essa fonte de radiação encontrou fortes aplicações na microeletrônica.

No campo das ciências da saúde, a maior parte das aplicações está voltada para a ablação de tecidos duros dentais: o fato de não provocar dano térmico ao tecido adjacente tornou-se atrativo para a possível substituição de instrumentos rotatórios convencionais que geram calor e vibrações excessivas por conta do atrito. A maior parte dos trabalhos explora as características da fonte de luz e dos parâmetros de iluminação no limiar de ablação de tecidos duros, a fim de se obter melhores taxas de remoção [51,52,54]. Recentemente, Rego-Filho e colaboradores [53] exploraram este fenômeno variando as condições de hidratação desses tecidos, possibilitando a

inclusão de um parâmetro estrutural num modelo matemático já estabelecido. Um exemplo de ablação precisa em tecidos duros dentais é mostrado na figura 4.

No entanto, o uso de lasers de femtossegundos para a ablação de tecidos moles também foi explorado. A maior parte dos trabalhos se concentrou na formação de plasma em água [55], córnea [56-58], pele [59,60] e fígado [61]. Nesta última, uma aplicação para a ablação por laser de femtossegundos é a produção de microfuros para aprimorar a penetração de fármacos, como o ALA utilizado para Terapia Fotodinâmica, porém com aplicação tópica e não avaliando como a mudança na ordem de aplicação do fármaco e a produção da modificação de superfície pode influenciar diretamente o protocolo de terapia fotodinâmica subsequente.

Figura 4 - Micro-crateras formadas em esmalte (esquerda) e dentina (direita) provocadas pela irradiação com laser de femtossegundos.



Fonte: [54].

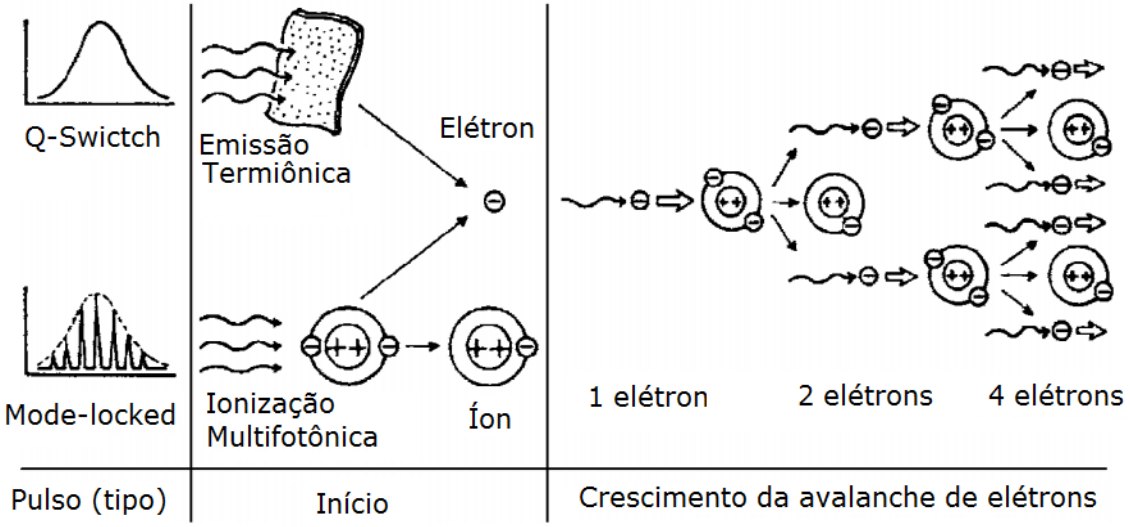
2.4.2 Mecanismo de interação: Ablação Induzida por Plasma

O fenômeno de *optical breakdown*, como mencionado anteriormente, gera o processo de ablação induzida por plasma. Este último tem suas origens nas propriedades eletrônicas do tecido irradiado e acontece quando as intensidades irradiadas são da ordem de 10^{11}-10^{14} W/cm². Nesse regime acontece a formação de um plasma induzido na superfície irradiada do tecido. Esse plasma por sua vez é

gerado a partir de um processo de ionização em avalanche. O mecanismo acontece da seguinte forma: as moléculas do tecido são ionizadas pela irradiação laser, pelo fato de o campo eletromagnético produzido ser alto o suficiente para fazer com que os elétrons saiam da banda de banda de valência para a banda de condução. O elétron que é liberado a partir dessa ionização continua a absorver energia do pulso incidente, aumentando sua energia cinética e adquirindo altas velocidades. O elétron livre de alta energia assim produzido choca-se com as moléculas de sua vizinhança, ionizando mais um elétron. Esses dois novos elétrons são excitados pelos pulsos de irradiação laser posteriores, arrancando dois novos elétrons. O processo de ionização segue então um padrão de avalanche, acumulando uma grande quantidade de elétrons na região focal, formando o plasma.

Esse plasma possui, no caso, um coeficiente de absorção muito maior que o do tecido alvo propriamente dito. Por acumular uma grande quantidade de energia incidente, o plasma transfere essa energia para as moléculas do tecido, que provoca a quebra de ligações intermoleculares e a ejeção das mesmas (transformação em energia cinética). A ionização em avalanche é representada na figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática do processo de ionização em avalanche.



Fonte: adaptado de [62].

A maior parte da energia que o plasma transfere para as moléculas é utilizada para a ejeção das moléculas do que para a quebra das ligações. Dada a natureza do processo, existem dois mecanismos distintos de ionização: um que é dado pela absorção direta da energia do feixe pelos elétrons, e um segundo que ocorre pelo impacto que esses elétrons sofrem com o tecido. O primeiro deles prevalece nos primeiros instantes da interação, quando a densidade de elétrons está em formação. Quando essa densidade torna-se expressiva, o segundo processo de ionização por impacto começa a dominar.

A natureza do processo de ablação induzida por plasma é, nesse caso, predominantemente eletrônica. Por conta da minimização de qualquer processo de origem térmica, as características do tecido remanescente após a irradiação é de qualidade altamente superior em comparação com qualquer outro Laser: a remoção tecidual é controlada, vista através de uma absoluta integridade das bordas das microcavidades geradas, com ausência de tecido que tenha sofrido fusão seguida de ressolidificação (mantendo a integridade química dos tecidos). Outra característica também observada é a diminuição do limiar de ablação no regime de pulsos ultracurtos. Isso pode ser visto como uma vantagem por conta de ser necessária uma menor quantidade de energia para promover a ablação. E ainda mais: a combinação dessas duas características gera uma vantagem combinada, que é a de ser possível a aplicação de taxas de repetições maiores que os outros lasers sem o risco de aquecimento e, dessa forma, promover ablação em taxas de remoção tecidual ainda maiores que os outros lasers comerciais convencionais.

Como no regime de pulsos ultracurtos o intervalo de interação é muito curto, processos de origem térmica ou hidrodinâmica não mais acontecem, dando lugar a processos de origem eletrônica. Isso acontece pelo fato de um pulso dessa região de operação ter um intervalo de duração muito menor do que qualquer processo de relaxação energética característico, como a transferência de energia elétron-íon e o tempo característico de relaxação térmica, proibindo assim a ocorrência de movimentações iônicas. Os átomos não têm tempo suficiente, durante o intervalo de interação, para transferir energia para os átomos vizinhos por meio de vibrações de rede. Com isso, ficam também proibidos os processos de ionização termiônica.

Assim, o processo de absorção multifotônica torna-se mais provável de ocorrer, nesse caso, provocando a ionização em avalanche.

Um dos modelos teóricos mais aceitos para explicar a ablação induzida por plasma é o modelo de Niemz [63]. Nesse modelo é possível demonstrar dependência do limiar de ablação com a largura do pulso incidente a partir de princípios básicos fundamentais, dependência essa já percebida empiricamente, porém, apenas contemplada analiticamente nesse modelo. Para isso, é proposta uma equação diferencial para demonstrar o comportamento temporal do plasma gerado. Tomamos que a partir da irradiação, podem ocorrer os seguintes fenômenos eletrônicos:

- Novos elétrons são excitados e agrupados ao plasma;
- Elétrons pertencentes ao plasma podem escapar do volume focal;
- Elétrons podem ser reabsorvidos pelo tecido adjacente ao plasma.

Assim, escrevemos a equação de taxa para a densidade de elétrons como:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \beta N(t) - \delta N(t) - \gamma N^2(t) \qquad (Eq.\ 8)$$

Onde *N(t)* é a densidade de elétrons livres do plasma, β é a taxa de ionização em avalanche, δ é a taxa de fuga de elétrons do volume focal e γ é a taxa de reabsorção de elétrons pelo tecido. O termo da esquerda da igualdade é a taxa de variação da população de elétrons do plasma, que cresce com a maior ionização (primeiro termo da equação à direita da igualdade, ou também conhecido como termo de fonte) e diminui com a fuga (difusão de elétrons, segundo termo à direita) e com a colisão e reabsorção de elétrons (último termo à direita). Considerando a população inicial de elétrons do material em t=0 como não nula e igual a N_0, chegamos a:

$$N(t) = \frac{\exp\left[\int_0^t (\beta - \delta)dt'\right]}{\frac{1}{N_0} + \gamma \int_0^t \exp\left[\int_0^{t'} (\beta - \delta)dt''\right]dt'} \qquad (Eq.\ 9)$$

A seguinte simplificação pode ser realizada:

$$\beta = \begin{cases} \eta I_0 & , se \;\; 0 \le t \le \tau \\ 0 & , outras\ regiões \end{cases} \qquad (Eq.\ 10)$$

onde η é a probabilidade de ionização e I_0 é a intensidade do campo incidente. Esta condição proposta pela equação 10 refere-se à simplificação do perfil temporal do pulso, naturalmente gaussiano, para a forma de onda quadrada. Aplicando esta condição à solução 9, podemos chegar a:

$$N(t) = N_0 \frac{e^{(\beta-\delta)t}}{1+\frac{\gamma N_0}{\beta-\delta}\left[e^{(\beta-\delta)t}-1\right]} \qquad (Eq.\ 11)$$

Assim, podemos manipular a equação acima para encontrar uma forma final para β na condição de limiar de formação do plasma. Chamando de s o parâmetro de avalanche, podemos defini-lo como na equação 12 a seguir:

$$s = \ln\left(\frac{N_{th}(t)}{N_0}\right) = \ln\left(\frac{e^{(\beta-\delta)t}}{1+\frac{\gamma N_0}{\beta-\delta}\left[e^{(\beta-\delta)t}-1\right]}\right) \qquad (Eq.\ 12)$$

$$s = (\beta-\delta)t - \ln\left(1+\frac{\gamma N_0}{\beta-\delta}\left[e^{(\beta-\delta)t}-1\right]\right) \qquad (Eq.\ 13)$$

Resolvendo, chegamos a:

$$\eta F_{th} = \frac{s}{2} + \sqrt{\left(\frac{s}{2}\right)^2 + \frac{\tau}{2\tau_c}} + \frac{\tau}{\tau_d} \qquad (Eq.\ 14)$$

Na equação acima, as constantes $\tau_c = 1/\gamma$ e $\tau_d = 1/\delta$ são os tempos característicos de reabsorção de elétrons (colisão) e de difusão. A equação acima mostra que a Fluência de limiar (F_{th}) tem dependência direta com a largura de pulso (τ), como queríamos demonstrar. Os detalhes do desenvolvimento do modelo de Niemz são mostrados no Apêndice 1 deste trabalho de tese.

Por fim, será apresentado a seguir o laser de Er:YAG, utilizado no presente estudo, seguindo um breve histórico do uso cirúrgico deste laser e, em seguida, descrito os fenômenos decorrentes de sua interação com tecidos biológicos.

2.5 Uso cirúrgico do laser de Er:YAG

A seguir, apresentaremos um laser com inúmeras aplicações em medicina e odontologia: o Laser de Er:YAG. Esse laser destaca-se por emitir laser em mais de um comprimento de onda, como em 1,5 μm, de extremo interesse para aplicações em telecomunicações. Porém, outro comprimento de onda emitido por este meio ativo é o de 2,94 μm, altamente absorvido pela água e pela hidroxiapatita, tornando-o extremamente interessante para aplicações nas áreas de saúde citadas. Apresentaremos uma breve introdução histórica do surgimento deste laser e detalhes das aplicações que esta fonte adquiriu com o passar dos anos. Em seguida, descreveremos em detalhe os mecanismos de interação que podem surgir da aplicação deste comprimento de onda.

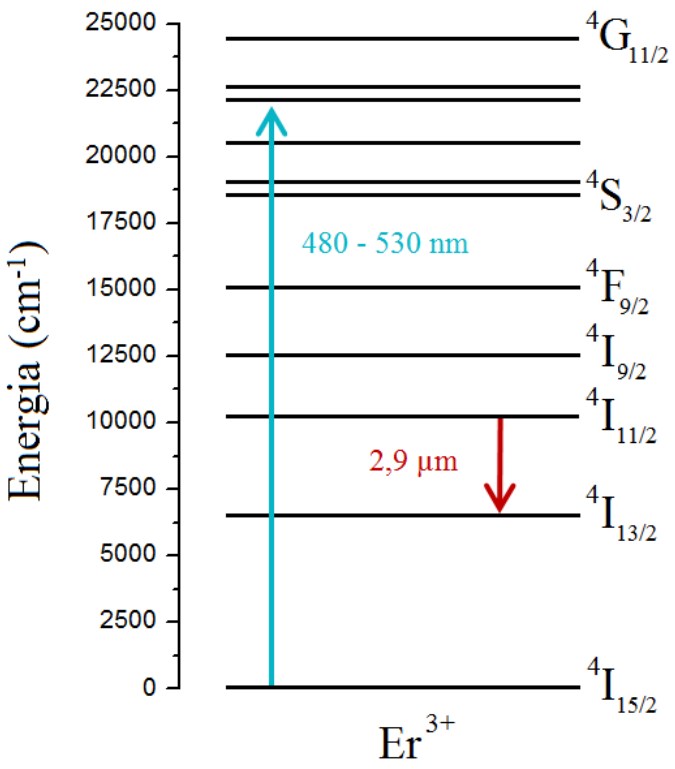
2.5.1 Revisão Literatura

O estudo de materiais vítreos e cristalinos dopados com íons terras-raras para a produção de radiação laser inicia-se ainda na década de 60, logo após a concepção do primeiro laser por Theodore Maiman [40]. O termo “terra-rara” é como também são conhecidos os lantanídeos da tabela periódica, série da qual o érbio faz parte. Por este fato, o érbio é um metal de transição interna, pois sua camada de valência

4f é blindada por uma camada já preenchida (5d). Para um átomo isolado, transições eletrônicas internas a um nível específico são proibidas, segundo as regras de seleção. Porém, devido à presença de vários termos perturbativos no hamiltoniano que dá origem às funções de onda dos níveis de energia, algumas transições internas da camada de valência passam a ser permitidas. Para o caso do íon de Érbio (Er^{3+}) imerso em uma matriz cristalina, além dos termos perturbativos referentes à interação coulombiana e ao acoplamento spin-órbita, há o termo de campo cristalino, que contribui para a distorção dos orbitais atômicos segundo a teoria de Judd-Ofelt [64,65]. Todos esses fatores tornam as transições possíveis e também com alto rendimento quântico, em certos casos. Por exemplo, em condições de alta dopagem e com o auxílio de outro terra-rara (o itérbio), pode-se atingir rendimentos quânticos altos o suficiente para gerar ação laser.

Os primeiros sistemas lasers baseados em érbio surgiram na década de 60 [66], mas em uma transição cujo comprimento de onda era próximo de 1,5 μm. Para este comprimento de onda, a maior parte das aplicações está no campo das telecomunicações, uma vez que está situado numa região do espectro eletromagnético em que as fibras ópticas de sílica apresentam baixos coeficientes de absorção óptica, apresentando assim baixas perdas de intensidade após viajar longas distâncias. Esse comprimento de onda possui também interesse médico, como verificado por Lund e colaboradores ainda no ano de 1970, para produzir ablação em córnea [67]. Nesse caso, o mecanismo de interação é a fotoablação, onde os fótons produzem tal efeito após a quebra de ligações por meio da excitação de modos vibracionais. Esse mecanismo de interação também é provocado por lasers que operam na região do ultravioleta (Excimer lasers), onde seus fótons produzem energia suficiente para quebrar tais ligações. O laser de Er:YAG emitindo nessa região ainda é estudado para este fim, porém, não abordaremos essa aplicação neste capítulo, uma vez que seu mecanismo de interação é diferente do mecanismo que ocorre no comprimento de onda de interesse do presente trabalho, em 2,94 μm. A figura 6 mostra o esquema simplificado de níveis de energia do érbio, indicando a luz de excitação quando o meio ativo é excitado por meio de uma lâmpada de flash (banda de emissão entre 480 nm a 530 nm, seta azul esverdeada), além da transição correspondente a geração de laser em 2,94 μm. Nesse esquema de excitação, o laser de Er:YAG é considerado um laser de 4 níveis.

Figura 6 - Representação esquemática dos níveis de energia do íon Er^{3+}.



Fonte: Autor, 2013.

A primeira observação de oscilação laser neste comprimento de onda data de 1975 [68]. O estudo desta emissão tornou-se de extremo interesse por sua forte absorção por um nível de energia vibracional da água, encorajando outras formas de produzir essa emissão [69,70]. Além da água, este laser é também fortemente absorvido pela hidroxiapatita: o principal componente mineral dos tecidos duros humanos (esmalte, dentina, osso, etc.). Estes tecidos duros, além da parte mineral, possuem grande composição de água na sua maioria, o que o torna um laser extremamente eficiente para interagir com esse tipo de material. Além disto, os tecidos biológicos “moles”, por conta da alta composição de água, absorvem linearmente neste comprimento de onda de forma bastante eficiente. Por este motivo, o uso cirúrgico deste laser em Medicina e Odontologia é bastante estudado e difundido, existindo hoje no mercado uma série de modelos comerciais desta fonte de luz.

Baseado nesse fato, várias aplicações de corte em tecidos moles foram propostas até hoje, com destaque para os cortes cirúrgicos em pele [71, 72], aorta,

osso e córnea, [72]. Aplicações diversas são também encontradas na odontologia, tanto para cortes cirúrgicos no tecido periodontal (gengiva) [73], como nos tecidos duros dentais [74,75].

Apresentaremos a seguir detalhes do mecanismo de interação que surge da irradiação em 2,94 μm em tecidos compostos por água ou hidroxiapatita: a ablação térmica.

2.5.2 Mecanismo de Interação: ablação térmica (termoablação)

O laser de Er:YAG é um laser de estado sólido formado por um cristal. Seu nome é referência ao seu meio ativo, composto de um cristal sintético, chamado de YAG, acrônimo vindo do inglês *Yttrium Aluminium Garnet*, ou Granada de Ítrio e Alumínio. Por "granada" entende-se a classe de minerais cristalinos em que as células unitárias são compostas por dodecaedros e trapezoedros. Sua fórmula química é $Y_3Al_5O_{12}$ onde alguns sítios ocupados pelo ítrio são substituídos por íons de érbio (íon dopante). Esse meio ativo, quando bombeado por uma lâmpada específica numa cavidade ressonante, emite luz em um comprimento de onda no infravermelho, em 2,94 μm, referente à transição entre os níveis de energia $^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ do érbio. Em relação ao número de níveis de energia eletrônicos participantes da emissão laser, ele classifica-se como um laser de três níveis. Por este motivo o cristal de Er:YAG, operando nessa linha, trabalha geralmente no modo pulsado (*Q-Switch*).

Suponhamos um modelo de laser de Er:YAG operando em 2,94 μm e pulsado no regime de microssegundos e incidente em um tecido biológico. Esse comprimento de onda é altamente absorvido por um modo vibracional da água e, por conta do tempo de interação ser longo, os processos de origem térmica são permitidos. Detalhes a respeito dos limites de densidade de energia *versus* tempo de interação, que estabelecem as regiões dos diferentes mecanismos de interação luz-tecido, serão detalhados no capítulo seguinte.

Dessa forma, a água presente nas células que compõem esse tecido rapidamente se aquece, uma vez que boa parte da energia absorvida em forma de vibrações é transformada em calor. Quando a água intracelular aquece à temperatura de 100 ºC, ela sofre uma transição de fase, passando para o estado de vapor. Essa transição de fase faz o volume intracelular aumentar drasticamente (em torno de 1000 vezes), o que promove a ruptura da membrana celular. A liberação de vapor carrega consigo boa parte do calor gerado além de alguns fragmentos do citoplasma que foi liberado na ruptura celular. Como a quantidade de energia doada em um pulso pode ser muito grande (podendo chegar a 500 mJ por pulso), várias células passam por esse processo, produzindo um efeito macroscópico de corte. Esse tipo de ablação (remoção de material) por meio da geração de calor local, que por sua vez é fruto da absorção linear da luz incidente, é chamado de ablação térmica, ou termoablação. O diagrama representativo desse mecanismo de interação é muito semelhante ao da figura 3, sendo a bolha gerada por um mecanismo diferente e composta de vapor.

Tendo finalizado o estudo de técnicas cirúrgicas ablativas, abordaremos no próximo capítulo a terapia fotodinâmica (TFD). Serão detalhados os aspectos fotofísicos, fotoquímicos e bioquímicos da técnica, as características ópticas dos tecidos biológicos, além das vantagens e limitações desta técnica.

REFERÊNCIAS

1 Goldwyn RM. Bovie: The man and the machine. Ann Plast Surg **2**:135-153 (1979).

2 Ohm GS. Die galvanische Kette: mathematisch bearbeitet. Berlin, J.G.F. Kniestädt (1827).

3 Maxwell JC. A treatise on Electricity and Magnetism. Londres, Macmillan (1873).

4 Simon AL. Made in Hungary: Hungarian contributions to universal culture. EUA, Simon Publications (1998).

5 Mitchell JP, Lumb GN. The principles of surgical diathermy and its limitations. Brit J Surg **50**:314-320 (1962).

6 d'Arsonval A. Action physiologique des courants alternatifs. Soc Biol **43**:283-286 (1891).

7 d'Arsonval A. Action physiologique des courants alternatifs á grande fréquence. Arch Physiol Norm Pathol **5**:401-408 (1893).

8 Massarweh NN, Cosgriff N, Slakey DP. Electrosurgery: history, principles, and current and future uses. J Am Coll Surg **202**:520-530 (2005).

9 Pollack SV, Carruthers A, Grekin RC. The history of Electrosurgery. Dermatol Surg **26**:904-908 (2000).

10 Rivière AJ. Action des courants de haute fréquence et des effleuves du résonateur Oudin sur certaines tumeurs malignes. J Méd Interne **4**:776-777 (1900).

11 Pozzi M. Remarques sur la fulguration. Bull Assoc Franc Cancer **2**:64-69 (1907).

12 Doyen D. Sur las destruction des tumeurs cancéreuses acessibles par la méthode de la voltaisation bipolaire et de l'électro-coagulation thermique. Arch Elec Med **17**:791-795 (1909).

13 Clark WL. Oscillatory desiccation in treatment of accessible malignant growths and minor surgical conditions: new electrical effect. J Adv Therm **29**:169-183 (1911).

14 Wyeth GA. Endothermy, surgical adjunct in accessible malignancy and precancerous conditions. Surg Gynecol Obstet **36**:711-714 (1932).

15 Wyeth GA. The endotherm. Am J Electrother Radiol **42**:186-187 (1924).

16 Bovie WT. New electro-surgical unit with preliminary note on new surgical current generator. Surg Gynecol Obstet **47**:751-752 (1928).

17 Cushing H, Bovie WT. Electro-surgery as an aid to the removal of intracranial tumors. Surg Gynecol Obstet **47**:753-784 (1928).

18 Pearce JA. Electrosurgery. New York, John Wiley (1986).

19 http://www.genesis-ultrasound.com/Lazzaro-Spallanzani.html (Acessado em 21/01/2013).

20 http://www.genesis-ultrasound.com/ultrasound-sonography.html (Acessado em 21/01/2013).

21 Curie J, Curie P. Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémièdres à faces inclinées. Bulletin de la Société Minérologique de France **3**:90-93 (1880).

22 Langevin MP. Procédé et appareils d'émission et de réception des ondes élastiques sous-marines à l'aide des propriétés piézo-électriques du quartz. Brevet francais, No. 505703 **17**:538 –542 (1918).

23 Dussik KT. On the possibility of using ultrasound waves as a diagnostic aid. Neurol Psychiat **174**:153-168 (1942).

24 Dussik KT, Dussik F, Wyt L. Auf dem Wege Zur Hyperphonographie des Gehirnes. Wien Med Wochenschr **97**:425-429 (1947).

25 Dussik KT. Ultraschall Diagnostik, in besondere bei Gehirnerkrankungen, mittels Hyperphongraphie Z. Phys Med **1**:140-145 (1948).

26 Dussik KT. Verfahren zur Untersuchung von Korpern mittels Ultraschall Osterreichisches. Patent Nr. A5720-47 (1947).

27 Dussik KT, Fritsch DJ (1954) Energy distribution measurements as a basis for the use of ultrasonics in arthritis and multiple sclerosis. Scientific Proceedings of the 3rd Annual Conference on Ultrasonic Therapie, Am Inst of Ultrasound Med 43-55 (1954).

28 Dussik KT, Fritch DJ, Kyriazidou M, Sears RS. Measurements of articular tissues with ultrasound. Am J Phys Med. **37**:160-165 (1958).

29 Kelman C. Phaco-emulsification and aspiration. Am J Ophthalmol **67**:464-477 (1969).

30 Flamm E, Ransohoff J, Wuchinich D, Broadwin A. Preliminary experience with ultrasonic aspiration in neurosurgery. Neurosurgery **2**:240-245 (1978).

31 Hodgson W, Poddar P, Mencer E. Evaluation of ultrasonically powered instruments in the laboratory and in the clinical setting. Am J Gastroenterol **72**:133-140 (1979).

32 Hodgson WJ. Ultrasonic surgery. Ann R Coil Surg Engl **62**:459—461 (1980).

33 Hodgson WJ, Del Guercio LR. Preliminary experience in liver surgery using the ultrasonic scalpel. Surgery **95**:230-234 (1984).

34 Giannopoulos T, Chipchase J, Tailor A, Butler-Manuel S. The use of harmonic shears (Ultracision) for laparoscopic lymphadenectomies in women with gynaecological malignancies. Gynecol Surg **2**:97-100 (2005).

35 Msika S, et al. Harmonic Scalpel™ in laparoscopic colorectal surgery. Dis Colon Rectum **44**:432-436 (2001).

36 Armstrong DN, Frankum C, Schertzer ME, Ambroze WL, Orangio GR. Harmonic Scalpel® hemorrhoidectomy. Dis Colon Rectum **45**:354-359 (2002).

37 Swank DJ, Bonjer HJ, Jeekel J. Safe laparoscopic adhesiolysis with optical access trocar and ultrasonic dissection. Surg Endosc **16**:1796-1801 (2002).

38 Brick AV, et al. Tratamento intra-operatório da fibrilação atrial crônica com ultra-som. Rev Bras Cir Cardiovasc **16**:337-349 (2001).

39 http://www.pcbdesign007.com/pages/zone.cgi?a=57265 (Acessado dia 17/03/2013).

40 Maiman TH. Stimulated optical radiation in Ruby. Nature **187**:493-494 (1960).

41 DiDomenico M Jr, Geusic JE, Marcos HM, Smith RG. Generation of ultrashort optical pulses by mode-locking de YAlG:Nd laser. Appl Phys Lett **8**:180-183 (1966).

42 Drozhbin YA, Zakharov YP, Nikitin W, Semenov AS, Yakovlev VA. Generation of ultrashort light pulses with GaAs semiconductor laser. JETP Lett **5**:143 (1967).

43 Bradley DJ, Durrant AJF. Generation of ultrashort dye laser pulses by mode locking. Phys Lett A **27**:73-74 (1968).

44 Laussade JP, Yariv A. Mode locking and ultrashort laser pulses by anisotropic molecular liquids. Appl Phys Lett **13**:65-66 (1968).

45 Glen WH. Parametric amplification of ultrashort laser pulses. Phys Rev Lett **11**:333-335 (1967).

46 Seitz F. On the theory of electron multiplication in crystals. Phys Rev **76**:1376–1393 (1949).

47 Molchanov AG. Avalanche ionization in transparent dielectrics induced by intense light pulses. Sov Phys Solid State **12**:749 (1970).

48 Yablonovitch N, Bloembergen N. Avalanche ionization and the limiting parameter of filaments induced by light pulses in transparent media. Phys Rev Lett **29**:907–910 (1972).

49 Epifanov AS. Theory of electron-avalanche ionization induced in solids by electromagnetic waves. IEEE J Qu Electron **QE-17**:2018–2022 (1981).

50 Sacchi CA. Laser-induced electric breakdown in water. J Opt Soc Am B **8**:337–345 (1991).

51 Chan A, et al. Ablation of dental enamel using subpicosecond pulsed lasers. International Congress Series **1248**:117–119 (2003).

52 Girard B, et al. Effects of Femtosecond Laser Irradiation on Osseous Tissues. Lasers Surg Med **39**:273–285 (2007).

53 Rego-Filho FG, Dutra-Corrêa M, Nicolodelli G, Bagnato VS, Araujo MT. Influence of the hydration state on the ultrashort laser ablation of dental hard tissues. Lasers Med Sci **28**:215-222 (2013).

54 Serbin J, Bauer T, Fallnich C, Kasenbacher A, Arnold WH. Femtosecond lasers as a novel tool in dental surgery. Appl Surf Sci **197**:737-740 (2002).

55 Teng P, Nishioka NS, Anderson RR, Deutsch TF. Acoustic studies of the role of immersion in plasma-mediated laser ablation. IEEE J Qu Electron **QE-23**: 1845–1852 (1987).

56 Stern D, et al. Corneal ablation by nanosecond, picosecond and femtosecond lasers at 532 nm and 625 nm. Arch Ophthalmol **107**:587–592 (1989).

57 Niemz MH, Klancnik EG, Bille JF. Plasma-mediated ablation of corneal tissue at 1053 nm using a Nd:YLF oscillator/regenerative amplifier laser. Lasers Surg Med **11**:426–431 (1991).

58 Niemz MH, Hoppeler TP, Juhasz T, Bille JF. Intrastromal ablations for refractive corneal surgery using picosecond infrared laser pulses. Lasers Light Ophthalmol **5**:149–155 (1993).

59 Frederickson KS, White WE, Wheeland RG, Slaughter DR. Precise ablation of skin with reduced collateral damageusing the pemtosecond-pulsed, terawatt titanium:sapphire laser. Arch Dermatol **129**:989-993 (1993).

60 Nicolodelli G, Angarita DP, Inada NM, Tirapelli LG, Bagnato VS. Effect of photodynamic therapy on the skin using the ultrashort laser ablation. J Biophotonics, doi: 10.1002/jbio.201300024 (publicado online em 11/04/2013).

61 Nicolodelli G, Kurachi C, Rego RF, Omairi T, Bagnato VS. Evidence of 5-aminolevulinic acid (ALA) penetration increase due to microdrilling in soft tissue using femtosecond laser ablation. Lasers Med Sci **27**:1067-1071 (2012).

62 Puliafito CA, Steinert RF. Short-pulsed Nd:YAG laser microsurgery of the eye: biophysical considerations. IEEE J Qu Electron **QE-20**:1442–1448 (1984).

63 Niemz MH. Laser-Tissue interactions: fundamentals and applications. Nova Iorque, Springer-Verlag (2007).

64 Judd BR. Optical absorption intensities of rare-earth ions. Phys Rev **127**:750-761 (1962).

65 Ofelt GS. Intensities of crystal spectra of rare-earth ions. J Chem Phys **37**:511-520 (1962).

66 Gandy HW, Ginther RJ, Weller JF, Laser oscillations in erbium activated silicate glass. Phys Lett **16**:266 (1965).

67 Lund DJ, et al. Ocular hazards of the Q-switched Erbium laser. Investig Ophtalmol **9**:463-470 (1970).

68 Zharikov EV, et al. Stimulated emission from Er^{3+} ions in yttrium aluminum garnet crystals at λ= 2.94 μm. Sov J Quantum Electron **4**:1039 (1975).

69 Bagdasarov KS, Zhekov VI, Lobachev VA, Murina TM, Prokhorov AM. Steady-state emission from a $Y_3Al_50_{12}$:Er laser (λ = 2.94 μm, T = 300 ºK). Sov J Quantum Electron **13**:262 (1983).

70 Shi WQ, Bass M, Birnbaum M. Effects of energy transfer among Er^{3+} ions on the fluorescence decay and lasing properties of heavily doped Er:$Y_3Al_50_{12}$. J Opt Soc Am B **7**:1456-1462 (1990).

71 Kaufmann R, Hibst R. Pulsed 2.94 μm erbium-YAG laser skin ablation – experimental results and first clinical application. Clin Experiment Dermatol **15**:389-393 (1990).

72 Walsh Jr. JT, Flotte TJ, Deutsch TF. Er:YAG laser ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. Lasers Surg Med **9**:314-326 (1989).

73 Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Clinical application of erbium:YAG laser in periodontology. J Int Acad Periodontol **10**:22-30 (2008).

74 Vogel A, Venugopalan V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. Chem Rev **103**:577-644 (2003).

75 Hibst R, Keller, U. Experimental studies of the application of the er yag laser on dental hard substances .Measurement of the ablation rate. Lasers Surg Med **9**:338-344 (1989).

3

Terapia Fotodinâmica (TFD)

3.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os aspectos fundamentais e os avanços atingidos no estudo da Terapia Fotodinâmica (TFD). Serão descritas as características e procedimentos necessários para se provocar o efeito fotodinâmico, além dos fotossensibilizadores (FS) disponíveis hoje no mercado, detalhes sobre as reações químicas envolvidas na terapia, atual aplicabilidade da técnica e, por fim, os fatores limitantes da técnica que motivaram a execução deste estudo.

3.2 Histórico da Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é uma técnica que tem por base a produção de uma cadeia de reações citotóxicas e apresenta-se hoje como uma das mais promissoras alternativas no tratamento de várias patologias. Estas reações têm o potencial de destruir micro-organismos patogênicos ou grupos de células específicas, como no caso de um tumor. A técnica é fundamentada na combinação de três fatores essenciais: uma fonte de luz (laser, LED ou mesmo lâmpada comum e luz solar), um composto químico fotossensível (ou fotossensibilizador - FS) e oxigênio molecular. Através de um protocolo de administração da substância fotossensível ou pró-fármaco (sistêmico ou tópico) e, esperando o tempo de máximo acúmulo do FS na região desejada, a luz é irradiada de forma a excitar suas moléculas. Uma vez que

este esteja no estado excitado e na presença do oxigênio molecular (essencialmente presente nas células-alvo), há uma transferência de energia entre ambos. Assim, o oxigênio molecular atinge um estado excitado do tipo singleto, altamente reativo, que em contato com o tecido da sua vizinhança, destrói suas estruturas e causa morte celular. Outras reações fotoquímicas podem acontecer simultaneamente, podendo formar espécies químicas além do oxigênio e com potencial semelhante de oxidação de estruturas [1].

A TFD possui diversas vantagens em relação a outras formas terapêuticas. A principal delas é a seletividade de destruição de células tumorais com mínimo comprometimento das células sadias na vizinhança da lesão. Uma vez que os tumores possuem um metabolismo mais acelerado em relação à maioria das células sadias, o esquema vascular de alimentação do tumor fará com que este acumule uma maior quantidade de FS em seu interior. Combinado a isto está o fato de que os fotossensibilizadores são sintetizados de forma a possuírem maior afinidade química com células tumorais. Assim, as células sadias terão metabolizado a maior parte dessas moléculas após certo tempo, ao passo que o tumor ainda conterá uma grande concentração do FS. Irradiando a região, essa concentração preferencial garantirá que apenas as células do tumor sofram a ação da terapia, uma vez que a ação fotodinâmica ocorre apenas onde se localizam simultaneamente os três ingredientes básicos.

Contudo, algumas células sadias podem eventualmente sofrer efeitos indiretos da terapia. Isso ocorre quando os vasos sanguíneos que alimentam a região apresentam uma quantidade significativa de FS em seu interior e nas células que compõem o endotélio. Irradiando a região, os vasos podem sofrer ação fotodinâmica e desenvolver um quadro de vasoconstricção. Assim, além de células tumorais, as sadias que dependam da irrigação desse vaso morrem por falta de nutrientes. Esse fenômeno é conhecido como efeito vascular da TFD.

No caso da destruição de organismos patogênicos, uma vantagem da terapia fotodinâmica é que ela não favorece a sobrevivência de espécies resistentes após a aplicação da técnica, ao contrário dos antibióticos convencionais. O alto potencial da ação fotodinâmica destrói várias biomoléculas, impossibilitando a sobrevivência de qualquer variação do micro-organismo, eliminando inclusive as mais resistentes.

Embora a terapia fotodinâmica tenha crescido em evidência nos últimos 30 anos, como fruto do rápido desenvolvimento de uma grande variedade de fontes de luz, a ideia por trás desta técnica é essencialmente antiga. Existem relatos que datam de cerca de 3000 anos, do Egito Antigo, onde substâncias extraídas de plantas eram aplicadas topicamente em seres humanos e estes eram expostos ao sol, numa técnica classificada como “Helioterapia” para o tratamento de vitiligo [2,3]. No entanto, existe carência de relatos que permitam saber se naquela época houve algum tratamento científico da fototerapia. Há também relatos semelhantes na Índia datando de 1400 a.C. sobre os efeitos terapêuticos do sol combinados a extratos de plantas, mas a maioria deles é informal. Em 1947, Fahmy e colaboradores conseguiram isolar os extratos fotossensíveis das plantas utilizadas nesses primeiros trabalhos, que foram identificados como sendo 8-metoxipsoraleno (8-MOP) e o 5-metoxipsoraleno (5-MOP) [4-6]. Nessa época, a técnica já era conhecida como “fotoquimioterapia”, uma vez que o termo helioterapia ficou mais ligado às terapias que utilizavam o sol (ou outras luzes) como única fonte de cura, sem a ajuda de extratos de plantas e corantes [7].

A forma como hoje é conhecida a terapia fotodinâmica, ou seja, a técnica que parte da interação entre um composto químico e luz para o tratamento de doenças, foi primeiramente utilizada por Oscar Raab e Herman von Tappeiner em Munique [8,9]. Em seus estudos com o protozoário causador da malária, ele descobriu que o uso da acridina vermelha combinada com luz produzia um efeito letal sobre a *Infusoria*, um tipo de paramécio. A descoberta aconteceu por acaso, uma vez que foi realizado durante uma tempestade de relâmpagos e a luz ambiente estava comprometida. Raab então prosseguiu na demonstração de que esse efeito era muito maior do que usando apenas luz ou apenas a acridina vermelha, ou ainda mais: se combinasse esses dois ingredientes e por último o micro-organismo, nada também acontecia. Pouco tempo depois, von Tappeiner sugeriu que o efeito era decorrente do acúmulo de energia luminosa pela substância química em questão, de uma forma parecida como a que acontece na clorofila durante a fotossíntese. Esse último trabalho afirmava ainda o grande potencial que substâncias fluorescentes teriam na medicina do futuro.

Em seres humanos, o primeiro registro de administração de uma substância fluorescente se deu na França no trabalho de Prime, um neurologista, em 1900. Nesse relato, Prime testou a eosina administrada oralmente para o tratamento de epilepsia, no entanto, ele observou que muitos pacientes apresentaram dermatite induzida nos dias que se seguiram quando era exposto à luz solar [10]. Assim, essa descoberta incentivou von Tappeiner, juntamente com um dermatologista chamado Jesionek a utilizar eosina tópica e luz para o tratamento de tumores de pele [11]. Em ocasiões posteriores, von Tappeiner demonstrou que para produzir esse tipo de reação, era necessário a presença de oxigênio [12]. No ano de 1907, ele utilizou pela primeira vez o termo “ação fotodinâmica” para designar tal fenômeno [13].

A partir desse ponto, novos fotossensibilizadores foram sintetizados, como é o caso dos Derivados de Hematoporfirina, que constituíram a primeira geração de fotossensibilizadores a serem utilizados clinicamente. Além disto, o rápido desenvolvimento no campo da eletrônica, mecânica quântica e óptica foi responsável pelo desenvolvimento de novas fontes de luz, como o laser na década de 1960 e, mais posteriormente, os LEDs. Com isso foi possível abranger os limites de aplicação da Terapia Fotodinâmica, tanto na destruição e inativação de micro-organismos patogênicos, como na eliminação de células tumorais.

Quando um protocolo de Terapia Fotodinâmica é posto em prática, seja em estágio experimental ou numa aplicação clínica consolidada, é preciso estar ciente de que vários eventos ocorrem simultaneamente. Inicialmente temos que levar em conta as propriedades ópticas do tecido biológico, que vão ditar a interação da luz diretamente com o tecido; a interação da luz com o fotossensibilizador; as reações fotoquímicas que vão desencadear os possíveis mecanismos de morte celular, entre outros. Serão descritos a seguir todos esses aspectos de forma detalhada.

3.3 Características ópticas dos tecidos biológicos

No que diz respeito à interação luz-matéria, todos os processos e efeitos colaterais dessa interação partem de um conjunto de interações fundamentais.

Quando um fóton se propaga através de um meio que não seja o vácuo, ele pode ser absorvido e/ou espalhado. Para que isto ocorra, as características do meio e do fóton (energia, frequência, fase, etc.) é que determinarão a ocorrência desses processos.

No caso de um tecido biológico, absorção e espalhamento de fótons ocorrem simultaneamente como fruto de um processo estatístico: existe uma probabilidade de um fóton ser absorvido baseado na sua energia e no coeficiente de absorção do meio para aquela frequência específica. Por questões de conservação da probabilidade, os fótons que não são absorvidos são transmitidos ou espalhados. É o que chamamos de um **meio túrbido** [14].

Quando um fóton atinge a interface entre dois meios, ele pode atravessar e ser transmitido através do meio seguinte. Esse processo é também conhecido como refração e ocorre sob condições específicas (Lei de Snell). Ainda, o fóton pode ser refletido na interface e retornar ao meio de origem. Esse processo também ocorre sob condições específicas (Lei da reflexão). Se a reflexão ocorrer em uma superfície rugosa, a reflexão é dita difusa.

Quando um fóton é absorvido por uma molécula presente no tecido biológico, outros processos subsequentes podem ocorrer. É o caso das emissões, como a fluorescência e a fosforescência. No caso de outros meios (não necessariamente biológicos) a população de elétrons em níveis metaestáveis pode atingir valores altos o suficiente para termos o que chamamos de emissão estimulada de radiação, princípio pelo qual se baseia o funcionamento dos lasers.

Os mecanismos primários de interação luz-tecido (reflexão, refração, espalhamento, absorção e emissão) estão pautados na fenomenologia intrínseca da propagação da luz em um meio qualquer. A maioria deles tem uma origem microscópica, como é o caso da reflexão e da transmissão que possui origem nas condições de contorno do campo elétrico e magnético na interface dos meios. Ou ainda a absorção, que pode ser explicada a nível molecular em termos de orbitais atômicos e transições de elétrons entre eles.

Quando essas interações ocorrem da irradiação de um tecido biológico por luz, a figura completa da interação luz-tecido é composta por uma série de fatores. As

interações microscópicas relativas a um único fóton, ou uma onda eletromagnética, agora ocorrem em larga escala, onde a contribuição de milhares de fótons compõe o cenário da interação. Além disso, as características da fonte de luz e a forma de entrega da luz passam a interferir no processo. Por exemplo, se é LED, laser, luz branca, halógena, contínua, pulsada, e qual a potência emitida, largura temporal de pulso, tempo de exposição, etc. As propriedades do tecido biológico alvo também interferem no processo, como o coeficiente de absorção, seção de choque de espalhamento, níveis de energia, constantes de elasticidade e cisalhamento, difusividade térmica, entre outros. Essas características irão ditar em que escala ocorrem os efeitos colaterais da interação luz-tecido. Todo esse panorama, unido a fatores clínicos, irá ditar quais danos teciduais ocorrem simultaneamente e em que escala de intensidade eles ocorrem. Podemos então classificar uma série de interações secundárias baseadas nos danos macroscópicos da interação luz tecido

Existe uma série de mecanismos de interação luz tecido nessa escala de descrição. A maioria semelhante entre si pode ser dividida em grupos [15]. Vamos defini-los como mecanismos secundários de interação luz-tecido:

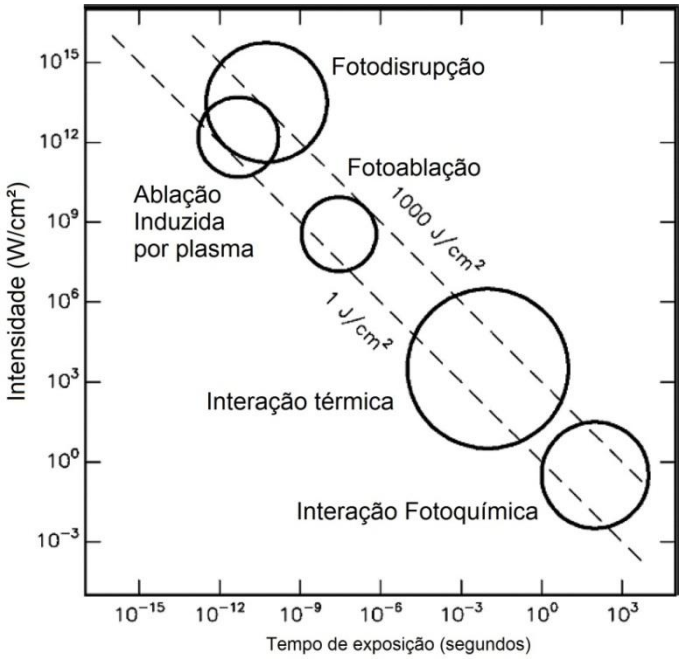
a. Interações fotoquímicas: efeito fotodinâmico, bioestimulação;

b. Interações fototérmicas: coagulação, vaporização e carbonização;

c. Interações fotomecânicas: fotoablação, ablação induzida por plasma e fotodisrupção.

A figura 7 mostra os intervalos de intensidade de luz (em W/cm^2) e o tempo de interação (em segundos) em que, em média, ocorre cada um desses efeitos. No caso da TFD, que tem por base a interação fotoquímica, o intervalo de interação é longo e a luz é de baixa intensidade. Por este motivo, embora utilizando o mesmo fármaco e luz em um mesmo comprimento de onda ressonante, as características de intensidade, de potência de pico e duração de pulso irão ditar qual efeito será o predominante. Assim, para uso em TFD, os lasers contínuos (longo tempo de exposição) em baixa intensidade, garantem a prevalência de reações fotoquímicas, evitando um gasto de energia luminosa na produção de efeitos secundários.

Figura 7 - Mecanismos de interação luz tecido em função da dose de luz (intensidade x tempo).



Fonte: adaptado de [16].

A seguir mostraremos as expressões que regem o comportamento da absorção e espalhamento de luz nos tecidos biológicos, pois são estes os mecanismos primários de interação que tem implicações diretas na TFD. Pelo mostrado no gráfico anterior, uma vez que a irradiação favoreça as reações fotoquímicas, veremos em detalhe a cadeia de reações fotoquímicas envolvidas na TFD e os mecanismos de morte celular que se seguem após o casamento entre emissão da luz e o espectro de absorção do FS.

3.3.1 Absorção

Tomemos um feixe de luz que ultrapassa uma porção de um meio material, que chamaremos de amostra. Vamos nos ater aqui a situações onde esse meio material seja um meio biológico, onde haverá interação da radiação incidente com apenas algumas biomoléculas e estruturas celulares, mas não todas. Tomando isso como

ponto de partida, imaginemos um feixe de luz com intensidade I_0 que, após atravessar uma porção do tecido, emerge desta com intensidade I_T.

Numa situação real, a intensidade I_T que emerge é menor do que a intensidade incidente. Isso se deve a, como já mencionado, reflexões, espalhamentos e absorção da luz. Matematicamente, temos que [17]:

$$I_0 = I_R + I_E + I_A + I_T \qquad (Eq.\ 15)$$

onde I_0 é a intensidade do feixe incidente, I_R é a intensidade refletida (na interface), I_E é a intensidade perdida por espalhamento, $\mathrm{I_A}$ a intensidade absorvida pelo meio e, finalmente, I_T a Intensidade transmitida após a amostra.

Se os efeitos de reflexão e espalhamento forem desprezíveis, teremos que a intensidade incidente será $I_0 = I_A + I_T$. A quantidade de energia absorvida por esse meio depende de quantidades como: (i) a concentração das entidades absorvedoras; (ii) a distância que o feixe atravessa o tecido e (iii) um fator que dependa da natureza do meio o qual a luz atravessa.

A lei que descreve a intensidade da luz após atravessar uma porção do tecido é a Lei de Beer-Lambert. Essa lei, deduzida empiricamente, descreve que a taxa de variação da intensidade de luz, à medida que esta atravessa um meio, (para um feixe com incidência normal à interface ar-amostra) é diretamente proporcional à própria intensidade naquele instante. A constante de proporcionalidade é uma quantidade chamada de coeficiente de absorção. Matematicamente, temos:

$$\frac{dI}{dl} = -\alpha(\lambda) \cdot I \qquad (Eq.\ 16)$$

Para o caso de um comprimento de onda específico, o coeficiente de absorção *α* é uma constante. Ainda, se tomarmos apenas um dos componentes do tecido biológico como absorvedor, sua concentração também é constante. Assim, podemos chegar a:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I_T}\right) = \varepsilon.c.l \qquad (Eq.\ 17)$$

onde *c* é a concentração da amostra, *l* a espessura da amostra e ε o índice de absorção, definido por $\alpha = c.\varepsilon \cdot$ Rearranjando os termos, temos:

$$\ln I_T - \ln I_0 = -\varepsilon.c.l \qquad (Eq.\ 18)$$

Finalmente, passando o segundo termo da primeira parte da igualdade para o outro lado e aplicando a função exponencial em ambos os lados da equação, temos:

$$I_T = I_0 \exp\left(-\varepsilon.c.l\right) \qquad (Eq.\ 19)$$

Essa expressão trata da absorção para apenas um comprimento de onda, e para apenas um elemento que absorve a radiação. Podemos generalizar a equação 17 para o caso de haver *n* elementos absorvedores, cada um com concentração c_n. Se tomarmos tanto a luz incidente I_0, a transmitida I, e os índices de absorção ε_n como funções do comprimento de onda λ, temos a equação a seguir:

$$\log\left[\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right] = l\left[\sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i(\lambda) c_i\right] \qquad (Eq.\ 20)$$

3.3.2 Espalhamento

Dependendo do comprimento de onda irradiado em tecidos, pode ocorrer o caso onde a luz é pouco absorvida pelo tecido. Nesse caso, ao penetrar no tecido, a luz percorre um longo caminho até ser efetivamente absorvida. Como exemplo, podemos citar o caso do Laser de Nd:YAG operando em 1064nm, usado na resolução de pequenas hemorragias. Os fótons presentes no feixe são absorvidos depois de percorrer um longo caminho dentro do tecido antes de ser efetivamente absorvido e provocar o aquecimento do tecido. O aquecimento faz as paredes dos vasos se contraírem e também induzem a produção de substâncias que aceleram a vasoconstricção. Este laser é um dos mais indicados para a produção de tal efeito,

pois a radiação alcança um volume muito maior do que o Laser de CO_2, por exemplo.

Podemos descrever o espalhamento nesse contexto levando em conta basicamente as características da água presente no mesmo, com a diferença que componentes intra e extracelulares funcionam como centros espalhadores de luz [18]. Tomando primeiramente os efeitos de absorção, considere um feixe atravessando a interface ar-tecido. Desconsiderando primeiramente os efeitos de reflexão nessa interface, temos que os fótons do feixe incidente sofrerão espalhamento e devem percorrer em média um comprimento de absorção característico (l_a) antes de serem absorvidos pelo tecido. Este comprimento é o indicador de quão rápido os fótons são "perdidos" por absorção. Dessa forma, o coeficiente de absorção (α) pode ser definido da seguinte forma:

$$l_a = \frac{1}{\alpha} \qquad (Eq.\ 21)$$

Além disso, sabe-se que a taxa em que os fótons são absorvidos pelo tecido é diretamente proporcional à velocidade que os fótons possuem (a velocidade da luz no meio), diretamente proporcional à densidade local de fótons por unidade de volume (n) e inversamente proporcional ao comprimento característico de absorção. Assim:

$$taxa\ de\ absorção = N\alpha v = \frac{nv}{l_a} \qquad (Eq.\ 22)$$

Para contabilizar os efeitos de espalhamento, considera-se que o feixe se difunde perfeitamente a partir da interface ao atravessar o tecido. Por conta disso, pode-se dizer que a taxa de difusão dos fótons ($\vec{j}$) é diretamente proporcional ao próprio gradiente de densidade, ou seja:

$$\vec{j} = -D\vec{\nabla}N \qquad (Eq.\ 23)$$

A constante de proporcionalidade D é conhecida como coeficiente de difusão. Em termos gerais diz-se que o coeficiente de difusão depende do espaçamento entre os centros espalhadores e da velocidade da luz no meio. O problema posto aqui é um genuíno problema de difusão, onde a entidade difundida são fótons, com o ingrediente adicional de que o número de fótons diminui a uma taxa dada pela equação (22), associada à absorção de luz pelo tecido. A equação de continuidade [19] nesse caso particular pode ser escrita como:

$$\frac{dN}{dt} + \vec{\nabla} \cdot \vec{j} + v\alpha N = 0 \qquad (Eq.\ 24)$$

Supondo que a intensidade do laser é baixa, todos os fótons incidentes são espalhados ou absorvidos, de tal forma que a taxa de variação do número de fótons em um volume *V* é nula. Assim:

$$\frac{dN}{dt} = 0 \quad \Rightarrow \quad \vec{\nabla} \cdot \vec{j} + v\alpha N = 0$$

$$\vec{\nabla} \cdot \left(-D\vec{\nabla}N\right) + v\alpha N = 0 \qquad (Eq.\ 25)$$

$$D\nabla^2 N - v\alpha N = 0$$

Tratando o problema em uma dimensão, o coeficiente de difusão toma a seguinte forma:

$$D = \frac{l_s v}{3} = \frac{v}{3\sigma} \qquad (Eq.\ 26)$$

Aqui é definido o comprimento de espalhamento médio l_s. O fator 1/3 se dá pelo fato de estarmos tratando de um espalhamento isotrópico em uma dimensão e σ é a seção de choque de espalhamento [18]. Portanto, temos que:

$$N = N_0 \exp\left(-\frac{v\alpha}{D}\right) = N_0 \exp\left(-v\alpha\frac{3}{l_s v}\right)$$

$$N = N_0 \exp\left(-3\alpha\sigma\right) \qquad (Eq.\ 27)$$

Este resultado possui uma forma semelhante à fórmula de Beer-Lambert, onde a quantidade tratada é a intensidade do feixe incidente ao invés da densidade de fótons, sendo uma diretamente proporcional à outra. A diferença aqui é que além do termo referente à absorção aparece a contribuição na diminuição de intensidade do feixe transmitido devido ao espalhamento.

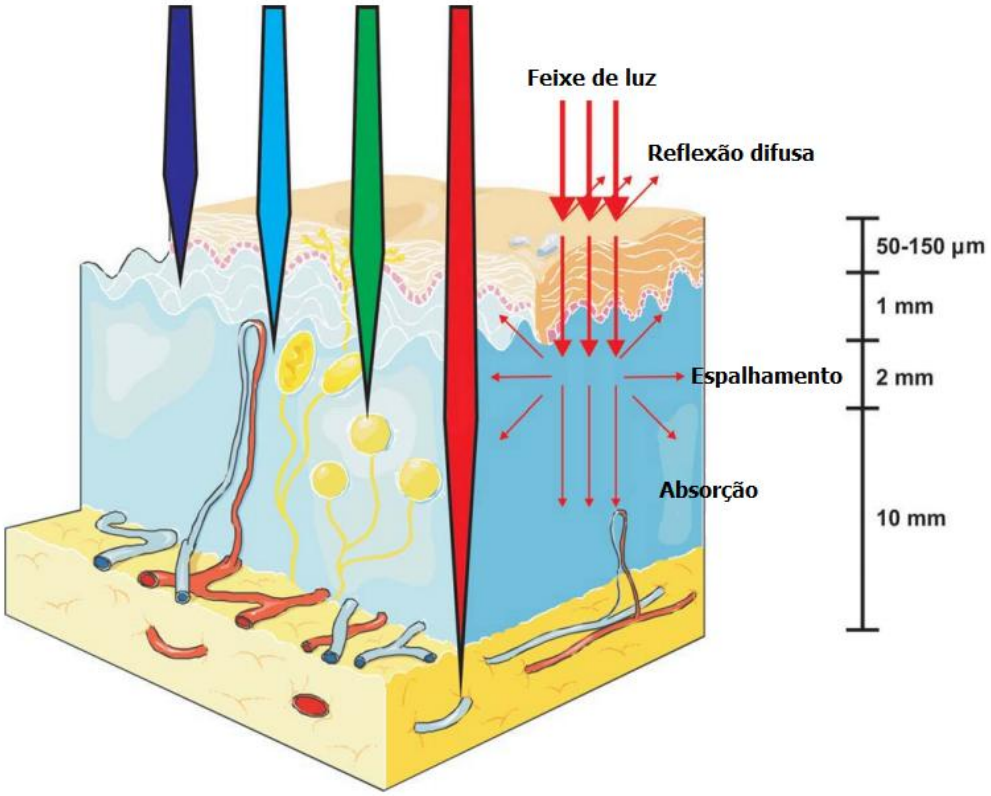
Pela grande presença de centros espalhadores nos tecidos orgânicos em geral, a trajetória de um fóton dentro do tecido segue os mesmos padrões de uma caminhada aleatória.

Nesse caso, os passos possuem a distância entre os centros, que é da ordem do próprio l_s. A direção do fóton após o choque com o centro espalhador é aleatória, e no fim o vetor deslocamento total é pequeno. Por exemplo, na pele humana, quando se contabilizam efeitos de espalhamento como uma caminhada aleatória a profundidade final resultante de um fóton após penetrar o tecido é da ordem de 2,5 mm, o que é observado experimentalmente [20]. Um esquema é mostrado a seguir na figura 8 ilustrando a ocorrência simultânea desses processos em um meio biológico.

É importante também ressaltar que, assim como o coeficiente de absorção, a seção de choque de espalhamento também é uma função do comprimento de onda. Um exemplo disto se dá quando um tecido, que previamente tenha atingido seu ponto de coagulação, é irradiado: a seção de choque de espalhamento, principalmente para os comprimentos de onda visíveis e UV aumenta significativamente. Esta mudança funciona como mecanismo de segurança para o próprio tecido, diminuindo o comprimento de penetração e fazendo com que tecidos

e órgãos situados abaixo da região de tratamento não sejam danificados durante uma aplicação clínica.

Figura 8 - Penetração da luz em tecidos biológicos como função do comprimento de onda e os diversos mecanismos primários de interação luz-tecido.



Fonte: adaptado de [21].

No caso da Terapia Fotodinâmica, a grande seção de choque de espalhamento na região do infravermelho também contribui para a diminuição da profundidade de tratamento. No outro extremo, na região do visível e pequenos comprimentos de onda, temos o caso em que o espalhamento é pequeno, porém a absorção é grande (maior α), o que também aumentam as perdas e diminui a profundidade de tratamento. Dessa forma, tomando a última equação, temos duas regiões de máxima perda de intensidade luminosa (baixa profundidade de tratamento). Matematicamente deve existir, então, uma região de mínima perda de intensidade

luminosa entre elas (máxima profundidade de penetração). Essa região é conhecida como “janela terapêutica”, e compreende a região de comprimentos de onda entre 700-900 nm (final do visível, início do infravermelho).

Grandes esforços têm sido concentrados em encontrar ou sintetizar substâncias fotossensíveis que apresentem resposta fotodinâmica na região de baixa absorção óptica pelos cromóforos teciduais. Veremos a seguir os fotossensibilizadores que formaram as primeiras gerações de fármacos para TFD e quais os atualmente desenvolvidos com resposta no infravermelho.

3.4 Dose de limiar de dano fotodinâmico (D_{th})

A Terapia Fotodinâmica pode ser caracterizada por um processo em etapas, o qual é iniciado com a devida excitação óptica do fotossensibilizador. Após a cadeia de reações fotoquímicas, inicia-se o processo de stress e degradação em nível celular, levando a morte do conjunto de células-alvo. O dano fotodinâmico diz respeito à necrose propriamente dita que foi gerada a partir do efeito fotodinâmico. Assim, o sucesso da terapia está intimamente relacionado à eficiente geração das espécies reativas de oxigênio.

Uma vez que ocorre atenuação de luz causada pela absorção óptica do próprio tecido, apenas a parte da luz que não sofre essa atenuação é que efetivamente excita o FS. É possível estabelecer uma relação da intensidade luminosa disponível para a TFD como função da profundidade de penetração baseando-se na lei de Beer-Lambert para um comprimento de onda fixo. Ou seja:

$$I = I_0 \exp\left(-\alpha d\right) \qquad (Eq.\ 28)$$

onde a espessura da amostra é representada pela profundidade de penetração d, I é a intensidade de luz nessa profundidade e α é o coeficiente de absorção.

No entanto, a TFD é uma terapia que depende diretamente do tempo de exposição à luz. Isso significa que tanto pequenas como altas intensidades são

capazes de produzir o mesmo efeito, desde que os tempos de iluminação sejam suficientes para classifica-los na escala de interações fotoquímicas, mostrada no gráfico da figura 7. Isto acontece baseado no fato de que, quanto maior for o tempo de exposição, maior é a probabilidade de um oxigênio molecular em seu estado fundamental encontrar o FS em seu estado excitado. Como consequência, há um aumento do número de moléculas de oxigênio em seu estado reativo para maiores tempos de exposição. Assim, para um tempo de iluminação *t*, é definida uma grandeza física chamada de fluência, ou dose de luz (*D*):

$$D = I.t \qquad (Eq.\ 29)$$

Assim, se multiplicarmos os dois lados da equação 28 pelo tempo de exposição, temos que a dose de luz que atinge um ponto a uma profundidade *d* é dada por:

$$D = D_0 \exp\left(-\alpha d\right) \qquad (Eq.\ 30)$$

onde $D_0 = I_0.t$.

Para relacionar a profundidade de necrose com a dose de luz, é necessário observar que o dano necrótico só ocorre a partir de um determinado nível de stress celular. Esse stress está relacionado, entre outras coisas, com a concentração de espécies reativas de oxigênio geradas durante o processo. Dessa forma, apenas a partir de uma dose de limiar é que o dano ao tecido deixa de ser reversível e passa a evoluir para necrose ou apoptose. É impossível determinar exatamente a quantidade de espécies reativas geradas a partir de uma dada iluminação, sem contar o fato de que cada tecido apresenta uma resposta distinta, o que faz variar o limiar com o tipo de célula. Contudo, é possível definir uma dose de limiar efetiva (D_{th}), aplicando a condição de contorno na equação 30 de que é exatamente quando no ponto onde a dose atinge esse valor que a necrose é provocada. Assim:

$$D_{th} = D_0 \exp\left(-\alpha d_{nec}\right) \qquad (Eq.\ 31)$$

onde d_{nec} é a profundidade de necrose. Rearranjando essa última equação, podemos definir que a profundidade de necrose esperada para um tecido com determinado limiar de dose, utilizando a definição da equação 21, é:

$$d_{nec} = l_a \ln\left(\frac{D_0}{D_{th}}\right) \qquad (Eq.\ 32)$$

Uma vez que o comprimento de penetração l_a pode ser determinado empiricamente, assim como a profundidade de necrose e dose inicial de luz, o limiar de dose de cada tecido pode, a priori, ser determinado [22].

3.5 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores são biomoléculas que apresentam resposta ao estímulo luminoso, o que as classifica, portanto, um cromóforo. Para ser considerado um fotossensibilizador, o composto precisa apresentar a maioria ou todas as características apresentadas a seguir. A saber [21]:

I. Ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico para permitir circulação e acúmulo seletivo nas células;

II. Apresentar seletividade quanto à retenção por células malignas;

III. Ter habilidade para o transporte passivo ou ativo dentro das células e ter um alvo intracelular bem conhecido;

IV. Possuir alto rendimento quântico de formação de estados tripletos;

V. Não ser tóxico a níveis terapêuticos;

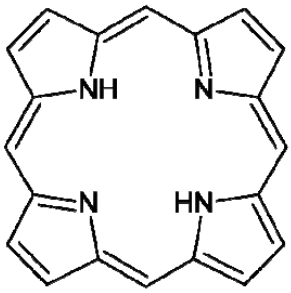
VI. Ser metabolizado rapidamente, minimizando possíveis efeitos colaterais;

VII. Banda de absorção dentro da janela óptica (de 700 a 900 nm).

As primeiras gerações de FS constituíam-se de Porfirinas e seus derivados (HpD, do inglês *Hematoporphyrin Derivate*), como o Photogem®, o Photofrin® e o Photosan®. Todos estes FSs são formados por uma cadeia heterocíclica conhecida como anel porfírico. Esta, por sua vez, é formada por um conjunto de anéis aromáticos (Figura 9). Essa molécula não é apenas biocompatível, como também

faz parte de um ciclo celular que acontece naturalmente nas células animais: o ciclo Heme [23].

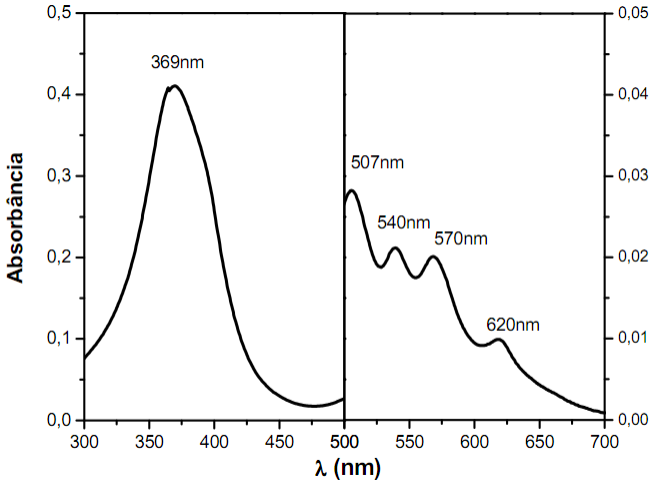
Figura 9 - Anel porfírico, comum a todos os Derivados de Hematoporfirina (HpD).



Fonte: [24].

Essa classe de FS possui características ópticas pouco favoráveis para a TFD uma vez que apresentam picos de absorção na região do UV-VIS apenas. Um espectro de absorção típico desse composto é mostrado na figura 10 [25].

Figura 10 - Espectro de absorção do Photogem®.

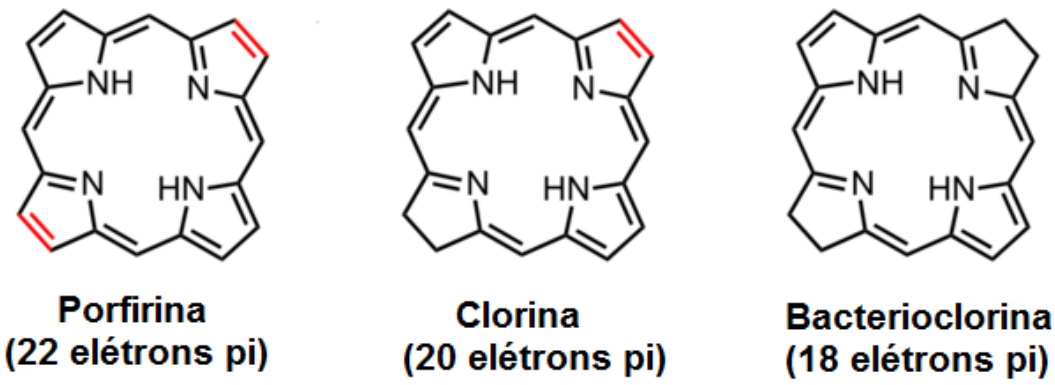


Fonte: Adaptado de [25].

O pico com maior comprimento de onda dessa classe de fármacos é na região de 620 nm. Todos os outros picos estão na região do Ultravioleta (369 nm – Banda de Soret) e do visível (507, 540 e 570 nm) e todos eles são altamente absorvidos por todos os cromóforos naturais dos tecidos biológicos.

Só com as últimas gerações de fotossensibilizadores, em especial com o desenvolvimento das porfirinas reduzidas e das Ftalocianinas, é que se tornou possível ter uma resposta óptica no início da região do infravermelho (em torno de 700 nm). A redução de porfirinas, leva à conversão de ligações CC (carbono-carbono) duplas em ligações CC simples nos anéis laterais da extremidade do macrociclo. Isso faz com que ligações de hidrogênio sejam favorecidas nesses sítios, provocando um deslocamento batocrômico que faz os níveis de energia naturais do anel porfírico se aproximarem da janela óptica dos tecidos biológicos, localizada no infravermelho próximo. Estas porfirinas reduzidas são as Clorinas e as Bacterioclorinas. Atualmente, um tipo especial de Bacterioclorina tem sido sintetizada de forma mais eficiente, com uma resposta no infravermelho mais distante, e seu uso tem sido testado amplamente em Terapia Fotodinâmica [26]. A seguir mostramos a comparação entre as moléculas centrais que compõem a estrutura das primeira e segunda geração de FS (figura 11).

Figura 11 - Comparação entre os anéis centrais de Porfirina, Clorina e Bacterioclorinas.



Fonte: adaptado de [27].

Logo em seguida é também mostrada a tabela que contém os principais fotossensibilizadores hoje utilizados em Terapia Fotodinâmica para o tratamento de tumores. Vale salientar que a maioria desses compostos contém uma estrutura central semelhante. A mudança de algumas ligações químicas no anel principal ou a adição de algum radical nas extremidades pode fazer variar a posição do pico de absorção que apresenta maior comprimento de onda no espectro (tabela 1) [21].

Tabela 1 - Relação de fotossensibilizadores aprovados para uso em TFD antitumoral.

Fotossensibilizador	Estrutura	$\lambda_{excitação}$ (nm)
Photofrin	Porfirina	630
ALA	Percursor de Porfirina	635
Temoporfin (Foscan) (mTHPC)	Clorina	652
Verteporfin	Clorina	690
Telaporfin	Clorina	660
Ftalocianina de Sílica	Ftalocianina	675
Padoporfin	Bacterioclorina	762

Fonte: [21]

Além dos fotossensibilizadores listados aqui, temos ainda os fotossensibilizadores utilizados para a inativação de micro-organismos patogênicos. Essa técnica de inativação é conhecida como Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT, do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy* – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana) utilizada para o tratamento de infecções localizadas. Nesse caso, é de interesse que a luz não penetre muito profundamente no tecido subjacente a lesão, pois não há, como no caso das células tumorais, um acúmulo preferencial intrínseco do fármaco. Assim sendo, a luz utilizada para esse tipo de aplicação opera na região do visível, em torno do azul (450 nm). Os fármacos utilizados possuem estruturas bem diversificadas, como por exemplo, o azul de metileno, azul de toluidina, curcuminas, entre outros [28-30]. O uso de luz vermelha em algumas aplicações de aPDT pode também ser recomendado a depender do protocolo envolvido (número de horas entre a administração até a irradiação, qual fotossensibilizador, etc.).

Podemos definir a TFD como um processo em três etapas: a excitação do fotossensibilizador, a produção de espécies citotóxicas e a morte celular provocada. O estudo das características do fármaco utilizado é importante na primeira e na última etapa: inicialmente suas propriedades químicas ditam como ocorre a absorção da luz e, por consequência, a profundidade de penetração da luz, além da eficiência quântica que nos diz a eficiência do FS em provocar reações fotoquímicas. Num segundo momento, conhecer suas propriedades químicas é importante para prever onde sua molécula se ligará na célula-alvo (ou no agente patogênico). Isso nos diz o local exato onde as reações fotoquímicas ocorrem (membranas, núcleo, mitocôndrias), o que influencia diretamente no tipo de morte celular provocada (necrose, apoptose, morte celular autofágica, etc.). Existem diversas formas de se determinar a localização exata do fotossensibilizador, como será mostrado mais adiante.

No entanto, no que diz respeito a segunda etapa do processo, as espécies químicas reativas formadas durante a TFD são basicamente as mesmas em todos os casos. O que muda em cada caso é a proporção entre as espécies formadas. Será mostrada a descrição completa dos tipos de reações fotoquímicas que ocorrem durante uma aplicação de Terapia Fotodinâmica.

3.6 Reações fotoquímicas envolvidas na TFD

Nesta seção será feita uma descrição mais detalhada dos processos fotofísicos e fotoquímicos que são possíveis de ocorrer durante a ação fotodinâmica. Como mencionado anteriormente, são necessários três elementos básicos para a ocorrência do efeito fotodinâmico: o fotossensibilizador (FS), o oxigênio molecular e a luz que deverá ser absorvida ressonantemente. O oxigênio é frequentemente relatado nessa tríade pois a geração de oxigênio no seu estado excitado singleto é o mecanismo predominante de ação fotodinâmica (mecanismo tipo II). No entanto, outros substratos podem interagir com a luz e o fotossensibilizador, formando outras espécies químicas oxidativas.

Para entender melhor o que ocorre durante cada mecanismo especificamente, deve-se ter em mente que as moléculas que participam deste processo absorvem e emitem luz em regiões específicas do espectro eletromagnético. Este fato está intimamente relacionado com a descrição quântica do átomo ou molécula e da ocupação de seus níveis de energia.

Como sabemos, em nível atômico e molecular a energia é quantizada, ou seja, pode ocorrer apenas como múltiplos de valores específicos de energia. As transições eletrônicas devem então ocorrer de tal forma que a energia absorvida (para ir de um nível mais baixo para um de mais alta energia) ou liberada (quando o elétron decai do nível de mais alta energia para o de mais baixa energia) ocorre segundo valores específicos. Esses valores de energia quando mostrados em função do comprimento de onda da luz (ou da frequência) constituem os espectros de absorção e emissão. Sabe-se ainda que os elétrons que giram em torno de um átomo são distribuídos em orbitais atômicos (1s, 2s, 2p, 3s, etc.). Pelo Princípio da Exclusão de Pauli, cada orbital atômico só pode ser ocupado por elétrons que possuam um conjunto distinto de números quânticos. Assim, cada orbital só pode ser ocupado por dois elétrons: um com número quântico de spin +1/2 e outro com spin -1/2. Por conta disso, as camadas eletrônicas possuem spin total inteiro ou fracionário. Elétrons com spins contrários ocupando um orbital são ditos estarem emparelhados [31]. Os estados de energia em que, após a distribuição dos elétrons segundo essas regras, todos os elétrons estão emparelhados (todos os orbitais ocupados por pares de elétrons com um *spin up* - ↑ - e outro *down* - ↓) é chamado de estado **singleto** e possui momento angular de spin total nulo (S = 0). Os estados que possuem elétrons desemparelhados após a distribuição, ou seja, possuem dois *spins up* ou dois *spins down*, são chamados de estados **tripletos** (|S| = 1).

Quando um átomo é excitado, seus elétrons ocupam camadas de mais alta energia. Após um determinado intervalo de tempo, conhecido como tempo de vida característico do nível excitado, os elétrons decaem emitindo uma energia dada por $h.\nu = \Delta E$, onde ΔE é a diferença de energia em que ocorreu a transição eletrônica. Esse decaimento pode ocorrer também de forma não-radiativa, liberando a energia absorvida em forma de calor ou vibrações. Quando o decaimento ocorre de forma que, durante a transição, o elétron do estado excitado possui momento angular de

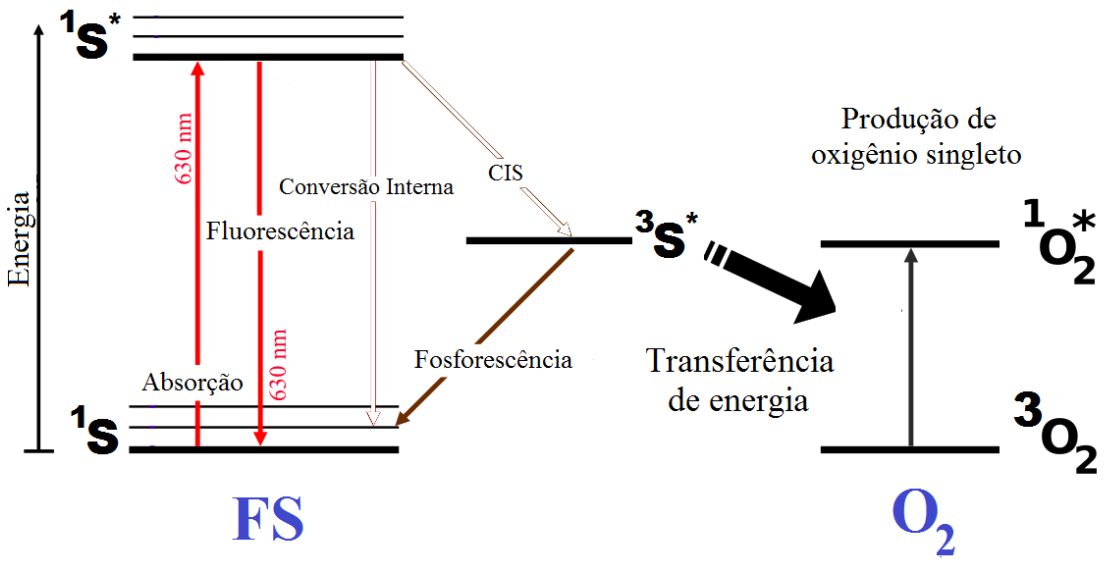
spin com sinal contrário ao do estado fundamental, dizemos que estes elétrons estão emparelhados. Assim, o elétron não precisa mudar seu estado de spin para ocupar o orbital menos energético após o decaimento. Por tal razão, o tempo de vida da transição é menor (em torno de alguns nanossegundos). Um exemplo de processo radiativo (com emissão de fótons) que ocorre dessa forma é a fluorescência.

Por outro lado, ocorrem com menor probabilidade as transições eletrônicas em que o elétron do estado excitado possui spin de mesmo sinal ao estado fundamental antes de decair. Isso faz com que ele necessite, ao decair, mudar seu estado de spin para emparelhar-se com o elétron do estado fundamental. Um dos processos radiativos que ocorre desta forma é a fosforescência. Por conta da menor probabilidade de transições desse tipo, o tempo de vida radiativo é bem maior, partindo de alguns microssegundos e podendo chegar a segundos. O tempo de vida radiativo é definido como sendo o inverso da probabilidade de transição radiativa entre os níveis de energia inicial e final [32]. Um exemplo de processo não-radiativo que ocorre nessas condições é o Cruzamento Intersistema (CIS), e está presente durante a TFD.

A maioria das substâncias possui um estado fundamental, ou seja, seu estado de menor energia, como sendo um estado singleto e para os fotossensibilizadores não é diferente. Na terapia fotodinâmica quando um fóton de energia apropriada, ressonante com a diferença de energia entre o nível fundamental singleto do FS (aqui designado por ^{1}S) e um estado excitado singleto ($^{1}S^{*}$) do mesmo é absorvido, o elétron transita do fundamental para esse último. Nesse ponto, o elétron pode voltar ao estado fundamental, de forma radiativa (fluorescência) ou não radiativa (conversão interna), ou pode decair para um estado de energia intermediário. Os fotossensibilizadores usados na TFD possuem um estado excitado intermediário tripleto. Nesse caso, ocorre o decaimento do estado excitado singleto para um estado excitado intermediário tripleto ($^{3}S^{*}$), definido anteriormente como cruzamento intersistemas (CIS). Uma vez que esse estado intermediário possui um tempo de vida elevado, uma alta população de elétrons se acumula nesse nível na excitação com vários fótons, semelhante ao que acontece num estado metaestável de um meio laser.

É após essa etapa que ocorre a formação da forma reativa do oxigênio molecular. Este é uma das poucas moléculas cujo estado fundamental é o estado tripleto (o que denominamos por $^3O_2$). Assim sendo, a energia acumulada no estado excitado tripleto do FS após o CIS é facilmente intercambiável e transferida ao oxigênio molecular em seu estado fundamental, fazendo com que esse transite para um estado de maior energia. O estado excitado do oxigênio é um estado singleto ($^1O_2$*) e, nesse estado, possui alto poder de oxidação. Uma vez formado, ele destrói as estruturas que encontra ao seu redor. Estando no interior de uma célula, o comprometimento de estruturas leva a morte celular por necrose, apoptose ou outros. Como o tempo de vida do oxigênio no estado $^1O_2$* é extremamente rápido (entre 10 e 320 nanossegundos) a sua difusão está limitada a uma distância entre 10 e 55 nm, tornando sua ação extremamente localizada [33]. Uma representação desse processo é mostrada no diagrama de Jablonski da figura 12 a seguir.

Figura 12 - Diagrama de Jablonski descrevendo processos radiativos e não radiativos na TFD.



Fonte: Autor, 2013.

No entanto, reações menos recorrentes também estão presentes, formando outras espécies reativas. Estas reações formam um conjunto chamado de

mecanismo tipo I. Elas são responsáveis pela formação de radicais livres em reações como a formação de dióxido de hidrogênio, transferência de prótons, entre outros. Os detalhes estão indicados na tabela a seguir.

Tabela 2 - relação das reações químicas tipo I que ocorrem durante a TFD

Transferência de Hidrogênio	$^3S^* + RH \rightarrow SH^\bullet + R^\bullet$
Transferência de elétron	$^3S^* + RH \rightarrow S^{\bullet -} + RH^{\bullet +}$
Formação de dióxido de hidrogênio	$SH^\bullet + {}^3O_2 \rightarrow {}^1S + HO_2^\bullet$
Formação do ânion superóxido	$S^{\bullet -} + {}^3O_2 \rightarrow {}^1S + O_2^\bullet$

Fonte: adaptado de [16]

Como mencionado aqui, a ação oxidativa da maioria das espécies formadas são de curto alcance e extremamente localizadas. A depender do fotossensibilizador utilizado, por sua vez, essa ação ocorrerá em locais específicos da célula ou do tecido (mitocôndrias, núcleos, membrana plasmática, parênquima ou endotélio do vaso sanguíneo, etc.). É justamente essa variedade de locais danificados que vão desencadear os diferentes tipos de morte celular observados clinica e experimentalmente, através da liberação de uma série de sinalizadores bioquímicos. Uma breve apresentação sobre este tópico é apresentado na seção a seguir.

3.7 Aspectos bioquímicos e mecanismos de morte celular

É conhecido o fato de que os fotossensibilizadores utilizados em TFD possuem a propriedade de acúmulo preferencial em tecido tumoral, comparado ao tecido sadio. Uma série de fatores contribui para este fato e eles vão desde propriedades estruturais e fisiológicas do tumor até a afinidade das moléculas do fotossensibilizador, às estruturas celulares e aos receptores bioquímicos encontrados especificamente nas células neoplásicas.

Tumores são tecidos de crescimento rápido. Assim sendo, durante o seu desenvolvimento ocorre uma neovascularização, porém, esta é errática e dá origem

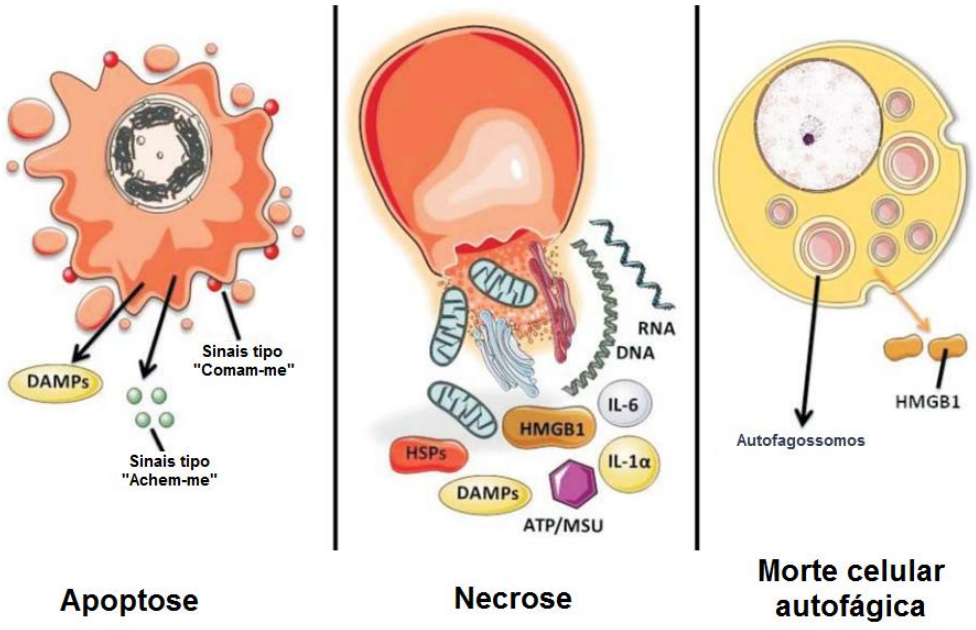
a vasos sanguíneos mal formados e com alta porosidade. Além disso, a falta de vasos linfáticos dificulta a drenagem da região, aumentando a permeabilidade e a retenção da droga [34]. Existem relatos na literatura que associam a seletividade de retenção à afinidade química dos fotossensibilizadores às LDLs (do inglês *Low Density Lipoproteins* – Lipoproteínas de Baixa Densidade): um tipo de colesterol. Assim sendo, a presença de receptores de LDL em algumas células tumorais pode contribuir para o aumento deste acúmulo [35]. Há ainda, nesse contexto, estudos que exploram a localização dos fotossensibilizadores após sua administração. Nestes é mostrada a afinidade química de fotossensibilizadores a várias biomoléculas e receptores bioquímicos que são especificamente expressados em células tumorais e que tal afinidade se dá por meio de ligações covalentes [36]. Uma vez que o mapeamento dessa localização seja preciso, é possível controlar e acompanhar a farmacocinética do fotossensibilizador até a sua retenção máxima no tecido neoplásico. Assim, seria possível otimizar a escolha do FS para cada tipo de tumor e, a partir disto, melhorar os veículos para cada caso. Hoje, existe uma gama de veículos farmacêuticos para FSs sendo estudada, incluindo anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos, peptídeos, proteínas, LDL, carboidratos, ácido fólico, entre outros.

Existe uma relação direta entre a estrutura da molécula do FS e o lugar onde ela se liga. No entanto, a maioria dos fotossensibilizadores não é formada apenas por uma, mas por uma mistura de moléculas. O Photofrin®, um derivado de Hematoporfirina da primeira geração de fotossensibilizadores, também conhecido como *Porfimer Sodium*, é uma complexa mistura de éteres de Porfirina e com localização intracelular variável, mais associado com estruturas com membranas lipídicas. Além dele, outros FS em uso no mercado, como NPe6 (*Telaporfin*, ou mono-L-aspartil clorina) costuma se ligar aos lisossomos. O derivado de Benzoporfirina (BpD, do inglês *Benzoporphyrin Derivate*) tem como alvo as mitocôndrias. Já o mTHPC (do inglês *m-tetrahydroxyphenylchlorin*) costuma ter sua localização associada às mitocôndrias, retículo endoplasmático, ou ambos. Por último, a ftalocianina Pc4 possui um amplo espectro de organelas celulares na qual pode se ligar, mas as mitocôndrias são tidas como sua localização preferencial [37]. O Photogem®, que é o fotossensibilizador utilizado nesse trabalho, é outro derivado

de Hematoporfirina muito semelhante ao Photofrin® e possui como organela-alvo a mitocôndria [38].

Quando ocorre a irradiação após a administração do fármaco, é formado o oxigênio singleto preferencialmente (mecanismo tipo II) ou as outras formas oxidativas (mecanismo tipo I). Como o tempo de meia-vida das espécies reativas de oxigênio é considerado curto, a ação fotodinâmica danifica exatamente a organela na qual o fotossensibilizador se liga. Basicamente, três tipos de morte celular podem ser desencadeados durante a TFD, dependendo da organela danificada (figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática de três tipos de morte celular por TFD.



Fonte: adaptado de [21].

Quando a membrana plasmática é o local danificado, o conteúdo do citoplasma é liberado para o meio extracelular e a célula deixa de existir enquanto unidade biológica. Nesse caso, é desencadeado o processo de **necrose**. A necrose é caracterizada pela liberação do conteúdo intracelular, gerando um processo inflamatório intenso, com a liberação de moléculas pró-inflamatórias na região lesionada. Esse processo também pode ser desencadeado por uma catástrofe energética, com a depleção dos níveis de ATP (adenosina trifosfato) a níveis que

são incompatíveis com a sobrevivência da célula. Mesmo a necrose tendo um aspecto macroscópico semelhante ao tecido morto via apoptose, a necrose é caracterizada pela ausência de sinalizadores bioquímicos típicos de apoptose. Em todo o caso, a necrose está ligada a um processo inflamatório intenso [39-42].

Quando o FS se localiza na membrana mitocondrial interna, pode ocorrer a chamada “transição de permeabilidade mitocondrial”, caracterizada por um aumento na porosidade da membrana que, ao ficar permeável, perde potencial de membrana e consequentemente, sua funcionalidade. Dessa forma, a produção de energia para sobrevivência da célula através da respiração celular (principal função das mitocôndrias) fica comprometida. O decréscimo da produção de moléculas de ATP de forma lenta e sem a devida recuperação da atividade mitocondrial por várias horas faz com que a célula programe sua própria morte. Assim, são liberados sinalizadores que darão início ao processo de apoptose, atuando como ativadores de vários tipos de caspases (citocromo c, Smac/DIABLO) além de outras moléculas pró-apoptóticas como o fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *Apoptosis Inducing Factor*) [43-46]. O processo de apoptose é o mais comum tipo de morte celular desencadeado pela terapia fotodinâmica e é caracterizado morfologicamente pela condensação da cromatina, clivagem do DNA em fragmentos internucleossômicos e encolhimento da célula com enrugamento da membrana plasmática. Além disso, há a liberação de sinalizadores bioquímicos para localizar e remover células mortas durante o processo. Para contribuir com este fato, há evidências de que os FSs que se acumulam em mitocôndrias causam danos a uma proteína anti-apoptótica, a Bcl-2 [44,45]. Há ainda evidências de que o processo de apoptose pode também ser desencadeado por danos à membrana plasmática [47-49]. No caso de o FS se localizar no complexo de Golgi, o dano fotodinâmico nessa organela também desencadeia apoptose [50].

A depleção dos níveis de produção energética pode ser uma causa tanto no desencadeamento de necrose quanto apoptose, sendo esta última a principal via de morte celular nesse caso. A apoptose também pode ser desencadeada quando outras organelas (como os lisossomos) são danificadas. Os lisossomos são responsáveis pela digestão celular e possui no seu interior um grande conjunto de enzimas digestivas, que, quando liberadas, podem danificar outras organelas. Esse

dano torna, a longo prazo, a sobrevivência da célula inviável, desencadeando a morte celular programada.

Um último tipo de morte celular desencadeado pela ação fotodinâmica é a autofagia ou macroautofagia. A autofagia é um mecanismo de degradação e reciclagem celular realizado pelos lisossomos para remoção de organelas ou proteínas intracelulares. Além do caráter de proteção, a autofagia pode também ser um mecanismo que provoca morte celular após o dano fotodinâmico, com o intuito de manter a viabilidade celular e histológica. Diante da produção de espécies químicas oxidativas, um estresse intracelular é iniciado, provocando a liberação de sinais que dão início à formação de autofagossomos que irão digerir boa parte das organelas, levando a célula à morte. [51-53].

Torna-se importante conhecer a terapia fotodinâmica de forma profunda para entender suas limitações. No presente trabalho, a limitação em questão é uma dificuldade frequentemente encontrada em aplicações clínicas: a profundidade de tratamento. Como mencionado neste capítulo, a profundidade de tratamento via TFD é fruto das propriedades ópticas dos tecidos-alvo. Assim sendo, é o conhecimento das propriedades físicas dos tecidos e das ferramentas em questão (laser, LEDs e etc.) que justifica a necessidade do uso de técnicas cirúrgicas para remoção do volume de tumores extensos de forma prévia à terapia fotodinâmica. Uma vez abordados os pormenores de técnicas cirúrgicas ablativas e da terapia fotodinâmica, descreveremos os experimentos realizados nesse trabalho de tese. Através de um modelo animal, se buscou criar situações que abordassem o uso combinado de cirurgia e TFD, propondo quatro tipos de cortes cirúrgicos diferentes para testar duas ordens de protocolos de cirurgia + TFD, analisando e discutindo os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

1. Dougherty TJ, et al. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst **90**:889-905 (1998).

2. Goldberg B. Heliotherapy. Arch Phys Ther **11**:263 (1930).

3. Krusen FH. Physical Medicine. Philadelphia, WB Saunders (1942).

4. Fahmy IR, Abu-Shady H. Ammi majus Linn: pharmacognostical study and isolation of a crystalline constituent, ammoidin. Q J Pharmacol **20**:281-291 (1947).

5. Fahmy IR, Abu-Shady H, Schönberg A, Sina A. A crystalline priciple from Ammi majus Linn. Nature **160**:468-469 (1947).

6. Fahmy IR, Abu-Shady H. Ammi majus Linn: the isolation and properties pf ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment pf leukoderma. Q J Pharmacol **21**:499-503 (1948).

7. Spikes JD. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. Primary photoprocesses in Biology and Medicine (editado por R. V. Bergasson, G. Jori, E. J. Land e T. G. Truscott). Nova Iorque, Plenum Press (1985).

8. Raab O. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z Biol **39**:524-546 (1900).

9. Von Tappeiner H. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. Muench Med Wochenschr **47**:5 (1900).

10. Prime J. Les accidents toxiques par l'eosinate de sodium. Paris, Jouve and Boyer (1900).

11. Von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierender Stoffen. Muench Med Wochenschr **47**:2042-2044 (1900).

12. Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Uber Wirkung der photodynamichen (fluorieszierenden) Stoffe auf Protozoan und Enzyme. Dtsch Arch Klin Med **80**:427-487 (1904).

13. Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Die Sensibilisierende Wirkung fluorieszierender Substanzer. Gesammte Untersuchungen uber die photodynamische Erscheinung. Leipzig, F. C. W. Vogel (1907).

14. Vo-Dihn T. Biomedical Photonics Handbook. Nova Iorque, CRC Press LLC (2003).

15. Prasad PN. Introduction to Biophotonics. Nova Jersey, John Wiley (2003).

16. Niemz MH. Laser-Tissue Interactions. Fundamentals and Applications. Nova Iorque, Springer-Verlag (2004).

17. Hecht F. Understanding Lasers: an entry-level guide. Nova Jersey, IEEE Press (1994).

18. Carruth JAS, McKenzie AL. Medical Lasers. Bristol, Adam Hilger Ltd. (1986).

19. Arfken GB, Weber HJ. Mathematical Methods for Physicists. EUA, Academic Press (2001).

20. Anderson RR, Parrish JA. The optics of human skin. J Invest Dermatology **77**:13-19 (1981).

21. Agostinis P, et. al. Photodynamic Therapy of cancer: an update. CA Cancer J Clin **61**:250-281 (2011).

22. Ferraz RCMC, et al. Determination of threshold dose of photodynamic therapy to measure superficial necrosis. Photomed Laser Surg **27**:93-99 (2009).

23. Freisen SA, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumours. Int J of Oncology **21**:577-582 (2002).

24. http://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin (Acessado dia 25/01/2013, 14:50).

25. Bagnato VS. Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde. São Paulo, Livraria da Física (2008).

26. Silva EEF. et al. Mechanisms of singlet oxygen and superoxide ion generation by porphyrins and bacteriochlorins. Chem Eur J **16**:9273-9286 (2010).

27. http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorin (Acessado dia 29/01/2013, 17:10).

28. Chang TW, Fiumara N, Weinstein L. Genital herpes: Treatment with methylene blue and light exposure. Int J Dermatol **14**:69-71 (1975).

29. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. Photochem Photobiol **72**:676-80 (2000).

30. Tønnesen HH, de Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. J Pharm Sci **76**:371-3 (1987).

31. Cohen-Tannoudji C, Diu B, Laloe F. Quantum Mechanics: Volume 1. Nova Jersey, John Wiley (1978).

32. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Nova Iorque, Springer-Verlag (2006).

33. Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. Phys Med Biol **50**:2597-2616 (2005).

34. Iyer AK, et al. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation. J Drug Target **15**:496-506 (2007).

35. Kessel D. The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizing agents. J Photochem Photobiol B **14**:261-262 (1992).

36. Sibani SA, McCarro n PA, Woolfson AD, Donnelly RF. Photosensitiser delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. Expert Opin Drug Deliv **5**:1241-1254 (2008).

37. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. Photodiagnosis Photodyn Ther **7**:61-75 (2010).

38. Ribeiro AP, Pavarina AC, Trindade FZ, Inada NM, Bagnato VS, de Souza Costa CA. Photodynamic Therapy associating Photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. Cell Biol Int **34**:343-351 (2010).

39. Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. Photochem Photobiol Sci **1**:837-840 (2002).

40. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. Curr Mol Med **8**:207-220 (2008).

41. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. Genes Dev **20**:1-15 (2006).

42. Nakagawa T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature **434**:652-658 (2005).

43. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. Biochim Biophys Acta **1776**:86-107 (2007).

44. Kessel D, Castelli M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. Photochem Photobiol **74**:318-322 (2001).

45. Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. Oncogene **20**:3420-3427 (2001).

46. Usuda J, Chiu SM, Murphy ES, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL. Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. J Biol Chem **278**:2021-2029 (2003).

47. Berg K, Moan J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. Photochem Photobiol **65**:403-409 (1997).

48. Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM. Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. Brit J Cancer **79**:72–81 (1999).

49. Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin® photosensitizaton: influence of the incubation protocol. Photochem Photobiol **64**:182-187 (1996).
50. Matroule J-Y, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DWC, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. Oncogene **20**:4070–4084 (2001).

51. Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR, Agostinis P. Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. Autophagy **2**:238-240 (2006).

52. Reiners JJ Jr, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. Autophagy **6**:7-18 (2010).

53. Dewaele M, Maes H, Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. Autophagy **6**:838-854 (2010).

4

Modificação das características de superfície e subsuperfície de tecidos biológicos e sua influência na TFD

4.1 Introdução e objetivos

Frente aos argumentos e fundamentos teóricos apresentados nos dois capítulos anteriores, constatou-se a carência de estudos que abordassem o uso de técnicas cirúrgicas previamente à terapia fotodinâmica de forma sistemática. Após a excisão tecidual por qualquer técnica que possa ser aplicada, o tecido remanescente não possui as mesmas propriedades fisiológicas (como coagulação, hemorragia, quadro inflamatório e outros), ópticas (variação dos coeficientes de absorção e espalhamento de luz) e propriedades estruturais, como a topologia da superfície do tecido após o corte.

O presente trabalho foi elaborado de forma a testar, em um primeiro momento, quatro técnicas cirúrgicas distintas com a terapia fotodinâmica, abordando os aspectos supracitados. Além desses, abordou-se também como estes aspectos influenciam a viabilidade de aplicação de TFD seguida da cirurgia, analisando a profundidade de tratamento por meio da profundidade de necrose, danos histopatológicos e características ópticas. Por último, um dos aspectos mais importantes analisados é a ordem de conjugação cirurgia-TFD: uma vez que a TFD apenas se concretiza após a administração do FS e a aplicação da luz, é possível trocar a ordem de aplicação do FS e da cirurgia. A importância em explorar a ordem

é que o resultado final das terapias combinadas pode mudar drasticamente, ou que simplesmente a melhor ordem de combinação não seja a mais adequada clinicamente falando, entre outros aspectos.

Nas seções que seguem serão abordados os aspectos metodológicos, seguidos dos resultados e discussões referentes às técnicas cirurgia-TFD. As técnicas testadas foram o bisturi elétrico, bisturi harmônico ou bisturi ultrassônico, laser de Ti:Safira pulsado no regime de femtossegundos e laser de Er:YAG pulsado no regime de microssegundos, sendo estes utilizados para produzir modificações de superfície e subsuperfície, seguidos da iluminação por laser segundo um protocolo de TFD.

4.2 Materiais e Métodos

Para investigar os efeitos *in vivo* de protocolos combinando cirurgia e TFD, foi utilizado um modelo animal. Os experimentos foram realizados utilizando tecido hepático sadio do lobo direito de 19 ratos da raça Wistar, machos, pesando entre 250 e 300 g. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), sob a coordenação do Professor Vanderlei Salvador Bagnato. O presente estudo foi submetido e devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (Anexo 1). O modelo utilizou tecido sadio para prova de princípios, que consistia em testar a viabilidade de uso de terapia fotodinâmica em tecidos previamente modificados por meio de técnicas cirúrgicas.

Para acessar o tecido hepático, todos os animais foram submetidos a um procedimento laparotômico. Todos eles foram anestesiados por via intramuscular utilizando um anestésico a base de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica S/A) na dose de 100 mg/kg de animal, associado a um analgésico, sedativo e relaxante muscular xilasina base 2g (Coopazine – Coopers ® Brasil) na dose de 6 mg/kg. Com o animal totalmente anestesiado, a cavidade

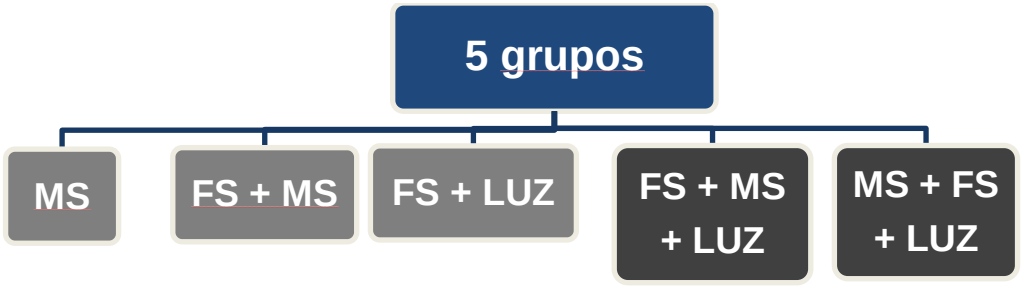
abdominal foi aberta e o lobo direito do fígado cuidadosamente exposto aos procedimentos de fotossensibilização, modificação de superfície e exposição à luz, de acordo com as necessidades de cada grupo experimental.

Escolheu-se para esse trabalho quatro ferramentas capazes de produzir cortes cirúrgicos, sendo duas delas bisturis eletrônicos e dois tipos de corte a laser. Os dois bisturis utilizados foram um bisturi elétrico (HF-120, WEM, Ribeirão Preto, Brasil) e um bisturi ultrassônico (Ethicon Endo-surgery, Johnson&Johnson, Cincinnati, OH, EUA). Foram utilizados também um laser de Ti:Safira - operando nos modos Q-switch e Mode-Locking, de pulsos com largura de 70 fs e banda de emissão centrada em 801 nm (Libra®, Coherent, Palo Alto, CA, EUA) – e um laser de Er:YAG - 2,94 µm, Q-Switch, com pulsos da ordem de centenas de microssegundos e energia de 200 mJ (Twin Light, Fotona Medical Lasers, Slovenia).

Baseado no fato de que o tecido que sofre uma excisão cirúrgica tem suas características de superfície e subsuperfície modificadas nas vizinhanças do corte, essas quatro ferramentas foram utilizadas para produzir modificação de superfície (MS) no fígado exposto, facilitando a incidência normal de luz na região tratada num momento posterior pela TFD, reproduzindo assim a influência dessas modificações de forma mais controlada.

Os 19 animais foram divididos em cinco grupos experimentais, que são mostrados no organograma da figura 14. Em seguida, a tabela 3 mostra a distribuição dos animais nos grupos em questão.

Figura 14 - Grupos experimentais: MS (G1); FS+MS (G2); FS+LUZ (G3); FS+MS+LUZ (G4); MS+FS+LUZ (G5).



Fonte: Autor, 2013.

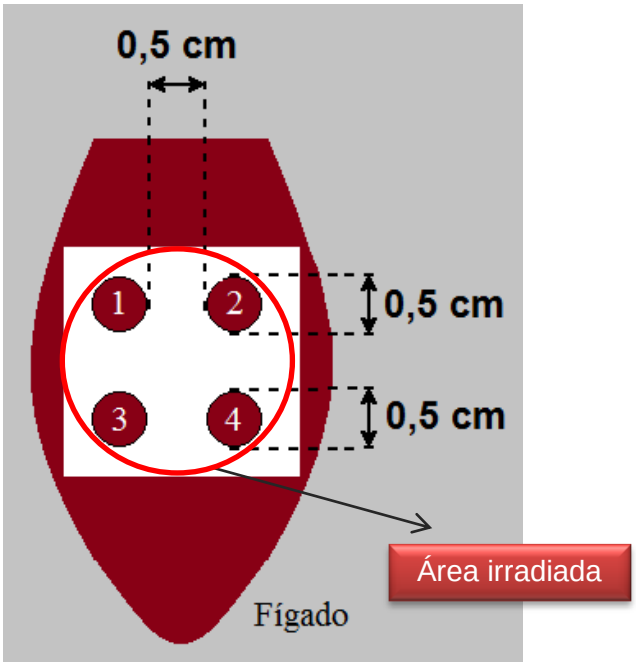
Tabela 3 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais.

Grupo	Descrição	Número de animais
G1	MS em tecido normal (controle)	n = 3
G2	Fotossensibilização seguida de MS (controle)	n = 3
G3	Fotossensibilização seguida de luz (controle TFD)	n = 3
G4	Fotossensibilização, seguida de MS e luz	n = 5
G5	MS, seguida de fotossensibilização e luz	n = 5

Fonte: Autor, 2013.

Cada animal pertencente aos grupos que envolvem modificações de superfície (G1, G2, G4 e G5) sofreu um conjunto de quatro lesões, sendo cada uma destas utilizando uma técnica distinta: bisturi elétrico, bisturi harmônico, laser de femtossegundos e laser de Er:YAG. A região destinada para cada uma das lesões foi limitada por uma máscara com quatro círculos distintos, mostrada na figura 15.

Figura 15 - Esquema para produção de lesões na superfície do tecido hepático, com áreas designadas para: 1 – bisturi elétrico, 2 – bisturi harmônico, 3 – laser de femtossegundos, 4 – laser de Er:YAG.



Fonte: Autor, 2013.

Os círculos possuíam um diâmetro de 0,5 cm, dando espaço para que fossem realizadas modificações de superfície com aproximadamente 0,2 cm² de área. Essa delimitação serviu para que a necrose produzida por cada uma das lesões não se superpusessem.

No presente estudo, foi escolhido um derivado de Hematoporfirina como fotossensibilizador (Photogem®, Moscou, Rússia). Utilizando os parâmetros de fotossensibilização estabelecidos por Ferreira et. al. [1], estabeleceu-se o tempo para atingir a concentração máxima de fotossensibilizador no tecido hepático de ratos como sendo de 30 min. O protocolo de administração do FS será detalhado mais adiante.

Assim sendo, os tempos de espera para produção das lesões foram adaptados naqueles grupos onde o dano fotodinâmico não foi provocado, para que os resultados pudessem ser comparados. No grupo G1 (controle MS) não houve a necessidade de esperar esse tempo, pois não houve administração do fármaco. Porém, no grupo G2 (controle FS+MS) esperou-se o tempo de 30 min para que as lesões fossem produzidas na condição de máxima concentração do FS. No grupo G3 (controle TFD) o protocolo seguiu os parâmetros da referência [1], iluminando a região em 630 nm a 150 J/cm² após 30 min da administração do FS, gerando apenas uma lesão por animal. Os detalhes do protocolo de iluminação serão apresentados na subseção 4.2.5. No grupo G4, os animais foram fotossensibilizados inicialmente. Após o tempo de espera de 30 min é que as lesões foram provocadas na superfície do tecido, seguidas imediatamente da iluminação, de forma que todos os danos fossem provocados nas mesmas condições. E finalmente, no grupo G5, as lesões que produziram MS foram imediatamente realizadas assim que o tecido hepático foi exposto, seguido da fotossensibilização. Após o referido tempo é que foi dado início ao protocolo de iluminação para TFD.

Após cada um dos processos, os animais foram suturados e foi administrado um analgésico pós-operatório por via intramuscular (Banamine®, Coopers Brasil Ltda.) na concentração de 2,2 mg/kg. Foi estabelecido um período de 30 horas pós-operatório como protocolo de formação de necrose nas referidas condições. Os animais foram então sacrificados e o lobo direito do fígado removido para produção de peças para análise histopatológica.

Seguem nas próximas subseções os detalhes de operação de cada uma das ferramentas de corte cirúrgico, do protocolo de fotossensibilização e iluminação, além dos detalhes das técnicas de análise (microscopia confocal de fluorescência e histopatologia).

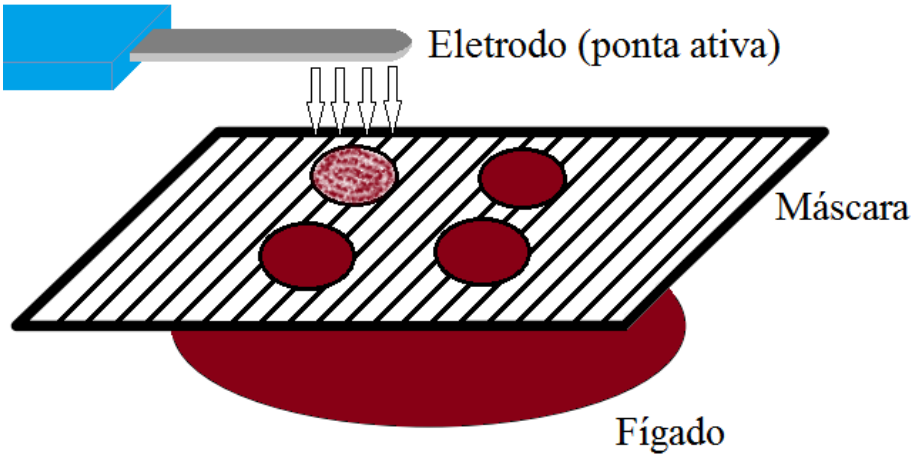
4.2.1 Procedimentos para uso de Bisturi Elétrico

A unidade eletrocirúrgica utilizada neste trabalho foi um bisturi eletrônico microprocessado HF-120 (WEM Eletrônica, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O corte realizado a partir deste tipo de aparato constitui o que chamamos de eletrocirurgia: a ablação tecidual por meio da transferência de correntes elétricas e subsequente aquecimento via efeito Joule. De forma resumida, este bisturi constitui-se numa unidade geradora de correntes elétricas de radiofrequência (RF) de 480 kHz. Esta corrente passa através de uma caneta com uma ponta condutora em suas extremidades, que é o eletrodo ativo de entrega de corrente. A corrente ao atravessar o paciente, é coletada por um segundo eletrodo de contato e levada de volta ao gerador, formando assim um circuito elétrico fechado. Esse modo de eletrocirurgia é conhecido como monopolar, pois o eletrodo neutro utilizado foi uma placa condutora distante do ponto de contato com o eletrodo ativo. A depender da geometria dos eletrodos, a extensão e a forma da região afetada após o corte também varia. Os animais que receberam esse tratamento tiveram os pelos de suas costas aparados com uma máquina de cortar pelos e depilados em seguida utilizando um creme depilador Veet® (Reckitt Benckiser, Inglaterra). Esse procedimento foi realizado após a anestesia total e antes do procedimento laparotômico com a finalidade de melhorar o contato dessa região com a placa do eletrodo neutro.

Essa unidade eletrocirúrgica opera em quatro modos distintos, a saber: *Pure Cut* (corte puro) e os cortes mistos (corte + coagulação) *Blend* 1, *Blend* 2 e *Blend* 3 onde o efeito de coagulação aumenta nessa ordem. O efeito de coagulação aumenta quanto menor for a frequência dos trens de pulso senoidal de corrente RF entregue. Para este trabalho utilizou-se um eletrodo plano para produzir a modificação de

superfície, operando em 45 W no modo de operação *Blend* 1 (baixa coagulação). A figura 16 a seguir mostra o aparato de modificação de superfície via eletrocirurgia. Foram realizados, em média, quatro contatos com um eletrodo tipo faca, deitado de forma que ao contato ficasse paralelo em relação à região exposta pela máscara. Os contatos duraram em média 0,5 segundos.

Figura 16 - Representação do contato para modificação de superfície pelo eletrodo ativo de uma unidade eletrocirúrgica. Considerar o fígado como parte do animal, cujo entorno não é mostrado no esquema. Abaixo do animal encontra-se o eletrodo neutro.



Fonte: Autor, 2013.

4.2.2 Procedimentos para uso de Bisturi Ultrassônico

A modificação de superfície, por meio do uso de bisturi ultrassônico (ou bisturi harmônico), foi realizada de forma muito semelhante ao procedimento realizado com bisturi elétrico. Uma unidade geradora de vibrações de alta frequência (Ethicon Endo-surgery, Johnson&Johnson, Cincinnati, OH, EUA) foi acoplada a uma ponta ativa específica que possuía duas faces: uma tipo gancho e uma plana. A face plana foi utilizada no presente experimento, tocando a superfície do tecido hepático da mesma forma que na figura 16. A unidade geradora foi configurada para trabalhar no

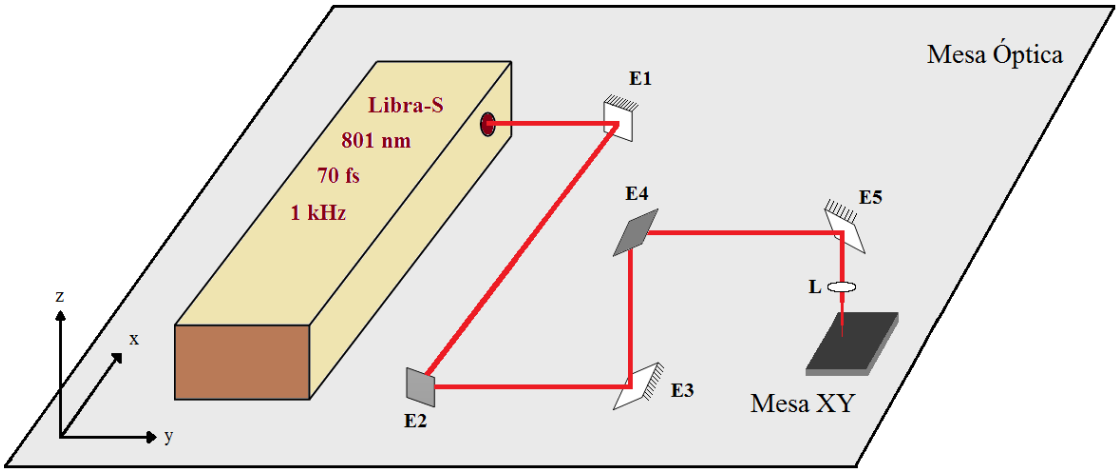
modo MIN, em que a potência é selecionável. Foi utilizada a potência mínima de 3 e máxima de 5 em unidades do próprio equipamento.

4.2.3 Procedimentos de irradiação com laser de femtossegundos

Com a finalidade de provocar a modificação de superfície utilizando um laser de femtossegundos, foi empregado um feixe de saída do laser Libra® S (Coherent, Palo Alto, CA, EUA). Essa cavidade contém um oscilador que consiste num cristal de Ti:Safira (meio ativo) e um laser de semicondutor de bombeio, como também espelhos de realimentação da cavidade e de saída. Além destes, um modulador eletro-óptico tipo *mode lock* produz um feixe de saída pulsado da ordem de 70 fs. Devido à estreita largura temporal dos pulsos, o espectro do feixe de saída é uma banda larga centrada em 801 nm. Esses pulsos passam por um amplificador com um modulador eletro-óptico tipo *Q-Switch* externo à cavidade principal, gerando pulsos gigantes na frequência de 1 kHz com energia máxima de 1 mJ. O controle de potência média para o experimento é ajustado via computador, utilizando o programa da interface de controle do próprio fabricante, que manipula a corrente de alimentação do laser de bombeio. O controle de potência através da manipulação da corrente de alimentação não é ideal para estudos com variação de potência de saída, porém o atual experimento foi realizado com apenas uma potência média fixa, o que garante a estabilidade da cavidade ressonante.

Ao sair da cavidade, o feixe foi redirecionado por um conjunto de espelhos de alumínio depositado em primeira face, de forma a promover uma incidência normal à superfície do fígado exposto na máscara. Por fim, o feixe foi focalizado utilizando uma lente de distância focal de 20 cm. A focalização garante a alta intensidade local e a geração de um plasma localizado que provoca ablação. Dessa forma, a modificação de superfície gerada apresenta pouco dano térmico. O aparato de iluminação é exposto na figura 17.

Figura 17 - Aparato de irradiação com laser de femtossegundos. Os animais foram apoiados na mesa XY, controlada por um motor de passo.



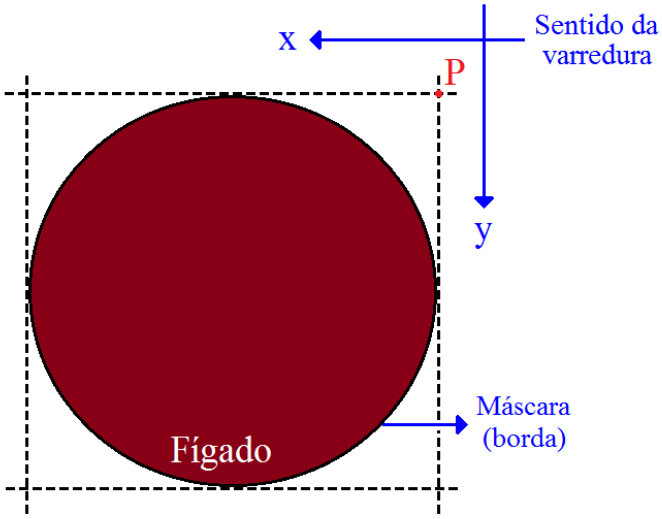
Fonte: Autor, 2013.

Os animais foram posicionados na mesa XY de forma que a posição inicial de incidência do laser de femtossegundos fosse o mais próximo possível do ponto P da figura 18 (encontro de duas retas tangenciais à circunferência delimitada pela máscara, sendo uma no sentido x e outra no sentido y da varredura). A mesa XY estava ligada a dois motores de passo que controlavam o seu deslocamento. Esses motores, por sua vez, estavam automatizados e seu controle foi feito através de um programa desenvolvido em plataforma LabVIEW®. Dessa forma, a mesa se desloca em relação ao feixe incidente em –x e em seguida numa linha mais abaixo em –y, até varrer toda a região. Sendo o laser pulsado e o motor promovendo o deslocamento da mesa em múltiplos de pequenas distâncias, a modificação de superfície é descontínua, porém, o controle automatizado da mesa torna tal modificação uniforme.

O programa controlou a mesa para mover-se 0,5 cm na direção x, com o espaçamento entre as linhas na direção y de 0,1 cm. A velocidade de varredura foi de 1000 em unidades arbitrárias, estabelecida no programa de controle do motor de passo. A potência média foi verificada logo após a lente L do aparato (fig. 18) com

um medidor de potência para o infravermelho, configurado para leitura em λ = 801 nm. Tal potência foi de aproximadamente 150 mW.

Figura 18 - Esquema de varredura de irradiação com laser de femtossegundos.



Fonte: Autor, 2013.

4.2.4 Procedimentos de irradiação com laser de Er:YAG

A última das técnicas utilizadas para modificar a superfície do tecido irradiado consiste em um sistema laser de Er:YAG (Twin Light, Fotona Medical Lasers, Slovenia), mostrado na figura 19.

Este sistema é composto de um cristal de Ítrio e Alumínio dopado com Érbio, onde o Érbio entra como substituinte em alguns sítios ocupados pelo Ítrio. Esse meio ativo é bombeado por uma lâmpada e, com a disposição de espelhos de reflexão total e parcial, forma a cavidade ressonante. O feixe de saída é um laser pulsado que opera na região do infravermelho distante, com comprimento de onda central de 2,94 µm (linha emitida pelo íon dopante) e duração de pulso na ordem de centenas de microssegundos, assim determinada por meio de um modulador eletro-óptico tipo *Q-Switch*. Acompanhando o feixe principal está um segundo feixe produzido por um

laser de diodo semicondutor que emite em 670 nm, utilizado como luz guia. Ambos os feixes são emitidos através de um braço articulado com cinco espelhos até a peça de mão. Nessa peça de mão há um conjunto de espelhos e lentes que focalizam tanto o feixe principal quanto a luz guia numa área de 0,466 mm².

Figura 19 - Sistema laser Er:YAG (à esquerda) e detalhe da saída de luz da peça de mão (à direita).

Fonte: Autor, 2013.

A frequência dos pulsos de saída varia entre 1 e 15 Hz e a energia do pulso pode variar até 500 mJ, assim ajustado pelo usuário. Para todos os animais, pertencentes a quaisquer grupos, quando houve modificação de superfície, os parâmetros de irradiação com este laser foram mantidos fixos: 15 Hz, distância entre a superfície irradiada e a saída do laser na peça de mão de 5 cm e energia de pulso de 200 mJ. O laser foi mantido fora de foco para provocar apenas uma ablação leve na superfície (para evitar hemorragia intensa) e bastante coagulação. O feixe fora de foco passou duas vezes pela superfície (ida e volta) com o tempo de exposição em cada varredura durando em média 0,5 segundo.

4.2.5 Procedimento experimental para TFD

Para provocar o efeito fotodinâmico é necessário que os animais sejam fotossensibilizados e, em seguida, irradiados com uma luz em comprimento de onda, intensidade e dose adequadas. Para o presente trabalho utilizamos como FS o Photogem® (Moscou, Rússia) na dose de 1,5 mg/kg de animal em aplicação única. O Photogem® é um derivado de Hematoporfirina (da expressão em inglês *Hematoporphyrin Derivate*, ou HpD), sendo este um fotossensibilizador de primeira geração. Esse fotossensibilizador foi diluído em água destilada numa concentração de 5 mg/mL. Dessa forma, após a medida do peso do animal, a quantidade de solução utilizada (volume *V* em mililitros) por animal foi calculada segundo a expressão:

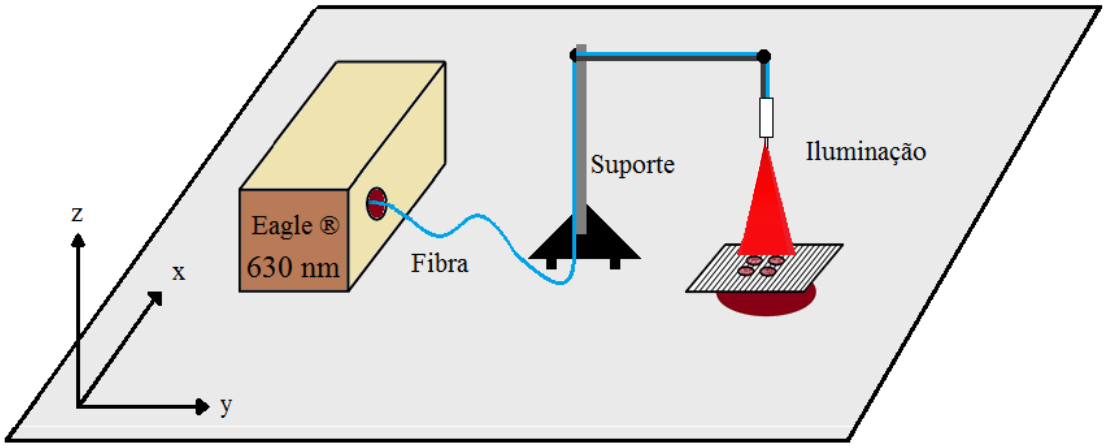
$$V(mL) = \frac{peso\ do\ animal\ (em\ gramas) \cdot 1{,}5}{5000} \qquad (Eq.\ 32)$$

O protocolo de sensibilização consistiu-se em, após a abertura da cavidade abdominal, administrar o volume calculado acima diretamente na veia cava. Utilizando o protocolo estabelecido em estudos anteriores [1], esse composto administrado segundo esses passos atinge uma concentração máxima em tecido hepático após um intervalo de 30 minutos a partir do instante de aplicação.

Após o referido tempo de espera e, a depender do grupo, feitas as devidas modificações de superfície (antes ou depois do presente procedimento), iniciou-se a irradiação da TFD propriamente dita. A iluminação para produzir efeito fotodinâmico foi realizada utilizando um laser de diodo emitindo em 630 nm em modo CW (Eagle Heron®, QuantumTech, São Carlos, Brasil). A área de iluminação foi de 1,77 cm² (círculo com 1,5 cm de diâmetro), de forma que todos os círculos da máscara externa fossem iluminados simultaneamente e nas mesmas condições, com uma intensidade de 150 $mW.cm^{-2}$. Sendo estabelecido o tempo de iluminação como 1000 s, a dose de luz total aplicada foi de 150 $J.cm^{-2}$. O feixe de luz foi direcionado na

superfície do fígado exposto do animal utilizando uma fibra óptica para iluminação direta, produzida por uma microlente na saída da mesma, gerando um perfil de feixe de intensidade uniforme em toda a região irradiada. Esse aparato busca produzir uma necrose de TFD com profundidade aproximadamente uniforme (figura 20).

Figura 20 - Aparato de iluminação para Terapia Fotodinâmica.

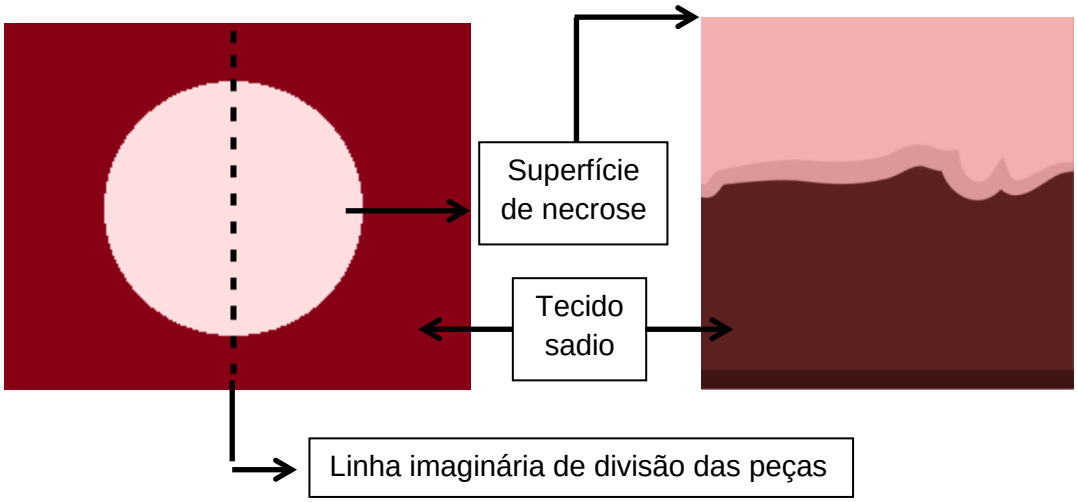


Fonte: Autor, 2013.

4.2.6 Análise histopatológica

Os animais do grupo G3 deram origem a três peças histológicas. Já o lobo de cada um dos animais pertencentes aos outros grupos (os que envolvem MS) foi dividido em quatro partes, dando origem a quatro peças, gerando um total de 67 peças histológicas. Todas as peças foram divididas ao meio para estabelecer o centro da lesão como a região a ser destinada para fixação na lâmina histológica. A divisão das peças individuais é mostrada a seguir na figura 21. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em formol tamponado e posteriormente desidratadas, cortadas em um micrótomo. Os cortes foram fixados e corados pelo método convencional utilizando hematoxilina e eosina.

Figura 21 - Esquema para divisão das peças histológicas. A linha imaginária foi utilizada para dividir as amostras para exposição do dano em profundidade (perpendicular ao plano da imagem).



Fonte: Autor, 2013.

4.2.7 Microscopia Confocal de Fluorescência

Complementando a análise da fluorescência em tempo real, foram obtidas imagens microscópicas de fluorescência da região de necrose após as 30h de formação das mesmas, utilizando para isto um microscópio de fluorescência confocal (LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As imagens são geradas por um sistema de entrega de luz de excitação (nesse caso, utilizou-se um laser CW de baixa intensidade operando em 405 nm) para excitar pontualmente uma amostra assim. O laser "varre" uma pequena porção da amostra e há a coleta simultaneamente a luz emitida por cada ponto, montando ao final da varredura uma imagem de fluorescência. As imagens foram geradas no modo *lambda coded*, onde as cores da imagem correspondem aproximadamente ao comprimento de onda predominante de emissão, utilizando uma lente objetiva de 10x e intensidade relativa do laser variando entre 5 e 10% (10% ≈ 389 µW). A potência total do laser (100%) é da ordem de 3,7 ± 0,3 mW.

Para cada imagem foi gerado um conjunto de três espectros: um da luz de fundo (*background*), um da região de necrose e um terceiro do tecido sadio. Cada espectro é uma média da luz emitida por uma área circular de 10 pixels de diâmetro, em cada uma das regiões listadas. Por conta de eventuais espalhamentos ocorridos durante a coleta, percebeu-se uma grande variação em termos de intensidade de emissão. Assim, o ponto de coleta (em cada uma das três regiões) variou de forma que as intensidades máximas fossem de valores semelhantes, para que as variações espectrais (bandas e *shifts*) fossem percebidas de forma mais clara.

4.3 Resultados

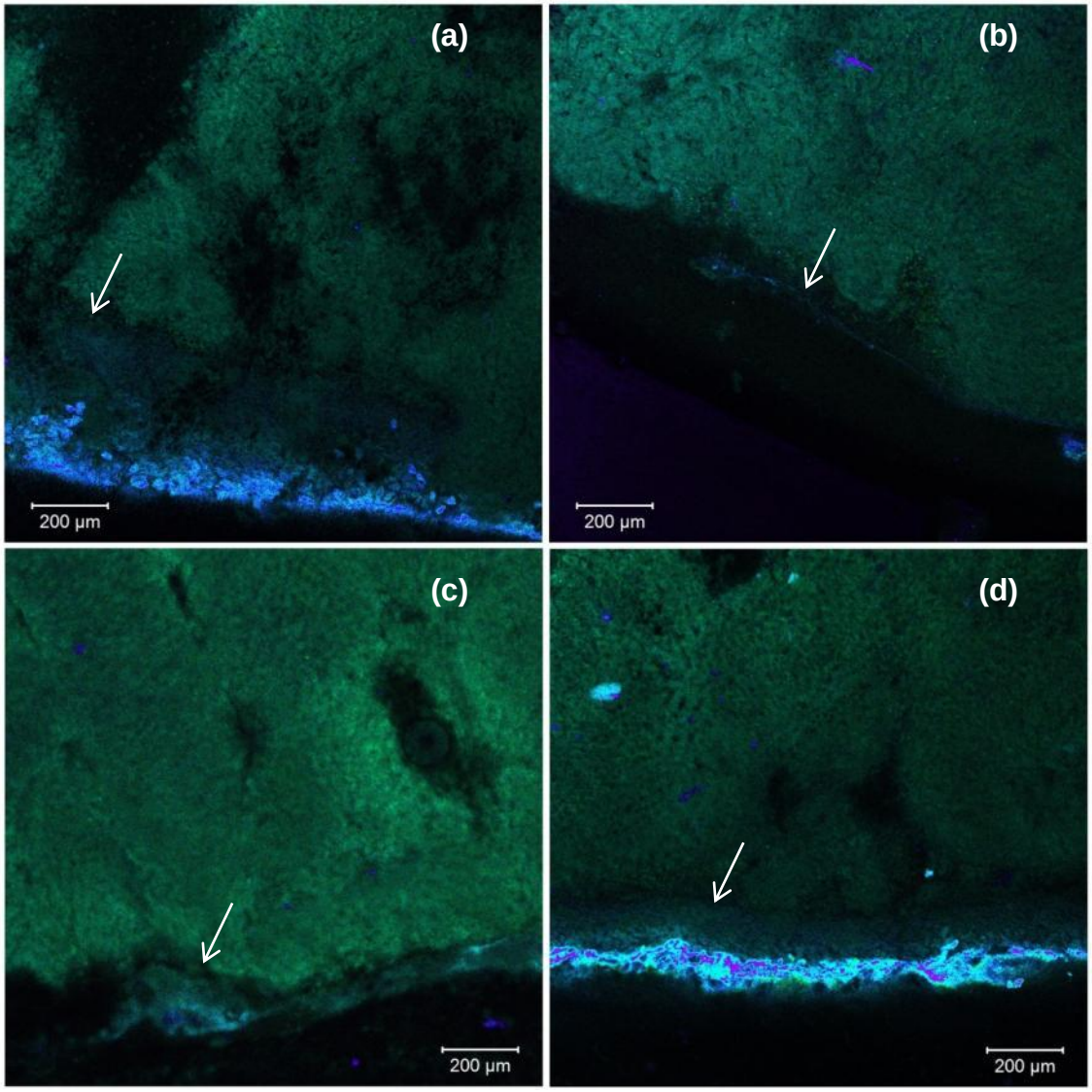
Com base nos procedimentos descritos, serão apresentados inicialmente os dados referentes à microscopia confocal de fluorescência, seguidos da análise histopatológica. Na primeira, as imagens mostram aspectos qualitativos da necrose formada após 30h dos procedimentos, obtidas a partir da amostra do fígado recém-extraído (*ex vivo*). A partir das imagens formadas, espectros de fluorescência foram extraídos de pontos específicos destas, a fim de analisar as características ópticas de emissão de luz do tecido danificado. Essa análise foi realizada para todos os grupos, exceto G3, priorizando os grupos onde houve alteração de superfície. Na segunda, os aspectos histopatológicos servirão para corroborar com a análise da fluorescência da necrose.

4.3.1 Microscopia Confocal de Fluorescência

A figura 22 mostra as imagens de fluorescência da necrose relativas ao grupo controle G1 (MS), utilizando bisturi elétrico (a), bisturi harmônico (b), além dos lasers cirúrgicos (Ti:Safira de femtossegundos e Er:YAG, (c) e (d) respectivamente). As cores das imagens correspondem ao comprimento de onda predominante emitido em cada região da amostra, segundo o modo de visualização do programa de

controle do microscópio (*λ-coded*). Em todas as imagens foi possível observar que os danos provocados na superfície se estendem para camadas de células logo abaixo, caracterizando-se como uma necrose bem delimitada na subsuperfície de tratamento. As setas indicam os limites da necrose observada em cada um dos casos.

Figura 22 - Imagens de fluorescência de fígado de rato, representativas das técnicas utilizadas no grupo G1: (a) Bisturi elétrico; (b) Bisturi Ultrassônico; (c) Laser Ti:Safira de femtossegundos; (d) Laser de Er:YAG. Aumento: 10x.



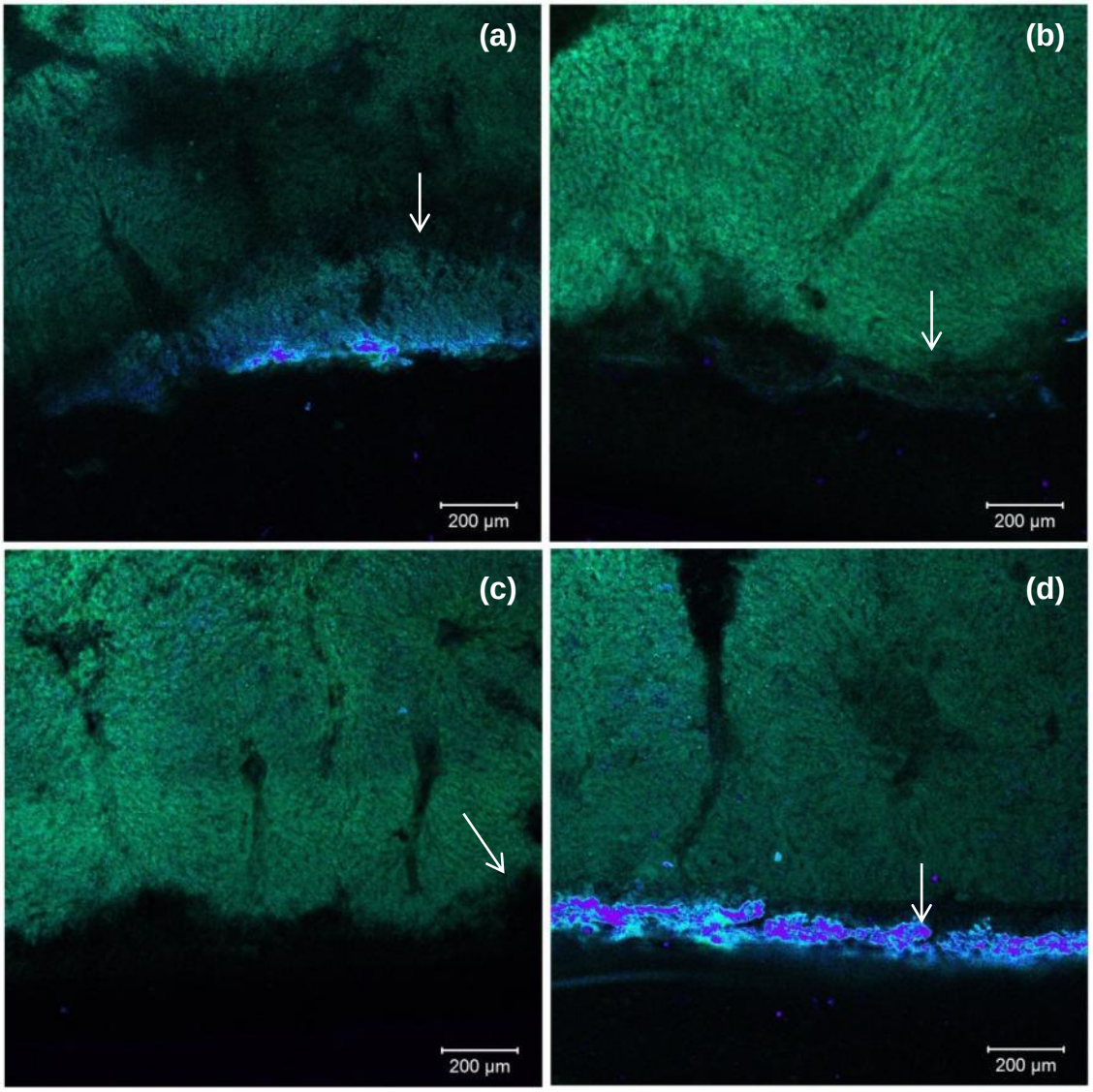
Fonte: Autor, 2013.

As necroses relativas ao tratamento de superfície por meio de bisturi elétrico e Laser de Er:YAG apresentam uma tendência de serem maiores em profundidade, em comparação com as necroses provocadas pelo uso do bisturi harmônico e do laser de Ti:Safira no regime de femtossegundos.

Com relação às duas técnicas primeiramente citadas, as regiões da necrose mais próximas da superfície apresentam um padrão distinto de emissão de luz, com emissão na região violeta e azul do espectro eletromagnético visível. Uma vez que o comprimento de onda de excitação é de 405 nm, as emissões no violeta devem-se ao retroespalhamento do laser de excitação. Os tons de azul, no entanto, estão relacionados a danos em nível celular, provocados pela coagulação do tecido tratado, como discutiremos mais adiante. Esse fato é esperado devido ao mecanismo de interação dessas duas técnicas (eletrocirurgia e laser de Er:YAG) provocarem ablação por meio da geração de calor. No caso do laser pulsado no regime de femtossegundos e do bisturi harmônico, os tons de azul e violeta próximo à superfície também aparecem, no entanto de forma mais discreta. Esse fato também é esperado pelo motivo de seus mecanismos de interação gerar uma quantidade menor de calor local, diminuindo drasticamente o dano térmico.

A figura 23 mostra os mesmos danos de superfície e subsuperfície agora provocados em um tecido previamente fotossensibilizado (Grupo G2: FS + MS). Observa-se que as necroses formadas nessas condições não apresentam diferenças significativas em relação ao grupo G1 quanto à sua profundidade. Isso é esperado uma vez que os bisturis eletrônicos não possuem a capacidade de ativar o fotossensibilizador, diferente do que ocorre durante a terapia fotodinâmica. Mesmo os lasers cirúrgicos utilizados não possuem tal capacidade, uma vez que operam na região do infravermelho (801 nm e 2,94 μm), distante dos comprimentos de onda absorvidos pelo fotossensibilizador. No entanto, uma sutil diferença é percebida na figura 23a em relação à figura 22a, em que a primeiramente citada apresenta uma diminuição na fluorescência emitida na região do azul. Este fato pode indicar uma possível atenuação do dano térmico nessas condições. Esta característica, no entanto, não é observada para a lesão provocada pelo laser de Er:YAG.

Figura 23 - Imagens de fluorescência de fígado de rato, representativas das técnicas utilizadas no grupo G2: (a) FS + Bisturi elétrico; (b) FS + Bisturi Ultrassônico; (c) FS + Laser de femtossegundos; (d) FS + Er:YAG. Aumento: 10x.

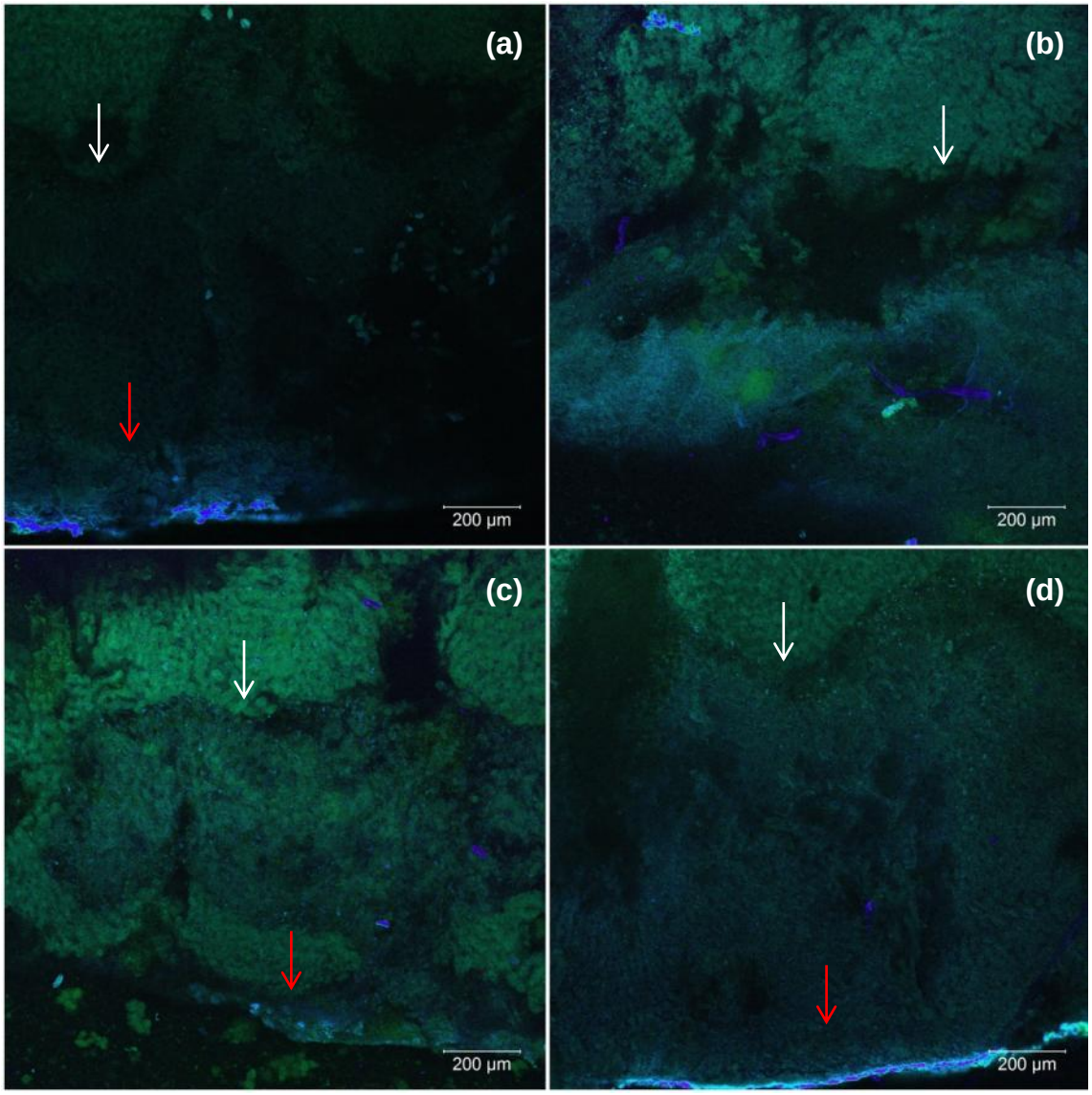


Fonte: Autor, 2013.

As figuras 24a até 24d denotam a necrose formada no primeiro dos grupos de combinação FS + MS + TFD (Grupo G4). Nesse grupo, as alterações de superfície ocorrem após a fotossensibilização e anterior à iluminação de TFD em 630 nm. Em todos os casos, observa-se um aumento substancial da profundidade de necrose em relação aos grupos controle G1 e G2. Em algumas imagens observam-se regiões escuras nas amostras que devem ser interpretadas como artefato de técnica: devido

às imperfeições no corte que dividiu a peça histológica ao meio para observação da necrose em profundidade, nem todas as regiões da amostra ficaram no mesmo plano focal.

Figura 24 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência de fígado de rato, representativas de cada técnica utilizada no grupo G4 (FS + MS + LUZ): (a) FS + Bisturi elétrico + LUZ; (b) FS + Bisturi Ultrassônico + LUZ; (c) FS + Laser de femtossegundos + LUZ; (d) FS + Er:YAG + LUZ. Aumento: 10x.

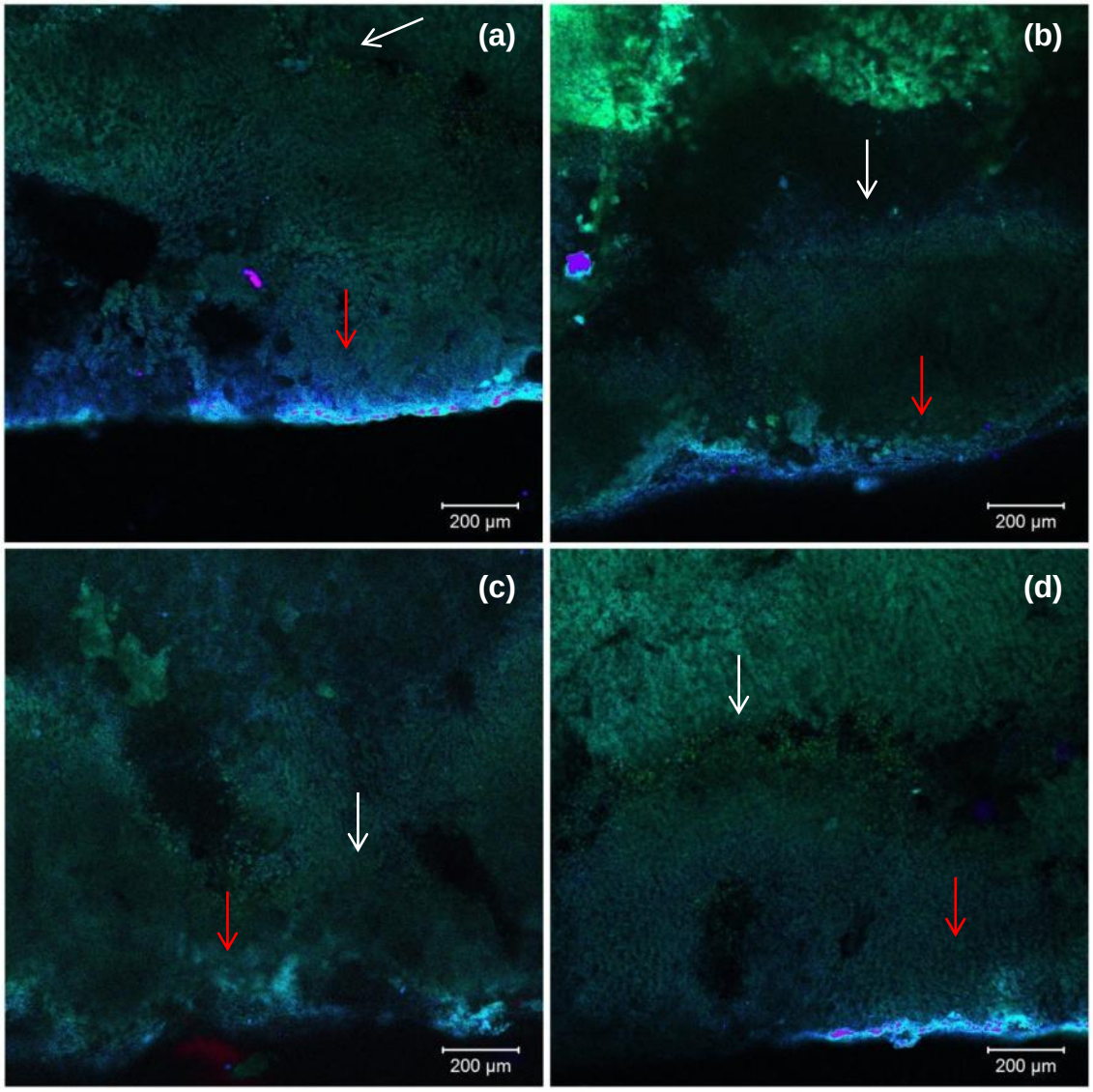


Fonte: Autor, 2013.

Primeiramente, deve ser destacado que as características de fluorescência da superfície dos grupos controle G1 e G2, observadas até o momento, foram mantidas no que diz respeito ao *blue shift* da emissão na presença de coagulação. As necroses, nesse caso, apresentaram duas regiões de dano na maioria das imagens: a primeira, mais próxima da superfície (indicada pelas setas vermelhas) relativa ao tratamento com os bisturis e lasers cirúrgicos, e uma segunda região de dano necrótico bem delimitado, bastante uniforme em sua extensão. Essa segunda região de dano é atribuída especialmente à ação fotodinâmica: uma vez que nem os bisturis eletrônicos nem os lasers cirúrgicos foram capazes de agir de forma sinergética com o fotossensibilizador, como constatado no grupo G2, apenas a iluminação em 630 nm pode ser capaz de causar o dano observado. Em outras palavras, as imagens comprovam a possibilidade de provocar dano fotodinâmico abaixo de uma região severamente modificada por um aparato cirúrgico, na ordem de combinação do protocolo G4. Não é possível afirmar se há ação fotodinâmica na primeira região de dano (superfície e subsuperfície) agindo de forma conjunta com as técnicas cirúrgicas. Porém, a utilização de um protocolo de fotossensibilização sistêmica garante a presença do fotossensibilizador nas células abaixo da primeira região de dano, não afetadas pelas técnicas de modificação de superfície. Lembrando que um dos possíveis limitantes do uso combinado de cirurgia com TFD seria a dificuldade do acoplamento da luz pela modificação de superfície, além da redução da profundidade de tratamento devido à variação de propriedades ópticas. Podemos concluir que estes dois fatores, se estiverem presentes, não foram determinantes a ponto de impedir que o efeito fotodinâmico ocorresse.

Na figura 25 são mostradas as imagens de fluorescência da necrose formada no grupo G5. As características de superfície e subsuperfície relativas aos danos provocados por bisturi elétrico e laser de Er:YAG são mantidas, isto é, a forte emissão na região do azul do espectro relacionada ao tecido coagulado, com aspecto diferenciado do restante da necrose. Diferentemente das imagens anteriores, a emissão na porção azul do espectro agora está presente também nos grupos que envolveram os tratamentos com bisturi harmônico e laser de femtossegundos. Porém, nestes a alteração aparece de forma mais branda que os dois primeiramente citados.

Figura 25 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência de fígado de rato, representativas de cada técnica utilizada no grupo G5 (MS + FS + LUZ): (a) Bisturi elétrico + FS + LUZ; (b) Bisturi Ultrassônico + FS + LUZ; (c) Laser de femtossegundos + FS + LUZ; (d) Er:YAG + FS + LUZ. Aumento: 10x.



Fonte: Autor, 2013.

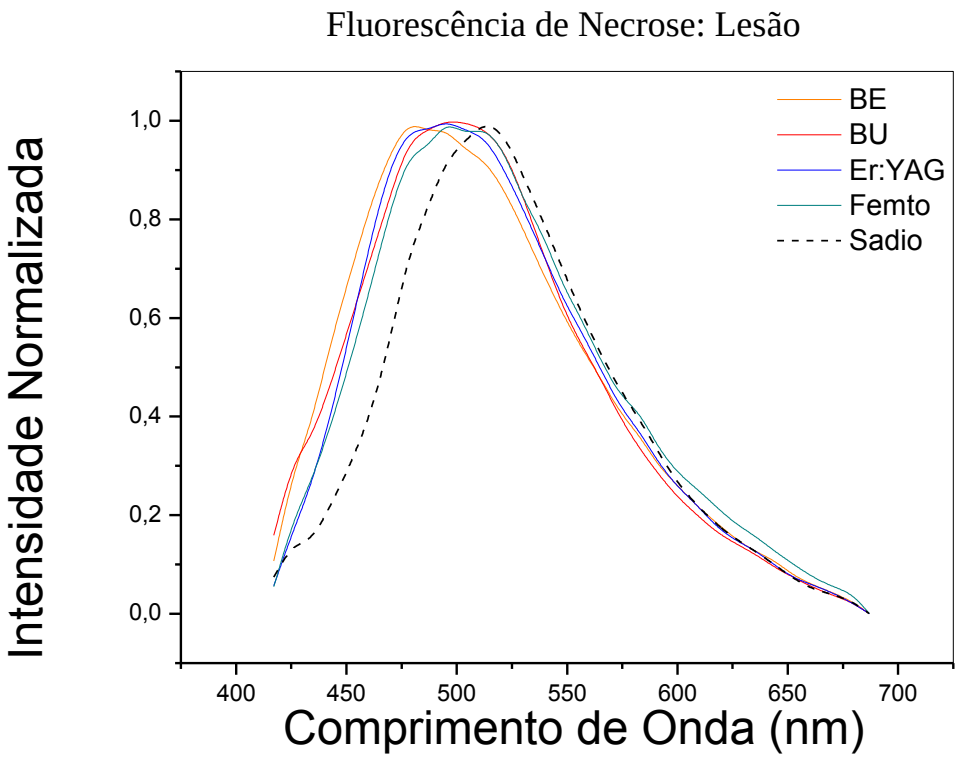
Com relação à profundidade de necrose, temos que todas apresentaram um aumento neste aspecto em comparação com os grupos controle G1 e G2. Assim, podemos garantir que nesta ordem de combinação das técnicas, o efeito sinergético da terapia fotodinâmica também está presente. Assim, mesmo que o tecido seja previamente danificado por técnicas cirúrgicas anteriormente à fotossensibilização, a terapia fotodinâmica subsequente é perfeitamente viável. Observa-se ainda nesse grupo de imagens uma tendência em se ter uma menor profundidade de necrose

total em comparação ao grupo G4. Esse fator pode ser explicado devido a uma maior perfusão local provocada pelo dano cirúrgico. Pelo fato de, no grupo G4, ambas as técnicas (cirurgia e iluminação referente à TFD) serem aplicadas uma imediatamente após a outra, não há um intervalo de tempo significativo entre elas para que se estabeleça uma resposta sistêmica como, por exemplo, uma reação inflamatória. No grupo G5, existe um intervalo de 30 minutos entre a modificação de superfície e a iluminação, tempo significativo que possibilita uma resposta sistêmica, provocando uma maior perfusão sanguínea no local do dano. Sendo o sangue um dos componentes que mais absorvem luz visível em tecidos biológicos, uma maior irrigação ocasiona maior atenuação da luz de tratamento em 630 nm, diminuindo assim sua penetração e, consequentemente, o volume de tecido tratado.

A seguir, são exibidos os gráficos de fluorescência obtidos a partir das imagens apresentadas. Os gráficos foram extraídos de três pontos específicos das imagens: necrose, tecido sadio e *background* (controle). Os gráficos extraídos são referentes a uma área circular de 10 pixels de diâmetro, localizada em cada uma das regiões. Todas as 64 peças referentes aos grupos G1, G2, G4 e G5 foram obtidas, de modo que os espectros apresentados são médias normalizadas de cada região de peças tratadas nas mesmas condições. A figura 26 mostra o gráfico referente à fluorescência de necrose do grupo G1.

É possível observar nos gráficos, de forma ainda mais clara, o deslocamento para o azul da fluorescência da necrose para todos os grupos experimentais em comparação ao tecido sadio da vizinhança. Porém, além do deslocamento, vemos um alargamento da banda também para esta porção do espectro, o que não era possível avaliar analisando apenas a imagem. Há uma sutil diferença entre as fluorescências referentes a cada uma das técnicas. Porém, os maiores deslocamentos e alargamentos foram para os tratamentos com bisturi elétrico e laser de Er:YAG (curvas laranja e azul respectivamente). Além disso, todos os grupos apresentam diferentes inclinações e protuberâncias nas curvas de fluorescência, podendo indicar, em ambos os casos, várias bandas de emissão superpondo-se no mesmo intervalo espectral.

Figura 26 - Fluorescência da necrose formada no grupo G1, referente unicamente ao dano de modificação de superfície, comparado com o tecido sadio.



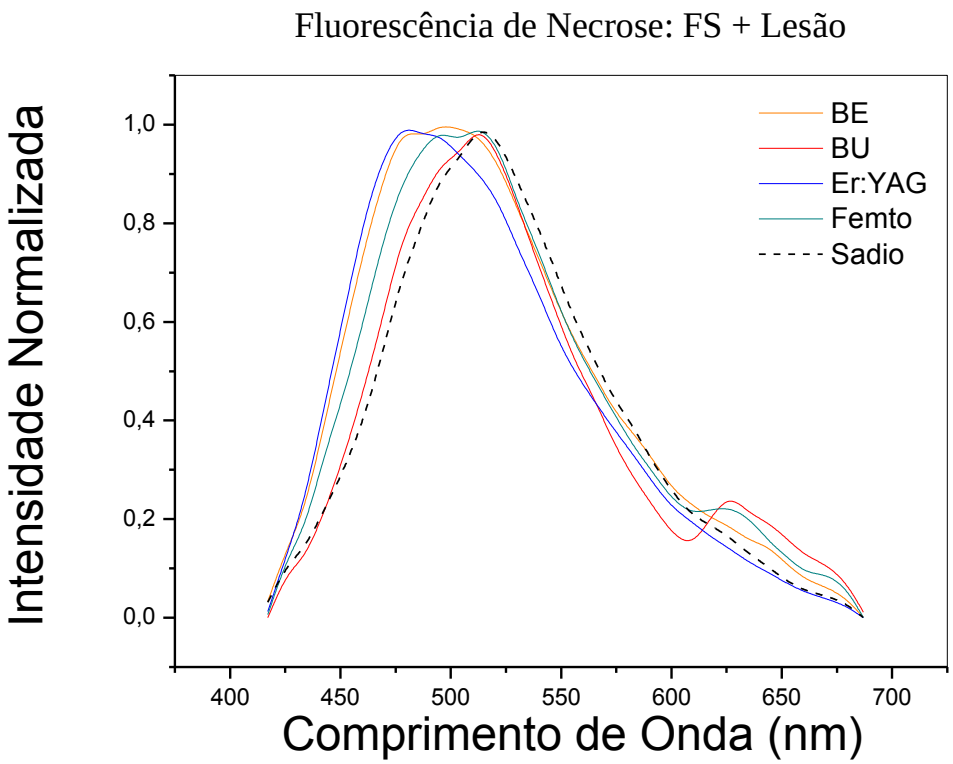
Fonte: Autor, 2013.

A figura 27 mostra a fluorescência relativa ao grupo controle G2, onde a modificação de superfície é realizada em tecido previamente fotossensibilizado. Observa-se, para todos os grupos, o mesmo deslocamento e alargamento da banda da fluorescência visto na figura 26, além das diferentes bandas de emissão presentes (fluorescência dual). Ainda, nesse caso, as necroses provocadas pelo uso de eletrocirurgia e laser de Er:YAG apresentam essas alterações de forma mais evidente.

Também pudemos observar o aparecimento de uma nova banda de emissão na porção vermelha do espectro, em uma região de comprimentos de onda compreendida, aproximadamente, entre 610 nm e 690 nm. O surgimento dessas bandas é mais evidente para os grupos que envolveram o manuseio de bisturi harmônico ou ablação com o laser de femtossegundos, em contraste com as

técnicas de bisturi elétrico e laser de Er:YAG. No caso do laser de femtossegundos é possível observar também que essa região possui duas bandas de emissão, com picos em 625 nm e 670 nm.

Figura 27 - Fluorescência da necrose formada no grupo G2, referente ao dano de modificação de superfície em tecido fotossensibilizado, comparado com o tecido sadio.



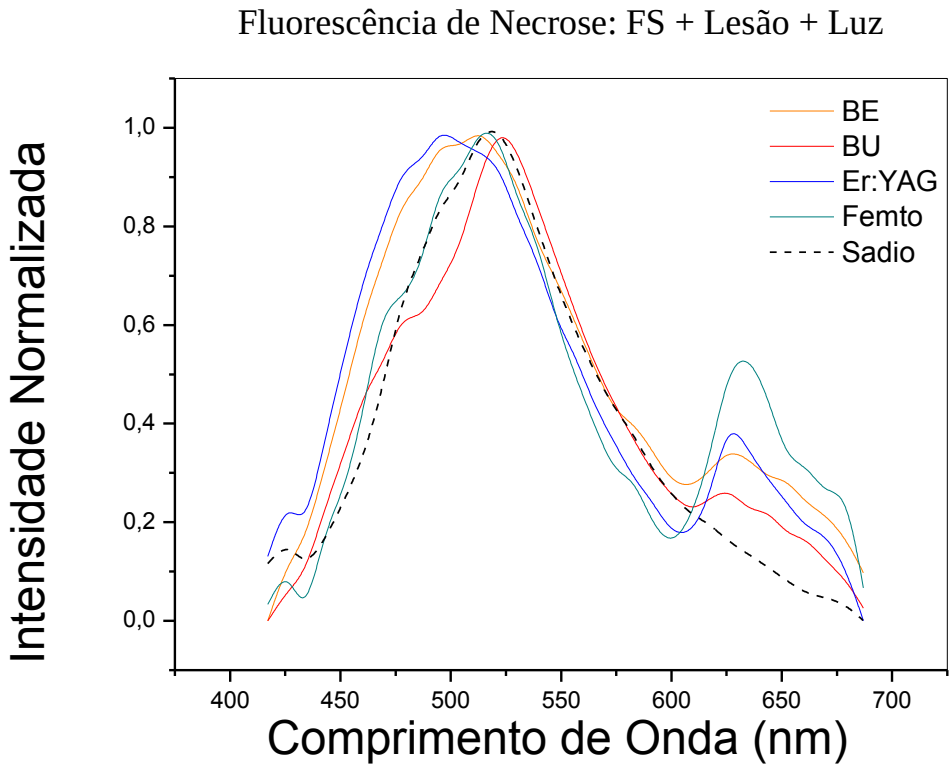
Fonte: Autor, 2013.

É possível relacionar o surgimento dessas bandas de emissão com um segundo aspecto do dano provocado por essas duas técnicas: a hemorragia intersticial ou extravasamento de hemácias. Como explanado anteriormente, os mecanismos de interação dos bisturis harmônicos e a ablação induzida por plasma produzida por um laser de femtossegundos são tais que o dano térmico é extremamente reduzido ou ausente. Dessa forma, como o tecido hepático é extremamente vascularizado, e o fato de essas duas técnicas apresentarem baixa hemostasia, o extravasamento de

hemácias durante a ablação é favorecido. Essas mesmas duas técnicas apresentaram deslocamento para o azul, como já mencionado, porém este aconteceu de forma menos evidente do que no grupo controle G1 (figura 26). Pelo fato de os espectros serem obtidos em animais sujeitos a administração de FS no animal *in vivo*, espera-se uma contribuição considerável deste para a fluorescência, já que o Photogem® quando excitado, emite nessa mesma região.

A figura 28 mostra os espectros de fluorescência de necrose para o grupo G4. É possível perceber que, nessas condições, há um aumento expressivo da emissão na região vermelha do espectro para todos os grupos experimentais. Como vimos nas imagens referentes a esse grupo (figura 24), todos os animais apresentaram danos histológicos relacionados à produção do efeito fotodinâmico, visto através do aumento da profundidade de necrose.

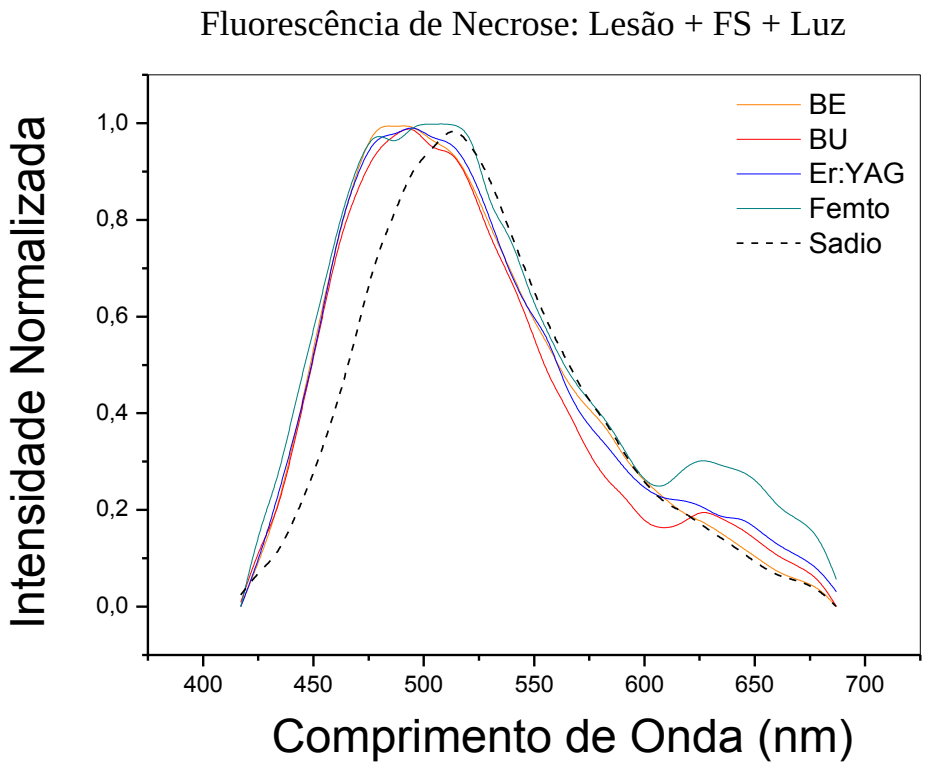
Figura 28 - Fluorescência da necrose formada no grupo G4 (FS + MS + LUZ), comparando com o tecido sadio.



Fonte: Autor, 2013.

É conhecido o fato de o dano fotodinâmico por si só provocar hemorragia, o que explica o fato de todos os grupos apresentarem bandas de emissão no vermelho. O aparecimento dessas bandas, agora de forma mais expressiva, foi suficiente para “equilibrar” o deslocamento da fluorescência para a região azul do espectro anteriormente observado na figura 27, relativo ao uso do bisturi harmônico e do laser de femtossegundos, aproximando seus picos de emissão do pico de emissão do tecido sadio. Assim, apenas as técnicas de bisturi elétrico e laser de Er:YAG foram capazes de provocar tal deslocamento, uma vez que o dano térmico inerente a estas técnicas é sempre mais acentuado quando comparamos com a emissão do tecido sadio. A fluorescência dual fica mais evidente em todos os grupos experimentais neste grupo.

Figura 29 - Fluorescência da necrose formada no grupo G5 (MS + FS + LUZ), comparando com o tecido sadio.



Fonte: Autor, 2013.

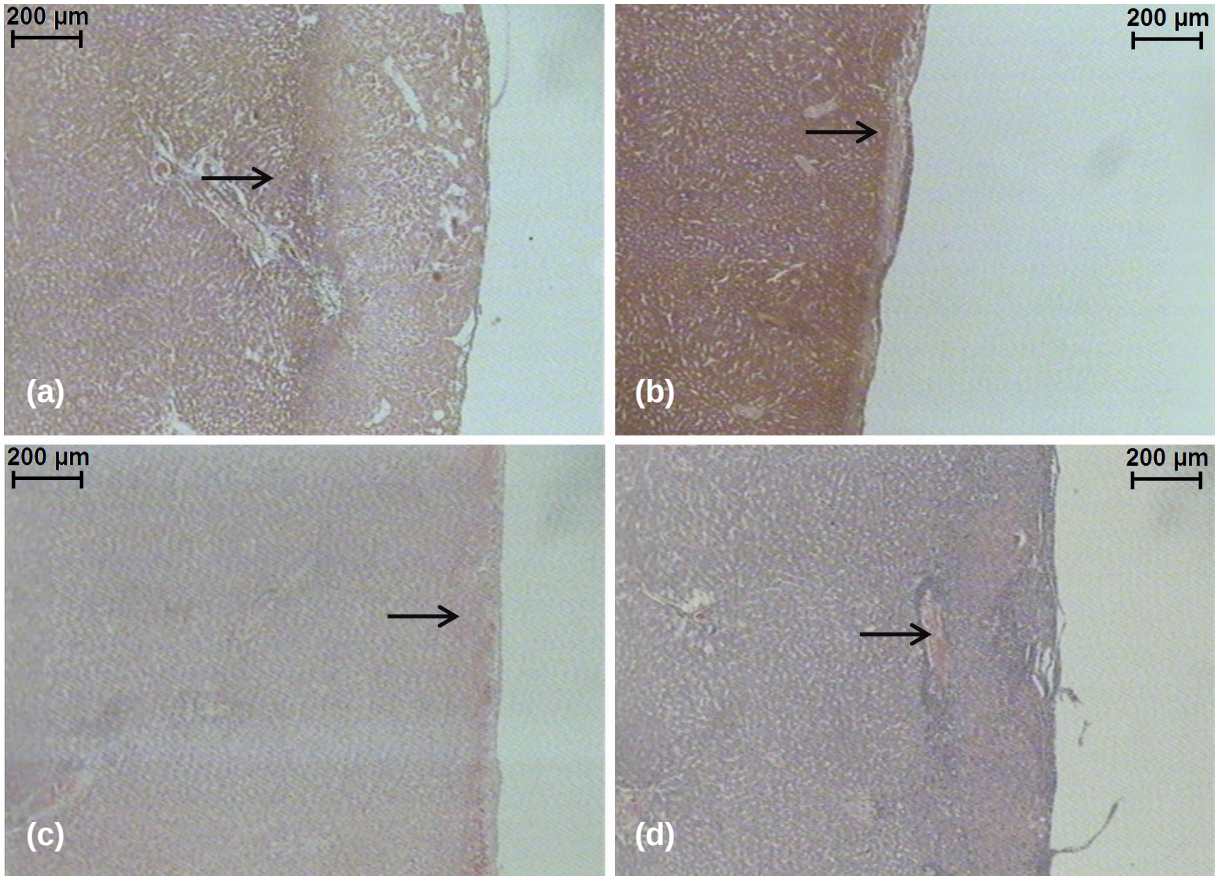
Por fim, a figura 29 apresenta os espectros de fluorescência referente às necroses geradas segundo o protocolo de alteração de superfície, seguido de fotossensibilização e iluminação em 630 nm. Nessa ordem de conjugação é possível constatar as duas alterações espectrais mencionadas no grupo anterior: o deslocamento da emissão para o azul e o surgimento de bandas de emissão na região do vermelho. A diferença em relação ao grupo G4 estaria no fato de o deslocamento para o azul ser muito semelhante para todos os grupos experimentais, o que não ocorreu no grupo G4. Assim, podemos dizer que os danos relacionados à hipertermia e extravasamento de hemácia estão presentes em todos os grupos. Isso é esperado já que o dano fotodinâmico está presente.

De forma geral, a análise da fluorescência se mostra capaz de relacionar alterações espectrais com danos histopatológicos que levam a formação de necrose. No presente trabalho, a técnica se mostrou eficaz para indicar tais alterações, algumas das alterações espectrais não são específicas de cada técnica, o que não a tornaria suficiente sozinha para analisar a necrose. As imagens de fluorescência e a análise dos cortes histológicos complementam a atual análise da fluorescência, como veremos a seguir.

4.3.2 Análise histopatológica

A figura 30 mostra a primeira sequência de imagens das lâminas histológicas, referentes aos danos de superfície e subsuperfície unicamente provocados pelas técnicas cirúrgicas (grupo G1). Nesse grupo é possível ver algumas disparidades quanto aos tratamentos. Nesta análise é também possível observar detalhes não captados na análise da fluorescência. Uma delas é o extravasamento de hemácias. Na figura 26, a fluorescência referente ao tratamento com laser de femtossegundos apresenta-se levemente maior do que os outros grupos, mas não se forma uma banda bem definida como nos gráficos de fluorescência referentes aos outros protocolos dos grupos.

Figura 30 - Lâminas histológicas do grupo G1: (a) bisturi elétrico, (b) bisturi ultrassônico, (c) laser de femtossegundos e (d) laser de Er:YAG.

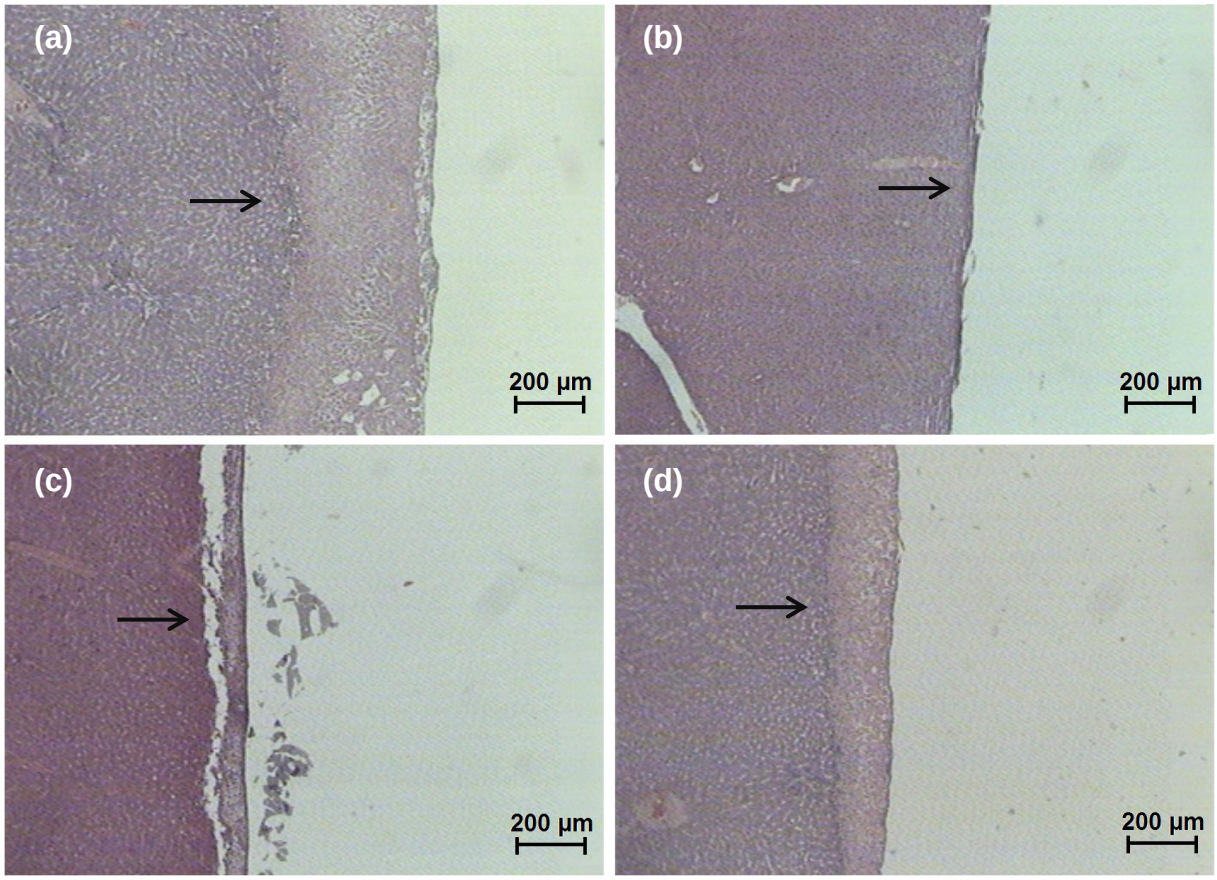


Fonte: Autor, 2013.

Na análise histopatológica pudemos observar outros fatores como coagulação, hemorragia e a presença de infiltrados inflamatórios (neutrófilos). Esses danos são evidenciados quando maiores aumentos são aplicados na observação no microscópio óptico (dados não exibidos). O dano coagulativo pode ser causado por dois motivos: dano térmico, isquemia, ou ambos. Em todos os casos, a coagulação apresentou-se com intensidades bastante semelhantes, com poucas variações entre os tratamentos. O dano hemorrágico também apresenta níveis semelhantes entre os tratamentos deste grupo. A diferença está apenas no grupo tratado com bisturi ultrassônico, onde as modificações foram leves e essas características não apresentaram níveis quantificáveis. A camada de células alteradas que aparece na figura foi classificada com danos histológicos reversíveis.

Na figura 31 vemos as imagens das lâminas dos grupos onde as lesões foram realizadas em tecido previamente fotossensibilizado. Assim como na análise anterior, vemos que as necroses dos tratamentos com laser de Er:YAG e bisturi elétrico são mais extensas que nos outros tratamentos por conta do dano térmico mais expressivo das técnicas. Ainda nesse grupo vemos que os mesmos danos histopatológicos estão presentes, ou seja: a necrose coagulativa, o extravasamento de hemácias e a presença de infiltrados inflamatórios. Aqui, os danos gerados pelo bisturi ultrassônico são pequenos em comparação aos outros tratamentos de superfície e foram considerados desprezíveis.

Figura 31 - Lâminas histológicas do grupo G2: (a) FS + bisturi elétrico, (b) FS + bisturi ultrassônico, (c) FS + laser de femtossegundos e (d) FS + laser de Er:YAG.

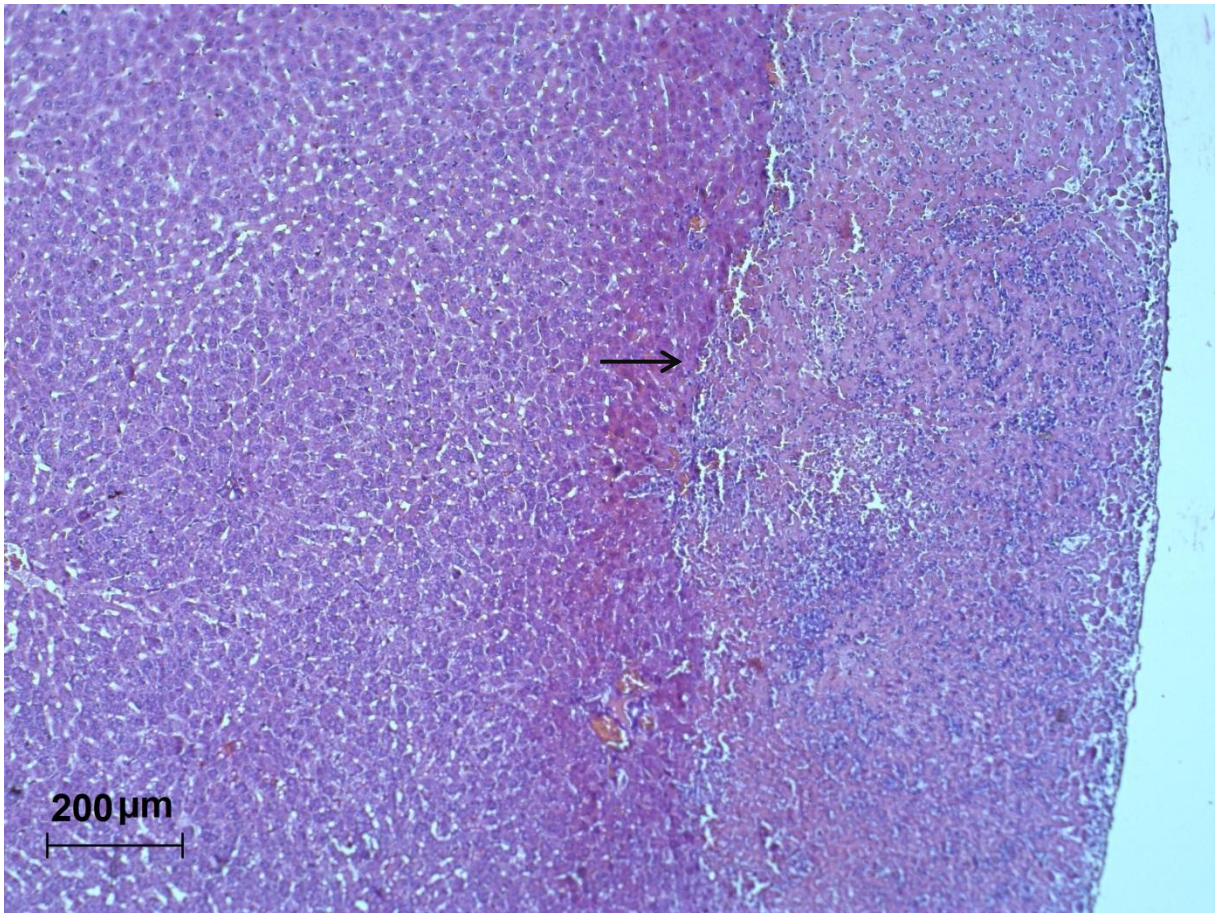


Fonte: Autor, 2013.

Na figura 32 vemos uma imagem representativa do grupo G3. Em todos os animais desse grupo foi observado um padrão muito semelhante de necrose, com

pouquíssima variação de suas características. Esta necrose, mesmo sendo provocada por um mecanismo diferente das técnicas de modificação de superfície, apresenta danos histopatológicos semelhantes a elas, com hemorragia, coagulação e inflamação. Porém, a profundidade de necrose é maior em relação às técnicas superficiais.

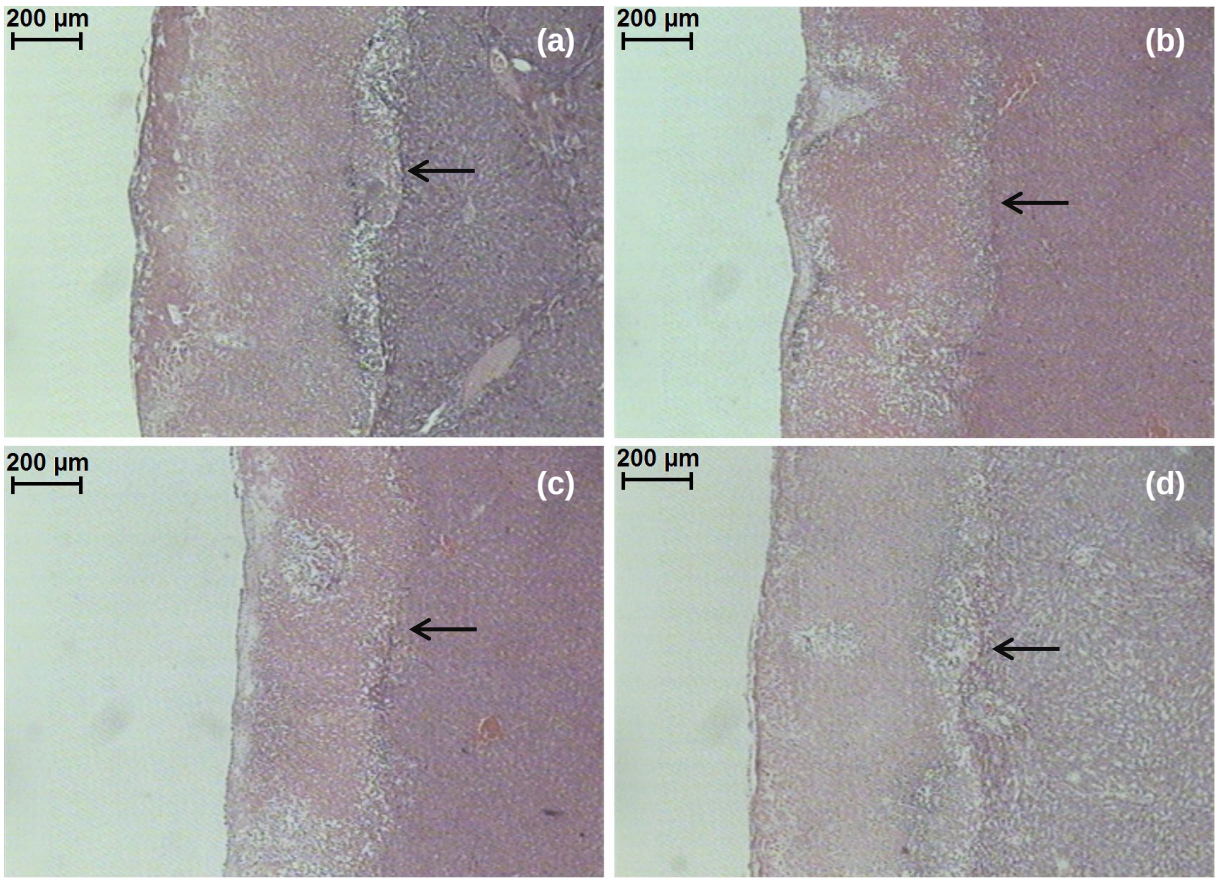
Figura 32 - Lâmina histológica do grupo controle G3: apenas TFD (FS + LUZ).



Fonte: Autor, 2013.

As figuras 33 e 34 apresentam necroses com duas regiões de dano: na superfície, os danos causados pelas técnicas cirúrgicas e, mais profundamente, o dano relativo à TFD, como evidenciado nas imagens de fluorescência. No grupo G5 das peças tratadas com laser de femtossegundos + FS + LUZ, foi observado uma degeneração hidrópica branda.

Figura 33 - Lâminas histológicas do grupo G4: (a) FS + bisturi elétrico + LUZ, (b) FS + bisturi ultrassônico + LUZ, (c) FS + laser de femtossegundos + LUZ e (d) FS + laser de Er:YAG + LUZ.

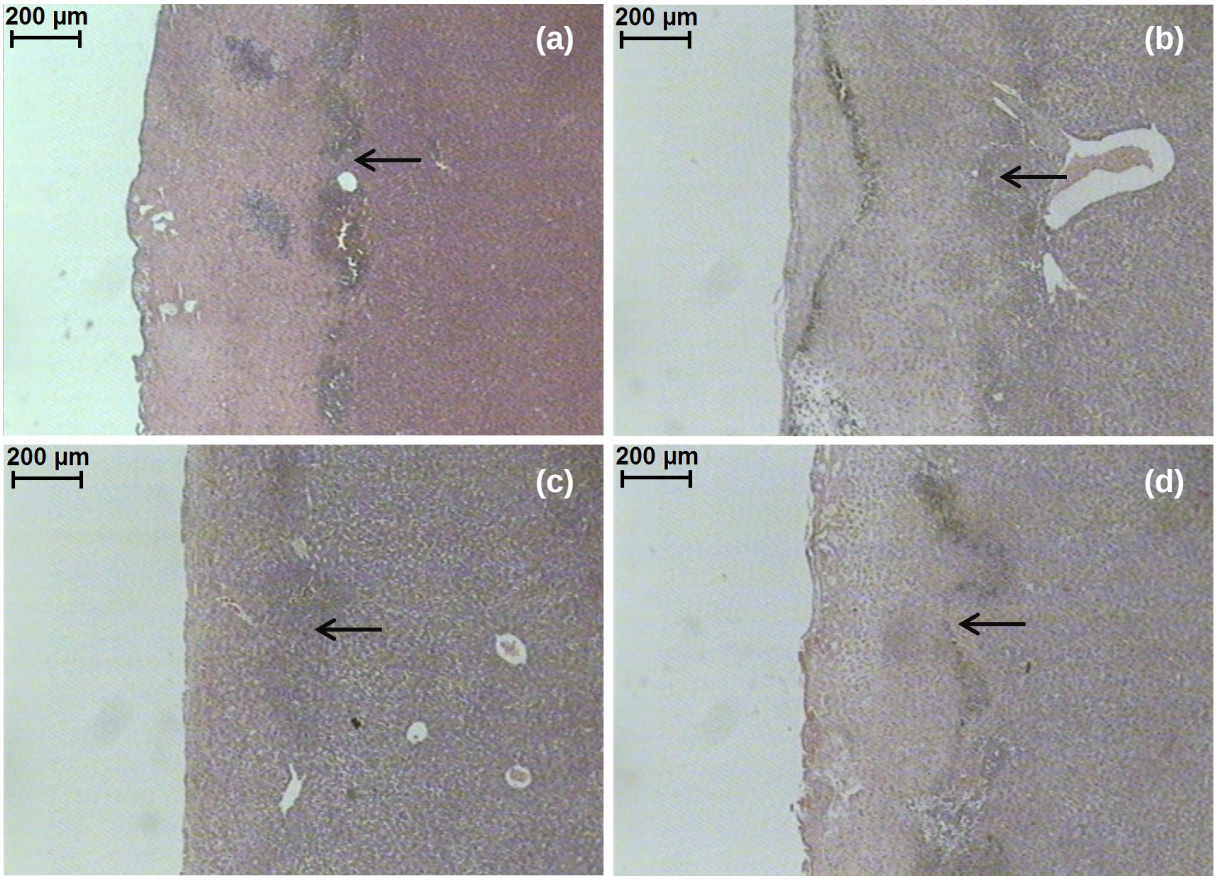


Fonte: Autor, 2013.

De uma forma geral, podemos estabelecer uma escala de intensidade para cada um dos danos observados. Uma análise quantitativa é estabelecida com três níveis de dano, denotados por cruzes: (+) danos leves, (+ +) danos moderados e (+ + +) danos severos. Valores intermediários foram atribuídos utilizando um sinal de meia-cruz (-). Por exemplo: um dano intermediário entre o brando e o moderado foi denotado pelo sinal (+ -), e assim sucessivamente.

Após a figura 34, as tabelas de 4 a 7 resumem a análise histopatológica, apresentado as intensidades dos danos agrupadas por técnica cirúrgica. Foram avaliados: necrose coagulativa (NC), hemorragia intersticial (HI), infiltração neutrofílica (IN) e degeneração hidrópica (DH).

Figura 34 - Lâminas histológicas do grupo G5: (a) bisturi elétrico + FS + LUZ, (b) bisturi ultrassônico + FS + LUZ, (c) laser de femtossegundos + FS + LUZ e (d) laser de Er:YAG + FS + LUZ.



Fonte: Autor, 2013.

Tabela 4 - Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com bisturi elétrico.

	Grupos	NC	HI	IN
Bisturi Elétrico (BE)	BE	+ -	+ -	+ +
	FS + BE	+ -	+ -	+ -
	FS + LUZ (PDT)	+ -	+ -	+ -
	FS + BE + LUZ	+ + -	+ +	+ +
	BE + FS + LUZ	+ +	+	+ -

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 5 - Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com bisturi ultrassônico.

	Grupos	NC	HI	IN
Bisturi Harmônico ou Ultrassônico (BU)	BU	Lesão degenerativa leve	Lesão degenerativa leve	Lesão degenerativa leve
	FS + BU	Lesão degenerativa leve	Lesão degenerativa leve	Lesão degenerativa leve
	FS + LUZ (PDT)	+ -	+ -	+ -
	FS + BU + LUZ	+ +	+	+ -
	BU + FS + LUZ	+ -	+	+ -

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 6 - Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com laser de Ti:Safira no regime de femtossegundos.

	Grupos	NC	HI	IN	DH
Laser de femtossegundos (Femto)	Femto	+ -	+ + -	+ + -	
	FS + Femto	+ -	+ -	+ -	
	FS + LUZ (PDT)	+ -	+ -	+ -	
	FS + Femto + LUZ	+ +	+ -	++	
	Femto + FS + LUZ	+ -	+	+ +	+

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 7 - Análise histopatológica quantitativa comparando os grupos de amostras tratadas unicamente com laser de Er:YAG pulsado.

	Grupos	NC	HI	IN
Laser de Er:YAG (Er)	Er	+ -	+ -	+ +
	FS + Er	+ +	+ -	+ -
	FS + LUZ (PDT)	+ -	+ -	+ -
	FS + Er + LUZ	+ +	+	+ +
	Er + FS + LUZ	+ +	+	+ -

Fonte: Autor, 2013.

Com relação ao grupo tratado com bisturi elétrico (BE), vemos que os grupos controle (G1, G2 e G3) apresentaram iguais níveis de coagulação na necrose formada. Já quando as técnicas foram combinadas, esse aspecto aumentou substancialmente, se aproximando ao nível mais alto de dano (severo). Esse aumento também foi observado para a hemorragia intersticial nos grupos combinados, porém não houve aumento significativo com relação a presença de neutrófilos. Os valores apresentados nas tabelas são médias obtidas entre as peças pertencentes a cada grupo. Durante a análise histopatológica foi percebida uma grande variação desses aspectos, atribuída neste caso à variabilidade intrínseca da resposta animal. Assim, estes valores são vistos como tendências, necessitando-se de um número maior de animais e amostras para afirmar tais valores com segurança.

Nos grupos de amostras tratados com bisturi ultrassônico e laser de femtossegundos, constata-se um aumento do nível de coagulação da necrose apenas para o grupo combinado G4, mas para o grupo G5 esse nível foi mantido constante ou diminuído em relação aos grupos controle e ao próprio G4. Porém, a hemorragia intersticial apresentou uma tendência a diminuir no grupo G5. Comparando os grupos G4 e G5 com relação à fluorescência, vemos que o grupo G4 apresentou bandas mais expressivas na região do vermelho do espectro eletromagnético e um deslocamento mais brando para a porção azul do espectro. Já no grupo G5, as bandas de emissão no vermelho são mais brandas e o deslocamento para o azul é mais evidente. Assim, reconhece-se a equivalência entre as duas análises. Na tabela 7 vemos um comportamento semelhante com relação à diminuição da hemorragia intersticial nas amostras tratadas com laser de Er:YAG. Já os níveis de coagulação e infiltração de células inflamatórias mantiveram-se praticamente constantes entre os tratamentos.

4.4 Discussões

A fluorescência é uma técnica capaz de identificar átomos, moléculas e também tecidos biológicos em situações específicas. Com relação a esta última aplicação,

temos que o espectro é formado por bandas largas. Isso acontece, pois os fluoróforos - estruturas do tecido biológico que respondem ao estímulo luminoso emitindo fluorescência - possuem espectros de emissão com tal aspecto por alguns motivos. Como a maioria deles são macromoléculas ou outras estruturas complexas, qualquer tipo de degenerescência torna-se praticamente improvável, tornando os níveis de energias permitidos bastante diversos e próximos entre si em termos de valores de energia. Outro fato é que em um tecido biológico, mais de um fluoróforo pode contribuir simultaneamente para a emissão, o que tornaria o espectro ainda mais complexo. Por esse motivo, espera-se a que os picos de absorção e de fluorescência tenham um caráter dual, onde duas ou mais bandas de emissão (de cromóforos distintos ou não) podem estar superpostas, mesmo em situações com nenhum tratamento cirúrgico ou de TFD. Esse caráter pode ser constatado quando percebemos uma banda de emissão com um pico principal (máximo absoluto) e pequenas protuberâncias (máximos locais), além de diferentes inclinações (derivadas) nas curvas.

Ainda assim, a fluorescência apresenta variações perceptíveis em tecidos que passaram por algum tipo de alteração. Um exemplo é a utilização desta técnica para diagnosticar tecidos tumorais, em comparação com sadio. Vários estudos mostram a capacidade da fluorescência de diagnosticar tecidos biológicos em diversas condições [2-9]. Da mesma forma, é uma técnica capaz de mostrar aspectos bastante específicos em relação a células tumorais, como a expressão genética distinta de proteínas em células tumorais.

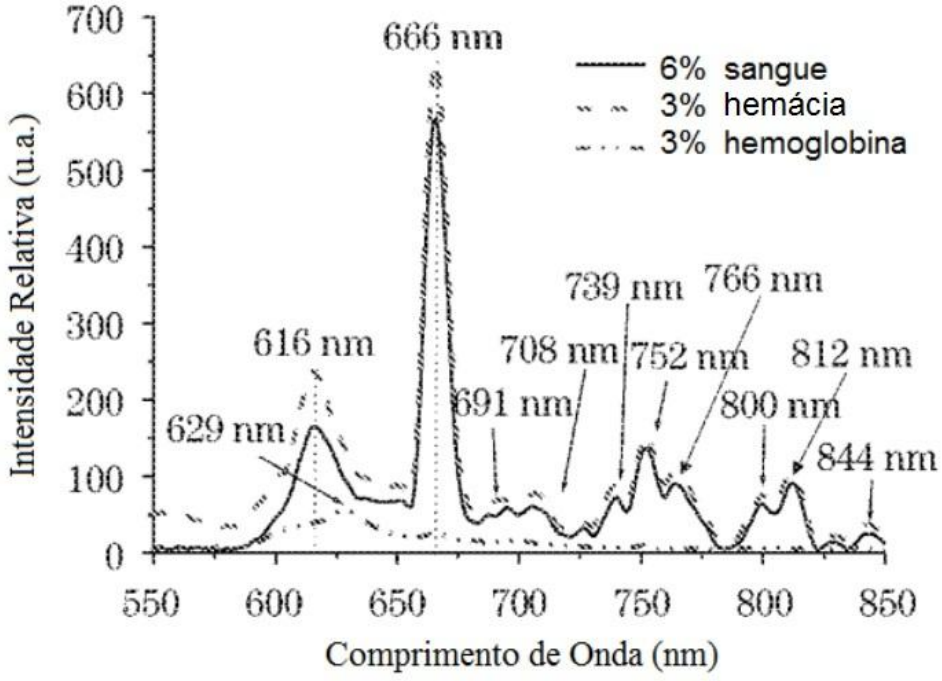
Com relação à autofluorescência de tecidos sadios, devemos destacar algum dos cromóforos naturais do corpo. Uma vez que no atual estudo tanto a excitação quanto a fluorescência foi tomada na região do visível e infravermelho muito próximo, vamos ater nossa análise aos cromóforos que apresentam resposta nessa região espectral apenas. Dentre eles, destacam-se a hemoglobina na absorção (nas formas oxi- e desoxi-) além de várias formas de colágeno no espalhamento. Outra molécula importante seria a Citocromo-C oxidase.

Por se tratar de tecido hepático e, por este ser um tipo de tecido extremamente irrigado e vascularizado, partimos do pressuposto que o sangue é o principal componente absorvedor e emissor de radiação na região do visível. Durante o dano

térmico, outra grande alteração que pode acontecer é a desnaturação de proteínas estruturais, principalmente o colágeno, e nessas condições o espalhamento de luz é aumentado significativamente para os menores comprimentos de onda [10].

A figura 35 mostra os espectros de emissão do sangue excitado por um laser de Argônio em 457 nm (CW) [11]. Vemos que a maior parte da emissão encontra-se na região do vermelho e infravermelho do espectro, o que já é conhecido de outros trabalhos [12]. Dessa forma, é esperada uma alta fluorescência na região do vermelho do espectro, mesmo para o tecido sadio.

Figura 35 - Espectro de Fluorescência do Sangue e Hemoglobina.



Fonte: Adaptado de [11].

Em tecido hepático excitado em 337 nm, no entanto, o centro da banda da fluorescência está na região verde do espectro (em torno de 500 nm), apresentando ainda assim fluorescência na região verde [13]. Pelo fato de se tratar de um menor comprimento de onda de excitação, decaimentos energéticos nas mesmas macromoléculas que tenham como produto fótons de maior energia podem ser

favorecidos, deslocando a fluorescência para o azul apenas mudando a excitação. Essa informação corrobora os dados observados para a fluorescência centrada em 513 nm para o fígado sadio, observado em nossos dados, quando excitado em 405 nm. Porém, a banda de emissão é larga e possui comprimentos de onda emitidos tanto na região do azul, quanto do vermelho.

Durante o dano térmico teríamos o aumento do espalhamento para o azul. Como a sonda de coleta de fluorescência utilizada no presente estudo é do tipo *Y-probe*, o ângulo entre a excitação e a coleta é de 0º e a distância entre eles é muito pequena, os menores comprimentos emitidos são coletados com maior intensidade. Em outras palavras, a luz emitida que sofre menor espalhamento tem sua coleta menos favorecida em relação àquela que apresenta maior espalhamento. Como as curvas são normalizadas, essas variações mudam a relação entre os picos e deixam as diferenças entre os tratamentos mais evidentes. Assim, temos que o *blue shift* visto nos dados de fluorescência do azul não necessariamente é devido a uma maior emissão de luz nessa região, mas a uma contribuição do retroespalhamento por cima da mesma, este causado pela desnaturação de colágeno.

Quando as técnicas aplicadas resultam em hemorragia intersticial, as hemácias e outros fluoróforos sanguíneos ficam expostos mais diretamente à luz de excitação, além de se concentrarem mais na região de necrose. Isso gera o aumento já discutido da emissão de fluorescência no vermelho e corroborado pelo espectro da figura 35. Como as técnicas que utilizam o bisturi ultrassônico, laser de femtossegundos, além de todos os grupos que envolvem TFD resultarem nesse tipo de dano histopatológico, ficou mais evidente o aparecimento dessas bandas na região do vermelho. Além deste fato, os grupos de animais que foram fotossensibilizados tiveram maior pico de fluorescência no vermelho. Como o Photogem® é um fotossensibilizador de primeira geração, espera-se que sua metabolização, mesmo num modelo de tecido sadio, seja mais lenta. Quando há fotossensibilização e iluminação, é esperado que a maior parte das moléculas de FS seja consumida durante a ação fotodinâmica. Porém, o protocolo de administração do FS utilizado faz com que a maior parte de suas moléculas ainda estejam localizadas internamente aos vasos sanguíneos. A sua devida penetração nas células hepáticas e metabolização pelas mesmas pode acontecer durante a

progressão do dano necrótico e suas moléculas permanecerem viáveis várias horas após sua administração, o que faz com que seus picos também estejam presentes na necrose produzida.

A profundidade de necrose é um parâmetro importante para a determinação da ocorrência do dano fotodinâmico. Esta característica demonstra exatamente a profundidade de penetração da luz que é relativa à dose de limiar. Não foram percebidas variações significativas da profundidade de necrose nessas condições onde apenas a superfície foi modificada, em que as ordens de combinação das terapias apresentaram resultados igualmente satisfatórios. Isso foi possível porque as alterações de superfície e subsuperfície não comprometeram suficientemente o acoplamento da luz no tecido, de forma que esta foi capaz de atravessar a região danificada e provocar o dano logo abaixo

Por fim, pudemos comprovar a viabilidade total de dano fotodinâmico e técnicas cirúrgicas ablativas. Devemos destacar que todas as técnicas apresentaram resultado satisfatório em termos de viabilização, porém, algumas apresentaram aspectos histopatológicos mais satisfatórios nos protocolos combinados do que outras. Acreditamos que da forma como aplicado aqui, o bisturi ultrassônico seria o melhor candidato entre os bisturis eletrônicos para o protocolo corte+TFD e o laser de Er:YAG apresentou resultados mais satisfatórios entre os lasers. Danos histopatológicos mais brandos podem influenciar em uma menor dor e melhor recuperação do paciente. Outro ponto a se destacar é que, em termos de viabilidade clínica, os protocolos que envolvem a fotossensibilização anterior ao corte cirúrgico apresentam maiores vantagens, já que o procedimento cirúrgico de acesso ao tecido alvo pode ser iniciado somente no instante do corte e imediata iluminação para TFD. Em termos práticos, isso reduz o tempo da laparotomia utilizado durante o nosso experimento caso a via de fotossensibilização fosse outra que não a veia cava.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira J, et al. Necrosis characteristics of photodynamic therapy in normal rat liver. Laser Phys **14**:209-212 (2004).

2. Amshalom A, et al. Severe Eosinophilia in Children: A Diagnostic Dilemma. J Pediatr Hematol Oncol **35**:303-306 (2013).

3. Bangash HK, Romegialli A, Dadras SS. What's new in prognostication of melanoma in the dermatopathology laboratory? Clin Dermatol **31**:317–323 (2013).

4. Kalaivani R, et al. Fluorescence Spectra of Blood Components for Breast Cancer Diagnosis. Photomed Laser Surg **26**:251-256 (2008).

5. Castro-e-Silva Jr O, et al. Autofluorescence Spectroscopy in Liver Transplantation: Preliminary Results From a Pilot Clinical Study. Transplantation Proceedings **40**:722-725 (2008).

6. O'Leary JG, Klintmalm GB. Impact of donor-specific antibodies on results of liver transplantation. Curr Opin Organ Transplant **18**:000-000 (2013) (online).

7. Sankarankutty AK, et al. Use of laser auto-fluorescence for evaluating liver grafts. Laser Phys Lett **3**:539–545 (2006).

8. Darren Roblyer, et al. Objective Detection and Delineation of Oral Neoplasia Using Autofluorescence Imaging. Cancer Prev Res **2**:423-431 (2009).

9. Tirapelli LG, et al. Histopathology and laser autofluorescence of ischemic kidneys of rats. Lasers Med Sci **24**:397–404 (2009).

10. Carruth JAS, Mackenzie AL. Medical Lasers. Bristol, Adam Hilger Ltd. (1986).

11. Gao S, et al. Characteristic of blood fluorescence spectra using low-level, 457.9 nm excitation from Ar^+ laser. Chin Opt Lett **2**:160-161 (2004).

12. Sayer P, Labbe RF, Gouterman M. Fluorescence of blood protoporphyrin in the presence of hemoglobin. Biochem Med **10**:24-35 (1974).

13. Buttemere CR, et al. *In vivo* assessment of thermal damage in the liver using optical spectroscopy. J Biomed Opt **9**:1018–1027 (2004).

5

Conjugação de excisão eletrocirúrgica e Terapia Fotodinâmica

5.1 Introdução e objetivos

Com base nos argumentos, resultados e discussões já apresentados no capítulo anterior, o presente capítulo é dedicado a avaliar a viabilidade de um protocolo de uso combinado de eletrocirurgia (EC) e terapia fotodinâmica, variando a ordem de aplicação das técnicas. A partir das técnicas apresentadas anteriormente, utilizadas para produzir modificações de superfície, escolheu-se a eletrocirurgia para avaliar uma situação mais realista, realizando uma excisão tecidual propriamente dita, através do uso de um eletrodo apropriado para tal. Variar a geometria do eletrodo significa a possibilidade de produzir cortes mais precisos uma vez que a corrente elétrica pode ser entregue de forma mais concentrada, o que varia também os danos teciduais no tecido remanescente. Através de uma análise histopatológica, avaliamos a eficiência dos protocolos combinados propostos em um modelo animal. Os dados obtidos foram interpretados de acordo com a fenomenologia intrínseca de ambas as técnicas, sob um ponto de vista físico, e características do tecido alvo como condutividade elétrica tecidual, progressão de calor, fluorescência in vivo e acoplamento de luz. Essa análise é capaz de avaliar a retenção do fotossensibilizador e a degradação do mesmo, segundo a ordem de tratamento, de forma que é possível chegar a conclusões para uma aplicação clínica futura, mínimo dano ao tecido sadio das vizinhanças da lesão e aumento do volume de tecido tratado.

5.2 Materiais e Métodos

Assim como no capítulo anterior, pretendemos analisar aqui as condições que um tecido sofre pela ação eletrocirúrgica, de um ponto de vista histopatológico e físico. Para este fim, utilizamos um modelo animal de tecido hepático sadio de ratos machos da raça Wistar. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), sob a coordenação do Professor Vanderlei Salvador Bagnato. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (Anexo 1).

Foram utilizados 15 ratos machos da raça Wistar, pesando entre 350 e 400 gramas. Como modelo foi escolhido o tecido hepático proveniente do lobo direito. Nesse estudo foi utilizado, assim como no trabalho anterior, tecido hepático sadio para prova de princípios a fim de observar como uma excisão eletrocirúrgica altera as propriedades ópticas do tecido alvo e um posterior protocolo de TFD.

Para acessar o tecido hepático, todos os animais foram submetidos a um procedimento laparotômico. Os procedimentos de anestesia, abertura da cavidade abdominal, sutura e uso do analgésico pós-operatório foram realizados de forma idêntica ao apresentado anteriormente, bem como a exposição do lobo esquerdo do fígado do animal para os procedimentos.

Nos grupos onde foi avaliada a excisão eletrocirúrgica, um bisturi eletrônico (HF-120, WEM, Ribeirão Preto, Brasil – Figura 36) foi utilizado. Inicialmente, foi realizado um estudo piloto com poucos animais a fim de definir a geometria adequada do eletrodo, os modos de operação adequados, além da potência do aparelho. Esse estudo será descrito na subseção a seguir.

Para o protocolo de fotossensibilização, foram repetidos os parâmetros do estudo anterior de modificação de superfície, utilizando o Photogem® (Moscou, Rússia). Este foi manipulado e administrado da mesma forma, com a aplicação do mesmo na dose calculada a partir da expressão 4.1. Para aplicação do corte eletrocirúrgico ou irradiação para a Terapia Fotodinâmica, esperou-se o intervalo de 30 minutos para

produzir as excisões, seguindo a mesma lógica dos tempos dos grupos detalhados na figura 14.

Figura 36 - Unidade Eletrocirúrgica HF-120.

Fonte: fabricante.

Inicialmente, um estudo piloto foi executado com a finalidade de teste de parâmetros para o estudo definitivo. Em ambos os estudos foi utilizada a técnica de fluorescência *in vivo*, com a finalidade de acompanhar a produção das lesões e a presença de fotossensibilizador endógeno. Também foi utilizada a análise histopatológica para avaliação do dano e para inferir a respeito dos processos físicos e clínicos envolvidos. Os detalhes dos dois estudos serão apresentados nas próximas seções.

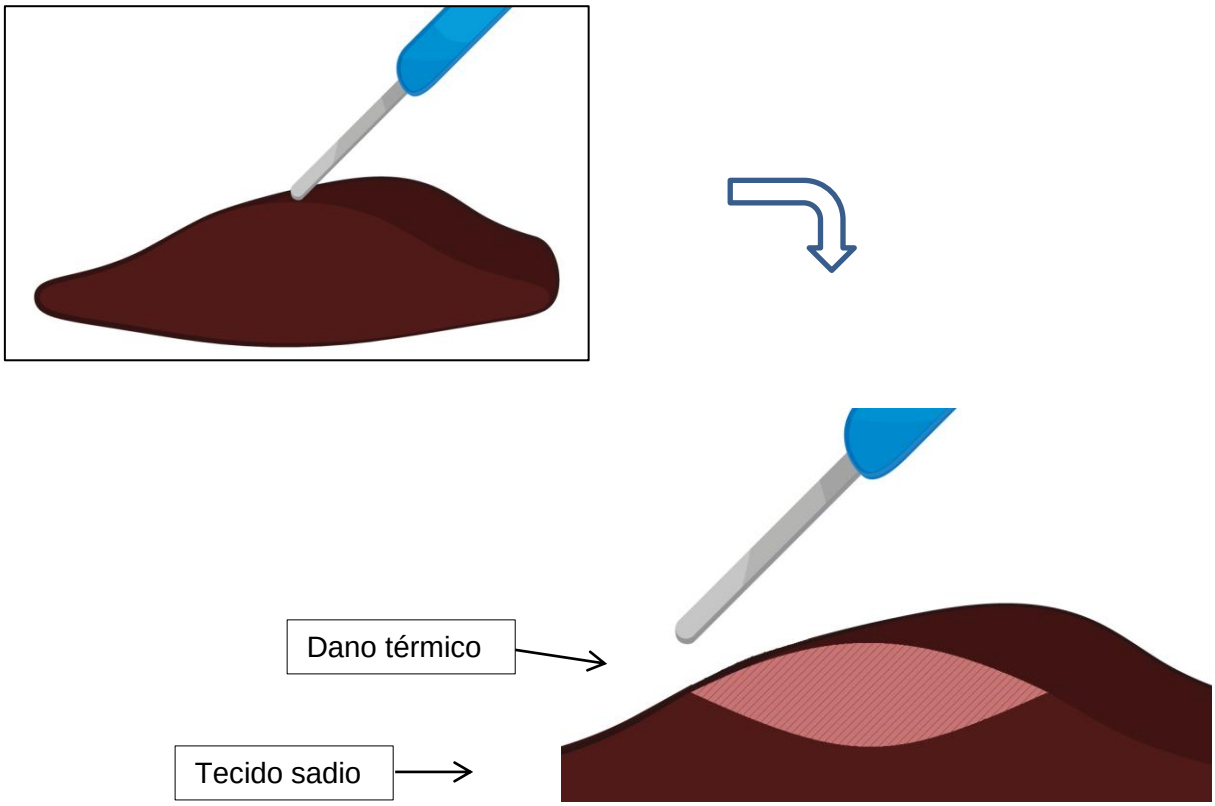
5.2.1 Estudo piloto

Com o objetivo de reduzir o número de animais utilizados nos experimentos, propusemos um estudo piloto inicialmente para definir os parâmetros de operação da unidade eletrocirúrgica mencionada. O equipamento opera com correntes RF senoidais de 480 kHz de frequência no modo de corte puro. Quando operando em modo de corte misto (corte + coagulação) são entregues pacotes de corrente com essa configuração, com frequência de entrega variável a depender do nível de coagulação pretendido. Inicialmente foram avaliadas as propriedades dos tecidos

submetidos a essas condições em função destes parâmetros. Para esta etapa foram utilizados três animais.

Foram testados os quatro modos de operações disponíveis, sendo um deles o modo de corte puro (onda senoidal constante: *Pure Cut*) e três modos de corte misto (corte + coagulação, pacotes de onda senoidal: *Blend* 1, *Blend* 2 e *Blend* 3). A numeração crescente está relacionada ao maior nível de coagulação provocada, ou seja, maior dano térmico tecidual. Foi utilizado nesta etapa um eletrodo simples, tipo "faca" para produzir os danos. O intuito foi o de entregar a corrente da unidade eletrocirúrgica em apenas um ponto, para que o calor irradiado danificasse uma região semi-hemisférica no interior do tecido (figura 37).

Figura 37 - Representação do dano, em profundidade, causado por uma corrente eletrocirúrgica visto transversalmente.

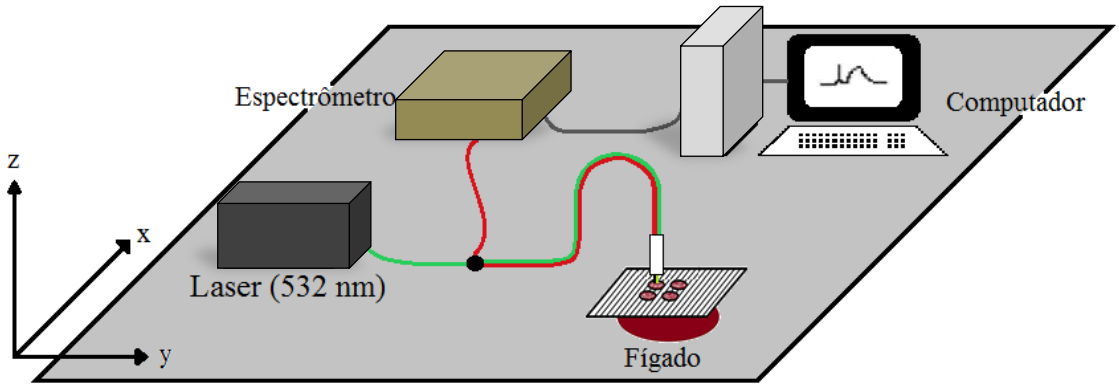


Fonte: Autor, 2013.

Durante esta etapa a autofluorescência e a fluorescência do tecido fotossensibilizado foram analisadas *in vivo* nos tecidos sadios e fotossensibilizados

submetidos aos cortes eletrocirúrgicos. O espectro de fluorescência foi coletado na superfície do tecido tratado em várias etapas do experimento, utilizando para isto um sistema de fluorescência (Spectr-Cluster v. 2.05m, Cluster, Moscou, Rússia). Este sistema é dotado de um laser de Nd:YAG com frequência dobrada (532 nm), acoplado a uma fibra óptica multimodo tipo Y. Um dos ramos desta fibra leva o laser de excitação, enquanto o outro ramo encarrega-se de levar a fluorescência coletada até um espectrômetro. O laser de excitação é transportado através de um dos ramos até a fibra de entrega da ponta de prova. A fluorescência é coletada também pela ponta de prova através de um conjunto de seis fibras situadas em volta da fibra de entrega e levada por estas até o espectrômetro. Uma vez que tanto a fluorescência quanto o retroespalhamento do laser de excitação é coletado nesse aparato, o sistema possui na sua entrada um filtro de frequência que elimina os comprimentos de onda iguais ou menores que 532 nm. O espectro coletado é exibido na tela de um computador em tempo real (figura 38).

Figura 38 - Sistema de coleta de fluorescência *in vivo*.

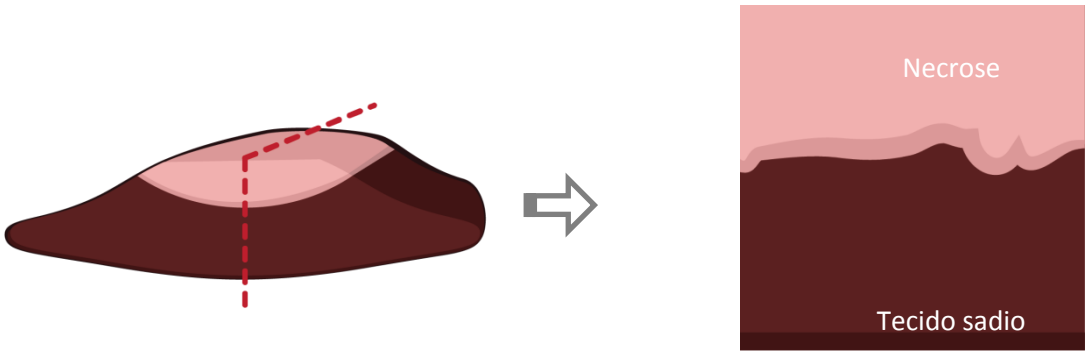


Fonte: Autor, 2013.

Após todos os procedimentos, os animais foram suturados e, esperando um período de 30 horas, os animais foram sacrificados em uma câmara de CO_2. As porções de tecido coletadas foram armazenadas em formol tamponado para conservação e posterior análise histopatológica. Para este, utilizou-se o processo de coloração convencional com Hematoxilina e Eosina, conforme realizado no capítulo

anterior. As fatias de tecido produzidas foram de cortes transversais às lesões produzidas (figura 39) para observar o perfil de necrose.

Figura 39 - Posição aproximada para coleta de fatias de tecido (linha tracejada à esquerda) para produção de lâminas histológicas (à direita).



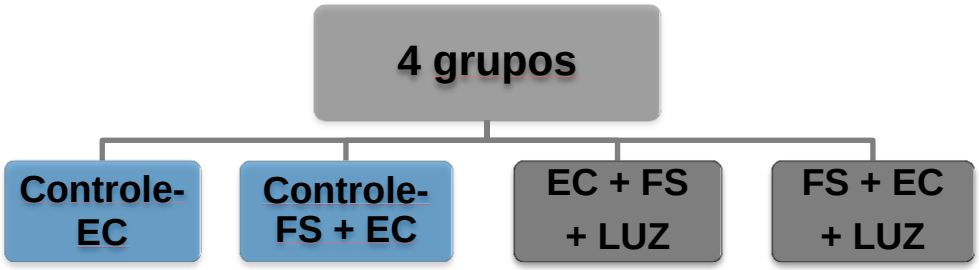
Fonte: Autor, 2013.

Durante as etapas do procedimento, fotos foram utilizadas como registro qualitativo das características de superfície do tecido submetido ao corte, obtidas utilizando uma câmera digital (Sony HX-1, zoom ótico de 6X) acoplada a um conjunto de lentes macro. Após essa etapa foi possível definir os parâmetros de operação do estudo definitivo, com as variáveis de ordem de conjugação das técnicas, como apresentado a seguir.

5.2.2 Estudo definitivo: parâmetros de corte e irradiação fixos

De forma a avaliar o dano celular e o perfil de necrose como função da ordem de combinação EC-TFD, foi utilizado um modelo animal com 12 ratos machos da raça Wistar. Esses animais foram divididos em quatro grupos experimentais com 3 animais cada um (n = 3). Os grupos experimentais são mostrados no organograma da figura a seguir:

Figura 40 - Organização dos grupos experimentais.



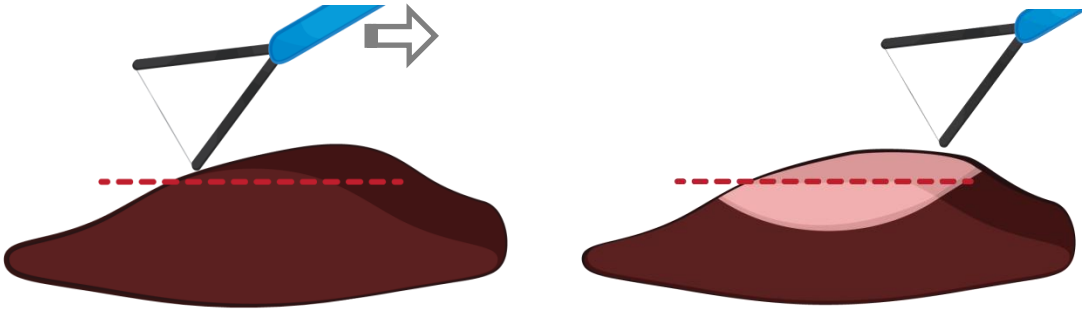
Fonte: Autor, 2013.

- **Grupo 1** - Controle EC: animais submetidos apenas ao corte eletrocirúrgico
- **Grupo 2** - Controle FS + EC: animais fotossensibilizados e submetidos ao corte eletrocirúrgico
- **Grupo 3** - EC + FS + LUZ: animais submetidos ao corte eletrocirúrgico, seguido imediatamente de fotossensibilização. Após 30 minutos, os animais foram irradiados para completar o protocolo de TFD.
- **Grupo 4** - FS + EC + LUZ: animais previamente fotossensibilizados e, após 30 minutos, submetidos ao corte eletrocirúrgico seguidos imediatamente de irradiação para TFD.

Adicionalmente, um quinto grupo experimental foi tomado como o grupo controle-TFD, apresentado no capítulo anterior. Não foi necessário repetir esse grupo controle nessa etapa do estudo uma vez que os danos histológicos observados e analisados nos animais desse grupo foram provocados seguindo parâmetros idênticos ao estudo anterior, promovendo assim o uso desnecessário de animais.

A ponta do eletrodo ativo escolhida para esta etapa consistiu-se de um fio condutor fino e reto, suportado por uma haste isolante de plástico. Uma vez que o fio é reto, a porção de tecido remanescente após o corte possui uma superfície aproximadamente plana para irradiação (figura 41).

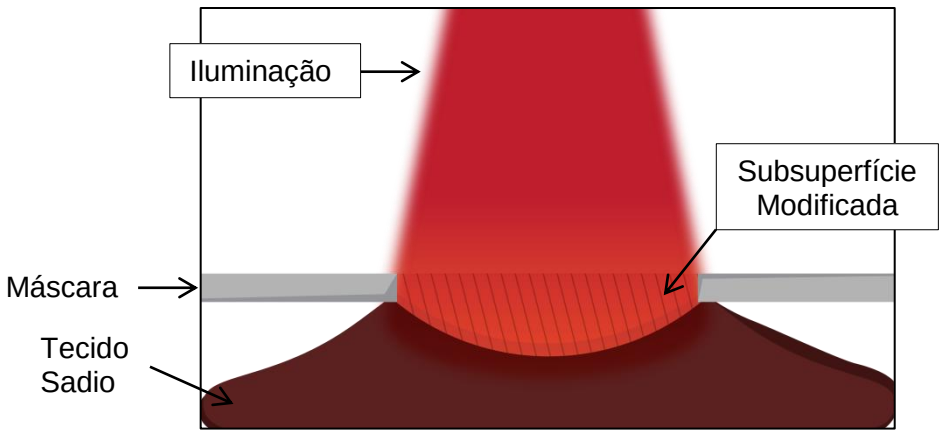
Figura 41 - Sequência de excisão eletrocirúrgica em tecido hepático.



Fonte: Autor, 2013.

O esquema de iluminação para produzir efeito fotodinâmico foi realizado utilizando um laser de diodo emitindo em 630 nm em modo CW (Eagle Heron®, QuantumTech, São Carlos, Brasil), da mesma forma que o aparato anterior (figura 21). Foram mantidos os parâmetros de iluminação utilizados no capítulo anterior, como a intensidade de 150 $mW.cm^{-2}$ e o tempo de iluminação de 1000 segundos, totalizando uma dose de luz de 150 $J.cm^{-2}$. A área iluminada, no entanto, foi diferente em relação ao estudo anterior, sendo esta de 1 cm^2, determinado por uma máscara externa com um furo apenas. O feixe de luz foi direcionado na superfície do fígado exposto do animal utilizando uma fibra de iluminação na região irradiada (figura 42).

Figura 42 - Iluminação da superfície de tratamento para TFD.



Fonte: Autor, 2013.

Em cada etapa dos experimentos foi coletada a fluorescência dos tecidos submetidos à eletrocirurgia utilizando o mesmo aparato citado na seção anterior (Spectr-Cluster v. 2.05m, Cluster, Moscou, Rússia), operando com as mesmas configurações. Além desse sistema, foi utilizado um sistema de imagens de fluorescência (São Carlos, Brasil) que ilumina a região de interesse com um LED emitindo em 405 nm e mostrado na figura 43. Esse sistema é acoplado a uma câmera digital (Sony HX-1, zoom ótico de 6X) com um conjunto de lentes macro, no intuito de observar qualitativamente o caráter de emissão de fluorescência na região afetada pelo corte.

Figura 43 - Sistema de imagens multiespectrais de fluorescência.

Fonte: referência [2].

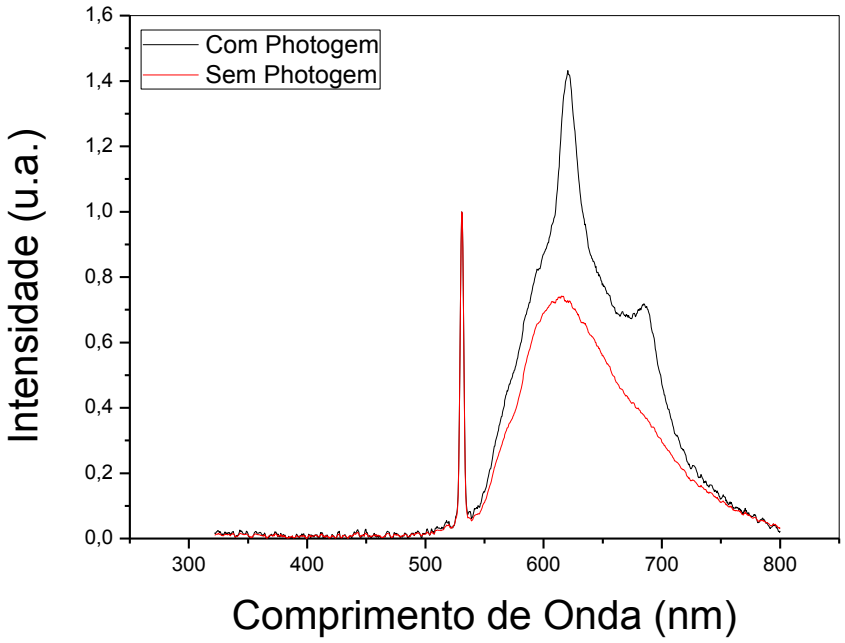
5.3 Resultados

5.3.1 Estudo piloto

Com base no proposto, o estudo piloto deteve-se a determinar principalmente o modo de operação eletrocirúrgica adequado para conjugar com terapia fotodinâmica. Um espectro típico de autofluorescência coletado nesse sistema com excitação em

532 nm, do tecido sadio e fotossensibilizado com Photogem®, é mostrado a seguir na figura 44.

Figura 44 - Espectro de fluorescência do tecido normal e após ser fotossensibilizado.

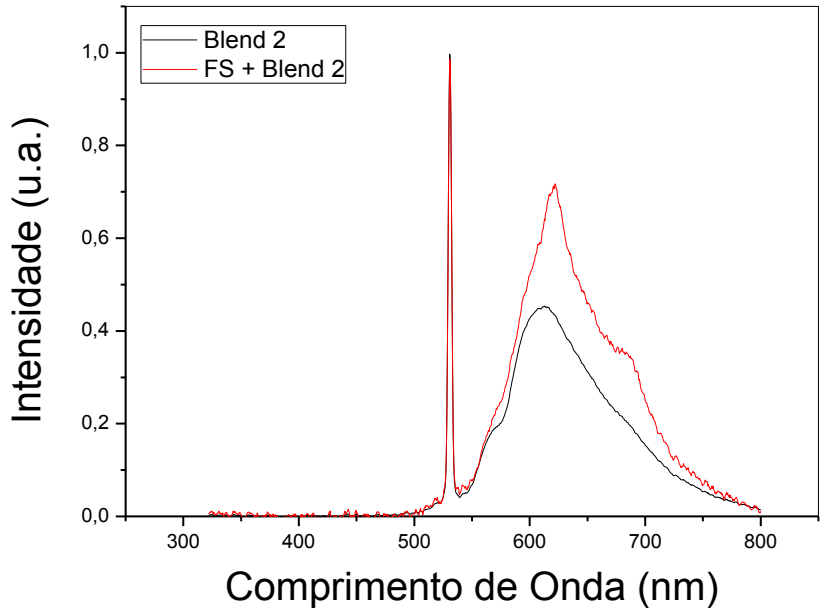


Fonte: Autor, 2012.

O espectro traçado com linha preta representa a emissão de autofluorescência para o tecido sadio não-fotossensibilizado e coletado segundo as configurações do aparato de fluorescência. O forte pico estreito observado na região de 532 nm é um resquício do retroespalhamento do laser de excitação coletado pela fibra, porém não totalmente absorvido pelo filtro do sistema. Acima dessa região de comprimentos de onda, percebe-se uma banda larga que se estende entre 550 e 800 nm, abrangendo do verde ao infravermelho. Tratando-se de um processo linear, o corte do filtro abaixo de 532 nm não deve interferir para excitação, uma vez que a radiação de menores comprimentos de onda é formada por fótons de maior energia. A banda é larga e apresenta um pico predominante em torno de 618 nm, porém picos secundários e pouco proeminentes aparecem em 565 nm, 589 nm e 684 nm.

No entanto, quando se analisa a emissão do tecido fotossensibilizado, apenas os picos em 565 e 589 nm do tecido normal aparecem sem interferência, sendo os outros picos de maiores comprimentos de onda mascarados pela emissão do fotossensibilizador. Os picos principais do Photogem®, em 623 nm e 689 nm, estão na mesma região da autofluorescência e são mais intensos, se superpondo aos observados inicialmente. Analisando a relação entre os picos de emissão em torno de 620 nm nas duas condições apresentadas, vemos que existe um fator de 2 entre as intensidades dos picos de emissão.

Figura 45 - Autofluorescência do tecido danificado via eletrocirurgia antes e após ser fotossensibilizado para um único modo de operação.



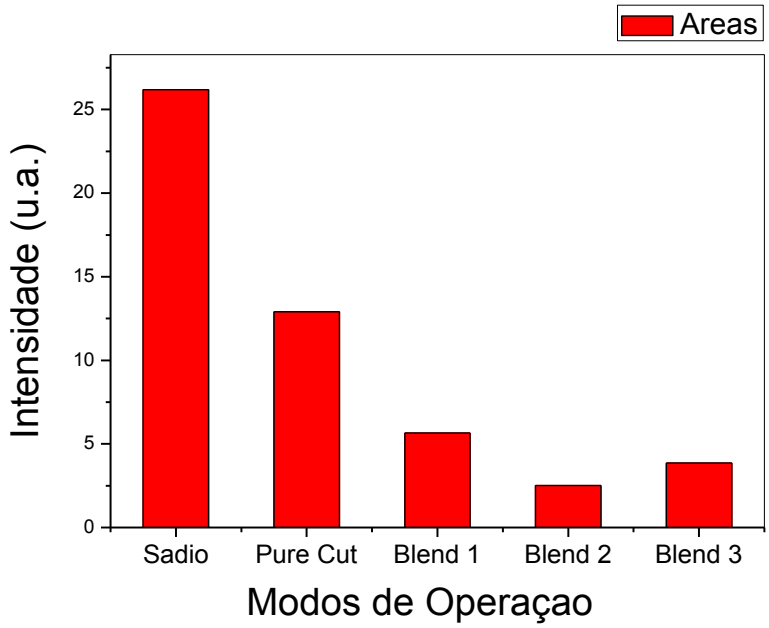
Fonte: Autor, 2012.

A figura 45 mostra os gráficos dos tecidos tratados termicamente pela ação do bisturi elétrico antes e depois da aplicação do FS. Percebemos um padrão bastante semelhante ao pontuado na figura 44, exceto para o fato da relação entre os picos de emissão de autofluorescência e o pico de retroespalhamento do laser. Além disso, podemos perceber que a relação entre os picos de emissão antes e depois de

sensibilizado é agora de aproximadamente 1,5. Além disso, os picos na região de 589 nm e 620 nm do tecido tratado via eletrocirurgia tendem a se superpor de forma a produzir uma banda larga com um único pico em torno de 600 nm.

Coletou-se também a fluorescência do tecido sadio fotossensibilizado e posteriormente submetido ao dano do bisturi elétrico, que foi posteriormente normalizado ao pico do laser, como na figura 45. Subtraindo-se a autofluorescência previamente normalizada do tecido sadio, foi possível obter apenas a contribuição do Photogem® na curva de emissão. Integrando tal curva obteve-se a intensidade de fluorescência do FS como função dos modos de operação da unidade eletrocirúrgica HF-120. O gráfico assim obtido é mostrado a seguir na figura 46.

Figura 46 - Intensidade de fluorescência do tecido danificado via eletrocirurgia após ser fotossensibilizado como função do modo de operação.

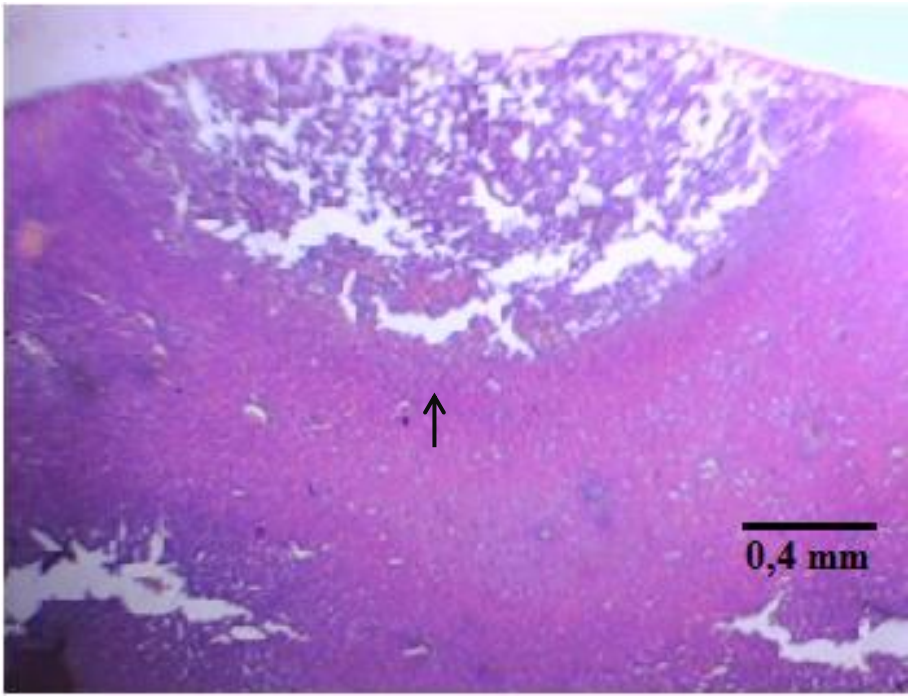


Fonte: Autor, 2011.

Os picos de fluorescência observados demonstram um alto acúmulo de moléculas do fotossensibilizador na região de coleta, uma vez que a fluorescência coletada é proveniente de um volume de tecido que contém várias camadas de célula abaixo da região de dano. Ainda assim, para garantir que a terapia

fotodinâmica aconteça, é necessário que haja acoplamento ideal da luz em toda a região e com profundidade considerável. Assim, para avaliar esses pontos, confeccionamos lâminas de cortes histológicos do tecido tratado apenas com bisturi elétrico e outras lâminas do tecido tratado segundo o protocolo FS + EC + LUZ. As figuras foram obtidas com uma câmera CCD acoplada a um microscópio e um computador, e são mostradas a seguir (figuras 47 e 48).

Figura 47 - Lâmina de corte histológico de fígado de rato tratado submetido ao dano térmico de uma unidade eletrocirúrgica (32x).

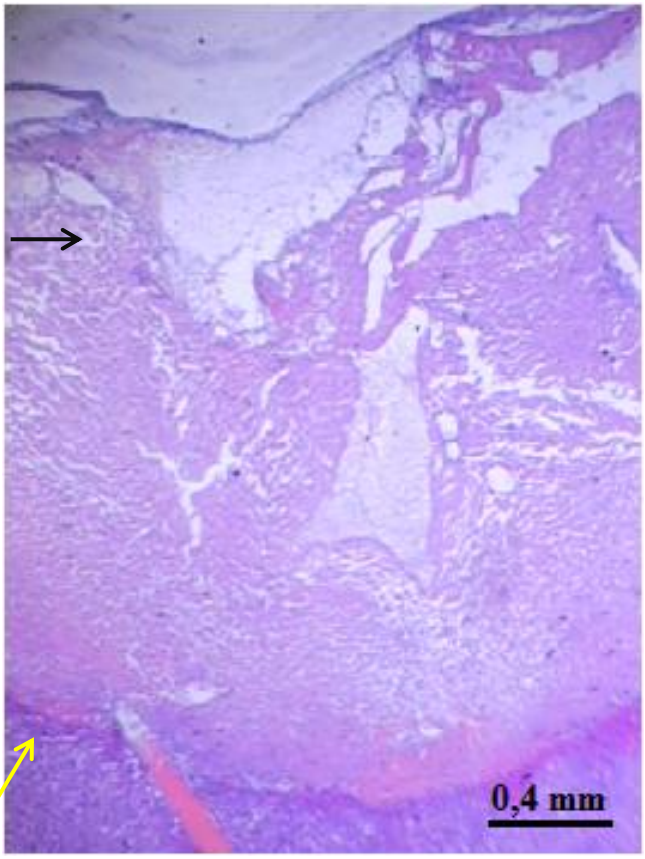


Fonte: Autor, 2011.

Percebe-se na figura 47 uma extensa camada de necrose causada por intenso dano térmico (seta preta). Dentro da região de necrose foi observada uma intensa concentração de infiltrados neutrofílicos, além de hemácias que extravasaram dos vasos devido à hemorragia não contida por completo (modo Blend 1: baixa hemostasia), além de tecido carbonizado e coagulado. Abaixo da necrose, observa-se uma extensa camada de células danificadas por hipertermia.

Na figura 48 podemos perceber que existe uma necrose com duas regiões distintas. Na camada de necrose mais superficial, as características histológicas são semelhantes àquelas apontadas na figura 47, ou seja, seriam as características inerentes ao dano térmico provocado pela corrente eletrocirúrgica.

Figura 48 - Lâmina de corte histológico de fígado de rato tratado submetido à fotossensibilização, seguido de corte eletrocirúrgico e iluminação para TFD (32x).



Fonte: Autor, 2011.

No entanto, abaixo dessa região (seta preta), apresenta-se uma necrose mais uniforme (seta amarela), também com extravasamento de hemácias e presença de infiltrados neutrofílicos. Porém, estes aparecem em menor escala, assim como a coagulação. Nesse ponto não é possível afirmar estatisticamente, mas observa-se uma extensão de necrose maior, com margens bem delimitadas, em relação ao tratamento com bisturi elétrico apenas. Essas características são típicas da necrose

causada por TFD apenas [1]. Assim, confirma-se que a terapia fotodinâmica ocorreu de forma eficiente numa região além da danificada termicamente, com concentração de fotossensibilizador e intensidade de luz favorável [3].

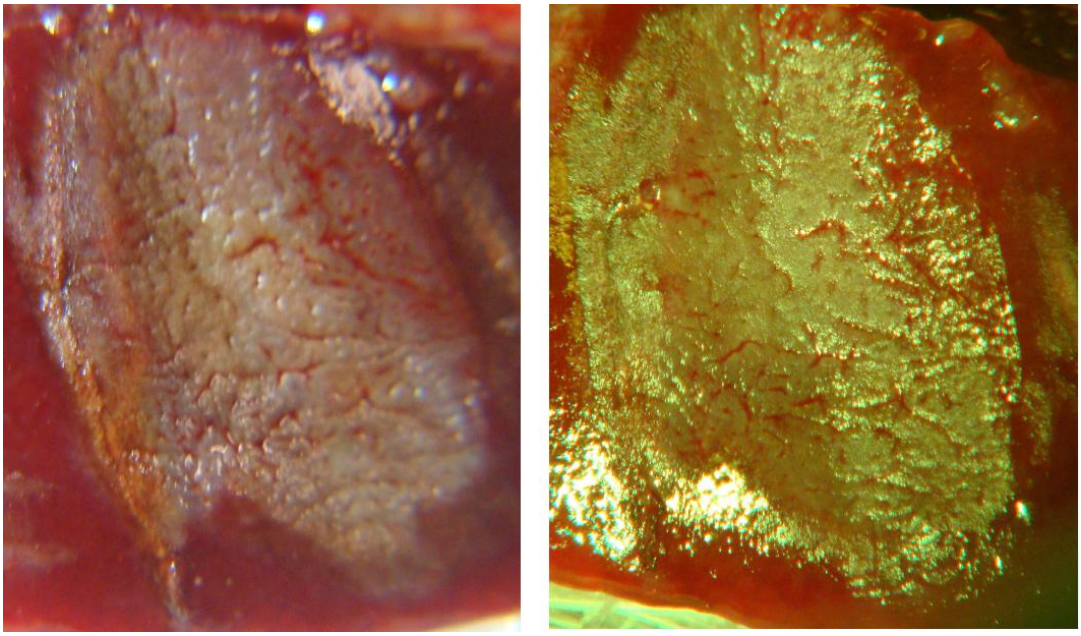
Essa confirmação, no caso, foi apenas para uma das sequências de combinação EC + TFD. Uma vez que uma das ordens já apresentou sucesso, tornou-se viável o estudo definitivo que explora as características da ordem de combinação das duas técnicas. Os dados desse estudo são apresentados na sessão a seguir.

5.3.2 Estudo definitivo: parâmetros de corte e irradiação fixos

5.3.2.1 Fluorescência macroscópica e pontual

A figura 49 mostra a superfície modificada do fígado do animal após o dano eletrocirúrgico (Grupo 1, Controle EC).

Figura 49 - Superfície de tecido hepático de rato submetido ao corte eletrocirúrgico iluminado com luz branca (à esquerda) e imagem de fluorescência (à direita).

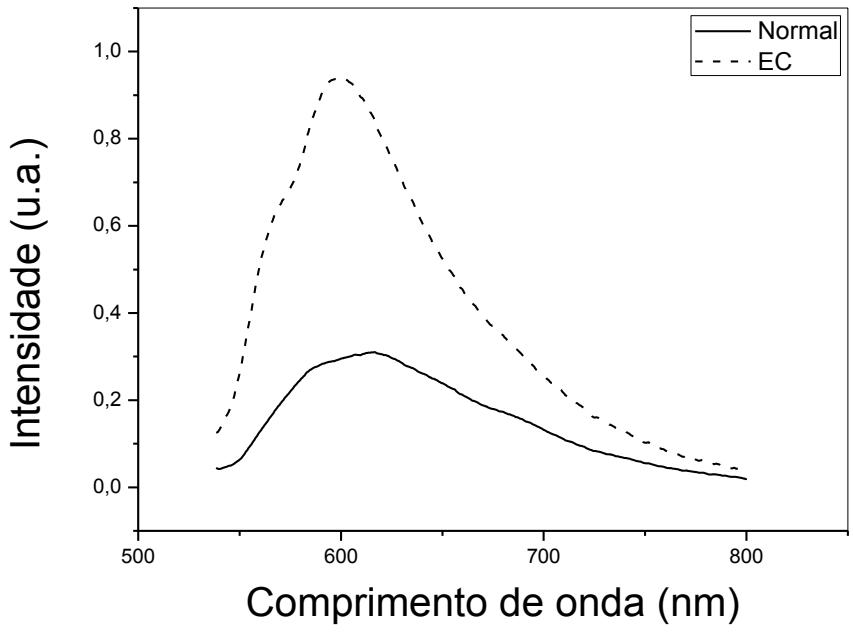


Fonte: Autor, 2013.

As imagens foram obtidas imediatamente após o corte eletrocirúrgico. A fluorescência da superfície modificada também foi analisada de forma espectral, coletando-se a emissão numa região de tecido normal e comparando com o tecido danificado pela eletrocirurgia apenas, da mesma forma como no estudo piloto. É observada uma intensa modificação da superfície, onde o tecido remanescente apresenta um aspecto esbranquiçado. Na região da borda do corte também se observa uma leve carbonização (seta branca) devido ao primeiro contato com o eletrodo levar um tempo maior até o início da remoção.

Dos três animais desse grupo, foram coletados espectros de fluorescência em vários pontos da extensão do corte. Os gráficos foram todos normalizados ao pico do laser e, logo após, a porção dos gráficos abaixo de 540 nm que continha tal pico foi removida. Isso foi realizado já que o filtro do sistema de fluorescência absorve qualquer luz emitida nessa região, como foi visto nos gráficos das figuras 44 e 45 do estudo piloto. Em seguida, as duas curvas foram renormalizadas pelo valor da maior intensidade de emissão. Este resultado é mostrado a seguir na figura 50.

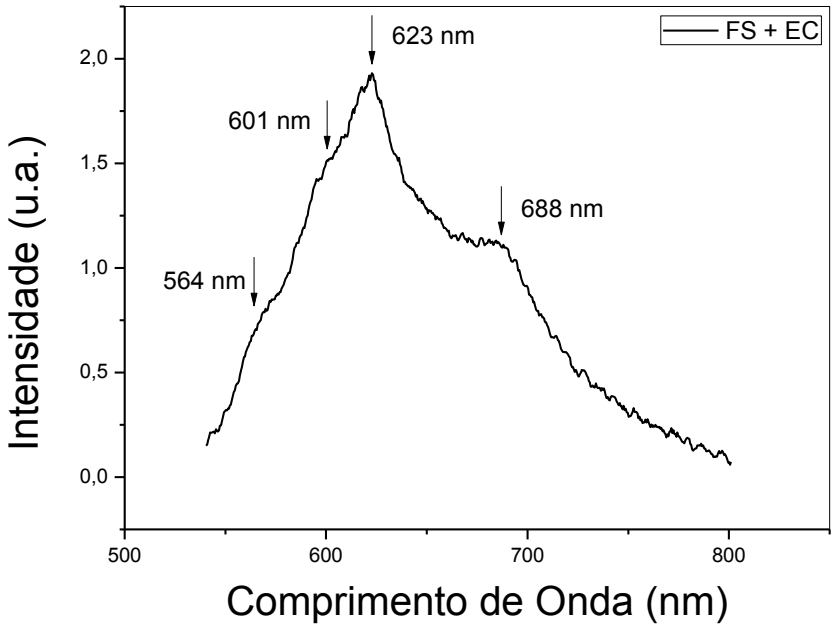
Figura 50 - Espectros de fluorescência do tecido normal e após corte eletrocirúrgico.



Fonte: Autor, 2013.

Observando de forma cautelosa os gráficos, é possível perceber o surgimento de três bandas bem definidas, mas com intensidades relativas distintas. Já a figura 51 mostra que os picos de fluorescência são semelhantes aos observados nas figuras 44 e 45 do estudo piloto (linha vermelha). Observam-se os picos relacionados à autofluorescência (565 e 589 nm) além de dois picos característicos do Photogem® (623 e 688 nm).

Figura 51 - Fluorescência do tecido fotossensibilizado após eletrocirurgia.

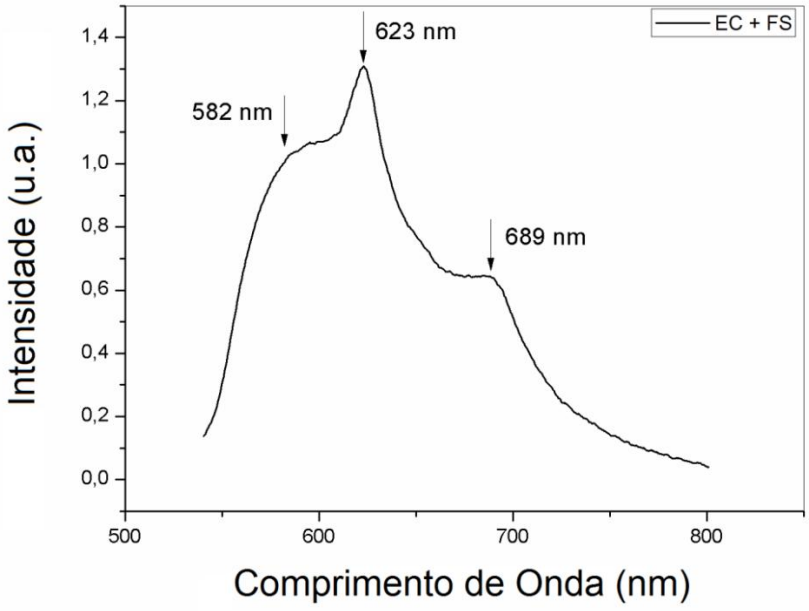


Fonte: Autor, 2013.

Se compararmos as linhas em preto dos gráficos da figuras 44 e 45 (normal e eletrocirurgia apenas, respectivamente), vemos que o pico na região de 565 nm torna-se, da mesma forma, mais proeminente também no presente gráfico. Os picos de 589 nm e 620 nm aqui também apresentam tendência de se unirem formando um pico único em 600 nm. Já no gráfico da figura 52, onde é mostrada a fluorescência do tecido previamente cortado com bisturi eletrônico e fotossensibilizado em seguida, temos um comportamento semelhante com relação aos picos, exceto pelo

fato de que os picos de autofluorescência (565 e 589 nm) se uniram em um único pico em 582 nm.

Figura 52 - Fluorescência do tecido após eletrocirurgia e fotossensibilizado em seguida.



Fonte: Autor, 2013.

É bem sabido que a fluorescência é uma resposta coletiva de emissão de várias camadas de tecido. Nesse sentido pode-se afirmar que, a julgar pelas figuras 51 e 52, o fotossensibilizador está de fato acumulado abaixo da camada de tecido danificado mais drasticamente. A diferença está no fato de que, em comparação com o estudo piloto, foi possível observar tal acúmulo para as duas ordens de conjugação (FS+EC e EC+FS). Assim, espera-se que o dano causado por terapia fotodinâmica seja viabilizado nos 2 grupos experimentais conjugados. Esse ponto foi, assim como anteriormente, avaliado via histopatologia e os dados são apresentados a seguir.

5.3.2.2 Análise histopatológica

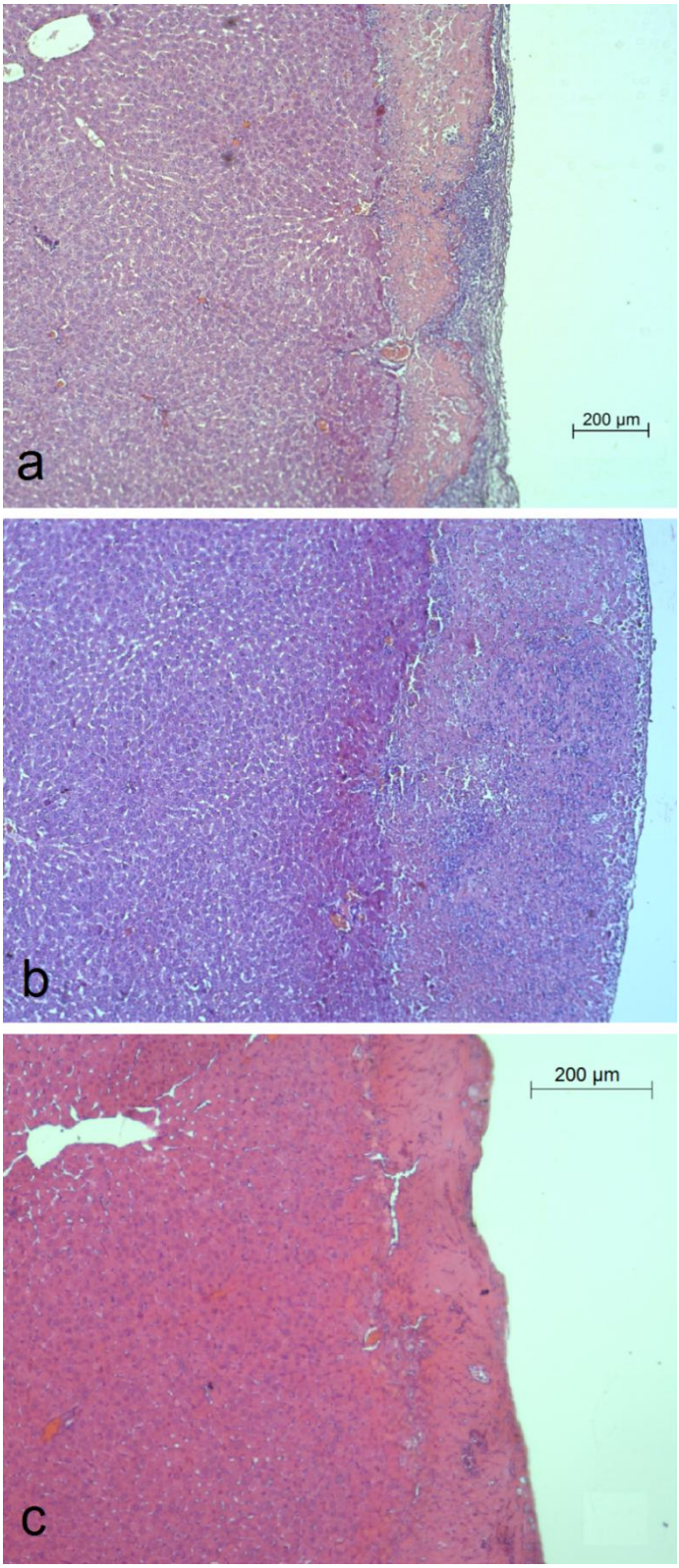
Com o intuito de avaliar a morfologia do tecido e suas características após a eletrocirurgia e sua conjugação com a terapia fotodinâmica, uma análise histopatológica foi realizada. As figuras 53 e 54 mostram imagens representativas das lâminas histológicas de todos os grupos experimentais.

Na figura 53a é mostrado o corte histológico representativo do Grupo 1 (Controle EC). Observa-se uma camada de células drasticamente danificadas via carbonização. Abaixo dessa camada, uma extensa necrose coagulativa está presente. Além disto, podemos observar uma intensa distribuição de infiltrados neutrofílicos que são produtos do processo inflamatório induzido após o corte. Esse último efeito é esperado quando qualquer tipo de dano é induzido em tecidos biológicos. Também se constata o extravasamento de hemácias na região de necrose. O efeito de hemorragia foi também observado macroscopicamente, uma vez que foi utilizado um modo de operação de fracas propriedades hemostáticas, além do fato de o tecido hepático ser um tecido altamente vascularizado e irrigado.

Já na figura 53b, observa-se uma lâmina histológica pertencente ao grupo controle de tecido hepático tratado apenas via terapia fotodinâmica. As características histopatológicas foram semelhantes às relatadas no trabalho de Ferreira et.al. [1], uma vez que o presente estudo aplica parâmetros de fotossensibilização e iluminação para provocar dano fotodinâmico em fígados de rato. A necrose que se apresenta na figura também denota características coagulativas com infiltrados neutrofílicos, porém, elas aparecem em uma escala moderada.

Nesse caso, o caráter coagulativo está ligado ao efeito térmico da TFD (absorção linear de luz em 630nm pelos cromóforos naturais do tecido), além do efeito vascular da TFD. Para este protocolo de fotossensibilização (30 minutos de acúmulo), boa parte do fotossensibilizador está dentro dos vasos sanguíneos, o que faz com que o efeito fotodinâmico ocorra diretamente no endotélio dos mesmos, produzindo uma vasoconstricção e, por fim, causando isquemia. A isquemia, por sua vez, apresenta-se no corte histológico como um tipo de dano coagulativo.

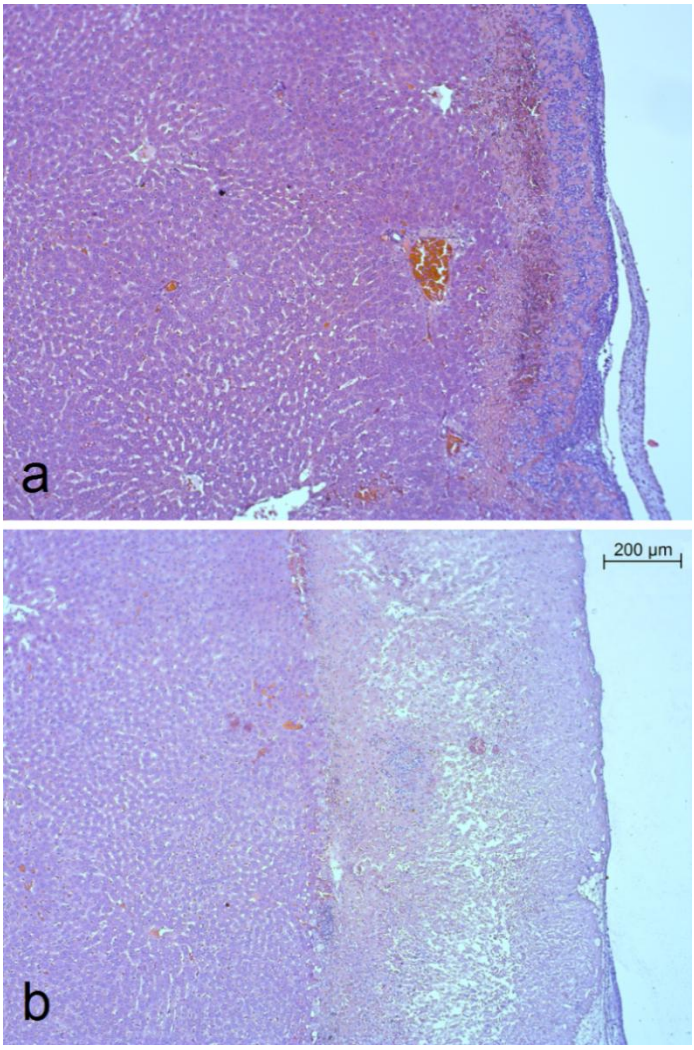
Figura 53 - Corte de lâmina histológica de fígado de rato referente aos 3 grupos-controle: (a) EC, (B) FS + LUZ, ou Grupo TFD e (c) FS + EC.



Fonte: Autor, 2012.

Na figura 53c é mostrado corte histológico do grupo controle que usa eletrocirurgia em um tecido previamente fotossensibilizado. O perfil de dano, neste caso, é indiscutivelmente mais brando em comparação aos outros 2 grupos, principalmente ao grupo utilizando EC no tecido normal. Existe uma leve acumulação de hemácias na região de necrose. No entanto, todos os danos observados (como a coagulação) apresentam-se numa escala de leve a moderada. Os mesmos danos histológicos observados até agora também estão presentes nos grupos combinados (Grupos 3 e 4, EC + TFD). As imagens dos cortes histológicos destes grupos são mostrados na figura 54.

Figura 54 - Corte de lâmina histológica de fígado de rato referente aos dois grupos EC + TFD: (a) Grupo 3: EC + FS + LUZ e (b) Grupo 4: FS + EC + LUZ.



Fonte: Autor, 2012.

Na figura 54a, onde o protocolo de combinação seguiu a ordem “eletrocirurgia → fotossensibilizador → luz”, todos os danos histológicos mencionados anteriormente estão presentes (coagulação, hemorragia, infiltrados, etc.). No entanto, eles ocorrem em uma intensidade maior: hemorragia intensa por entre e abaixo da região de necrose, desidratação devido aos danos térmicos, carbonização.

Observa-se também uma zona de dano nesse grupo formada por células que sofreram degeneração hidrópica abaixo da região de necrose. Esse tipo de dano é causado principalmente pela hipertermia.

A figura 54b mostra as características histopatológicas quando o protocolo é mudado para a ordem “fotossensibilização → eletrocirurgia → luz”. Os danos histológicos agora apresentam graus diferenciados de intensidade: intensa desidratação devido ao dano térmico decorrente tanto da eletrocirurgia quanto da TFD, além de hemorragia e inflamação moderadas. A escala moderada é esperada uma vez que o grupo FS + EC apresentou danos brando em comparação a todos os grupos. Nesse sentido, podemos afirmar que quando a eletrocirurgia é aplicada num tecido previamente fotossensibilizado, os danos mais brandos (especialmente o hemorrágico) permite que a irradiação subsequente penetre mais profundamente no tecido alvo. Essa situação é extremamente favorável para fazer com que os danos referentes ao procedimento de TFD prevaleçam. Todos os danos histológicos mencionados podem ser resumidos como mostrado na tabela 8.

Tabela 8 - Danos histológicos (resumo).

Grupos Experimentais	**Dano histopatológico**			
	Extensão de necrose	**Hemorragia**	**Infiltrados Inflamatórios**	**Coagulação**
EC	+ -	+	+ -	+
FS + LUZ	+ -	+ -	+ -	+
FS + EC	+ -	+	+	-
EC + FS + LUZ	+ -	+ + +	+ + -	+ -
FS + EC + LUZ	+ +	+ -	+ -	+ +

Escala de Intensidade: branda (+), moderada (++) ou severa (+++). Valores intermediários: meia cruz (-). Valores médios da análise de todos os animais de cada grupo. Fonte: Autor, 2013.

5.4 Discussões

O branqueamento é em geral associado com o dano térmico decorrente da passagem de correntes RF da unidade eletrocirúrgica. A passagem de correntes elétricas em qualquer meio de resistência elétrica maior que zero produz calor pelo conhecido Efeito Joule. A energia em forma de calor que é liberada causa um aquecimento local de vários graus Celsius. O tempo de interação com o eletrodo é capaz de fazer com que esse aumento de temperatura atinja diversas faixas de dano como:

1) Hipertermia: entre 45ºC e 60ºC;
2) Coagulação: entre 60ºC e 100ºC;
3) Vaporização: acima de 100ºC;
4) Carbonização: de 200ºC a 400ºC.

Em geral, essas faixas de dano se estendem da faixa 4 até a faixa 1 partindo do ponto de contato com o eletrodo até as regiões mais profundas do tecido. Uma vez que os elétrons se espalham dentro do tecido biológico, forma-se um gradiente de densidade de corrente elétrica $\vec{J}$, que, por sua vez, gera um gradiente de temperatura que define as regiões de dano térmico. Nesse caso, teríamos as seguintes correlações com os danos relatados:

1) Hipertermia – degeneração hidrópica
2) Coagulação – branqueamento macroscópico
3) Vaporização – corte
4) Carbonização – escurecimento das camadas mais externas

A coagulação, em especial, está ligada a uma transição de fase das moléculas de colágeno que compõem o tecido biológico: a conformação de tripla-hélice da molécula de colágeno é desfeita em temperaturas acima de 60ºC. Assim, as tiras que anteriormente formavam a molécula ficam soltas e tornam-se centros espalhadores de luz, principalmente para comprimentos de onda mais absorvidos pelo organismo (faixa UV-VIS). Essa resposta pode ser vista, em termos evolutivos, como uma defesa do organismo ao aquecimento que seria provocado pela absorção de comprimentos de onda nessa faixa. A então rejeição desses comprimentos de onda é vista e captada pelos nossos olhos macroscopicamente como a luz branca retroespalhada pelo tecido [4]. Esse fato influencia no aumento da fluorescência coletada para o tecido danificado termicamente (figura 50). De fato, quando o tecido biológico emite luz após a excitação em camadas abaixo da superfície, existe uma grande probabilidade de ela ser reabsorvida pelos cromóforos naturais do tecido. Uma vez que o tecido da superfície está coagulado, a luz emitida na fluorescência sofre maior espalhamento. Assim, uma maior intensidade de luz atinge as fibras de coleta da ponta de prova. Um possível decréscimo no coeficiente de absorção, em razão da degradação térmica, também contribui para aumentar a intensidade de fluorescência coletada. Em virtude do gráfico da figura 46 apresentar um decréscimo na intensidade coletada com um aumento do dano térmico, acredita-se que tais efeitos não sejam suficientes para causar variações no comportamento original. Apenas no modo *Blend 3* o aumento na intensidade coletada passa a ser não desprezível.

Quando comparamos os grupos de terapia combinada (Grupos 3 e 4) deve ser levado em conta o fato que a troca da ordem de conjugação acarreta num distanciamento entre o instante de corte e o instante da irradiação para TFD. Isso ocorre pelo fato de que, ao realizar a eletrocirurgia primeiro e a fotossensibilização em seguida, o protocolo de espera de 30 minutos para atingir a máxima concentração de Photogem® no tecido hepático é suficiente para que se estabeleça um processo inflamatório severo, além de fazer a hemorragia atingir maiores patamares. O dano fotodinâmico então provocado após esses 30 minutos é realizado em um tecido com maior concentração de hemácias e infiltrados neutrofílicos. No grupo 4, como a fotossensibilização é aplicada antes, o corte e a irradiação podem ser feitos ambos após os 30 min do protocolo, fazendo com que a

TFD ocorra em tecidos com condições patológicas distintas. Esse fato é possivelmente o causador das diferenças espectrais observadas nos gráficos das figuras 51 e 52. Além do mais, esse mesmo fato é responsável pela intensificação dos danos histopatológicos observados na figura 54a, em comparação com a 54b. Uma maior concentração de hemácias intersticial no grupo 3 também acarreta numa maior absorção de luz em 630 nm, diminuindo o comprimento de penetração e, por consequência, a profundidade de necrose (vide tabela 8). Uma maior absorção linear de luz também aumenta o calor gerado pela TFD, aumentando também os efeitos ligados ao dano térmico, como a hipertermia observada abaixo da região de necrose que aparece apenas nesse grupo. Podemos ainda dizer que, em termos práticos, uma aplicação clínica nessa ordem pode causar maiores dores aos pacientes, por conta dos graus de dano térmico e inflamação. Além disso, a combinação na ordem FS + EC + LUZ apresenta a vantagem de, ao seguir outros protocolos de fotossensibilização sistêmicos, que o procedimento de laparotomia seja realizado mais próximo da hora de realizar a eletrocirurgia e a irradiação, diminuindo o número de horas de um procedimento cirúrgico desse tipo para uma víscera interna como o fígado.

Quanto ao fato de os danos terem sido mais brandos para o tecido cortado com o bisturi eletrônico estando previamente fotossensibilizado, nós levantamos a hipótese de que a aplicação de um fotossensibilizador endógeno melhore a condutividade elétrica tecidual. Fotossensibilizadores (FS) são moléculas que emitem luz de forma bastante eficiente quando são excitadas, justamente pelo fato de serem bons condutores elétricos e seus elétrons possuem maior facilidade de transitarem para a banda de condução e emitirem luz.

Quando a corrente eletrocirúrgica deixa o eletrodo de entrega e penetra no tecido hepático nessas condições, ela acaba por se dispersar mais facilmente nas três dimensões espaciais (se pensarmos na densidade de corrente como uma função $\vec{J}(r,\theta,z)$, por exemplo). Assim, para cada ponto do espaço interno ao tecido, os valores de densidade de corrente são menores em comparação com o tecido não-fotossensibilizado e submetido à mesma corrente inicial. Dessa forma, o efeito Joule, que é diretamente proporcional ao quadrado da densidade de corrente, torna-se menos intenso e provoca menores variações de temperatura intersticial.

Relacionando a variação de temperatura com a condutividade elétrica do tecido e a densidade de corrente, chegamos à expressão [5]:

$$T - T_0 = \left(\frac{1}{\sigma \rho c} \right) J^2 t \quad , \qquad (Eq.\ 33)$$

onde T e T_0 são as temperaturas final e inicial, respectivamente; σ é a condutividade elétrica; ρ é a densidade de massa do tecido; c é o calor específico; J é o módulo da densidade de corrente e t é o tempo de interação com o eletrodo.

Assumindo o argumento anterior, uma maior condutividade elétrica tecidual promovida por um prévio acúmulo de Photogem® diminuiria a densidade de corrente elétrica. De acordo com a equação 33, essa maior condutividade contribui duplamente para a menor disparidade entre as temperaturas final e inicial de cada ponto do tecido durante o contato com o eletrodo. Assim, dado um menor dano térmico, a intensidade das patologias observadas diminuem para os grupos experimentais nos quais houve fotossensibilização anterior ao corte eletrocirúrgico.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira J, et al. Necrosis characteristics of photodynamic therapy in normal rat liver. Laser Phys **14**: 209-212 (2004).

2. Costa MM. Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontológico [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2010.

3. Rego-Filho FG, Vieira E, Kurachi C, Araujo MT, Bagnato VS. Viability for the conjugate use of electrosurgery and photodynamic therapy. SPIE-OSA/ Vol. **8092**:80921U1-80921U6 (2011).

4. Carruth JAS, Mackenzie AL. Medical Lasers. Bristol, Adam Hilger, Ltd. (1986).

5. Pearce JA. Electrosurgery. New York, John Wiley (1986).

6

Conclusões

Com base nos resultados apresentados nos capítulos anteriores, pode-se listar as conclusões a seguir a respeito da viabilidade do uso combinado de técnicas cirúrgicas e Terapia Fotodinâmica e sobre as propriedades ópticas dos tecidos biológicos tratados segundo os protocolos apresentados.

O uso de eletrocirurgia (bisturi elétrico) ou de termoablação (laser de Er:YAG) apresentaram extensas regiões de necrose quando utilizadas separadamente (grupos controle), em comparação com as técnicas de dissecção ultrassônica (bisturi harmônico) e ablação induzida por plasma (laser de femtossegundos). Esse fato é explicado por meio dos mecanismos de interação fundamentais que possibilitam o corte cirúrgico dessas técnicas, que são baseados na geração de calor excessivo que se difunde para as camadas de células subjacentes. Os dados apresentados estão em perfeita conformidade com a teoria e dados da literatura que abordam tais técnicas.

Em um tecido previamente fotossensibilizado apenas o bisturi elétrico, quando utilizado para promover excisão tecidual, apresenta variações no aspecto histopatológico provocado. Este fato pode ser explicado pelo fato de que a distribuição máxima e aproximadamente homogênea do fotossensibilizador provoca um aumento na condutividade elétrica do tecido hepático, contribuindo para a diminuição da densidade de corrente nesse caso. Esse fato, no entanto, não foi observado quando a técnica foi utilizada para provocar modificação de superfície apenas. Porém, neste caso, o tempo de contato do eletrodo ativo, em cada ponto da lesão no segundo caso, foi maior do que no primeiro caso. Assim, o calor produzido

foi excessivo a ponto de mascarar a contribuição da condutividade elétrica na diminuição dos danos.

De todas as técnicas utilizadas na combinação cirurgia + TFD, o bisturi ultrassônico apresentou os níveis mais favoráveis de dano histopatológico. Porém, um número maior de amostras e de repetição desse experimento é necessário para corroborar a informação de que esta é a técnica mais favorável. Tal investigação é importante, uma vez que danos histopatológicos mais brandos propiciam uma melhor recuperação dos pacientes e, por sua vez, aumenta a aplicabilidade clínica e diminui custos operacionais.

A técnica de fluorescência apresentou-se extremamente eficaz para avaliar as alterações ocorridas nos tecidos necróticos resultantes do uso das técnicas cirúrgicas separadamente e quando combinadas com terapia fotodinâmica. O deslocamento do espectro de fluorescência para o azul é explicado por meio da desnaturação de proteínas estruturais, como o colágeno, que ocorre em condições de dano térmico intenso, contribuindo para o aumento do espalhamento de luz nessa região do espectro. Assim, esse aspecto é mais evidente no uso de bisturi elétrico e laser de Er:YAG nos grupos controle e em todos os grupos que envolvem protocolo de iluminação para TFD, uma vez que o efeito fotodinâmico também produz dano térmico.

A técnica de fluorescência foi também capaz de verificar variações espectrais em condições de hemorragia em alguns grupos experimentais. Esse fato é reconhecido pelo surgimento de bandas de emissão na região do vermelho do espectro eletromagnético visível, e pode ser explicado pelo fato de o sangue e seus principais cromóforos apresentarem emissão nessa região quando excitados no violeta (405 nm). Esse fato é mais evidente nos grupos que envolvem uso de bisturi ultrassônico e laser de pulsos ultracurtos (nos grupos controle) por conta de sua menor hemostasia, além de serem observados em todos os grupos que utilizam terapia fotodinâmica de forma combinada, uma vez que a TFD por si só provoca extravasamento de hemácias. Todos esses resultados não apenas corroboram com resultados experimentais já observados em estudos que abordam a fluorescência de forma mais isolada, como corroboram com os danos esperados na teoria dos

mecanismos de interação, além de serem conformados pela análise histopatológica apresentada neste trabalho.

No estudo da excisão propriamente dita pelo uso de eletrocirurgia, a fluorescência possibilitou o acompanhamento do protocolo combinado quando realizado *in vivo*, mostrando-se sensível para captar alterações teciduais por dano térmico durante a terapia e o acúmulo de fotossensibilizador no tecido alvo em todos os protocolos. Assim, foi comprovado que o uso de eletrocirurgia influencia de forma significativa a retenção de FS durante o protocolo combinado. Esse aspecto é importante para corroborar o dano fotodinâmico observado posteriormente na análise histopatológica.

Tanto a análise histopatológica quanto a análise da fluorescência *ex vivo* foram capazes de determinar alterações que modificam a absorção e o espalhamento de luz durante a aplicação das técnicas cirúrgicas desse trabalho. Porém, o dano fotodinâmico, evidenciado nas lâminas histológicas referentes aos protocolos combinados, comprova que tais variações das propriedades ópticas, mesmo presentes, não são determinantes para impedir que a luz se propague através da região alterada e cause dano por meio de TFD nas camadas de tecido abaixo dela. Um fator que também contribui para tal aspecto é a escolha de um protocolo de fotossensibilização sistêmica, que garante a chegada de moléculas de fotossensibilizador no tecido hepático sadio abaixo da região de dano, o que foi comprovado pela fluorescência *in vivo*.

De uma forma geral, é possível afirmar que, utilizando parâmetros adequados, o uso combinado de técnicas cirúrgicas ablativas com terapia fotodinâmica é perfeitamente viável. Os níveis observados de danos histopatológicos e de variação de propriedades ópticas não influenciam drasticamente a retenção de fotossensibilizador e o acoplamento da luz de iluminação. A técnica de fluorescência, por sua vez, mostrou alto potencial para análise e acompanhamento de protocolos que envolvem o uso de Terapia Fotodinâmica, podendo ser futuramente utilizada na análise em tempo real de lesões provocadas clinicamente.

Sobre as ordens de combinação, tanto a ordem “FS + cirurgia + LUZ” quanto “cirurgia + FS + LUZ” mostraram-se eficazes na produção de efeito fotodinâmico.

Vale ressaltar que no presente estudo a laparoscopia foi realizada anteriormente a todos os procedimentos, já que a via de fotossensibilização escolhida foi a veia cava. Utilizando outras vias de fotossensibilização, pode-se realizar o procedimento laparoscópico após o tempo de acúmulo máximo do FS no tecido alvo, realizando a abertura e o acesso apenas no momento de realizar a excisão cirúrgica e da iluminação. Essa estratégia pode contribuir para a diminuição do tempo de cirurgia, o que aumenta a viabilidade clínica e reduzindo custos. Assim, a ordem de combinação “FS + cirurgia + TFD” pode apresentar vantagens em alguns casos.

O presente trabalho abre precedente para novos e variados estudos semelhantes. Como perspectivas e sugestão de trabalhos futuros, podemos citar: as mudanças nas vias de fotossensibilização (oral, intraperitoneal, etc.); uso de fotossensibilização tópica; aplicações em outros tipos de tecido (pele, músculo, e outros órgãos); estudos clínicos de protocolo combinado, entre outros. No campo das investigações fundamentais, podemos sugerir a utilização de espectroscopia de impedância para acompanhar os danos em tais situações, espectroscopia de infravermelho (FTIR) para avaliar as mudanças nos cromóforos presentes em tais tecidos; estudos teóricos que envolvam a inclusão de modificação de superfície com a finalidade de modelar o transporte de luz e a dosimetria da radiação em tecidos biológicos, além de estudos que verifiquem de forma sistemática a condutividade elétrica e térmica de tecidos fotossensibilizados.

ANEXOS

- **Anexo 1 – Certificado de aprovação do estudo pela comissão de ética**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **n° 147/2010**, sobre o projeto intitulado *"Viabilidade do uso de Eletro-cirurgia e Terapia Fotodinâmica na remoção de lesões extensas"*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Vanderlei Salvador Bagnato** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de setembro de 2010.

(We certify that the protocol ***n° 147/2010***, about ***"Viability of conjugate use of Electro-surgery and Photodynamic Therapy (PDT) on the removal of extensive tumors"***, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in ***09/27/2010.***

Ribeirão Preto, 27 de setembro de 2010.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

APÊNDICES

- **Apêndice 1 – Modelo de Niemz para a Ablação Induzida por Plasma**

O modelo de Niemz descreve o comportamento temporal da população, além do limiar de ablação, de um plasma gerado durante o *optical breakdown* induzido pela ação de um laser de pulsos ultracurtos. Dos modelos matemáticos existentes, o modelo de Niemz é um dos poucos que demonstra a dependência do limiar de ablação como função da raiz quadrada da largura de pulso, um comportamento que até a década de 90 era estabelecido empiricamente.

Para compor o problema, relembramos que a interação com o tecido gera um plasma localizado por meio de ionização em avalanche. Nesse caso, os elétrons liberados permanecem na região focal absorvendo a energia subsequentemente irradiada pelo feixe incidente.

Dessa forma, a partir do momento em que a densidade inicial de elétrons é formada, alguns fenômenos podem ocorrer. Entre eles:

- Novos elétrons são liberados e incorporados ao plasma;
- Elétrons que compõem o plasma podem difundir-se para fora do mesmo;
- Elétrons já ionizados podem ser reabsorvidos pelo tecido adjacente.

Cada um desses termos tem uma contribuição na dinâmica da densidade de elétrons livres do plasma. No modelo proposto por Niemz, uma equação de taxa que descreve essa dinâmica tem a seguinte forma:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \beta N(t) - \delta N(t) - \gamma N^2(t) \quad , \qquad \textbf{(A.1)}$$

Onde:

$N(t)$ é a densidade de elétrons livres do plasma

β é o termo que designa a ionização em avalanche

δ é o termo que designa a fuga de elétrons do volume focal

γ é o termo que designa a reabsorção de elétrons pelo tecido

A equação A.1 é exatamente a equação 2.8 do capítulo 2. Nela, aparece que o termo de reabsorção dos elétrons (termo de colisões inelásticas, como também pode ser chamado) tem uma dependência com o quadrado da densidade de elétrons. Isso se deve ao fato que para tal processo ocorrer, precisam ser gerados dois portadores de cargas elétricas: um da ionização que gera o elétron livre e outro portador de carga responsável pela absorção desse elétron. Por conta disso, podemos escrever a equação A.1 de outra maneira. Se tomarmos a reabsorção de elétrons pelo tecido adjacente como um processo inverso ao de ionização em avalanche, podemos dizer que o plasma é gerado via uma ionização em avalanche reduzida:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \beta' N(t) - \delta N(t) \quad \text{(A.2)}$$

,

onde:

$$\beta' = \beta - \gamma N(t) \quad \text{(A.3)}$$

,

é o termo de avalanche reduzida.

Partimos então para a solução da equação A.1 através de uma substituição de variável. Se chamarmos a função $u(t) = 1/N(t)$, temos que:

$$\frac{dN}{du}\frac{du}{dt} = \left(\beta - \frac{\gamma}{u}\right)\frac{1}{u} - \frac{\delta}{u} \quad \text{(A.4)}$$

Desenvolvendo, temos:

$$\left(-\frac{1}{u^2}\right)\frac{du}{dt}=\left(\beta-\frac{\gamma}{u}\right)\frac{1}{u}-\frac{\delta}{u}$$

$$\frac{du}{dt}+(\beta-\delta)u-\gamma=0 \qquad \textbf{(A.5)}$$

.

Temos, assim, uma nova equação que é uma EDO (Equação Diferencial Ordinária) linear de primeira ordem. Resolvendo com a ajuda de um fator integrante $c(t)$ definido como:

$$\frac{d}{dt}[c(t)u(t)]=\gamma\, c(t) \qquad \textbf{(A.6)}$$

,

multiplicamos por $c(t)$ os dois lados da equação A.5 e desenvolvemos o termo de derivação da equação A.6., podemos comparar os termos de cada uma delas. Trabalhando a equação A.5 dessa forma, temos:

$$\frac{du(t)}{dt}c(t)+(\beta-\delta)u(t)c(t)=\gamma c(t)$$

$$(\beta-\delta)u(t)c(t)=\frac{dc(t)}{dt}u(t)$$

$$(\beta-\delta)c(t)=\frac{dc(t)}{dt}$$

A resolução da equação diferencial para $c(t)$nos dá que:

$$c(t)=\exp\left[\int_0^t(\beta-\delta)dt'+C\right] \qquad \textbf{(A.7)}$$

.

Conhecendo o fator integrante, podemos obter uma expressão para $u(t)$. Integrando a equação A.6, temos:

$$\int_0^{t''} \frac{d}{dt''}\left[c(t'')u(t'')\right]dt'' = \int_0^{t''} \gamma\, c(t'')dt''$$

O que, por inspeção, podemos afirmar que:

$$c(t)u(t) = \int_0^{t''} \gamma\, c(t'')dt''$$

Substituindo a forma de $c(t)$ na equação anterior, temos que:

$$u(t) = \exp\left[-\int_0^t (\beta - \delta)dt'\right] \cdot \left\{u(0) + \gamma \int_0^t \exp\left[\int_0^{t'} (\beta - \delta)dt''\right]dt'\right\}$$

onde assumimos que γ é uma constante. Por fim, temos que a densidade de elétrons é imediatamente:

$$N(t) = \frac{\exp\left[\int_0^t (\beta - \delta)dt'\right]}{\frac{1}{N(0)} + \gamma \int_0^t \exp\left[\int_0^{t'} (\beta - \delta)dt''\right]dt'} \qquad \textbf{(A.8)}$$

Essa expressão para a densidade de elétrons é definitiva, mas ainda não mostra a dependência com a largura de pulso. Para que isso ocorra, devemos aplicar condições de contorno para resolver as integrais em diferentes situações de geração de plasma. Um deles ocorre da interação com pulsos ultracurtos, onde a potência de pico é extremamente alta, o que faz com que a situação de *optical breakdown* ocorra durante a interação com o pulso.

Para questões de simplificação, tomamos que o pulso tem um perfil temporal quadrado. Ou seja:

$$\beta = \begin{cases} \eta I_0 & , se \;\; 0 \le t \le \tau \\ 0 & , outras\ regiões \end{cases} \qquad \textbf{(A.9)}$$

.

Aqui, o termo η é tomado como uma probabilidade de ionização e I_0 é a intensidade de pico à meia altura. Outra simplificação é que estamos contando apenas as ionizações que ocorrem de forma linear, pois de outra forma β teria termos proporcionais a outras potências de I_0. Assumimos também que o material possui elétrons livres iniciais, gerados a partir de ionização termiônica. Assim, resolvemos as integrais envolvidas na expressão para a densidade eletrônica, chegando a:

$$N(t) = N_0 \frac{e^{(\beta-\delta)t}}{1 + \frac{\gamma N_0}{\beta - \delta}\left[e^{(\beta-\delta)t} - 1\right]} \qquad \textbf{(A.10)}$$

,

Onde simplificamos a notação $N_0 = N(0)$. Definimos um parâmetro s que chamamos de quociente de limiar, definido por:

$$s = \ln\left(\frac{N_{th}(t)}{N_0}\right) = \ln\left(\frac{e^{(\beta-\delta)t}}{1 + \frac{\gamma N_0}{\beta - \delta}\left[e^{(\beta-\delta)t} - 1\right]}\right)$$

$$s = (\beta - \delta)t - \ln\left(1 + \frac{\gamma N_0}{\beta - \delta}\left[e^{(\beta-\delta)t} - 1\right]\right) \qquad \textbf{(A.11)}$$

.

Nesta última equação, o tempo t é o tempo em que a condição de *optical breakdown* é atingida. Nela, o termo de fonte de elétrons, a ionização em avalanche β, deve ser muito maior que os outros termos, como δ e γ. Dessa forma, a equação A.11 se torna:

$$s = (\beta - \delta)t - \ln\left(1 + \frac{\gamma N_0}{\beta - \delta} e^{(\beta-\delta)t}\right)$$

Se supormos que essa condição seja atingida num instante próximo ao final do pulso, de forma que toda sua energia seja aproveitada unicamente para formação do plasma, e que ao final da interação a população de elétrons deve estar saturada. Temos que:

$$s = (\beta - \delta)\tau - \ln\left(1 + \frac{\gamma N_0}{\beta - \delta} e^{(\beta-\delta)\tau}\right) \qquad \textbf{(A.12)}$$

$$\frac{dN(t)}{dt}_{t=\tau} \approx 0 \qquad \textbf{(A.13)}$$

.

Aplicando essa condição na equação A.1 e chamando de $N(t=\tau) = N_\tau$ a densidade de elétrons neste instante, temos que:

$$\beta N_\tau - \delta N_\tau - \gamma N_\tau^2 \approx 0$$

$$N_\tau(\beta - \delta - \gamma N_\tau) \approx 0$$

Assim:

$$\frac{\gamma N_\tau}{\beta - \delta} \approx 1 \qquad \textbf{(A.14)}$$

Então:

$$1 + \frac{\gamma N_0}{\beta - \delta} e^{(\beta-\delta)\tau} \approx 1 + \frac{\gamma N_0}{\beta - \delta} e^{\beta\tau} \qquad \textbf{(A.15)}$$

Podemos aplicar a condição de que $\beta >> \delta$ para a equação A.10 assim como aplicamos para a A.11, chegando a:

$$N_\tau = N_0 \frac{e^{\beta\tau}}{1+\frac{\gamma N_0}{\beta-\delta}e^{\beta\tau}}$$

$$1+\frac{\gamma N_0}{\beta-\delta}e^{\beta\tau} = \frac{N_0 e^{\beta\tau}}{N_\tau}$$

$$N_0 e^{\beta\tau}\left(\frac{1}{N_\tau}-\frac{\gamma}{\beta-\delta}\right)=1$$

Como $\beta >> \delta$, o segundo termo entre parênteses é aproximadamente nulo.

$$N_\tau = N_0 e^{\beta\tau} \qquad \textbf{(A.16)}$$

Com uso dessas aproximações, podemos reduzir o quociente de limiar a:

$$s = (\beta-\delta)\tau - \ln\left(1+\frac{\gamma N_\tau}{\beta-\delta}\right) \qquad \textbf{(A.17)}$$

Aplicando a igualdade A.16 à A.15, temos:

$$1+\frac{\gamma N_0}{\beta-\delta}e^{\beta\tau} \approx 1+\frac{\gamma N_\tau}{\beta-\delta} \approx 2$$

Assim, podemos expandir o logaritmo da equação A.17 em série de Taylor em torno de *a* = *2*, da seguinte forma:

$$f(x) = f(a)+(x-a)f'(a)$$

Ou seja:

$$s = (\beta - \delta)\tau - \left\{ \ln 2 + \left[\left(1 + \frac{\gamma N_\tau}{\beta - \delta} \right) - 2 \right] . \frac{1}{2} \right\}$$

$$s = (\beta - \delta)\tau - \ln 2 - \frac{1}{2}\left(\frac{\gamma N_\tau}{\beta - \delta} \right) + \frac{1}{2}$$

Se isolarmos o termo $(\beta - \delta)$, teremos:

$$(\beta - \delta)\tau - \frac{1}{2}\frac{\gamma N_\tau}{(\beta - \delta)} = s + \ln 2 - 0{,}5$$

$$\tau(\beta - \delta)^2 - (s + \ln 2 - 0{,}5)(\beta - \delta) - \frac{1}{2}\gamma N_\tau = 0$$

O que é uma equação de segundo grau com $(\beta - \delta)$ sendo a nossa variável. Resolvendo, temos que:

$$\beta - \delta = \frac{s + \ln 2 - 0{,}5}{2\tau} + \sqrt{\left(\frac{s + \ln 2 - 0{,}5}{2\tau} \right)^2 + \frac{\gamma N_\tau}{2\tau}} \qquad \textbf{(A.18)}$$

Neste ponto, os parâmetros de difusão de elétrons e de colisão inelástica são substituídos por suas respectivas taxas através das relações:

$$\delta = \frac{1}{\tau_d} \qquad \text{e} \qquad \gamma = \frac{1}{N_\tau \tau_c} \qquad \textbf{(A.19)}$$

Bloembergen estimou o valor do quociente de limiar em 1974 como sendo aproximadamente $s = \ln\left({N_{th}(t)}/{N_0} \right) \approx 18$. Desta forma, o termo (ln2 – 0,5) tem uma ordem de grandeza cerca de duas vezes menor que s, o que nos permite desprezá-lo. Assim:

$$\beta - \delta = \frac{s}{2\tau} + \sqrt{\left(\frac{s}{2\tau}\right)^2 + \frac{\gamma N_\tau}{2\tau}}$$

$$\beta = \frac{s}{2\tau} + \sqrt{\left(\frac{s}{2\tau}\right)^2 + \frac{\gamma N_\tau}{2\tau}} + \delta$$

$$\beta = \eta I_{th} = \frac{s}{2\tau} + \sqrt{\left(\frac{s}{2\tau}\right)^2 + \frac{1}{2\tau\tau_c}} + \frac{1}{\tau_d} \qquad \textbf{(A.20)}$$

A igualdade da equação anterior expressa a intensidade de limiar. Para expressar a fluência limiar é preciso multiplicar a intensidade pelo intervalo de tempo de interação. Já que nós assumimos esse tempo como sendo a própria largura do pulso incidente, temos que a fluência de limiar é dada por:

$$\eta F_{th} = \frac{s}{2} + \sqrt{\left(\frac{s}{2}\right)^2 + \frac{\tau}{2\tau_c}} + \frac{\tau}{\tau_d} \qquad \textbf{(A.21)}$$

Como queríamos demonstrar.

REFERÊNCIAS

Agostinis P, et. al. Photodynamic Therapy of cancer: an update. CA Cancer J Clin **61**:250-281 (2011).

Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. Photodiagnosis Photodyn Ther **7**:61-75 (2010).

Amshalom A, et al. Severe Eosinophilia in Children: A Diagnostic Dilemma. J Pediatr Hematol Oncol **35**:303-306 (2013).

Anderson RR, Parrish JA. The optics of human skin. J Invest Dermatology **77**:13-19 (1981).

Arfken GB, Weber HJ. Mathematical Methods for Physicists. EUA, Academic Press (2001).

Armstrong DN, Frankum C, Schertzer ME, Ambroze WL, Orangio GR. Harmonic Scalpel® hemorrhoidectomy. Dis Colon Rectum **45**:354-359 (2002).

Bagdasarov KS, Zhekov VI, Lobachev VA, Murina TM, Prokhorov AM. Steady-state emission from a $Y_3Al_5O_{12}$:Er laser (λ = 2.94 μm, T = 300 ºK). Sov J Quantum Electron **13**:262 (1983).

Bagnato VS. Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde. São Paulo, Livraria da Física (2008).

Bangash HK, Romegialli A, Dadras SS. What's new in prognostication of melanoma in the dermatopathology laboratory? Clin Dermatol **31**:317–323 (2013).

Berg K, Moan J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. Photochem Photobiol **65**:403-409 (1997).

Bovie WT. New electro-surgical unit with preliminary note on new surgical-current generator. Surg Gynecol Obstet **47**:751-752 (1928).

Bradley DJ, Durrant AJF. Generation of ultrashort dye laser pulses by mode locking. Phys Lett A **27**:73-74 (1968).

Brick AV, et al. Tratamento intra-operatório da fibrilação atrial crônica com ultra-som. Rev Bras Cir Cardiovasc **16**:337-349 (2001).

Brown DB. Concepts, considerations, and concerns on the cutting edge of radiofrequency ablation. J Vasc Intervent Radiol **16**:597-613 (2005).

Buttemere CR, et al. *In vivo* assessment of thermal damage in the liver using optical spectroscopy. J Biomed Opt **9**:1018–1027 (2004).

Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR, Agostinis P. Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. Autophagy **2**:238-240 (2006).
Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. Biochim Biophys Acta **1776**:86-107 (2007).

Carruth JAS, Mackenzie AL. Medical Lasers. Bristol, Adam Hilger Ltd. (1986).

Castro-e-Silva Jr O, et al. Autofluorescence Spectroscopy in Liver Transplantation: Preliminary Results From a Pilot Clinical Study. Transplantation Proceedings **40**:722-725 (2008).

Ceiley RI, Del Rosso JQ. Current modalities and new advances in the treatment of basal cell carcinoma. Int J Dermatol **45**:489-498 (2006).

Chan A, et al. Ablation of dental enamel using subpicosecond pulsed lasers. International Congress Series **1248**:117–119 (2003).

Chang TW, Fiumara N, Weinstein L. Genital herpes: Treatment with methylene blue and light exposure. Int J Dermatol **14**:69-71 (1975).

Clark WL. Oscillatory desiccation in treatment of accessible malignant growths and minor surgical conditions: new electrical effect. J Adv Therm **29**:169-183 (1911).

Cohen-Tannoudji C, Diu B, Laloe F. Quantum Mechanics: Volume 1. Nova Jersey, John Wiley (1978).

Costa MM. Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontológico [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2010.

Curie J, Curie P. Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémièdres à faces inclinées. Bulletin de la Société Minérologique de France **3**:90-93 (1880).

Cushing H, Bovie WT. Electro-surgery as an aid to the removal of intracranial tumors. Surg Gynecol Obstet **47**:753-784 (1928).

Darren Roblyer, et al. Objective Detection and Delineation of Oral Neoplasia Using Autofluorescence Imaging. Cancer Prev Res **2**:423-431 (2009).

d'Arsonval A. Action physiologique des courants alternatifs. Soc Biol **43**:283-286 (1891).

d'Arsonval A. Action physiologique des courants alternatifs á grande fréquence. Arch Physiol Norm Pathol **5**:401-408 (1893).

Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin® photosensitizaton: influence of the incubation protocol. Photochem Photobiol **64**:182-187 (1996).

Dewaele M, Maes H, Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. Autophagy **6**:838-854 (2010).

DiDomenico M Jr, Geusic JE, Marcos HM, Smith RG. Generation of ultrashort optical pulses by mode-locking de YAlG:Nd laser. Appl Phys Lett **8**:180-183 (1966).

Dougherty TJ, et al. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst **90**:889-905 (1998).

Doyen D. Sur las destruction des tumeurs cancéreuses acessibles par la méthode de la voltaisation bipolaire et de l'électro-coagulation thermique. Arch Elec Med **17**:791-795 (1909).

Drozhbin YA, Zakharov YP, Nikitin W, Semenov AS, Yakovlev VA. Generation of ultrashort light pulses with GaAs semiconductor laser. JETP Lett **5**:143 (1967).

Dussik KT. On the possibility of using ultrasound waves as a diagnostic aid. Neurol Psychiat **174**:153-168 (1942).

Dussik KT, Dussik F, Wyt L. Auf dem Wege Zur Hyperphonographie des Gehirnes. Wien Med Wochenschr **97**:425-429 (1947).

Dussik KT. Ultraschall Diagnostik, in besondere bei Gehirnerkrankungen, mittels Hyperphongraphie Z. Phys Med **1**:140-145 (1948).

Dussik KT. Verfahren zur Untersuchung von Korpern mittels Ultraschall Osterreichisches. Patent Nr. A5720-47 (1947).

Dussik KT, Fritsch DJ (1954) Energy distribution measurements as a basis for the use of ultrasonics in arthritis and multiple sclerosis. Scientific Proceedings of the 3rd Annual Conference on Ultrasonic Therapie, Am Inst of Ultrasound Med 43-55 (1954).

Dussik KT, Fritch DJ, Kyriazidou M, Sears RS. Measurements of articular tissues with ultrasound. Am J Phys Med. **37**:160-165 (1958).

Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. Phys Med Biol **50**:2597-2616 (2005).

Epifanov AS. Theory of electron-avalanche ionization induced in solids by electromagnetic waves. IEEE J Qu Electron **QE-17**:2018–2022 (1981).

Fahmy IR, Abu-Shady H. Ammi majus Linn: pharmacognostical study and isolation of a crystalline constituent, ammoidin. Q J Pharmacol **20**:281-291 (1947).

Fahmy IR, Abu-Shady H, Schönberg A, Sina A. A crystalline priciple from Ammi majus Linn. Nature **160**:468-469 (1947).

Fahmy IR, Abu-Shady H. Ammi majus Linn: the isolation and properties pf ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment pf leukoderma. Q J Pharmacol **21**:499-503 (1948).

Fang J-Y, Lee W-R, Shen S-C, Fang Y-P, Hu C-H. Enhancement of topical 5-aminolevulinic acid delivery by Er:YAG laser and microdermabrasion: a comparison with iontophoresis and electroporation. Br J Dermatol **151**:132-140 (2004).

Ferraz RCMC, et al. Determination of threshold dose of photodynamic therapy to measure superficial necrosis. Photomed Laser Surg **27**:93-99 (2009).

Ferreira J, et al. Necrosis characteristics of photodynamic therapy in normal rat liver. Laser Phys **14**:209-212 (2004).

Flamm E, Ransohoff J, Wuchinich D, Broadwin A. Preliminary experience with ultrasonic aspiration in neurosurgery. Neurosurgery **2**:240-245 (1978).

Frederickson KS, White WE, Wheeland RG, Slaughter DR. Precise ablation of skin with reduced collateral damage using the femtosecond-pulsed, terawatt titanium-sapphire laser. Arch Dermatol **129**:989–993 (1993).

Freisen SA, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumours. Int J of Oncology **21**:577-582 (2002).

Gao S, et al. Characteristic of blood fluorescence spectra using low-level, 457.9 nm excitation from Ar^+ laser. Chin Opt Lett **2**:160-161 (2004).

Gandy HW, Ginther RJ, Weller JF, Laser oscillations in erbium activated silicate glass. Phys Lett **16**:266 (1965).

Giannopoulos T, Chipchase J, Tailor A, Butler-Manuel S. The use of harmonic shears (Ultracision) for laparoscopic lymphadenectomies in women with gynaecological malignancies. Gynecol Surg **2**:97-100 (2005).

Girard B, et al. Effects of Femtosecond Laser Irradiation on Osseous Tissues. Lasers Surg Med **39**:273–285 (2007).

Goldwyn RM. Bovie: The man and the machine. Ann Plast Surg **2**:135-153 (1979).

Glen WH. Parametric amplification of ultrashort laser pulses. Phys Rev Lett **11**:333-335 (1967).

Goldberg B. Heliotherapy. Arch Phys Ther **11**:263 (1930).

Hecht F. Understanding Lasers: an entry-level guide. Nova Jersey, IEEE Press (1994).
Hibst R, Keller, U. Experimental studies of the application of the er yag laser on dental hard substances .Measurement of the ablation rate. Lasers Surg Med **9**:338-344 (1989).

Hodgson W, Poddar P, Mencer E. Evaluation of ultrasonically powered instruments in the laboratory and in the clinical setting. Am J Gastroenterol **72**:133-140 (1979).

Hodgson WJ. Ultrasonic surgery. Ann R Coil Surg Engl **62**:459—461 (1980) .

Hodgson WJ, Del Guercio LR. Preliminary experience in liver surgery using the ultrasonic scalpel. Surgery **95**:230-234 (1984).

Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Clinical application of erbium:YAG laser in periodontology. J Int Acad Periodontol **10**:22-30 (2008).

Iyer AK, et al. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation. J Drug Target **15**:496-506 (2007).

Judd BR. Optical absorption intensities of rare-earth ions. Phys Rev **127**:750-761 (1962).

Kalaivani R, et al. Fluorescence Spectra of Blood Components for Breast Cancer Diagnosis. Photomed Laser Surg **26**:251-256 (2008).

Karakullukcu B, De Boer JP. Van Veen R, Wegman J,Tan B. Surgical debulking combined with photodynamic therapy to manage residual extramedullary plasmacytoma of the nasopharynx. Photodiagnosis Photodyn Ther **8**:264-266 (2011).

Kaufmann R, Hibst R. Pulsed 2.94 µm erbium-YAG laser skin ablation – experimental results and first clinical application. Clin Experiment Dermatol **15**:389-393 (1990).

Kelman C. Phaco-emulsification and aspiration. Am J Ophthalmol **67**:464-477 (1969).
Kessel D. The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizing agents. J Photochem Photobiol B **14**:261-262 (1992).

Kessel D, Castelli M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. Photochem Photobiol **74**:318-322 (2001).

Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. Photochem Photobiol Sci **1**:837-840 (2002).

Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. Photochem Photobiol **72**:676-80 (2000).

Krusen FH. Physical Medicine. Philadelphia, WB Saunders (1942).

Loesel FH, et al. Non-thermal ablation of neural tissue with femtosecond laser pulses. Appl Phys B **66**:121–128 (1998).

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Nova Iorque, Springer-Verlag (2006).

Langevin MP. Procédé et appareils d'émission et de réception des ondes élastiques sous-marines à l'aide des propriétés piézo-électriques du quartz. Brevet francais, No. 505703 **17**:538 –542 (1918).

Laussade JP, Yariv A. Mode locking and ultrashort laser pulses by anisotropic molecular liquids. Appl Phys Lett **13**:65-66 (1968).

Lee W-R, et al. Microdermabrasion as a novel tool to enhance drug delivery via the skin: an animal study. Dermatol Surg **32**:1013-1022 (2006).

Lund DJ, et al. Ocular hazards of the Q-switched Erbium laser. Investig Ophtalmol **9**:463-470 (1970).

MacCormack MA. Photodynamic Therapy. Arch Dermatol **22**:219-258 (2006).

Morton CA, MacKie RM, Whitehurst C, Moore JV, McColl JH. Photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. Arch Dermatol **134**:248-249 (1998).

Maiman TH. Stimulated optical radiation in Ruby. Nature **187**:493-494 (1960).

Massarweh NN, Cosgriff N, Slakey DP. Electrosurgery: history, principles, and current and future uses. J Am Coll Surg **202**:520-530 (2005).

Matroule J-Y, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DWC, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. Oncogene **20**:4070–4084 (2001).

Maxwell JC. A treatise on Electricity and Magnetism. Londres, Macmillan (1873).

McIntyre WJ, Downs MR, Bedwell SA. Treatment options for actinic keratosis. Am Family Physician **5**:667-671 (2007).

Medtech Insight. US Surgical Procedure Volumes. Medtech Insight LLC Report No A606:1-2 (2007).

Minutolo V, et al. Usefullness of the ultrasonically activated scalpel in laparoscopic cholecystectomy: our experience and review of literature. G Chir **29**:242-245 (2008).

Mitchell JP, Lumb GN. The principles of surgical diathermy and its limitations. Brit J Surg **50**:314-320 (1962).

Molchanov AG. Avalanche ionization in transparent dielectrics induced by intense light pulses. Sov Phys Solid State **12**:749 (1970).

Msika S, et al. Harmonic Scalpel^{TM} in laparoscopic colorectal surgery. Dis Colon Rectum **44**:432-436 (2001).

Nakagawa T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature **434**:652-658 (2005).

Nicolodelli G, Angarita DP, Inada NM, Tirapelli LG, Bagnato VS. Effect of photodynamic therapy on the skin using the ultrashort laser ablation. J Biophotonics, doi: 10.1002/jbio.201300024 (publicado online em 11/04/2013).

Nicolodelli G, Kurachi C, Rego RF, Omairi T, Bagnato VS. Evidence of 5-aminolevulinic acid (ALA) penetration increase due to microdrilling in soft tissue using femtosecond laser ablation. Lasers Med Sci **27**:1067-1071 (2012).

Niemz MH, Klancnik EG, Bille JF. Plasma-mediated ablation of corneal tissue at 1053 nm using a Nd:YLF oscillator/regenerative amplifier laser. Lasers Surg Med **11**:426–431 (1991).

Niemz MH, Hoppeler TP, Juhasz T, Bille JF. Intrastromal ablations for refractive corneal surgery using picosecond infrared laser pulses. Lasers Light Ophthalmol **5**:149–155 (1993).

Niemz MH. Laser-Tissue interactions: fundamentals and applications. Nova Iorque, Springer-Verlag (2007).

Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM. Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. Brit J Cancer **79**:72–81 (1999).

Ofelt GS. Intensities of crystal spectra of rare-earth ions. J Chem Phys **37**:511-520 (1962).

Ohm GS. Die galvanische Kette: mathematisch bearbeitet. Berlin, J.G.F. Kniestädt (1827).

O'Leary JG, Klintmalm GB. Impact of donor-specific antibodies on results of liver transplantation. Curr Opin Organ Transplant **18**:000-000 (2013) (online).

Olson JM, Alam M, Asgari MM. Needs assessment for general dermatologic surgery. Dermatol Clin **30**:153-166 (2012).

Payne, Jr JH. Ultrasonic dissection. Surg Endosc **8**:416—418 (1994).

Pearce JA. Electrosurgery. New York, John Wiley (1986).

Pollack SV, Carruthers A, Grekin RC. The history of Electrosurgery. Dermatol Surg **26**:904-908 (2000).

Pope AJ, Bown SG. Photodynamic Therapy. Br J Urol **1**:1-9 (1991).

Palanker D, Vankov A, Jayaraman P. On mechanisms of interaction in electrosurgery. New J Phys **10**:2-15 (2008).

Pozzi M. Remarques sur la fulguration. Bull Assoc Franc Cancer **2**:64-69 (1907).

Prasad PN. Introduction to Biophotonics. Nova Jersey, John Wiley (2003).

Prime J. Les accidents toxiques par l'eosinate de sodium. Paris, Jouve and Boyer (1900).

Puliafito CA, Steinert RF. Short-pulsed Nd:YAG laser microsurgery of the eye: biophysical considerations. IEEE J Qu Electron **QE-20**:1442–1448 (1984).

Raab O. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z Biol **39**:524-546 (1900).

Rego-Filho FG, Vieira E, Kurachi C, Araujo MT, Bagnato VS. Viability for the conjugate use of electrosurgery and photodynamic therapy. SPIE-OSA/ Vol. **8092**:80921U1-80921U6 (2011).

Rego-Filho FG, Dutra-Corrêa M, Nicolodelli G, Bagnato VS, Araujo MT. Influence of the hydration state on the ultrashort laser ablation of dental hard tissues. Lasers Med Sci **28**:215-222 (2013).

Reiners JJ Jr, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. Autophagy **6**:7-18 (2010).

Ribeiro AP, Pavarina AC, Trindade FZ, Inada NM, Bagnato VS, de Souza Costa CA. Photodynamic Therapy associating Photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. Cell Biol Int **34**:343-351 (2010).

Rivière AJ. Action des courants de haute fréquence et des effleuves du résonateur Oudin sur certaines tumeurs malignes. J Méd Interne **4**:776-777 (1900).

Sacchi CA. Laser-induced electric breakdown in water. J Opt Soc Am B **8**:337–345 (1991).

Sankarankutty AK, et al. Use of laser auto-fluorescence for evaluating liver grafts. Laser Phys Lett **3**:539–545 (2006).

Sayer P, Labbe RF, Gouterman M. Fluorescence of blood protoporphyrin in the presence of hemoglobin. Biochem Med **10**:24-35 (1974).

Seitz F. On the theory of electron multiplication in crystals. Phys Rev **76**:1376–1393 (1949).

Serbin J, Bauer T, Fallnich C, Kasenbacher A, Arnold WH. Femtosecond lasers as a novel tool in dental surgery. Appl Surf Sci **197**:737-740 (2002).

Shen S-C, Lee W-R, Fang Y-P, Hu C-H, Fang J-Y. *In vitro* percutaneous absorption and *in vivo* protoporphyrin IX accumulation in skin and tumors after topical 5-aminolevulinic acid application with enhancement using an Er:YAG laser. J Pharm Sci **95**:929-938 (2006).

Shi WQ, Bass M, Birnbaum M. Effects of energy transfer among Er^{3+} ions on the fluorescence decay and lasing properties of heavily doped $Er:Y_3AI_5O_{12}$. J Opt Soc Am B **7**:1456-1462 (1990).

Shokrollahi K, Marsden NJ, Whitaker IS, James W, Murison MSC. Basal cell carcinoma treated successfully with combined CO_2 laser and photodynamic therapy in a renal transplant patient: a case report. Cases J **2**:7920 (2009).

Sibani SA, McCarro n PA, Woolfson AD, Donnelly RF. Photosensitiser delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. Expert Opin Drug Deliv **5**:1241-1254 (2008).

Silva EEF. et al. Mechanisms of singlet oxygen and superoxide ion generation by porphyrins and bacteriochlorins. Chem Eur J **16**:9273-9286 (2010).

Simon AL. Made in Hungary: Hungarian contributions to universal culture. EUA, Simon Publications (1998).

Šmucler R, Vlk M. Combination of Er:YAG laser and photodynamic therapy in the treatment of nodular basal cell carcinoma. Lasers Surg Med **40**:153-158 (2008).

Souza CS, et al. Optimized Photodynamic Therapy with systemic photosensitizer following debulking technique for nonmelanoma skin cancers. Dermatol Surg **33**:194-198 (2007).

Spikes JD. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. Primary photoprocesses in Biology and Medicine (editado por R. V. Bergasson, G. Jori, E. J. Land e T. G. Truscott). Nova Iorque, Plenum Press (1985).

Stern D, et al. Corneal ablation by nanosecond, picosecond, and femtosecond lasers at 532 and 625 nm. Arch Ophthalmol **107**:587–592 (1989).

Stern D, et al. Corneal ablation by nanosecond, picosecond and femtosecond lasers at 532 nm and 625 nm. Arch Ophthalmol **107**:587–592 (1989).

Swank DJ, Bonjer HJ, Jeekel J. Safe laparoscopic adhesiolysis with optical access trocar and ultrasonic dissection. Surg Endosc **16**:1796-1801 (2002).

Teng P, Nishioka NS, Anderson RR, Deutsch TF. Acoustic studies of the role of immersion in plasma-mediated laser ablation. IEEE J Qu Electron **QE-23**: 1845–1852 (1987).

Thissen MRTM, Schroeter CA, Neumann HAM. Photodynamic therapy with delta-aminolevulinic acid for nodular basal cell carcinomas using a prior debulking technique. Br J Dermatol **142**:338-339 (2000).

Tirapelli LG, et al. Histopathology and laser autofluorescence of ischemic kidneys of rats. Lasers Med Sci **24**:397–404 (2009).

Tønnesen HH, de Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. J Pharm Sci **76**:371-3 (1987).

Usuda J, Chiu SM, Murphy ES, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL. Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. J Biol Chem **278**:2021-2029 (2003).

Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. Curr Mol Med **8**:207-220 (2008).

Vo-Dihn T. Biomedical Photonics Handbook. Nova Iorque, CRC Press LLC (2003).

Vogel A, Venugopalan V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. Chem Rev **103**:577-644 (2003).

Von Tappeiner H. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. Muench Med Wochenschr **47**:5 (1900).

Von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierender Stoffen. Muench Med Wochenschr **47**:2042-2044 (1900).

Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Uber Wirkung der photodynamichen (fluorieszierenden) Stoffe auf Protozoan und Enzyme. Dtsch Arch Klin Med **80**:427-487 (1904).

Von Tappeiner H, Jodlbauer A. Die Sensibilisierende Wirkung fluorieszierender Substanzer. Gesammte Untersuchungen uber die photodynamische Erscheinung. Leipzig, F. C. W. Vogel (1907).

Wakako R, Hashimoto M. Development of ultrasonically activated bending scalpel for endoscopic surgery. Proceedings of IEEWRSJ:1415-1420 (2002).

Walsh Jr JT, Flotte TJ, Deutsch TF. Er:YAG laser ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. Lasers Surg Med **9**:314-326 (1989).

Whitaker IS, Shokrollahi K, James W, Lohana P, Murison MC. Combined CO_2 laser with photodynamic therapy for the treatment of nodular basal cell carcinomas. Ann Plast Surg **59**:484-488 (2007).

Wyeth GA. Endothermy, surgical adjunct in accessible malignancy and precancerous conditions. Surg Gynecol Obstet **36**:711-714 (1932).

Wyeth GA. The endotherm. Am J Electrother Radiol **42**:186-187 (1924).

Walsh Jr. JT, Flotte TJ, Deutsch TF. Er:YAG laser ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. Lasers Surg Med **9**:314-326 (1989).

Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. Oncogene **20**:3420-3427 (2001).

Yablonovitch N, Bloembergen N. Avalanche ionization and the limiting parameter of filaments induced by light pulses in transparent media. Phys Rev Lett **29**:907–910 (1972).

Zharikov EV, et al. Stimulated emission from Er^{3+} ions in yttrium aluminum garnet crystals at λ= 2.94 μm. Sov J Quantum Electron **4**:1039 (1975).
Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. Genes Dev **20**:1-15 (2006).

http://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin (Acessado dia 25/01/2013, 14:50).

http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorin (Acessado dia 29/01/2013, 17:10).

http://www.genesis-ultrasound.com/Lazzaro-Spallanzani.html (Acessado em 21/01/2013).

http://www.genesis-ultrasound.com/ultrasound-sonography.html (Acessado em 21/01/2013).

http://www.pcbdesign007.com/pages/zone.cgi?a=57265 (Acessado dia 17/03/2013).