

MURILO PENTEADO DEL-GRANDE



São Paulo
2013

MURILO PENTEADO DEL GRANDE

**Terapia Fotodinâmica no tratamento do tumor de Ehrlich
inoculado em camundongos: Avaliação da eficácia e da resposta
imunológica sistêmica.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Zaidan Dagli

**São Paulo
2013**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2780
FMVZ

Del- Grande, Murilo Penteado

Terapia fotodinâmica no tratamento do tumor de Ehrlich inoculado em camundongos: avaliação da eficácia e da resposta imunológica sistêmica / Murilo Penteado Del-Grande. -- 2013.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

1. Terapia fotodinâmica. 2. PDT. 3. Tumor de Ehrlich. 4. Resposta imunológica. 5. Tratamento neoplasias. I. Título.

ERRATA

DEL-GRANDE, M. P. **Terapia fotodinâmica no tratamento do tumor de Ehrlich inoculado em camundongos: avaliação da eficácia e da resposta imunológica sistêmica.** 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	2º	104 f.	103 f.
Resumo	1º	104 f.	103 f.
Abstract	1º	104 f.	103 f.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Terapia fotodinâmica no tratamento do tumor sólido de Ehrlich inoculado em camundongos: avaliação de eficácia e resposta imunológica sistêmica", protocolado sob o nº 2235/2011, utilizando 45 (quarenta e cinco) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/5/2011.

We certify that the Research "Photodynamic therapy in the treatment of Ehrlich solid tumor in mice: efficacy evaluation and the systemic immune response", protocol number 2235/2011, utilizing 45 (forty-five) mice, under the responsibility Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/18/2011.

São Paulo, 19 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DEL-GRANDE, Murilo Penteado

Titulo: **Terapia fotodinâmica no tratamento do tumor de Ehrlich inoculado em camundongos**: avaliação da eficácia e da resposta imunológica sistêmica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____.
Instituição: _____ . Julgamento: _____.

Prof. Dr. _____.
Instituição: _____ . Julgamento: _____.

Prof. Dr. _____.
Instituição: _____ . Julgamento: _____.

**À Deus, por sua natureza de beleza infinita,
sua família que nos fortalece e seus animais
que nos inspiram.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Álvaro Del Grande Filho e Lydia Renata Penteado Del Grande, pelo amor e apoio incondicional. Sem os seus exemplos, lições, broncas e carinho eu nada seria.

Aos meus irmãos Heitor Penteado Del Grande e Mariana Penteado Del Grande Moré, pela amizade, brincadeiras, cuidados, brigas e a companhia essencial em todos esses anos.

Aos meus avós Alvaro Del Grande, Pascoalina Del Grande, Maria José Sanches e Francisco Penteado, pelo caráter e exemplos de uma vida dura e feliz.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (todo o corpo discente e funcionários), por se tornar a minha segunda casa durante esses 10 anos de graduação e pós-graduação, ampliando meu conhecimento e lapidando meu caráter.

A Professora Doutora Maria Lucia Zaidan Dagle, pela orientação e atenção dedicadas na realização deste trabalho e com isso em meu crescimento intelectual, científico e pessoal.

A Professora Doutora Silvia Renata Gaido Cortopassi, pela ajuda e indicações no momento de escolha do caminho a ser seguido.

A todos os colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada (Pós-Graduandos e a Técnica Marguiti Isaura Soares), por dividirem esse interesse e dedicação na luta contra o câncer.

Aos queridos setentianos, por todos os momentos incríveis divididos, dentro e fora das salas de aula.

A todos os integrantes do glorioso time de handebol da VET USP, por todos os treinos, jogos, conquistas, derrotas e o aprendizado e crescimento decorrentes.

Ao surfe, por me manter são nesta babilônia moderna.

Quanto mais me aprofundo na ciência mais me aproximo de Deus.

Albert Einstein

RESUMO

DEL-GRANDE, M. P. **Terapia fotodinâmica no tratamento do tumor de Ehrlich inoculado em camundongos:** avaliação da eficácia e da resposta imunológica sistêmica. [Photodynamic Therapy in the treatment of Ehrlich solid tumor in mice: Efficacy evaluation and the systemic immune response]. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy - PDT) é um método de tratar neoplasias baseado na interação entre luz, oxigênio molecular e um agente fotossensibilizador. Após a administração do agente, o tumor é iluminado com luz visível, ativando-o e produzindo espécies reativas de oxigênio, altamente citotóxicas, que provocam morte celular e destruição tecidual. Com a destruição do tumor há ativação do sistema imune inato e o subsequente processo inflamatório determina a apresentação de antígenos tumorais aos linfócitos, promovendo uma resposta imunológica adaptativa contra o tecido tumoral. O presente trabalho visou estudar a PDT associando um laser de diodo como fonte de luz e o fotossensibilizante Azul de Metileno (AM) a 1%, avaliando a sua efetividade no tratamento do Tumor de Ehrlich (TE) em sua forma sólida e a resposta imunológica nos animais tratados. Em um primeiro estudo, avaliou-se macro e microscopicamente tumores tratados, determinando a capacidade do protocolo em induzir inflamação e destruição do tecido tumoral. No segundo estudo, a resposta imune foi estudada em camundongos desafiados com um segundo implante de células do tumor de Ehrlich. O primeiro implante tumoral foi tratado com a PDT ou a excisão cirúrgica, comparando-se com um grupo controle sem tratamento. Os parâmetros avaliados após 17 dias foram o crescimento tumoral ($p > 0,05$), peso relativo dos órgãos linfóides [Baço ($p < 0,05$) e Linfonodo poplíteo ($p > 0,05$)], tamanho relativo do linfonodo ($p < 0,05$), presença de metástase em linfonodo poplíteo ($p > 0,05$), contagem de leucócitos sanguíneos ($p > 0,05$) e análise morfométrica quantitativa do tumor secundário [determinação da fração volumétrica de células tumorais ($p < 0,05$), infiltrado inflamatório ($p < 0,05$), necrose ($p > 0,06$) e porcentagem da área tumoral em necrose ($p < 0,05$)]. A PDT com o AM foi capaz de induzir necrose do TE e inflamação, havendo diferenças da resposta imune sistêmica quando comparado aos animais tratados por meio de excisão cirúrgica do tumor de Ehrlich.

Palavras chave: Terapia fotodinâmica. PDT. Tumor de Ehrlich. Resposta imunológica. Tratamento neoplasias.

ABSTRACT

DEL-GRANDE, M. P. **Photodynamic Therapy in the treatment of Ehrlich solid tumor in mice: efficacy evaluation and the systemic immune response.** [Terapia Fotodinâmica no tratamento do tumor de Ehrlich inoculado em camundongos: Avaliação da eficácia e da resposta imunológica sistêmica]. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Photodynamic therapy (PDT) is a method of treating neoplasms based on the interaction between light, molecular oxygen and a photosensitizing agent. After administration of the photosensitizer, the tumor is illuminated with visible light, activating the agent and producing reactive oxygen species (ROS). This highly cytotoxic ROS cause cell death and tissue destruction. The activation of the innate immune system and the subsequent inflammation induces tumor antigen presentation to lymphocytes, promoting an adaptive immune response against the tumor cells. This work aimed to study the PDT using a diode laser as light source and Methylene Blue (MB) 1% as photosensitizer. It was assessed its effectiveness in treating Ehrlich Solid tumor (ET) and the immune response produced in treated animals. First the treated tumors were evaluated macroscopically and microscopically, determining the ability of the protocol to induce inflammation and tumor tissue destruction. In a second study, the immune response was studied in mice challenged with a second tumor cell implant. The primary tumor was treated with PDT or surgical excision, comparing with a control group without treatment. The parameters evaluated after 17 days were tumor growth ($p > 0.05$), relative weight of lymphoid organs [spleen ($p < 0.05$) and popliteal lymph node ($p > 0.05$)], the relative size of the lymph node ($p < 0, 05$), metastasis at lymph node ($p > 0,05$), blood leukocyte count ($p > 0.05$) and quantitative morphometric analysis of secondary tumor [determining the volume fraction of tumor cells ($p < 0.05$), inflammatory infiltrate ($p < 0.05$), necrosis ($p > 0.06$) and tumor necrosis area ($p < 0.05$)]. PDT with MB was able to induce necrosis of the ET and inflammation, with differences in the immune response when compared to animals treated surgically to remove the Ehrlich tumor in its solid form.

Key-words: Photodynamic therapy. PDT. Ehrlich solid tumor. Immune response. Cancer treatment.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média e desvio padrão do diâmetro dorso-plantar do coxim esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**71**
- Tabela 2 - Média e desvio padrão da fração volumétrica (em %) apresentando células tumorais, infiltrado inflamatório, necrose ou outras estruturas da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**73**
- Tabela 3 - Média e desvio padrão da porcentagem de área ocupada por necrose na massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**74**
- Tabela 4 - Média e desvio padrão do peso relativo do baço em g por 100g de peso vivo (PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**75**
- Tabela 5 - Média e desvio padrão do peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo em g por 100g de peso vivo (PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**77**
- Tabela 6 - Média e desvio padrão do tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo em mm² por 100g de peso vivo (PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**78**
- Tabela 7 - Média e desvio padrão da contagem total de leucócitos sanguíneos por mm³ em camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**81**
- Tabela 8 - Média e desvio padrão do peso vivo nos dias zero, 17 e o ganho de peso de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral.....**82**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mapa do mundo mostrando a taxa de mortalidade pelo câncer padronizada pela idade a cada 100.000 pessoas nos diferentes países.....	20
Figura 2 -	Distribuição proporcional das principais causas de morte no Brasil em 2004.....	21
Figura 3 -	O espectro de radiação eletromagnética, mostrando os diferentes comprimentos de onda (λ), a frequência de oscilações por segundo (Hz) e a energia do fóton (eV).....	29
Figura 4 -	Representação da luz laser com seu espectro monocromático com apenas um comprimento de onda e da luz branca com diversos comprimentos de onda em seu espectro.....	30
Figura 5 -	Representação da coerência da luz laser (A) em comparação com a incoerência da luz não laser (B).....	31
Figura 6 -	Representação da unidirecionalidade do feixe de luz laser em comparação com a luz branca que se propaga em varias direções.....	31
Figura 7 -	Ilustração representando o mecanismo da imunidade tumoral produzida com a Terapia Fotodinâmica.....	42
Figura 8 -	Animal portador do tumor de Ehrlich na forma ascitica.....	53
Figura 9 -	Hemocitômetro de Neubauer contendo suspensão das células tumorais diluída em azul de Tripán 0,1% para contagem (Objetiva de 40x em MO).....	54
Figura 10 -	Equipamento de Laser (Photon vet®) com meio ativo de InGaAlP emitindo luz vermelha visível, no comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW.....	56
Figura 11 -	Figura demonstrando o delineamento experimental.....	60
Figura 12 -	Imagem mostrando a tela do programa ImageJ, usado para a tomada das medidas dos diâmetros do coxim plantar esquerdo inoculados com o tumor sólido de Ehrlich.....	61
Figura 13 -	Tela do programa ImageJ usado para a colocação da grade com 35 pontos sobre imagem histológica do coxim plantar esquerdo contendo a massa tumoral (H&E objetiva 20x).....	62
Figura 14 -	Imagem mostrando a utilização do programa ImageJ para a mensuração da área total tumoral do corte histológico do tumor secundário corado em H&E sob aumento em objetiva de 0,25x.....	63
Figura 15 -	Imagem mostrando a utilização do programa ImageJ para a mensuração da área de necrose presente no corte histológico do tumor secundário corado em H&E sob aumento da objetiva de 0,25x).....	64
Figura 16 -	Imagem do linfonodo poplíteo esquerdo usado para a determinação do tamanho deste. O tamanho foi determinado através da mensuração de sua área em mm ² no programa ImageJ.....	65

Figura 17 -	Imagem do linfonodo poplíteo esquerdo processada pelo programa ImageJ para a mensuração de sua área (mm ²), determinando o seu tamanho relativo.....	66
Figura 18 -	Fotografias da cauda de animal tratado com a Terapia fotodinâmica utilizando o fotossensibilizante Azul de Metileno a 1%.....	69
Figura 19 -	Fotomicrografia do tumor de Ehrlich na cauda de animal cinco dias após ser tratado com a terapia fotodinâmica utilizando o Azul de Metileno (HE).....	70
Figura 20 -	Fração volumétrica de cada componente da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos quanto a fração volumétrica de células tumorais e infiltrado inflamatório (ANOVA, p < 0,0001). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto a necrose (ANOVA p = 0,0669)	73
Figura 21 -	Área em necrose (%) da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis, p =0,0007).....	74
Figura 22 -	Peso relativo do baço (g/100g de PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, p < 0,001).....	75
Figura 23 -	Fotomicrografia de corte histológico do baço de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral (H&E objetiva 4x).....	76
Figura 24 -	Peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo (g/100g de PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, p = 0,0622).....	77
Figura 25 -	Tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo (mm ² /100g de PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, p < 0,001)....	78
Figura 26 -	Fotomicrografia do linfonodo poplíteo esquerdo em vários aumentos de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e	

	tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (Controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral (H&E objetiva 4x, 10x e 20x).....	79
Figura 27 -	Fotomicrografia de corte histológico do linfonodo poplíteo esquerdo de camundongo portadore do tumor de Ehrlich e tratado com a excisão cirúrgica após 17 dias de desenvolvimento de nova inoculação tumoral (H&E objetiva 10x e 20x).....	80
Figura 28 -	Contagem total de leucócitos sanguíneos por mm ³ em camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, p > 0,05).....	81
Figura 29 -	Ganho de peso de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, p = 0,0588).....	82
Figura 30 -	Camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral no coxim plantar esquerdo..	87
Gráfico 1 -	Curva de crescimento do diâmetro dorso-plantar (mm) do coxim esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle), pelo tempo (dias) nos diferentes grupos. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA duas vias p > 0,05)	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALA	Ácido 5-Aminolevulinico
AM	Azul de Metileno
APC	Células Apresentadoras de Antigenos
CASPC	Phitalocianina sulfonada de cloro-aluminio
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido Etilenodiamino tetra-acético)
Er:YAG	Érbio dopado por Itrio-Aluminio-Granada
FDA	Food and Frud Administration (Administração de alimentos de drogas)
HE	Hematoxilina e Eosina
He-Ne	Helio – Neônio
Hp	Hematoporfirinas
HpD	Derivados de Hematoporfirina
HPPH	2-[1-hexy-loxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbideo
HSP70	Proteína de Choque extracelular 70
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência internacional para pesquisa do cancer)
IFN – γ	Interferon gamma
IgM	Imunoglobulina M
INCA	Instituto Nacional de câncer
LASER	Light Amplification by Estimulated Emission of Radiation (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LILT	Low Intensity Laser Terapy (Terapia com Laser de Baixa Intensidade)
MAC	Complexos de ataque a membrana
MEALA	Ácido metilaminolevulinico
MHC – II	Complexo de histocompatibilidade maior classe dois
Nd:YAG	Neodimio dopado por Itrio-Aluminio-Granada
NK	Natural Killer
PDT	Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica)
RAG	Gene ativador da recombinação
TE	Tumor de Ehrlich

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Linfócitos T reguladores
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μm	Micro metros
μs	Micro segundos
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleto
cm^2	Centímetros quadrados
CO_2	Dióxido de Carbono
eV	Eletron Volts
f	Frequência de oscilações
g	Gramas
Hz	Hertz
J	Joules
K^+	Potássio
mg	Miligramas
mL	mili Litros
mm^2	Milímetros quadrados
mm^3	Milímetros cúbicos
mW	miliWatts
Na^+	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
W	Watts
λ	Lambida - Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 O Câncer: Etiologia e aspectos imunológicos	24
2.1.1 Neoplasias	24
2.1.2 A imunomodulação do câncer	25
2.2 O Laser	28
2.3 A história da Terapia Fotodinâmica	33
2.3.1 Dos primórdios ao uso clínico	33
2.3.2 No Brasil	35
2.3.3 Na Medicina Veterinária	36
2.4 Como funciona a Terapia Fotodinâmica	38
2.4.1 O mecanismo da reação fotodinâmica	38
2.4.2 Os efeitos diretos da Terapia Fotodinâmica	39
2.4.3 Os efeitos secundários da Terapia Fotodinâmica	40
2.5 A Terapia Fotodinâmica e o sistema imunológico	41
2.6 O modelo Experimental	44
2.6.1 O tumor de Ehrlich	45
2.6.2 O Azul de Metileno	47
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos	50
4 MATERIAL e MÉTODOS	51
4.1 Modelo experimental e procedimentos em geral	52
4.1.1 Animais	52
4.1.2 Tumor experimental	52
4.1.3 Manutenção do Tumor de Ehrlich	52
4.1.4 Preparo das células tumorais para inoculação	53
4.1.5 Inoculação dos animais com o tumor de Ehrlich	55
4.1.6 Tratamento dos animais portadores do tumor de Ehrlich sólido	55
4.1.6.1 Terapia fotodinâmica no tumor de Ehrlich sólido em camundongos	55
4.1.6.2 Excisão cirúrgica do tumor de Ehrlich sólido em camundongos	56
4.1.7 Eutanásia e coleta de material biológico	56
4.1.8 Histopatológico	57
4.1.8.1 Fixação	57
4.1.8.2 Inclusão em parafina	57
4.1.8.3 Corte dos blocos de parafina	58
4.1.8.4 Desparafinização, hidratação e coloração HE	58
4.2 Experimentos	59
4.2.1 Experimento 1	59
4.2.2 Experimento 2	59
4.2.2.1 Delineamento experimental	59

4.2.2.2 <i>Mensuração diâmetro dorso-plantar do coxim esquerdo durante crescimento do tumor de Ehrlich sólido</i>	60
4.2.2.3 <i>Morfometria</i>	61
4.2.2.3.1 <i>Determinação da fração volumétrica dos componentes da massa tumoral</i>	61
4.2.2.3.2 <i>Quantificação da área em necrose na massa tumoral do coxim plantar esquerdo</i>	63
4.2.2.4 <i>Peso relativo do baço</i>	64
4.2.2.5 <i>Análise histopatológica do baço</i>	64
4.2.2.6 <i>Peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo</i>	65
4.2.2.7 <i>Tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo</i>	65
4.2.2.8 <i>Análise histopatológica do linfonodo poplíteo esquerdo</i>	66
4.2.2.9 <i>Contagem total de leucócitos sanguíneos</i>	66
4.2.2.10 <i>Ganho de peso dos animais durante crescimento do tumor secundário</i>	67
4.3 Análise Estatística	67
5 RESULTADOS	68
5.1 Experimento 1	69
5.2 Experimento 2	70
5.2.1 <i>Mensuração diâmetro dorso-plantar do coxim esquerdo durante crescimento do tumor de Ehrlich sólido</i>	70
5.2.2 <i>Morfometria</i>	72
5.2.2.1 <i>Fração volumétrica dos componentes da massa tumoral</i>	72
5.2.2.2 <i>Área em necrose na massa tumoral do coxim plantar esquerdo</i>	74
5.2.3 <i>Peso relativo do baço</i>	75
5.2.4 <i>Análise histopatológica do baço</i>	76
5.2.5 <i>Peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo</i>	77
5.2.6 <i>Tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo</i>	78
5.2.7 <i>Análise histopatológica do linfonodo poplíteo esquerdo</i>	79
5.2.8 <i>Contagem total de leucócitos sanguíneos</i>	81
5.2.9 <i>Ganho de peso dos animais durante crescimento do tumor secundário</i>	82
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	94

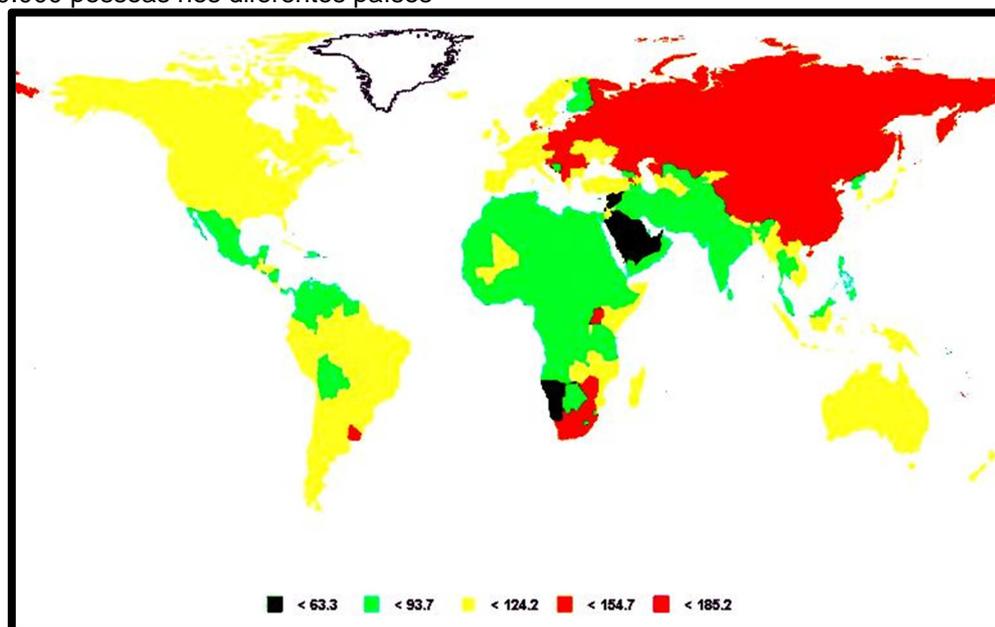
1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Em 2008 a Agência internacional para pesquisa do câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) promoveu o projeto GLOBOCAN, com o intuito de estimar a prevalência, mortalidade e incidência dos principais tipos de câncer no mundo.

Segundo os dados obtidos num total de 184 países (representados na figura 1), o câncer é a principal causa das mortes no mundo, totalizando 7,6 milhões de mortes em 2008 (aproximadamente 13% de todas as mortes). Os neoplasmas de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama são os principais causadores das mortes. As projeções indicam que em 2030 o número de mortes pelo câncer será de 13,1 milhões (GLOBOCAN, 2008).

Figura 1 - Mapa do mundo mostrando a taxa de mortalidade pelo câncer padronizada pela idade a cada 100.000 pessoas nos diferentes países



(Fonte: GLOBOCAN, 2008).

No Brasil a mortalidade proporcional por neoplasias vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas e em 2004 foram registrados 141 mil óbitos, representando 13,7% de todos os óbitos (Figura 2), ficando atrás apenas das mortes relacionadas a doenças do aparelho circulatório (INCA, 2006).

Figura 2 - Distribuição proporcional das principais causas de morte no Brasil em 2004.



(Fonte: INCA, 2006)

Na Medicina Veterinária a estimativa da incidência, prevalência e mortalidade dos animais devido às neoplasias fica dificultada pela inexistência, ou existência estratificada, de bancos de registro de câncer. Entretanto a literatura mundial mostra fortes indícios de que o câncer é uma doença de extrema importância na medicina veterinária, sendo a maior causa de morte em animais de estimação (REIF, 2007).

O modo como a sociedade atual tem enfrentado este grande problema passa inicialmente por medidas preventivas, que visam principalmente a diminuição dos fatores de risco, como o fumo e a exposição ao sol. Passa também pela detecção precoce da doença, que pode ser feita através da educação da população quanto ao reconhecimento dos principais sintomas, como exemplo, as campanhas do autoexame para o câncer de mama. A detecção precoce da doença também depende do desenvolvimento e acessibilidade, de métodos diagnósticos efetivos. Por fim, o tratamento dos pacientes e a manutenção da qualidade de vida são essenciais e os esforços para o desenvolvimento de técnicas mais apuradas de tratamento são vistos ao redor do globo (WHO, 2012).

Atualmente o tratamento dos tumores sólidos está baseado principalmente na excisão cirúrgica do mesmo. A radioterapia e a quimioterapia são as modalidades de tratamento adjuvante usualmente utilizada, dependendo da neoplasia em questão (WITHROW, 2007).

As pesquisas na área de oncologia têm avançado muito e o conhecimento sobre o câncer como um todo tem produzido novas modalidades de tratamento que aos poucos vão sendo introduzidas, como exemplo, a Terapia Fotodinâmica (PDT – do inglês: Photodynamic Therapy).

A PDT é um método de tratamento de neoplasias baseado na interação entre um agente fotossensibilizante, luz e oxigênio molecular. Existem inúmeros tipos de

fotossensibilizantes, que podem ser administrados pelas vias endovenosa, oral ou tópica. A iluminação do tumor com luz visível, no intuito de ativar o fotossensibilizante, é feita após determinado tempo de administração do agente, levando à produção de espécies reativas de oxigênio, altamente citotóxicas, determinando a morte celular, por necrose e apoptose, e a destruição do tecido tumoral (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

A característica singular da PDT no tratamento de neoplasias é a participação ativa do sistema imunológico no combate às células tumorais. Os efeitos fototóxicos na membrana celular liberam de uma série de mediadores inflamatórios levando a ativação do sistema imune inato. A inflamação local e a invasão por neutrófilos, macrófagos e células “*Natural Killer*” (NK) junto à destruição das células neoplásicas, determina a condição necessária para a apresentação de antígenos tumorais as células dendríticas e demais células apresentadoras de antígenos (APC). A apresentação antigênica promove ativação do sistema imune adaptativo e há a sensibilização dos linfócitos T efetores (CD8+) determinando uma resposta específica para a neoplasia tratada, envolvida na erradicação de focos disseminados e/ou metastáticos. Além disso, há a sensibilização de linfócitos B (de memória) aos antígenos tumorais, promovendo um controle em longo prazo do tumor. A produção de anticorpos antitumorais pelos plasmócitos pode ser sugerida, porém ainda não demonstrada em modelo experimental (GOMER; FERRARIO; MURPHREE, 1987; KOBERLIK, 1996; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

O presente trabalho visou estudar a PDT associando um laser de diodo e o Fotossensibilizante Azul de Metileno (AM) a 1%, avaliando a sua efetividade no tratamento do Tumor de Ehrlich sólido e a indução da resposta imunológica antitumoral. Em uma primeira fase avaliou-se macro e microscopicamente tumores tratados, determinando a capacidade do protocolo em induzir inflamação e destruição tecidual. Em uma segunda fase, a indução de resposta imune foi estudada em camundongos desafiados com um segundo implante de células do tumor de Ehrlich. O primeiro implante tumoral foi tratado com a PDT ou a excisão cirúrgica, comparando-se a resposta com um grupo controle sem tratamento. Os parâmetros avaliados foram o crescimento tumoral, peso relativo, tamanho e análise histopatológica dos órgãos linfóides (Baço e Linfonodo poplíteo), contagem de leucócitos sanguíneos e morfometria do tumor secundário (determinação da fração volumétrica dos componentes da massa tumoral: células tumorais, infiltrado inflamatório e necrose).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Câncer: Etiologia e aspectos imunológicos.

A seção a seguir trata dos conceitos referentes ao estudo do câncer, sua etiologia e sua interação com os mecanismos de defesa do organismo.

2.1.1 Neoplasias

Segundo Beremblum (1970), uma neoplasia é uma massa de tecido cujo crescimento excede e é incoordenado com o de tecidos normais, persistindo de maneira excessiva após a cessação do estímulo que provocou a alteração. Com o advento da biologia molecular e genética, Evans (1993) elaborou o conceito de que “os cânceres são consequências de alterações genéticas e epigenéticas, envolvendo uma variedade de genes que são fundamentais para os processos de crescimento, diferenciação e remoção celular programada”.

O câncer é determinado pelo acúmulo de alterações genéticas que conferem à célula a capacidade de evasão dos mecanismos de controle homeostático, garantindo sua sobrevivência e proliferação. O processo de surgimento do câncer é denominado carcinogênese, sendo este separado em iniciação, promoção, manutenção e progressão (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2005; MODIANO; BREEN, 2007).

Na iniciação as células sofrem a ação de carcinógenos, adquirindo mutações nos genes supressores de tumores e nos proto-oncogenes, não sendo estas letais para a célula, mas tornando-as suscetíveis a ação dos promotores. Na etapa de promoção, as células iniciadas são expostas a agentes não mutagênicos, mas que promovem a expansão da população celular com a mutação inicial. Durante a manutenção as células são mantidas na população, somente quando não possuem mutações deletérias. As alterações genéticas induzem maior proliferação que as células normais e levam ao escape da morte celular programada. Por fim, na progressão as células cancerosas se proliferam, adquirindo a capacidade de invadir os tecidos adjacentes, promover a formação de vasos sanguíneos e linfáticos na massa tumoral e a

metastatização para outros locais do organismo (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2005; MODIANO; BREEN, 2007; BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMMAS, 2013).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000, 2011), os fatores que caracterizam as células cancerosas (conhecidos em inglês como: “The Hallmarks of Cancer”) são agrupados em: 1) Autossuficiência quanto a produção de fatores de crescimento; 2) Insensibilidade para com os fatores inibitórios de proliferação; 3) Evasão da apoptose; 4) Potencial de replicação ilimitado; 5) Angiogênese contínua; e 6) Invasão tecidual e metástase.

2.1.2 A imunomodulação do câncer

Paul Ehrlich (1906) no início de Século, em sua coleção de estudos sobre a imunidade, propôs que haveria uma incidência de cânceres muito maior não fosse a existência de um controle da proliferação destas células por um sistema do organismo. O conceito de vigilância imunológica, entretanto, não pode ser comprovado devido as limitações científicas da época.

Na década de 50 os estudos de Medawar demonstraram a participação da imunidade celular na rejeição de transplantes alográficos. Naquele momento era aceito que o sistema imune seria capaz de reconhecer e destruir células neoplásicas transplantadas em linhagens não isogênicas de camundongos. A conclusão foi de que o mecanismo de tais rejeições era o mesmo de transplantes alográficos, e não devido a um mecanismo específico para os tumores. Com a criação de linhagens isogênicas de camundongos foi demonstrado que estes poderiam ser imunizados contra transplantes singênicos de células neoplásicas, embasando a existência de antígenos tumorais específicos (SCHREIBER et al., 2002).

Com estas descobertas Burnet (1957) afirmou:

De forma nenhuma é inconcebível que pequenas populações de células tumorais possam se desenvolver e devido a presença de novos antígenos provoquem uma resposta imunológica levando a regressão tumoral antes de sinais clínicos existirem

Lewis Thomas, durante este mesmo período, sugeriu que a imunidade celular tinha como função primária o controle neoplásico e não o mecanismo de rejeição a transplantes (SCHREIBER et al., 2002).

Lewis e Burnet levaram as ideias originais de Paul Ehrlich a um novo patamar, onde os Linfócitos T seriam as células sentinelas da resposta imunológica contra o câncer. Estas definições levaram a formação do conceito de vigilância imunológica do câncer por Burnet em 1970:

Em vertebrados de sangue quente, mudanças genéticas herdáveis são comuns nas células somáticas e uma fração destas mudanças pode ser o passo inicial para a malignidade. É uma necessidade evolutiva a existência de um mecanismo que elimine ou inative tais células mutantes potencialmente perigosas, ficando postulado que tal mecanismo é de caráter imunológico

Diversos estudos utilizando modelos experimentais com animais imunodeprimidos (como timentomia e uso de anticorpos antilinfócitos T) foram realizados e observou-se maior suscetibilidade desses animais a neoplasias de origem viral e uma maior ocorrência de linfomas. Resultados discordantes quanto a carcinogênese química e neoplasias espontâneas, levaram a crer que, a maior ocorrência das neoplasias virais e linfomas seria devido a maior suscetibilidade dos animais a agentes infecciosos (KAPLAN, 1971; SANFORD et al., 1973).

O uso de animais atímicos como os camundongos *nude*, foi a ferramenta usada por Stutman (1974) na tentativa de confirmar a participação do sistema imune no controle do câncer. Mais uma vez não houve diferença na susceptibilidade a neoplasias quimicamente induzidas nestes animais, como se esperaria com base na vigilância imunológica.

Na época não se sabia, mas os animais *nude* possuem um sistema imune apenas parcialmente comprometido e que ainda possibilita a interação de células imunológicas com as neoplásicas, podendo ocorrer a influência do sistema imune no desenvolvimento tumoral (SCHREIBER et al., 2002).

Thomas (1982) relatou que “O maior problema da vigilância imunológica é que não se pode comprovar sua existência nos modelos experimentais existentes”. Assim levando o conceito ao esquecimento por certo período. Entretanto, algumas descobertas retomariam as pesquisas na área.

Dighe et al. (1994), utilizando células tumorais insensíveis ao Interferon gama (IFN - γ) não obtiveram regressão tumoral, como esperado no modelo utilizado, demonstrando a participação direta do IFN - γ na imunogenicidade tumoral, tendo este um importante papel no reconhecimento e eliminação de células tumorais.

Observou-se também que animais deficientes na produção da perforina (substância presente nos grânulos de linfócitos T) desenvolviam mais tumores quimicamente induzidos (VAN-DEN-BROEK et al., 1996).

No início do século XXI, o desenvolvimento de animais geneticamente modificados possibilitou a produção de animais com mutações em genes ativadores da recombinação 1 e 2 (RAG -1 e RAG - 2), sendo estes animais completamente desprovidos de Linfócitos T, B e “*Natural Killer*” (NK). Nestes animais ocorreu um maior surgimento de sarcomas induzidos quimicamente e de carcinomas espontâneos, mostrando a participação dos linfócitos no controle do câncer (SHANKARAN et al., 2001). Os experimentos do grupo de pesquisadores de Schreiber e Old foram definitivos para demonstrar que o sistema imunológico pode, e com frequência previne o desenvolvimento de células malignas, sendo de extrema importância na proteção contra o câncer.

Muitos outros estudos em uma variedade de animais incompetentes em pontos críticos do sistema imunológico suportam a ideia de Thomas e Burnet. Os resultados também sugerem que a vigilância imunológica do câncer se trata de um processo heterogêneo, com ações de diferentes componentes imunológicos conforme variações do tipo celular tumoral, mecanismos de transformação neoplásica, localização anatômica e as formas de reconhecimento imunológico pelo organismo (SCHREIBER et al., 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; ZIMMERMANN; BENIGNI; MONDINO, 2005).

Mesmo com a existência de uma vigilância imunológica contra o câncer, indivíduos com a imunidade intacta desenvolvem a doença. Em estudos com implantes de células neoplásicas em camundongos imunocompetentes se observa surgimento de variáveis tumorais com menor imunogenicidade enquanto nos animais imunossuprimidos as células se tornam mais imunogênicas (UYTTENHOVE; VAN-SNICK; BOON, 1980; URBAN et al., 1982).

O grupo de Schreiber e Old, que demonstrou a participação dos linfócitos no controle do câncer, também propôs que, assim como a ação do sistema imune pode selecionar bactérias, vírus e parasitas mais adaptados a sobrevivência no organismo, a vigilância imunológica também pode ter efeito semelhante sobre as células neoplásicas em desenvolvimento. O grupo comparou a carcinogênese química entre animais imunocompetentes e imunodeficientes e mostrou que os tumores formados sob condições de imunossupressão são mais imunogênicos que os formados em situação de imunocompetência (SHANKARAN et al., 2001).

A forma como o sistema imunológico interage com as células neoplásicas ainda não é completamente elucidada, mas o conceito de vigilância imunológica evoluiu para o termo Imunomodulação do câncer, ou seja, conforme o ambiente imunológico em que se encontram, as células neoplásicas adquirem características que possibilitam a progressão da doença (SCHREIBER et al., 2002).

Pesquisas recentes mostraram que não somente as células neoplásicas escapam os mecanismos de defesa do organismo, mas são também capazes de alterar o microambiente imunológico do tumor e possivelmente do ambiente sistêmico.

As chamadas células T reguladoras (Treg), responsáveis pela manutenção da tolerância imunológica, impedindo ou controlando uma resposta excessiva a antígenos próprios (doenças imunomediadas) ou exógenos (processos alérgicos), também estão presentes em diversos tumores experimentais e espontâneos. A depleção destas células previamente ao desafio com células tumorais produz uma menor ou não progressão tumoral (YAMAGUCHI; SAKAGUCHI, 2006).

O interesse pelas células imunossupressoras de origem mieloide vem surgindo nos últimos anos. Tais células estão presentes em grande número em uma variedade de tumores experimentais e em pacientes com tumores de mama, pulmão, próstata, rins, etc. Estas células são precursoras de granulócitos, macrófagos e células dendríticas. Quando isoladas, tais células não se diferenciam se expostas a fatores derivados de tumores, e apresentam uma intensa capacidade imunossupressora em testes *in vitro* e *in vivo*. É considerada por muitos como fator chave no mecanismo tumoral de escape da vigilância imunológica (GABRILOVICH; BRONTE; CHEN et al., 2007).

A interação do sistema imunológico com o câncer é base para as pesquisas de modalidades de tratamento que possam de alguma forma modificar essa interação promovendo o controle do câncer. A PDT tem em seu mecanismo de ação a essencial participação do sistema imunológico, sendo este o foco deste trabalho.

2.2 O Laser

Em 1922 Albert Einstein recebeu o prêmio Nobel de física pelos seus trabalhos e contribuições com a física teórica, mas principalmente pela sua descoberta da lei do efeito fotoelétrico. Tal efeito se refere à emissão de elétrons de uma superfície, geralmente metálica, quando esta absorve a energia emitida por um foco de luz incidente (PREMIO NOBEL, 2013).

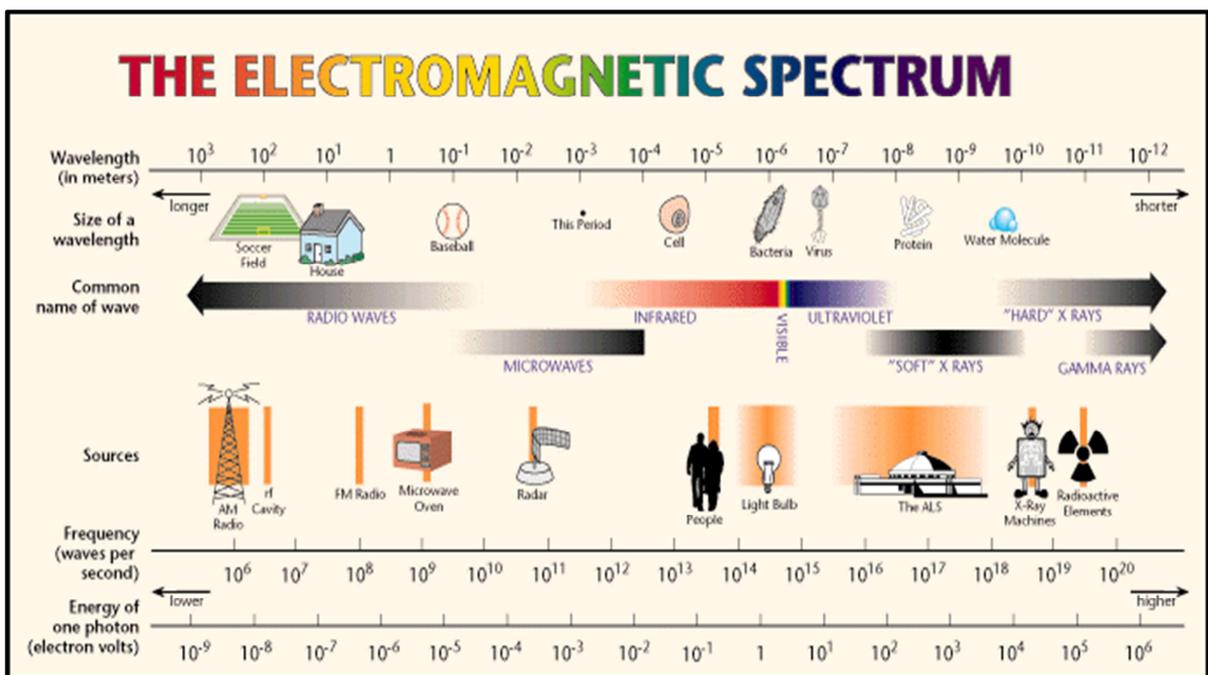
Em 1917, Einstein foi o primeiro a descrever o conceito de Laser, sendo este o acrônimo formado pela expressão em inglês *Light Amplification by Stimulated Emission Of Radiation* - Amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação. Passaram-se mais de 40

anos, quando Theodore Maiman em 1960 criou o primeiro equipamento de Laser que foi inicialmente usado na oftalmologia para a fotocoagulação (GORES, 2006).

A luz visível faz parte do espectro de radiação eletromagnética. A radiação eletromagnética é energia que se movimenta através do espaço em forma de ondas não possuindo matéria, ou seja, não tem massa ou peso. Cada pequeno pacote de energia é denominado fóton, tendo sua energia medida em eletronVolts (eV). A quantidade de energia em um fóton varia conforme o comprimento de onda (λ), medido em nanômetros (nm), e a sua frequência de oscilações por segundo (f), medida em Hertz (Hz) (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

O espectro de radiação eletromagnético varia desde os comprimentos de onda grande (da ordem de centenas de metros) e com baixa frequência (10^6 Hz) e energia (10^{-9} eV), como as ondas de radio, até os comprimentos de onda bastante curtos (da ordem de nanômetros) e com alta frequência (10^{20} Hz) e energia (10^6 eV), como a radiação gama. A energia do fóton para ionização dos tecidos biológicos esta entre 3,5 e 20 eV, estando os principais tipos de laser entre 0,12 e 2,5 eV. A figura 3 mostra todo o espectro, estando a luz visível na região 400 a 700 nm (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

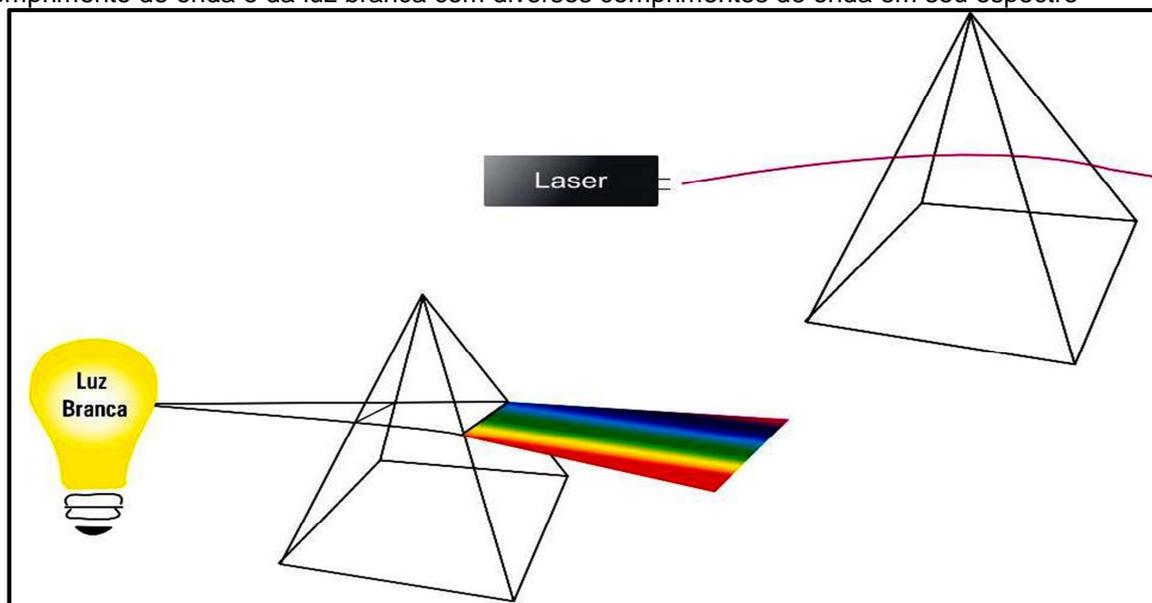
Figura 3 - O espectro de radiação eletromagnética, mostrando os diferentes comprimentos de onda (λ), a frequência de oscilações por segundo (Hz) e a energia do fóton (eV)



(Fonte: LBNL, 2001)

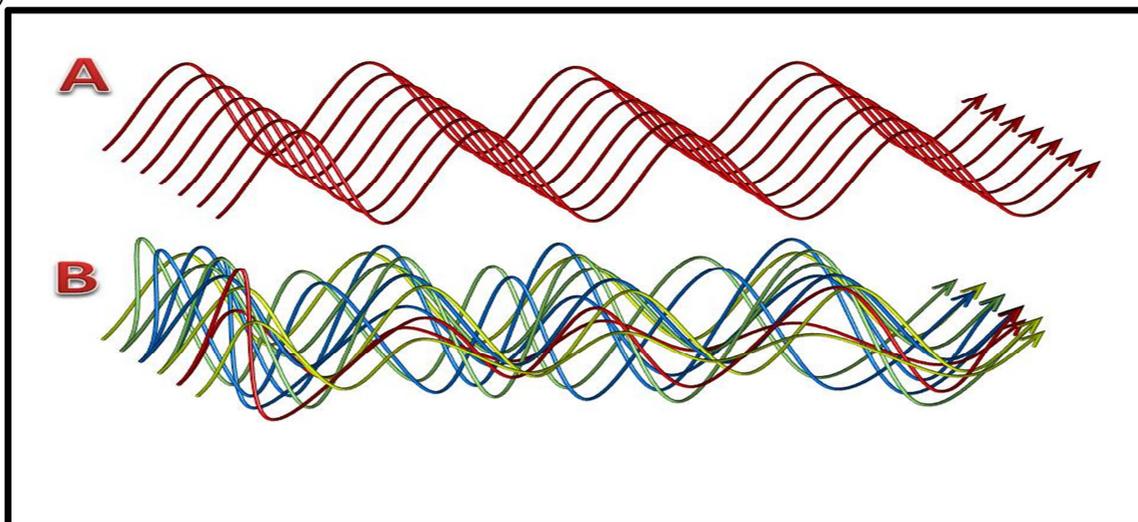
A luz emitida pelos equipamentos de laser apresenta algumas características que a diferem da luz emitida por outras fontes, como a luz solar e a luz de lâmpadas incandescentes. A primeira e mais marcante é o fato de ser monocromática. Diferente da luz branca o laser emite apenas um comprimento de onda (λ), com isso quando direcionada para um prisma óptico o espectro transmitido será de apenas uma cor, enquanto da luz branca por emitir vários comprimentos de onda será de várias cores (Figura 4). A segunda característica importante do laser é a sua coerência ao se propagar. Ter coerência significa que as ondas de luz do laser tem uma relação de espaço e tempo fixa, estando elas sempre alinhadas entre si (Figura 5). Por fim, a terceira característica, que difere o laser das demais fontes de luz, é o fato de o feixe ser unidirecional e pouco divergente (Figura 6). As ondas de luz do laser se propagam em uma única direção e o diâmetro do feixe emitido é praticamente o mesmo após percorrer longas distâncias (BAGNATO, 2001).

Figura 4 - Representação da luz laser com seu espectro monocromático com apenas um comprimento de onda e da luz branca com diversos comprimentos de onda em seu espectro



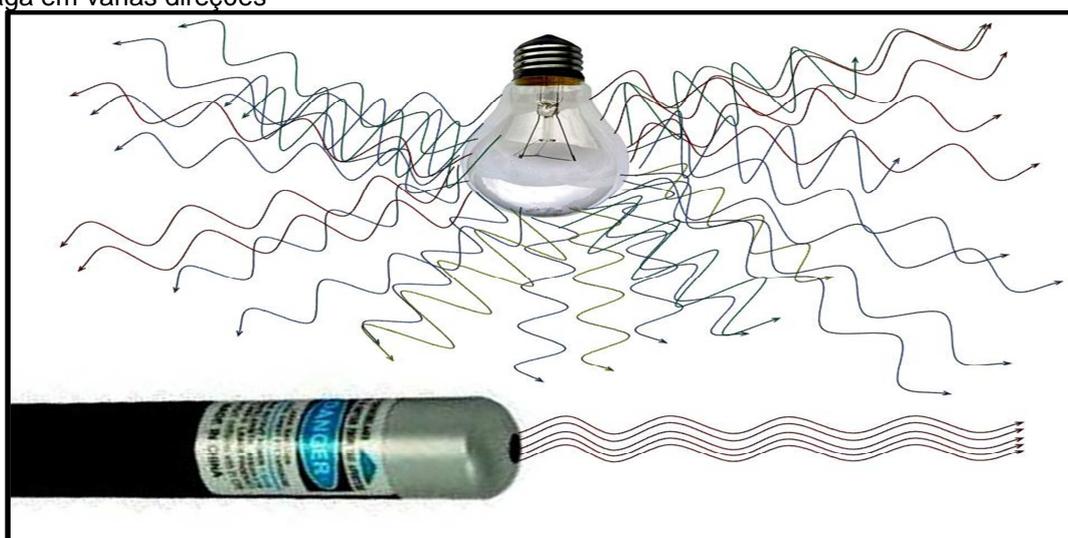
(Fonte: NEVES, 2005)

Figura 5 - Representação da coerência da luz laser (A) em comparação a incoerência da luz não laser (B)



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Figura 6 - Representação da unidirecionalidade do feixe de luz laser, comparado a luz branca que se propaga em varias direções



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

As aplicações mais estudadas do laser são aquelas relacionadas aos efeitos térmicos, ou seja, quando a energia emitida é absorvida pelo tecido e subsequentemente transformada em calor. O chamado laser de alta intensidade, onde a potência utilizada é de algumas dezenas de Watts por centímetro quadrado (W/cm^2), age como um bisturi, cortando o tecido. O procedimento cirúrgico torna-se mais seguro devido ao menor grau de sangramento e melhores condições de assepsia. Os tipos de laser mais utilizados para esse fim são de gás

carbônico (CO₂), os de Érbio dopado por Ítrio-Alumínio-Granada, (Er:YAG) e Neodímio dopado por Ítrio-Alumínio-Granada (Nd:YAG) (MORITZ, 2006).

O Laser de baixa intensidade utiliza uma potência de alguns miliWatts por centímetro quadrado (mW/cm²), portanto o seu efeito térmico é mínimo ou inexistente. Nestas baixas intensidades, a energia emitida, quando absorvida, não resulta na produção de calor. Os efeitos produzidos serão fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos. Para que isso ocorra, a energia deve ser absorvida pelos chamados fotoaceitadores, ou fotorreceptores; sendo eles endógenos (usados na LILT – do inglês: Low Intensity Laser Therapy) ou exógenos (utilizados para a PDT). Os lasers de baixa intensidade mais estudados são os de Hélio – Neônio (He-Ne), Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAlAs) e Arseneto de Gálio (GaAs) (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

Na PDT, as fontes de luz para a ativação do agente fotossensibilizante descritas na literatura variam muito em diversas características. Inicialmente foi descrita a utilização de lâmpadas de xenônio e utilização de filtros específicos para determinados comprimentos de ondas em lâmpadas halogênicas. Com o avanço da tecnologia do Laser, uma miríade de modelos surgiu, utilizando diferentes substâncias como meio ativo para seu funcionamento, resultando cada uma delas em um comprimento de onda emitido diferente. Os equipamentos de laser ainda possibilitam a escolha de diferentes regimes de irradiação da luz podendo-se alterar a intensidade da luz (em watts), a dose de energia irradiada em determinada área (em joules/cm²) e o tempo de irradiação. Mantendo-se a mesma dose, porém variando a intensidade ou o tempo de exposição, pode-se obter diferentes resultados (CASTANO et al., 2007).

Atualmente, a diminuição dos custos de produção dos lasers de diodo, tornou a tecnologia acessível, estando os equipamentos presentes em consultórios odontológicos, clínicas veterinária e hospitais, sendo estes utilizados na LILT e na PDT antimicrobiana. O efeito da PDT contra o câncer com estes equipamentos é estudado por diversos pesquisadores. O presente estudo utilizou um destes equipamentos, produzido no Brasil com o meio ativo de Fosfato de Arsênio Índio Galio (InGaAIP) emitindo luz vermelha visível, no comprimento de onda de 660 nm.

2.3 A história da Terapia Fotodinâmica

Nesta seção a PDT é revisada quanto as suas origens, passando pelas pesquisas básicas até a sua utilização clínica, tanto na medicina humana quanto na veterinária.

2.3.1 Dos primórdios ao uso clínico

Uma das mais antigas referências do uso da luz como terapia esta em um dos livros sagrados do Hinduísmo, o Atharvaveda, datado de 1400 anos antes de cristo. Nele é descrito o uso das sementes da planta *Psoralea corylifolia* associada a luz do sol no tratamento do vitiligo. Psoralen é o componente fotoativo dessas sementes, estando presente também na planta *Ammi majus*, que cresce nas margens do rio Nilo. Os antigos egípcios também usavam extratos dessa planta associado a luz solar no tratamento de leucodermias. Atualmente o Psoralen purificado, associado a irradiação com luz ultravioleta artificial, é o tratamento utilizado para condições como o vitiligo, psoríase, micose fungoide, entre outras (PARRISH et al., 1974; LUCROY, 2002; MOAN; PENG, 2003).

O primeiro relato científico de uma reação fotodinâmica foi feito em 1888 pelo italiano Marccaci¹ (1888 apud SPIKEST, 1997.), onde ele descreveu um aumento da toxicidade de alcaloides (quinina) para com ovos de sapos, enzimas e algumas plantas quando expostos a luz.

Marccaci não deu continuidade a seus estudos e foi no inicio do século XX que a PDT começou a emergir. Em 1900 Oscar Raab, estudante do grupo do alemão Herman Von Tappeiner, estudava o efeito da acridina (um corante laranja) nos paramécios (protozoários causadores da malária) quando percebeu que após uma forte tempestade elétrica a amostra de protozoários sobreviveu por apenas uma hora e meia quando o tempo normal era de quinze horas. Raab² (1900 apud BLUM, 1941; MOAN; PENG, 2003;) relacionou o efeito tóxico da

¹ MARCCACI, A. Sur l'action des alcaloides dans le règne végétal et animal. *Archives Italiennes de Biologie*, v. 9, p. 2-4, 1888.

² RAAB, O. Ueber die wirkung fluorescierenden stoffe auf infusorien. *Zeitschrift fur biologie*, v. 39, p. 524-546, 1900.

acridina com a exposição a luz dos relâmpagos, mas foi Von Tappeiner³ (1900 apud BLUM, 1941; MOAN; PENG, 2003) quem publicou as descobertas, antes do aluno.

Em 1903 o médico dinamarquês Dr. Niels Finsen recebeu o prêmio Nobel de medicina por seus trabalhos com o uso da eosina associado a luz no tratamento do *Lupus Vulgaris* (Tuberculose cutânea) (PREMIO NOBEL, 2013). No mesmo ano o grupo de Von Tappeiner⁴ (1903 apud LUCROY, 2002.) realizou diversos experimentos e determinou como essencial a participação das moléculas de oxigênio nas reações, a partir de então, denominadas Fotodinâmicas.

No início do século XX o grupo de Von Tappeiner⁵ (1905 apud MOAN; PENG, 2003.) fez ainda diversos experimentos com inúmeros corantes no tratamento de tumores de pele, obtendo bons resultados. Entretanto não houve um acompanhamento em longo prazo dos pacientes e a PDT ficou por um tempo esquecida, provavelmente devido ao advento da terapia oncológica baseada na radiação ionizante (MOAN; PENG, 2003).

Entre os anos de 1908 e 1913 os estudos foram feitos utilizando as hematoporfirinas (Hp), descobrindo-se assim o seu efeito fototóxico em diversos organismos, como os paramécios, eritrócitos de camundongos, cobaias e até em humanos. O médico alemão Friedrich Meyer Betz apresentou uma extrema fotossensibilização durante dois meses após a auto administração de 200 mg de Hp (MOAN; PENG, 2003).

Em 1942 os alemães Auler e Banzer⁶ (1942 apud SPIKEST, 1997; LUCROY, 2002.) descreveram o acúmulo preferencial das Hp no tecido tumoral implantado em camundongos, assim como uma maior necrose destes após a sua iluminação e referiram a ocorrência da fluorescência do tumor durante a iluminação.

Na década de 1960 o doutor S. Schwartz produziu em seu laboratório os derivados da hematoporfirina (HpD) (DOUGHERTY et al., 1998). Os doutores Lipson, Baldes e Gray (1967), do mesmo grupo que Schwartz, realizaram uma série de estudos clínicos utilizando as HpD, determinando a melhor capacidade de se localizar o tecido tumoral através da fluorescência emitida pelo HpD acumulado nas células neoplásicas.

³ VON-TAPPEINER, H. Ueber die wirkung fluoreszierenden stoffe auf infusioeren nach versuchen. **Munich Medic Wochenschr**, v. 47, p. 5-28, 1900.

⁴ VON-TAPPEINER, H.; JOSIONEK, A. Zer behandlung der hautcarcinomit mit fluoreszierenden stoffen. **Munich Medic Wochenschr**, v. 47, p. 20-42, 1903.

⁵ VON-TAPPEINER, H.; JOSIONEK, A. Zur behandlung der haut carcinome mit fluoreszierenden stoffe. **Archive Klindr Medic**, v. 82, p. 223, 1905.

⁶ AULER, H.; BANZER, G. Untersuchungen iiber die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. **Zeitschrift Krebsforsch**, v. 53, p. 65-68, 1942.

Na década de 1970 o grupo do doutor T. J. Dougherty iniciou o uso da PDT baseada no HpD para o tratamento de tumores. Em 1975 realizaram estudos em vários tipos de tumores em camundongos obtendo cura de longo prazo em vários animais (DOUGHERTY et al., 1975).

Em 1976 o mesmo grupo, utilizando células de carcinoma mamário de camundongos, descobriu a imprescindível e determinante participação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) no mecanismo de ação da PDT (WEISHAUPST et al., 1976).

Dois anos mais tarde, em estudo clínico, obtiveram respostas parciais ou completas em mais de 100 tumores de pele e carcinomas malignos em diversos tecidos (DOUGHERTY et al., 1978). E em 1979 utilizaram a técnica em carcinomas de mama recorrentes constatando a sua eficiência no controle dos tumores (DOUGHERTY et al., 1979).

Dougherty e seu grupo estabeleceram a técnica de preparo do HpD e patentearam a produção em larga escala, seguindo as regras determinadas pelo FDA (Food and Drug Administration). A saga, de muitos anos, para a sonhada aprovação pelo FDA da PDT baseada no Photofrin®, é contada por Dougherty em publicação de 1996.

Em 1995 o uso do Photofrin® foi aprovado nos Estados Unidos para uso em tumores esofágicos, sendo em seguida aprovado em outros países como França, Canada, Holanda e Japão. A partir de então a PDT ficou conhecida como uma alternativa no tratamento de diversos tumores e outras moléstias. Com isso as pesquisas básicas e clínicas foram impulsionadas, levando ao desenvolvimento de novos protocolos, novos fotossensibilizantes e novas fontes de luz para a realização da PDT (SPIKEST, 1997).

2.3.2 No Brasil

No Brasil, os estudos a respeito da PDT se iniciaram em 1987 com a dissertação de mestrado e tese de doutorado da Dra. Denise Maria Zezell, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), estudando as Hp (ZEZELL, 1987, 1991). A tese de doutorado do Dr. Valdir Carlos Colussi deu continuidade aos trabalhos de Zezell, estudando os efeitos da maior concentração de oxigênio em câmara hiperbárica sobre a ação da PDT (COLUSSI, 1997).

A experiência clínica com a PDT começou em 1998, quando o grupo do professor V. S. Bagnato do Instituto de física de São Carlos, o hospital Amaral Carvalho, de Jaú, e a escola de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão preto iniciaram colaboração

internacional com o centro de PDT do hospital geral de Búfalo nos Estados Unidos. A colaboração promoveu o treinamento e conhecimento prático necessário para a implementação da PDT no Brasil, com isso também promovendo as pesquisas básicas e clínicas em outras instituições do país (BAGNATO et al., 2005).

Atualmente as pesquisas levaram ao desenvolvimento do equipamento Lince®, que com o uso do fotossensibilizante precursor da Hp, o Acido 5-aminolevulinico (ALA) é usado no diagnóstico, localização e o tratamento do câncer de pele. A técnica esta em fase de testes clínicos, com bons resultados e os dados obtidos poderão ser avaliados pelo governo federal para uma futura adoção da técnica pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

2.3.3 Na Medicina Veterinária

Na Medicina Veterinária o início do uso da PDT no tratamento do câncer foi contemporâneo aos primeiros testes clínicos em humanos. Os estudos iniciais eram justificados pela busca de modelos animais para estudar a PDT e o câncer nos seres humanos (LUCROY et al., 1996). Nos Estados Unidos, Dougherty et al. (1981) utilizaram os mesmos protocolos de humanos em tumores espontâneos de cães e gatos de diversos tipos, tais como: osteosarcoma, carcinoma, melanoma maligno, mastocitoma, fibrossarcoma e metástase de carcinoma prostático. As melhores respostas foram obtidas principalmente nos carcinomas.

Na Itália, Cheli et al. (1984, 1987) publicaram seus testes, com protocolos semelhantes aos dos americanos, utilizando o HpD. Em diferentes tumores de cães e gatos, como mastocitoma, fibrossarcoma, carcinoma de células escamosas, granuloma eosinofílico e sarcoma de células reticulares, obtiveram respostas positivas, com até treze meses sem recidiva em um carcinoma oral de cão.

Em 1989 Thoma reportou o uso do HpD em 26 tipos histológicos de tumores intersticiais de cães. Os tipos tumorais com as melhores respostas foram mastocitoma, melanoma, fibrossarcoma, osteosarcoma e sarcoma de células sinoviais. Os tumores menos responsivos ao tratamento com a PDT foram carcinoma de células escamosas orais, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma e hemangiopericitoma.

Roberts et al. (1990) descreveram pela primeira vez o uso de fotossensibilizantes de segunda geração em tumores de cães, gatos e serpentes. A Phthalocianina sulfonada de cloro-

alumínio (CASPC) foi utilizada e as respostas obtidas foram semelhantes aos tratamentos por crioterapia, hipertermia e excisão cirúrgica.

Em 1993, também utilizando as Phthalocianinas como fotossensibilizante, Peaston, Leach e Higgins trataram carcinomas de células escamosas do plano nasal e orelha de gatos. Obtiveram resposta completa com apenas uma sessão em dez dos dezenove tumores tratados e após duas sessões, em dois tumores. Observaram também a necessidade de manter os animais longe da exposição solar por duas semanas.

Seguindo a busca pelo fotossensibilizante ideal, iniciou-se o uso do 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbideo (HPPH). O HPPH possui uma menor capacidade de produzir fotossensibilização prolongada sendo testada por Magne et al. (1996) no tratamento dos carcinomas do plano nasal de felinos. O grupo obteve resposta completa em 100 % dos animais com tumores não invasivos menores de 1,5 cm de diâmetro, assim como 100% dos animais sem recidivas após um ano de acompanhamento.

Assim como é usado no homem para o tratamento principalmente de carcinomas, o ALA também tem sido usado em animais com o mesmo propósito. Em 2000 o grupo de Lucroy iniciou estudos a respeito dos efeitos colaterais, assim como efetividade no tratamento de carcinomas de células de transição da bexiga urinária de cães. Nos resultados, os efeitos colaterais foram poucos, como estranguria por dois a três dias. O intervalo médio de progressão sem recidiva foi de 6 semanas, chegando ao máximo de 34 semanas.

Os carcinomas orais em cães são bastante invasivos e o tratamento cirúrgico requer excisões de grandes fragmentos de mandíbula e maxila. McCaw et al. (2000) trataram onze cães com neoformações orais, utilizando o HPPH. Oito cães foram considerados curados com intervalos sem recidivas de até 17 meses. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados em animais tratados com a excisão cirúrgica do tumor, sendo o resultado cosmético bastante superior com a PDT.

Em 2008, em sua tese de doutorado, Emilio utilizou e comparou a aplicação tópica dos precursores da protoporfirina, o ALA e o metil aminolevulinato (MEALA) no tratamento do carcinoma espinocelular dos felinos. Dos dez tumores tratados com o MEALA, 30% apresentaram resposta completa. O MEALA mostrou-se mais efetivo que o ALA quando utilizados topicamente.

2.4 Como funciona a Terapia Fotodinâmica

Na presente seção a reação fotodinâmica da PDT é revisada, mostrando seus mecanismos primários e secundários de funcionamento na destruição do tecido tumoral.

2.4.1 O Mecanismo da reação Fotodinâmica

O termo reação fotodinâmica foi primeiramente utilizado em 1904 pelo professor alemão Herman Von Tappeiner. A escolha do sufixo “dinâmica” foi, provavelmente, para diferenciar esta reação biológica daquela que ocorre no processo das fotografias, descoberto alguns anos antes (MOAN; PENG, 2003).

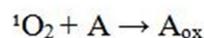
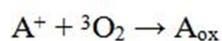
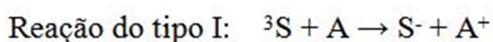
Apesar das contradições em relação ao nome da reação, o termo reação fotodinâmica foi descrito por Blum (1941) no seu livro sobre fotossensibilização, quando ficou determinado que tal nomenclatura fosse utilizada apenas para as reações de fotossensibilização dependentes da presença de oxigênio.

A PDT é baseada nas reações fotodinâmicas que promovem a oxidação das moléculas orgânicas presentes no meio, envolvendo três constituintes básicos: O fotossensibilizante, a irradiação com luz (com o comprimento de onda melhor absorvido pela substância em uso) e o oxigênio (CALIN; PARASCA, 2006).

A energia dos fótons, transmitida para as moléculas do agente fotossensibilizante (S), provoca uma transição eletrônica ao estado singlete excitada. Conforme a sua estrutura molecular e o ambiente no qual se encontra, tal molécula perderá essa energia por processos físicos ou eletrônicos ou, como se deseja na PDT, ela sofrerá uma transição ao estado tripleto excitada (3S). Neste estado, o fotossensibilizante pode ainda sofrer um decaimento eletrônico, retornando ao seu estado fundamental, não produzindo assim o efeito desejado. Para que o efeito da PDT seja observado, este estado tripleto excitado da molécula deve ser bem povoado e de uma relativa longa duração, ocorrendo assim um dos dois tipos de reação possíveis (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

Na reação do tipo I, a molécula do fotossensibilizante reage com outras moléculas presentes no ambiente (A), como peptídeos e lipídeos da membrana celular. Através de transferência eletrônica ou reações de óxido-redução, transfere sua energia para tais moléculas

(A⁺), sendo estas responsáveis pela oxidação das moléculas alvo (A_{ox}). Na reação do tipo II (a principal e mais desejada), a energia, do estado tripleto excitado do agente (³S) é transferida diretamente às moléculas de oxigênio (³O₂), produzindo o altamente reativo oxigênio singleto (¹O₂). Este reagirá com as moléculas alvo (A), oxidando-as (A_{ox}). Assim, a PDT danifica os alvos biológicos (células tumorais, bactérias, fungos, vírus, etc) principalmente através da oxidação de suas estruturas (WAINWRNGHT, 1998; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; RIBEIRO; ZECELL, 2004; CALIN; PARASCA, 2006).



De modo geral, os dois tipos de reação acontecem durante a PDT. A eficiência da reação dependerá da quantidade de fotossensibilizante acumulada no tecido tumoral e a densidade de energia da luz irradiada neste tecido (CALIN; PARASCA, 2006).

2.4.2 Os efeitos diretos da terapia fotodinâmica

Os efeitos diretos da PDT ocorrem principalmente devido a reação do tipo II, com a formação do oxigênio singleto. Este estado da molécula possui um tempo de vida bastante curto (0,01 a 0,04 μs), assim como uma limitada distância de difusão no meio biológico (0,01 a 0,02 μm) devido sua alta reatividade. A morte celular por necrose se dá pela destruição que ocorre nas células tumorais em termos subcelulares, ou seja, nas proximidades de onde se encontra a substância fotossensibilizante na célula (MOAN; BERG, 1991).

A localização subcelular do fotossensibilizante dependerá se este é lipofílico ou hidrofílico. As substâncias lipofílicas tendem a se acumular na membrana celular e nas

organelas (mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana nuclear), já as hidrofílicas tem um acúmulo preferencial nos lisossomos (CALIN; PARASCA, 2006).

Quando a foto-oxidação ocorre nas proteínas e lipídios da membrana celular a ativação das fosfolipases presentes leva a mudanças na permeabilidade, redução da fluidez do mosaico fluido e a inativação dos sistemas enzimáticos e receptores (GIROTTI, 1990).

Segundo Malik et al. (1993), a inativação dos sistemas de transporte na membrana citoplasmática (como a bomba de Na/K) e a consequente despolarização causada são fatores iniciais para o desenvolvimento de danos celulares. A inativação das enzimas mitocôndrias ocorre após as alterações em membrana citoplasmática, mas é considerado um fator chave para a indução de morte celular decorrente da PDT (GIBSON et al., 1989).

O estresse oxidativo produzido durante a PDT pode levar ainda a danos ao Ácido Desoxirribonucleico (ADN), com quebra nas suas cadeias, mudanças entre cromátides irmãs e produção de aberrações cromossômicas (MOAN; WAKSVIK; CHRISTENSEN, 1980; EVENSEN; MOAN, 1982; GOMER; RUCKER; MURPHREE, 1988; PENNING et al., 1994).

2.4.3 Os efeitos secundários da Terapia Fotodinâmica

A maior parte das células tumorais é destruída pelos efeitos diretos da PDT. As células neoplásicas que não sofreram morte celular por necrose sofrerão os efeitos secundários. Tais efeitos são as alterações vasculares no local da aplicação da PDT, a iniciação da apoptose das células neoplásicas e a intensa inflamação promovida no local (CALIN; PARASCA, 2006).

Os efeitos vasculares são observados *in vivo* facilmente e ocorrem na microvasculatura levando principalmente a ocorrência de estase sanguínea na massa tumoral. Quando a formação tumoral se localiza na pele, edema e eritema são os primeiros sinais visualizados momentos após a irradiação (HENDERSON; FINGAR, 1987). Em modelos experimentais foi demonstrada a ocorrência de agregação da microvasculatura seguida por uma vasoconstrição transitória, ocorrendo então vasodilatação, estase sanguínea e hemorragia local (FINGAR et al., 1992).

A apoptose das células neoplásicas remanescentes ocupa um papel bastante importante nos mecanismos secundários da PDT. Na apoptose a morte celular ocorre sem que haja

envolvimento da resposta inflamatória, formando os corpúsculos apoptóticos, que são silenciosamente removidos pelos macrófagos locais (DOUGHERTY et al., 1998).

Oleinick et al. (1991) observaram a ocorrência de características indicativas da indução de apoptose rapidamente após a aplicação da PDT em culturas celulares de linfoma de camundongos. Essa rápida aparição indicaria a ocorrência da apoptose sem os passos iniciais da sinalização da morte celular programada, como quando induzida por outros agentes quimioterápicos e a radioterapia.

Em 1996 Webber et al. demonstraram a ocorrência de células apoptóticas e a fragmentação do ADN (decorrente do processo de apoptose), após a PDT, em tumores inoculados no subcutâneo de camundongos. A linhagem de células tumorais utilizada apresentava resistência a indução de apoptose quando tratada pelos agentes quimioterápicos mais comuns.

A PDT promove uma intensa reação inflamatória no tecido tratado, com ativação dos mecanismos do sistema imune inato. Os efeitos fototóxicos na membrana celular levam a liberação de metabólitos que são potentes mediadores da resposta inflamatória (CALIN; PARASCA, 2006). A inflamação é primordial na indução da resposta imunológica adaptativa antitumoral, comentada melhor mais adiante.

2.5 A Terapia Fotodinâmica e o Sistema Imunológico

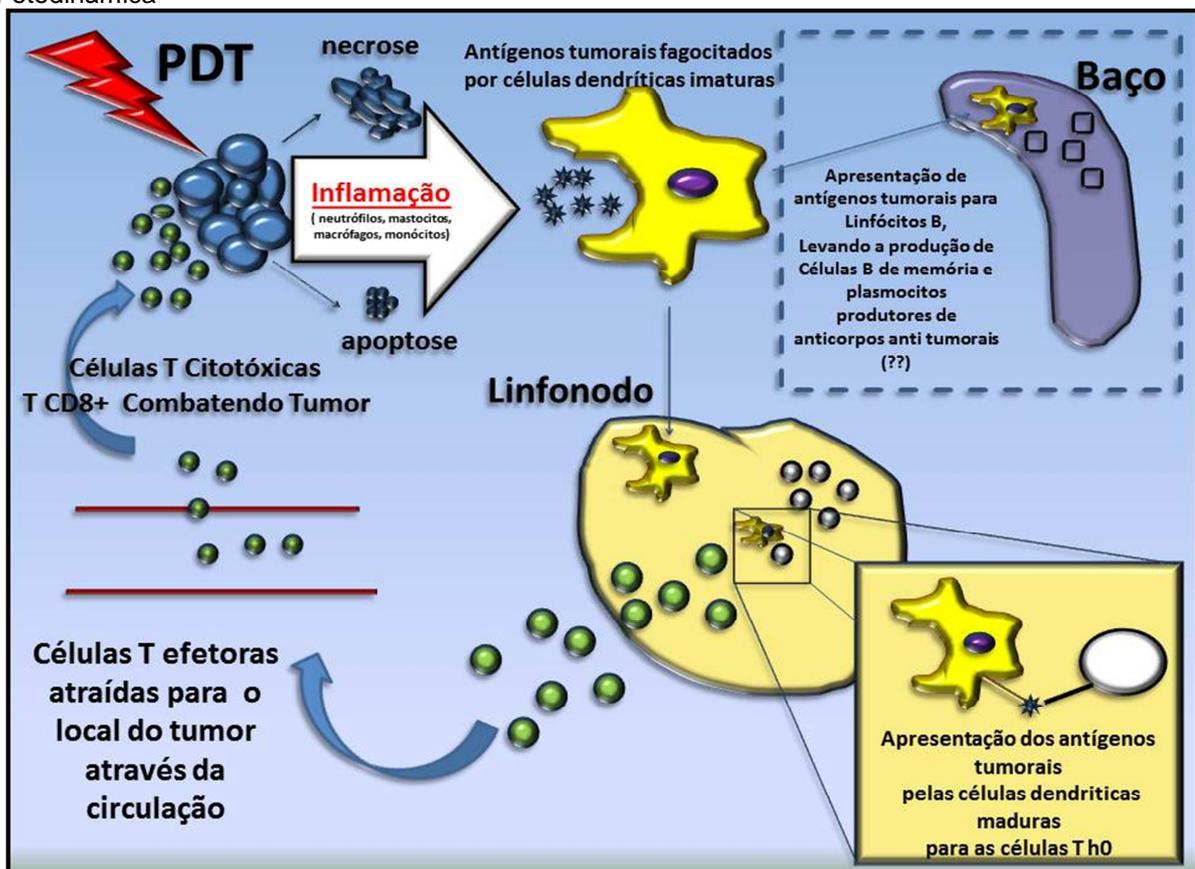
Na década de noventa o grupo de Dougherty começou a investigar os efeitos da PDT sobre o sistema imunológico ao observar indícios da produção de resposta imune adaptativa antitumoral. Korbelik et al. (1996) realizaram estudo utilizando sarcomas mamários em camundongos. Em animais imunocompetentes (BALB/c) o tratamento com a PDT curou todas as lesões. O mesmo protocolo quando realizado em animais com o sistema imunológico deficiente (SCID e *nude*) obteve ablação total dos tumores, mas não produziu a cura em longo prazo. Quando linfócitos esplênicos (uma mistura de linfócitos T CD4+, CD8+, B, NK e monócitos) ou o transplante de medula óssea era realizado nos animais BALB/c para os animais SCID (Severe Combined Immunodeficiency) previamente ao tratamento, as taxas de cura em longo prazo eram restabelecidas. Estes resultados demonstraram a participação do sistema imunológico e mais precisamente das células linfóides nos efeitos secundários da PDT.

Como revisado no tópic “2.1.2 A Imunomodulação do Câncer”, a doença progride quando as células neoplásicas conseguem escapar os mecanismos de controle do organismo. A Característica singular da PDT é a sua capacidade de ativar o sistema imunológico, inato e adaptativo, através da inflamação aguda decorrente da destruição das células tumorais, produzindo resposta específica em curto e longo prazo (Figura 7).

A PDT determina o recrutamento de células inflamatórias para o local do tratamento em um processo que é vital para remodelar o microambiente tumoral quanto a sua característica imunossupresiva. Vários mecanismos independentes são responsáveis pela invasão do local por diferentes células do sistema imunológico inato (GARG et al., 2010).

Já durante a iluminação do tumor ocorre a estase sanguínea que leva a agregação plaquetaria, formação de trombo e a ativação do sistema complemento (FINGAR et al., 2000; KRAMMER, 2001). A ativação da cascata de reações do sistema complemento leva a formação dos complexos de ataque da membrana (MAC) que diretamente danificarão as células neoplásicas e as células endoteliais no ambiente tumoral (CECIC et al., 2005).

Figura 7 - Ilustração representando o mecanismo da imunidade tumoral produzida com a Terapia Fotodinâmica



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Os produtos da degradação do sistema complemento, principalmente C5a e C3a, são extremamente quimiotáticos para os neutrófilos, levando a uma intensa invasão dos mesmos no ambiente tumoral (KORBELIK; CECIC, 2008). Também pela morte das células tumorais e endoteliais há a liberação de metabólitos do ácido araquidônico, envolvidos com a atração de neutrófilos para o local do tratamento (HENDERSON; DONOVAN, 1989).

Em termos de expressão genética, o estresse oxidativo induzido pela PDT inicia uma vasta gama de vias de transdução de sinais que ativam fatores de transcrição e induzem a expressão de genes ligados as citosinas, moléculas de adesão e uma miríade de mediadores inflamatórios (MATROULE et al., 1999; GRANVILLE et al., 2000).

A população celular no ambiente tumoral de carcinomas em camundongos foi examinada em vários intervalos de tempo após a PDT. As técnicas utilizadas foram marcação celular com anticorpos monoclonais, coloração de Wright e citometria de fluxo. A grande invasão por neutrófilos foi observada já nos cinco primeiros minutos de irradiação da luz, seguida imediatamente pela invasão de mastócitos. Outras células mieloides invadiram o estroma tumoral em até duas horas. Os macrófagos isolados do tumor foram avaliados *in vitro*, e demonstraram uma maior atividade contra as células tumorais, sendo mais acentuada duas horas após o tratamento. Este trabalho de Krosli, Korbelik e Dougherty (1995) mostrou que a invasão por células mieloides está associada com a ativação funcional de células imunológicas da imunidade adaptativa.

Kousis et al. (2007) comparou dois protocolos de PDT que induziam menos ou mais inflamação aguda conforme a dose de energia utilizada. Utilizando marcadores celulares específicos de neutrófilos observaram a presença dominante destas células no ambiente tumoral logo após o tratamento, sendo esta mais acentuada para o protocolo com melhor capacidade inflamatória. Observou-se também que os animais com o maior grau de inflamação quando desafiados novamente com células tumorais apresentavam uma menor progressão tumoral, mostrando a relação da inflamação aguda com a indução de uma resposta imune específica, e de longo prazo, contra o tumor tratado.

Neste mesmo trabalho de Kousis et al. (2007), a grande infiltração local de neutrófilos associada a um melhor controle em longo prazo foi relacionada com a participação dos Linfócitos T CD8+. Tais células foram isoladas, por citometria de fluxo, do linfonodo dos animais dois dias após o tratamento. A contagem de linfócitos T CD8+ foi significativamente maior nos animais tratados com a PDT, quando comparados aos animais tratados com excisão cirúrgica ou o protocolo com pouca inflamação.

O papel dos neutrófilos na indução da resposta imune adaptativa frente a patógenos é bem caracterizado. Os sinais quimiotáticos liberados recrutam monócitos e células dendríticas imaturas. Há a maturação das células dendríticas através do contato celular e a secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além da estimulação dos monócitos e a diferenciação dos linfócitos T pela liberação de IFN- γ (NATHAN, 2006).

O mecanismo detalhado de indução da resposta imunológica adaptativa a tumores iniciado pelos neutrófilos não é ainda bem elucidado como na resposta a patógenos, mas Kousis et al. (2007) utilizaram animais geneticamente modificados com maior produção de citosinas e a conseqüente maior invasão tumoral pelos neutrófilos. A infiltração subsequente a PDT por células T é maior e há regressão tumoral nestes animais. Ademais, quando realizaram a depleção dos neutrófilos houve a redução da infiltração de linfócitos T CD8+ e eliminação da regressão tumoral.

Um dos mais importantes fatores liberados durante a PDT devido a necrose das células tumorais é a proteína de choque extracelular 70 (Extracellular heat-shock protein 70 – HSP70). Esta proteína promove, nas células neoplásicas remanescentes, a formação de complexos citoplasmáticos estáveis contendo antígenos tumorais. Estes antígenos são expressos na membrana ou liberados intactos das células necróticas, interagindo com as APC. Esta interação ativa e matura as células dendríticas, possibilitando a apresentação cruzada de antígenos tumorais e uma resposta imune antitumoral adaptativa (KORBELIK; SUN; CECIC, 2005).

A capacidade da PDT induzir uma resposta imunológica adaptativa específica para com os antígenos tumorais foi demonstrada em diversos modelos experimentais. A produção de uma imunidade tumoral em longo prazo foi muitas vezes alcançada. A produção de memória imunológica através da apresentação destes antígenos a Linfócitos B, e a sua posterior maturação em plasmócitos produtores de anticorpos antitumorais, pode ser sugerida, entretanto a sua demonstração em um modelo experimental é difícil e não foi ainda realizada (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

2.6 O Modelo Experimental

Nesta seção, o Tumor de Ehrlich e o protocolo de PDT utilizado no presente trabalho são revisados quanto as suas principais características.

2.6.1 O Tumor de Ehrlich

O avanço nos estudos do câncer e a compreensão de diversos mecanismos relacionados à sua etiologia, progressão, diagnóstico e tratamento, se deve principalmente a oncologia experimental. Este ramo da oncologia surgiu com a introdução dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Estes são mantidos em laboratório através da inoculação seriada em animais suscetíveis ou mantidos em cultura celular.

Em 1896, Paul Ehrlich⁷ (1906 apud GUERRA, 1983.) isolou células de um adenocarcinoma mamário pouco diferenciado de camundongas fêmeas e inoculou no subcutâneo de animais da mesma espécie. As células foram capazes de proliferar produzindo um tumor sólido, denominado Tumor de Ehrlich (TE).

O TE foi convertido para a sua forma ascítica por Loewenthal e Jahn⁸ (1932 apud GUERRA, 1983.) que inocularam as células na cavidade peritoneal dos animais, sendo estas capazes de crescer em suspensão em um fluido ascítico. Esta suspensão contendo células neoplásicas pôde então ser inoculada, produzindo um tumor ascítico quando na cavidade abdominal, ou sólido se no subcutâneo dos animais.

O TE se desenvolve em diversas linhagens de camundongos sendo isso possível pela perda do complexo de histocompatibilidade maior da classe II (MHC-II) das células tumorais, como descrito por Chen e Watkins (1970).

A vantagem do uso do TE como modelo experimental é a possibilidade da contagem das células do fluido, para se padronizar o número exato a ser inoculado no animal suscetível. Após 7 dias da inoculação peritoneal há presença de fluido ascítico viscoso de aspecto leitoso, contendo células pleomórficas, com diâmetro de 2 a 3 vezes superior as hemácias, com núcleos de formas e tamanhos variáveis e nucléolos únicos ou múltiplos (GUERRA, 1983; DAGLI, 1989).

A forma sólida do tumor, com 7 dias de inoculação no subcutâneo, apresenta-se palpável com a consistência firme. Ao exame histopatológico é caracterizado por parênquima indiferenciado e estroma delicado. As células neoplásicas são arredondadas e apresentam citoplasma escasso, núcleo central redondo ou ovoide, com nucléolos conspícuos e

⁷ EHRLICH, P.; APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. *Berliner Klinischer Ocheschrift*. v. 28, p. 871-874, 1906.

⁸ LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Ubertragungsversuch mit carcinomatoser mause ascitesflussigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische. *Einwirkungen. Zeitschrift Krebsforsch.* v. 37, p. 439-447, 1932

pleomorfismo celular evidente, apresentando frequentemente figuras de mitose aberrante (GUERRA, 1983).

Os estudos a respeito da interação do TE com o sistema imunológico iniciaram-se com Lala (1974) que demonstrou a inflamação presente na evolução da forma ascítica do TE acompanhada pelo influxo de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos do sangue para a cavidade peritoneal, além de uma maior renovação sanguínea destas células. Observou também uma maior migração ou retenção de monócitos jovens e macrófagos no ambiente tumoral indicando o papel funcional destes na evolução tumoral.

A diminuição da atividade das células NK em animais portadores do TE foi descrita por Pahar e Lala (1985). A população das NK é mantida, porém a sua atividade é reduzida por meio da interação com células supressoras no baço, que impedem o amadurecimento das NK.

Guerra (1989) estudando o processo inflamatório de animais portadores do TE relatou uma diminuição do influxo celular para um foco inflamatório induzido por implante de nitrocelulose no local de inoculação do TE. Analisando ainda o local do tumor sólido, observou um aumento do potencial fagocitário e capacidade de espraiamento dos macrófagos. Guerra ainda demonstrou a característica imunogênica do TE, onde animais com 12 dias de evolução tumoral não apresentavam crescimento de um segundo implante de células tumorais.

Subiza et al. (1987) utilizaram células de TE atenuadas com mitomicina e obtiveram a imunização de várias linhagens de camundongos, que não apresentavam crescimento tumoral por até 6 meses quando inoculados com células de TE viáveis. Esta proteção foi alcançada em animais que apresentavam uma maior contagem de imunoglobulina M (IgM) contra antígenos tumorais.

A população celular do baço de animais portadores do TE foi estudada por Segura, Barbero e Marquez (2000). Uma diminuição rápida e aguda de células T CD4⁺ e CD8⁺, juntamente com um aumento transitório das células B e macrófagos foi observada através de citometria de fluxo. A incubação das células esplênicas com enterotoxina B demonstrou uma menor responsividade das células T CD8⁺ e diminuição da expressão de INF- γ , mostrando a capacidade de fuga do sistema imune pelo TE. Ademais o aumento transitório das células B explica a produção das IgM contra antígenos do TE observado anteriormente por Subiza et al.

A progressão do TE é acompanhada por importantes alterações no sistema imunológico havendo uma menor atividade das células T citotóxicas e NK, mediada principalmente pelos macrófagos e células supressoras. Há uma ativação das células B com produção de anticorpos contra antígenos tumorais, entretanto, a proliferação das células

tumorais supera os mecanismos de controle do organismo, resultando na morte do animal (VALADARES et al., 2003).

O uso do TE como modelo experimental é bem estabelecido para diversos tipos de estudo. O TE é simples de ser mantido e manipulado, sendo os mecanismos de progressão e interação com o organismo animal bem caracterizado. No presente estudo, a característica de diminuição da atividade das células T citotóxicas é de grande valia, pois é exatamente onde os estudos mostram que a PDT pode atuar.

2.6.2 O Azul de Metileno

O Azul de Metileno (AM) é um corante histológico bastante conhecido e usado há muitos anos, pertencendo à classe dos compostos fenotiazínicos. A banda de absorção do AM está na luz vermelha visível, entre o comprimento de onda de 550 a 700 nm, sendo 664 nm o comprimento com melhor absorção. A localização intracelular do AM foi demonstrada em lisossomos, com a liberação de suas enzimas após a irradiação da luz, e nas mitocôndrias, com efeitos na cadeia respiratória celular (BAPTISTA et al., 2005).

A interação do AM com a luz, produzindo o efeito fototóxico em células tumorais foi primeiramente observado pelos alemães Berg e Jungstand⁹ (1966 apud KONIG, 1987.), que utilizaram lâmpadas de xenônio e aplicação intratumoral do AM em animais portadores do TE.

Konig et al. (1987) realizaram protocolo semelhante ao de Berg e Junstand, porém a fonte de luz utilizada foi um Laser de criptônio emitindo luz visível vermelha nos comprimentos de onda entre 647 nm e 676 nm. Os animais portadores do TE na sua forma sólida foram tratados com administração de solução de AM a 1% intra tumoral e irradiados com uma potencia de 100mW durante 10minutos (Densidade de energia não mencionada). Houve redução da progressão tumoral em ate 90% e a análise histológica determinou a presença de necrose e destruição celular.

Em humanos a PDT com o AM como fotossensibilizante foi descrita no tratamento de diversos tipos de tumores. Willians et al. (1989) trataram carcinomas superficiais na bexiga,

⁹ BERG, H.; JUNGSTAND, W. Photodynamische Wirkung auf das solide Ehrlich-Karzinom. *Naturwissenschaften*. v. 18, p. 481-482, 1966.

não observando efeitos colaterais indesejados. Orth et al. (1995) utilizaram o AM no tratamento de carcinomas esofágicos recorrentes, obtendo respostas variáveis. Em 2004, Tardivo et al. utilizaram a PDT com o AM em melanomas não elegíveis para cirurgia e em 2006 tratando sarcomas de Kaposi, em ambos os casos obtendo bons resultados.

Em estudo mais recente, Baran et al. (2010) comparou as respostas de tumores EMT6 em camundongos sob diferentes regimes de PDT com o AM. O protocolo com os melhores resultados utilizou solução de AM a 0,5% intratumoral imediatamente antes da irradiação com laser de diodo de potência 60mW, somando uma dose de energia de 480 J/cm². A taxa de cura foi de 55% com 90 dias sem crescimento do tumor.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com terapia fotodinâmica sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em sua forma sólida e a resposta imunológica induzida em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito direto do tratamento com a terapia fotodinâmica sobre o tumor de Ehrlich na forma sólida utilizando o Azul de Metileno a 1% como fotossensibilizante associado a um laser de diodo com meio ativo de InGaAIP emitindo o comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW.

Estudar a evolução de um segundo implante do tumor de Ehrlich sólido em camundongos tratados com a terapia fotodinâmica, excisão cirúrgica ou sem tratamento de um tumor de Ehrlich primário após a evolução do tumor secundário.

Estudar os componentes da massa tumoral de um segundo implante do tumor de Ehrlich sólido em camundongos tratados com a terapia fotodinâmica, excisão cirúrgica ou sem tratamento de um tumor de Ehrlich primário após a evolução de um tumor secundário.

Estudar os efeitos em órgãos linfoides (baço e linfonodo poplíteo) e na contagem total de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com a terapia fotodinâmica, excisão cirúrgica ou sem tratamento de um tumor de Ehrlich primário após a evolução de um tumor secundário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo experimental e procedimentos em geral

4.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, não isogênicos, machos, pesando de 25 a 35 g, oriundos do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Durante o período de experimentação, os animais permaneceram em caixas de policarbonato forradas com maravalha, mantidos em sala com aeração, exaustão e climatização controladas, com temperatura entre 22 e 24°C, umidade relativa de 55% e ciclo de luz noite/dia de 12 horas, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. A utilização dos animais esteve de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da comissão de ética no uso de animais da FMVZ-USP, protocolo número 2235/2011.

4.1.2 Tumor Experimental

Utilizou-se a forma sólida do Tumor de *Ehrlich*. Originalmente, trata-se de um adenocarcinoma mamário, de fêmeas de camundongo, que cresce em várias linhagens desta espécie – na forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculado no subcutâneo.

4.1.3 Manutenção do Tumor de Ehrlich

O tumor de *Ehrlich* é mantido na forma ascítica, em camundongos *Swiss*. Para tanto, cerca de 0,3 mL de fluido ascítico, contendo aproximadamente 10^7 células tumorais, são

colhidos de animais portadores de tumor ascítico e imediatamente inoculados intraperitonealmente em camundongos receptores, sem tumores. Este procedimento é repetido a cada 10 dias.

4.1.4 Preparo das Células Tumorais para Inoculação

O preparo das células tumorais inclui lavagem, contagem, teste de viabilidade e padronização das mesmas (DAGLI, 1989).

A coleta foi feita com o auxílio de agulhas e seringas estéreis descartáveis, colhendo-se cerca de 3,0 mL de fluido ascítico de um camundongo com Tumor de *Ehrlich*, inoculado há 10 dias na cavidade peritoneal (Figura 8). Este fluido foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto, durante 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em solução salina tamponada e novamente centrifugadas; este procedimento foi repetido três vezes.

Figura 8 - Animal portador do tumor de Ehrlich na forma ascítica



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Para a contagem, a suspensão de células foi diluída a 1:200, em pipeta de contagem de glóbulos vermelhos, tendo como diluidor o Azul de Tripán a 0,1 %, diluído na proporção de 1:4 em solução salina tamponada. No Hemocitômetro de Neubauer contaram-se as células contidas nos quatro quadrantes externos, ou quadrados “brancos” (Figura 9). A fórmula final para a determinação do número de células da suspensão foi assim deduzida (CAMPBELL; CAMPBELL, 1986):

$$\frac{\text{n}^\circ. \text{ céls. da}}{\text{suspensão}} = \frac{\text{n}^\circ. \text{ céls.}}{\text{contadas}} \times \text{fator final}$$

sendo que:

$$\text{fator final} = \frac{\text{fator de profundidade} \times \text{fator de diluição}}{\text{área contada}}$$

onde:

$$\text{fator de profundidade} = 10$$

$$\text{fator de diluição} = 200$$

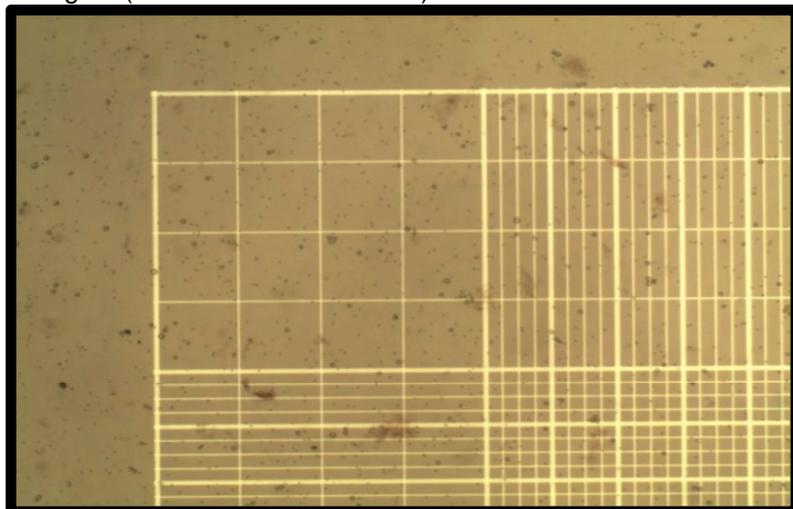
$$\text{área contada} = 4\text{mm}^2$$

$$\text{mm}^3 \text{ para mL} = \times 10^3$$

$$\text{fator final} = 5 \times 10^5$$

As células que adquiriram coloração azul, pelo Azul de Tripán, foram contadas e consideradas como inviáveis. O número de células presentes na suspensão foi ajustado para 5×10^7 por mL de solução, sendo somente utilizadas as suspensões com viabilidade celular superior a 90%.

Figura 9 - Hemocitômetro de Neubauer contendo suspensão das células tumorais diluídas em azul de tripan 0,1% para contagem (aumento de 10x em MO)



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

4.1.5 Inoculação dos Animais com o Tumor de Ehrlich

Os animais foram contidos fisicamente, e com o auxílio de seringas e agulhas estéreis descartáveis, receberam 0,05 mL de suspensão, contendo $2,5 \times 10^6$ células tumorais, no subcutâneo da região do dorso (tumor primário) ou coxim plantar esquerdo (tumor secundário) e cauda (experimento 1).

4.1.6 Tratamento dos animais portadores do tumor de Ehrlich sólido

4.1.6.1 Terapia fotodinâmica no tumor de Ehrlich sólido em camundongos

Para o tratamento com a PDT, os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina, na dose de 100 mg/kg, associada a xilazina, na dose de 20 mg/kg. A região circundante ao local do crescimento do TE foi tricotomizada e a antisepsia do local realizada com álcool iodado. Com o auxílio de agulhas e seringas descartáveis, 0,05 mL de uma solução a 1,0 % de Azul de Metileno (Synth®) diluído em solução estéril de NaCl a 0,9%, foi administrado pela via intratumoral. Após 10 minutos, o tumor foi irradiado durante 9 minutos, com uma dose de 54 J. Para tanto, foi utilizado equipamento de Laser com meio ativo de InGaAIP emitindo luz vermelha visível, no comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW (Figura 10). Durante a irradiação todos os presentes utilizavam óculos de proteção conforme as normas de segurança para a utilização de equipamentos laser.

Figura 10 - Equipamento de Laser (Photon vet®) com meio ativo de InGaAlP emitindo luz vermelha visível, no comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

4.1.6.2 Excisão cirúrgica do tumor de Ehrlich sólido em camundongos.

Para o tratamento cirúrgico do TE no dorso dos animais, estes foram anestesiados com administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina, na dose de 100 mg/kg, associada a xilazina, na dose de 20 mg/kg. O campo cirúrgico foi tricotomizado e a antissepsia do local realizada com álcool iodado. O tumor foi retirado *en bloco*, com margens de aproximadamente 2 mm, e a sutura da pele realizada com fio de nylon (4-0) em pontos simples separados.

4.1.7 Eutanásia e coleta de material biológico

Ao final dos experimentos os animais foram eutanasiados, seguindo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP, utilizando-se câmara de CO₂. Os tumores com 5 dias de crescimento após inoculação na cauda (experimento 1) foram excisados e acondicionados em formol 10%. No experimento 2, metade dos animais (5 de cada grupo) foi eutanasiado em câmara de CO₂ e outra metade foi anestesiada com a

administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina, na dose de 100 mg/kg, associada a xilazina, na dose de 20 mg/kg e a posterior coleta de todo o volume sanguíneo via punção intracardiaca, sendo este acondicionado em tubo com EDTA. Após a eutanásia dos animais foi realizada a coleta do coxim plantar esquerdo contendo a massa tumoral, sendo acondicionado em formol 10%. A região plantar do membro foi excisada o mais rente possível ao tecido ósseo e a massa tumoral foi seccionada ao meio no intuito de se visualizar a região mais central na lâmina histológica.

Os órgãos linfóides como o baço e o linfonodo poplíteo esquerdo (*ipsi* lateral ao tumor secundário) também foram coletados, pesados e acondicionados em formol 10%.

4.1.8 Histopatológico

O material coletado para a análise histopatológica foi processado conforme descrito a seguir.

4.1.8.1 Fixação

O material coletado foi fixado em solução de formaldeído 10% durante 5 dias e acondicionados em álcool 70°.

4.1.8.2 Inclusão em parafina

Os fragmentos tumorais ou órgãos linfóides foram rotineiramente processados para inclusão em parafina. Para tanto, este foi submetido a 3 passagens de 2 horas em álcool 96°, três passagens de 1 hora em álcool absoluto, 3 passagens de 30 minutos em xilol, e um banho de 12 horas em parafina a 60°C em estufa.

Os fragmentos foram então incluídos em blocos de parafina, e após o seu resfriamento foram acondicionados em geladeira durante 10 minutos para a retirada das formas.

4.1.8.3 Corte dos blocos de parafina

Os blocos de parafina contendo o material coletado foram aparados com cortes realizados em micrótomo e posteriormente colocados em água e mantidos em refrigerador a 8° C para a hidratação das peças.

Os cortes de 5 micrometros (μm) de espessura foram feitos em micrótomo manual (Leica® RM2235) e, com o auxílio de uma pinça, as fitas foram colocadas em banho Maria a 45°C. Os cortes foram, então, separados delicadamente e mantidos na água até esticarem. Os cortes foram “pescados” com as próprias lâminas, perfeitamente limpas e desengorduradas. As lâminas foram colocadas em estufa a 60°C durante 120 minutos para a adesão dos cortes.

4.1.8.4 Desparafinização, hidratação e coloração HE

Os seguintes passos foram realizados:

XILOL I.....	10min
XILOL II.....	10min
XILOL/ALCOOL.....	10min
ALCOOL ABSOLUTO.....	5min
ALCOOL 95°.....	5min
ALCOOL 70°.....	5min
ÁGUA DESTILADA.....	5min
HEMATOXILINA.....	4min
ÁGUA CORRENTE.....	5min
ÁGUA AMONICAL 3%.....	Passagem rápida
ÁGUA.....	Passagem rápida
EOSINA.....	1min
ALCOOL 70°.....	5min
ALCOOL 95°.....	5min
ALCOOL ABSOLUTO.....	5min
Montagem lâmina com lamínula e resina.	
Observação em microscópio de luz.	

4.2 Experimentos

4.2.1 Experimento 1

O primeiro experimento foi realizado para se determinar a eficiência do protocolo de PDT selecionado. Para tanto dez animais com o TE inoculado na cauda foram utilizados. Um grupo de cinco animais foi tratado com a PDT enquanto o grupo controle não recebeu tratamento algum. A evolução tumoral após a PDT foi acompanhada durante 5 dias. Ao final os animais foram eutanasiados e os tumores coletados para análise histopatológica.

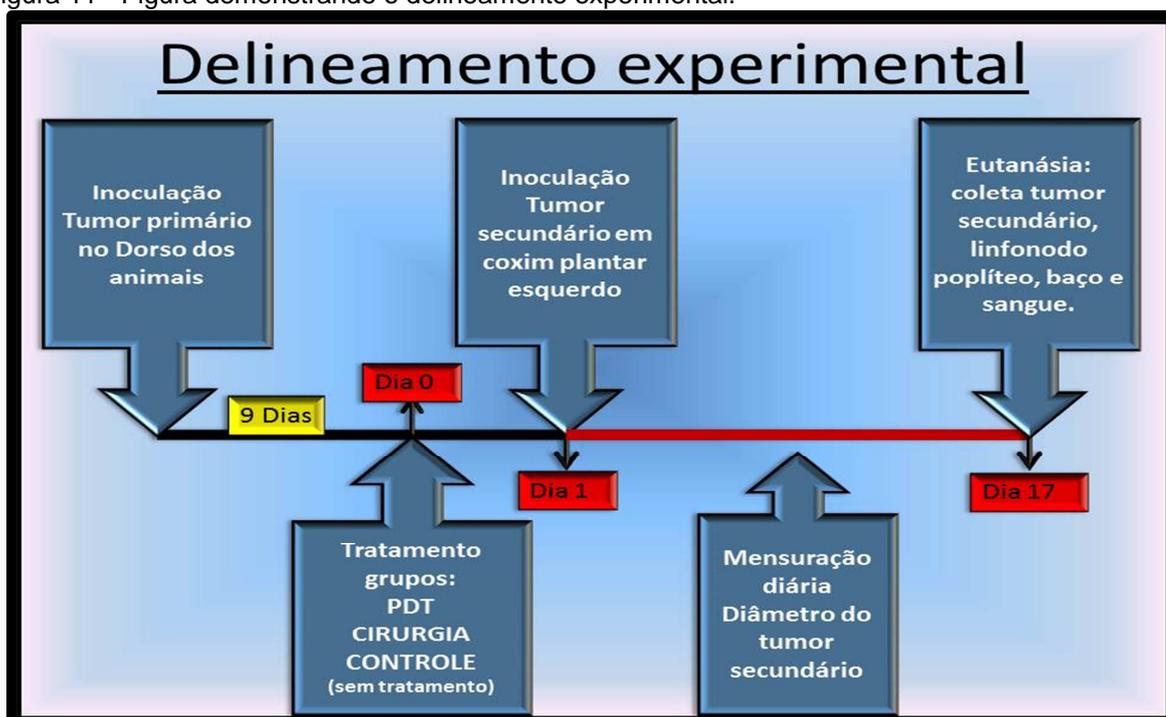
Através da análise macro e microscópica dos tumores foi determinada a capacidade do protocolo de PDT utilizado em produzir os efeitos primários comumente observados e relatados em literatura, como: efeitos vasculares, induzir inflamação, necrose tecidual e retardo na progressão tumoral, quando comparada aos tumores não tratados.

4.2.2 Experimento 2

4.2.2.1 Delineamento experimental

Trinta animais foram inoculados com as células do tumor de Ehrlich no subcutâneo da região do dorso. Após nove dias (Dia zero), quando o tumor apresentava-se palpável, dez animais (grupo PDT) foram tratados com a PDT, dez animais (grupo cirurgia) foram tratados com a excisão cirúrgica do tumor e dez animais (grupo controle) não receberam nenhum tratamento. Após 24h (Dia 1) os animais receberam uma nova inoculação de células tumorais no subcutâneo do coxim plantar esquerdo (tumor secundário), e o diâmetro dorso-plantar do coxim foi mensurado durante 17 dias. Ao final os animais foram eutanasiados e o tumor secundário foi analisado por métodos morfométricos e os órgãos linfoides e sangue estudados para avaliação da resposta imunológica produzida (Figura 11).

Figura 11 - Figura demonstrando o delineamento experimental.

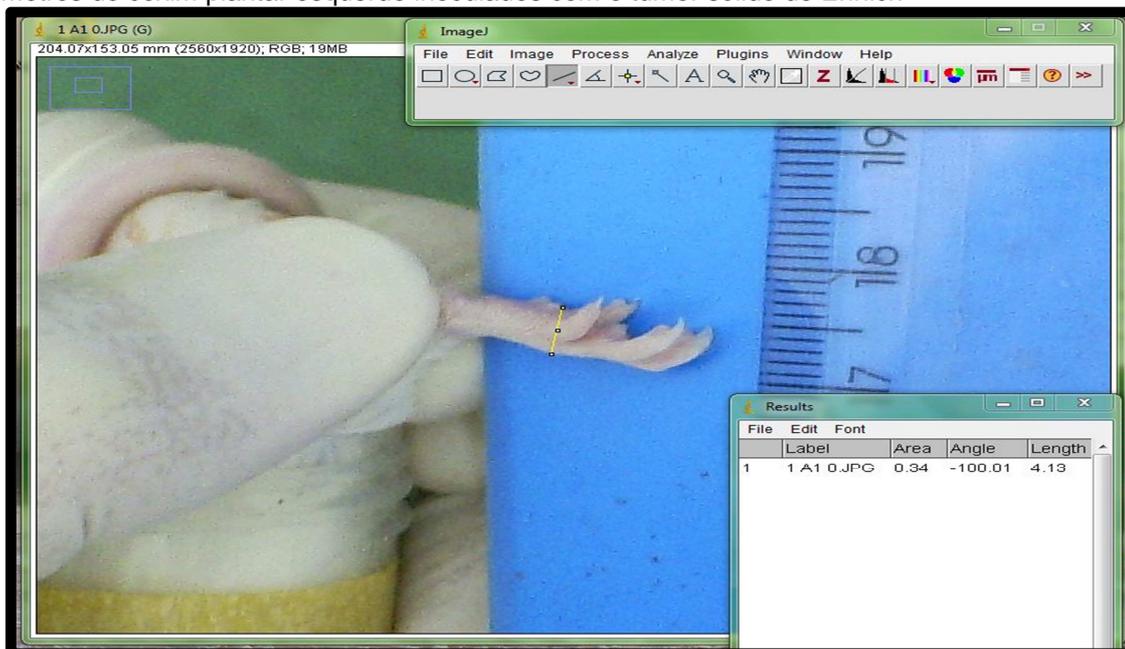


(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

4.2.2.2 Mensuração diâmetro dorso-plantar do coxim esquerdo durante crescimento do tumor de Ehrlich sólido

Após o tratamento os animais receberam a inoculação do segundo implante de células tumorais no coxim plantar esquerdo, e o seu diâmetro dorso-plantar foi mensurado durante 17 dias. Com o auxílio de um suporte fixo para a câmera o coxim plantar dos animais foi fotografado diariamente em visão latero-medial. Utilizando-se o programa de uso livre ImageJ foi possível determinar o diâmetro em numero de pixels na imagem e, por meio de uma regra de três, obter o diâmetro dorso-plantar do coxim em milímetros (Figura 12).

Figura 12 - Imagem mostrando a tela do programa ImageJ, usado para a tomada das medidas dos diâmetros do coxim plantar esquerdo inoculados com o tumor sólido de Ehrlich



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

4.2.2.3 Morfometria

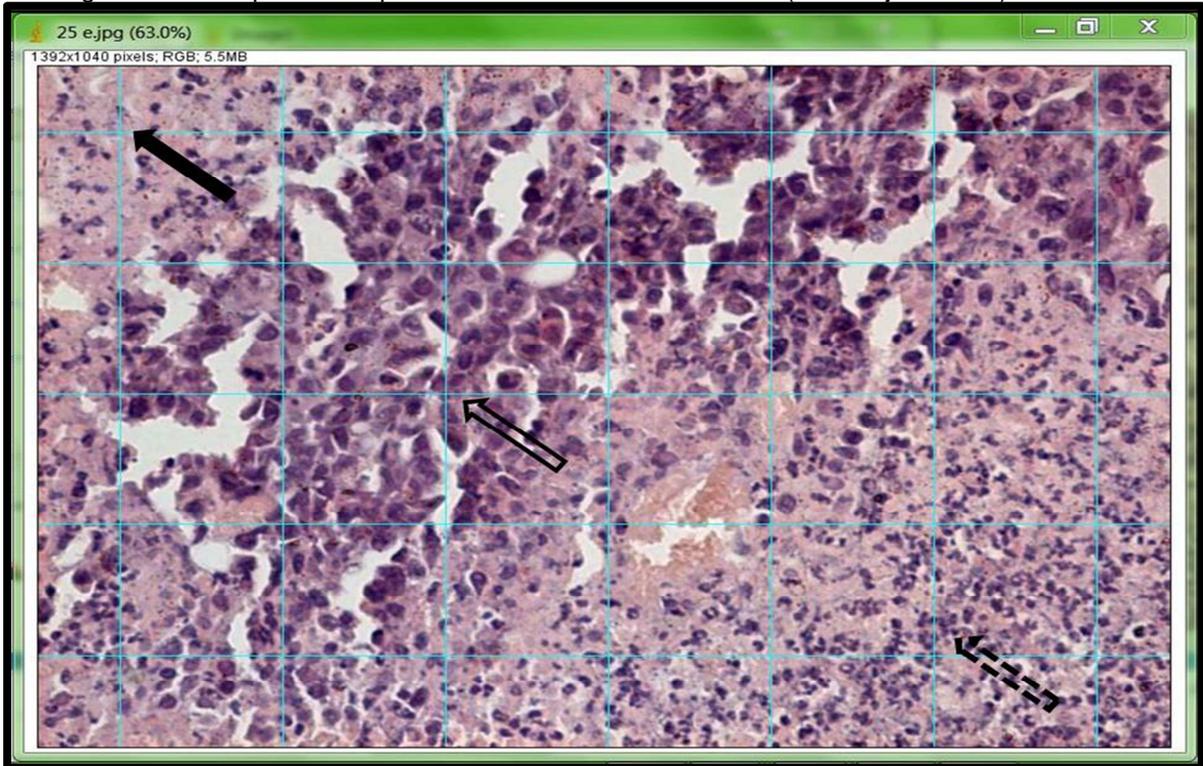
Os cortes histológicos do tumor secundário (coxim plantar esquerdo inoculado ha 17 dias com o TE), corados em H&E, foram observados em microscópio de luz e a sua análise foi feita por meio de métodos morfométricos (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966), comparando-se os grupos experimentais.

4.2.2.3.1 Determinação da fração volumétrica dos componentes da massa tumoral

Os cortes histológicos dos coxins plantares esquerdos contendo a massa tumoral foram observados em microscópio de luz Nikon® eclipse E800, acoplado com câmera fotográfica Nikon® DXM 1200c. Sob o aumento da objetiva de 20x, 8 campos (sendo quatro da periferia e quatro da região central da massa tumoral) foram fotografados e as imagens foram digitalizadas pelo programa IMAGE PRO PLUS®. Com o uso do programa ImageJ uma grade com 35 pontos foi sobreposta a cada imagem (Figura 13). Cada ponto foi determinado

como sendo: Célula tumoral, infiltrado inflamatório, necrose ou outro (vasos, musculatura, subcutâneo, etc.)

Figura 13 – Tela do programa ImageJ usado para a colocação da grade com 35 pontos sobre imagem histológica do coxim plantar esquerdo contendo a massa tumoral (H&E objetiva 20x)



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Nota: A seta preenchida indica local considerado como ponto de necrose, a seta sem preenchimento indica local considerado como ponto de célula tumoral e a seta pontilhada indica local considerado como ponto de infiltrado inflamatório.

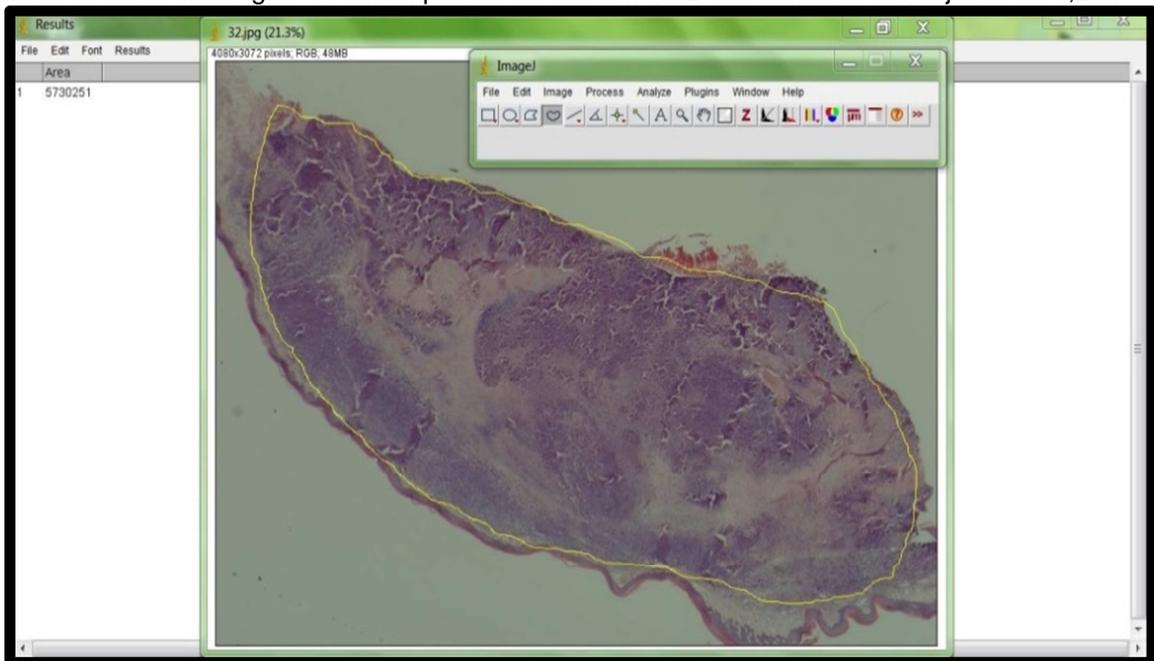
Sabe-se que a fração da área ocupada por uma estrutura num dado compartimento de referência em um corte bidimensional (ex.: área ocupada por pontos com células tumorais num corte histológico) corresponde a fração de volume dessa mesma estrutura no espaço tridimensional do tecido onde ela se encontra. Sendo assim, a fração volumétrica (FV) pode ser calculada dividindo-se o número de pontos contados, referentes àquela estrutura, pelo número de pontos total contados na massa tumoral. A FV fica assim expressa em porcentagem.

A FV apresentando célula tumoral, infiltrado inflamatório e necrose foi comparada entre os grupos experimentais.

4.2.2.3.2 Quantificação das áreas de necrose na massa tumoral do coxim plantar esquerdo

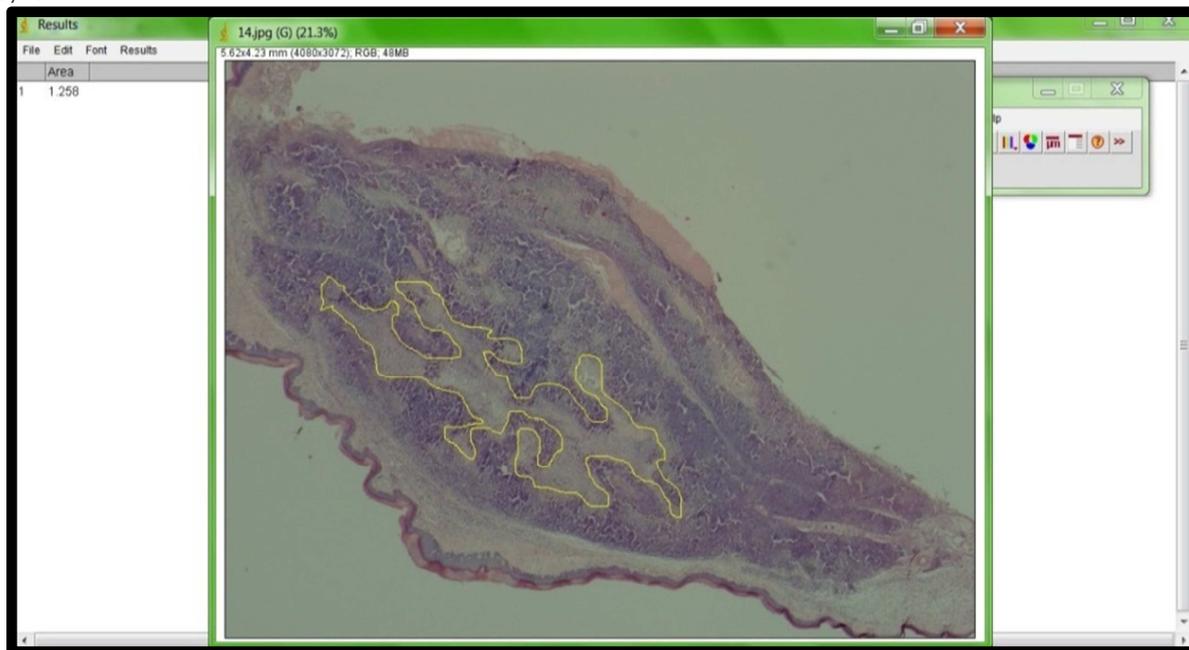
Cortes histológicos dos coxins plantares esquerdos contendo a massa tumoral foram observados em microscópio de luz Olympus, modelo SZX2-ILLK com a objetiva de 0,25x, obtendo-se a imagem de toda a área do corte. Através do programa ImageJ, utilizando-se a ferramenta de seleção manual, a área total tumoral foi obtida (Figura 14), assim como a área de necrose (Figura 15). Com isso ficou determinada a porcentagem de necrose presente em cada corte, sendo essa comparada entre os diferentes grupos experimentais.

Figura 14 - Imagem mostrando a utilização do programa ImageJ para a mensuração da área total tumoral do corte histológico do coxim plantar corado em H&E sob aumento em objetiva de 0,25x



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Figura 15 - Imagem mostrando a utilização do programa ImageJ para a mensuração da área de necrose presente no corte histológico do coxim plantar corado em H&E sob aumento da objetiva de 0,25x



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

4.2.2.4 *Peso relativo do baço*

Durante a necropsia ao final do experimento o baço dos animais foi coletado e pesado. O peso do baço, em gramas, para cada 100 gramas de peso vivo dos animais determina o peso relativo do baço nos grupos experimentais (SELLERS et al., 2007).

4.2.2.5 *Análise histopatológica do baço*

Os cortes histológicos do baço dos animais foram observados em microscópio de luz determinando a presença de alterações na arquitetura do órgão.

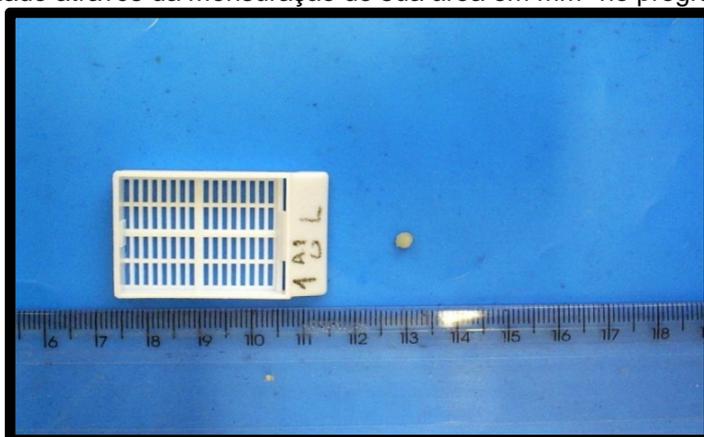
4.2.2.6 Peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo

Durante a necropsia ao final do experimento o linfonodo poplíteo do membro posterior esquerdo (*ipsi lateral* ao tumor secundário) foi coletado e pesado. O peso do linfonodo, em gramas, para cada 100 gramas de peso dos animais determina o peso relativo do linfonodo nos grupos experimentais (SELLERS et al., 2007).

4.2.2.7 Tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo

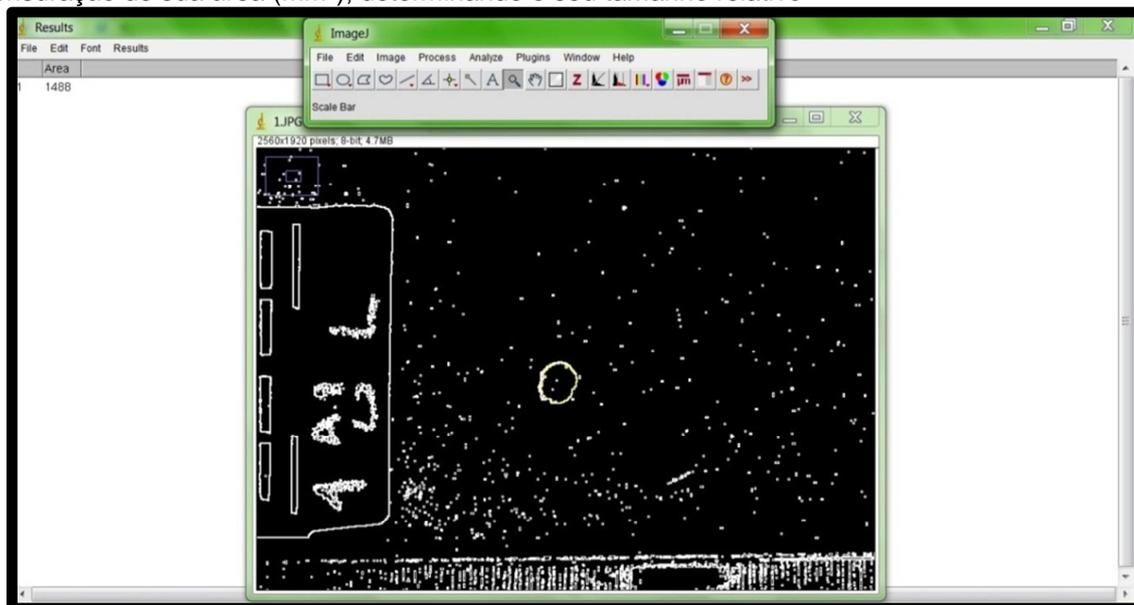
Após a fixação em formaldeído a 10% o linfonodo poplíteo esquerdo (*ipsi lateral* ao coxim inoculado com o tumor secundário) dos animais foi posicionado com seu diâmetro maior horizontalmente, sendo fotografado por câmera em suporte fixo (Figura 16). No programa ImageJ a imagem foi aberta. Em seguida em “Image” no menu inicial foi selecionado “Type” e em seguida “8-bit”. Novamente em “Image” no menu inicial é selecionado “adjust” e em seguida “threshold”, ajustando-se o contraste apropriado e em seguida “apply”. Então no menu inicial selecionou-se “process” e então “Find edges”. Com a ferramenta “tracing” a área do linfonodo foi selecionada e então mensurada em cada imagem (Figura 17). A área do linfonodo, em mm², para cada 100 gramas de peso vivo dos animais determina o tamanho relativo do linfonodo poplíteo nos grupos experimentais.

Figura 16 - Imagem do linfonodo poplíteo esquerdo usado para a determinação do tamanho deste. O tamanho foi determinado através da mensuração de sua área em mm² no programa ImageJ



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Figura 17 - Imagem do linfonodo poplíteo esquerdo processada pelo programa ImageJ para a mensuração de sua área (mm²), determinando o seu tamanho relativo



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

4.2.2.8 *Análise Histopatológica do linfonodo poplíteo esquerdo*

Os cortes histológicos do linfonodo poplíteo esquerdo dos animais foram observados em microscópio de luz determinando alterações na arquitetura do órgão e buscando-se presença de metástases do TE.

4.2.2.9 *Contagem total de leucócitos sanguíneos*

Ao final do experimento cinco animais de cada grupo foram anestesiados e foi realizada coleta de sangue pela via intracardíaca (WOLFENSOHN; LLOYD, 2003). O sangue foi acondicionado em frasco com EDTA e a contagem de leucócitos circulantes por microlitro de sangue foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se como diluidor o líquido de Thoma (GARCIA-NAVARRO, 2005).

4.2.2.10 Ganho de peso dos animais durante crescimento do tumor secundário

O peso dos animais foi mensurado utilizando balança digital ScoutPro®. A aferição foi feita no dia zero, quando foi realizada a inoculação do tumor secundário no coxim plantar esquerdo, e no dia 17 quando os animais foram eutanasiados. A diferença entre os pesos determinou o ganho de peso dos animais, que foi comparado entre os grupos experimentais.

4.3 Análise Estatística

Para a análise dos dados foram utilizados os programas estatísticos Minitab 16® (Minitab, Inc., Pensilvânia, USA) e GraphPad Prism5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Para verificação da normalidade dos dados utilizou-se o teste de Anderson-Darling. A homocedasticidade dos dados foi verificada pelo teste de Barlet. Para os dados paramétricos foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Turkey para comparação entre os grupos experimentais. Para os dados não paramétricos foi utilizado teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação entre os grupos. A curva do crescimento do diâmetro do coxim plantar com o tumor de Ehrlich foi analisada pelo teste ANOVA de duas vias. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

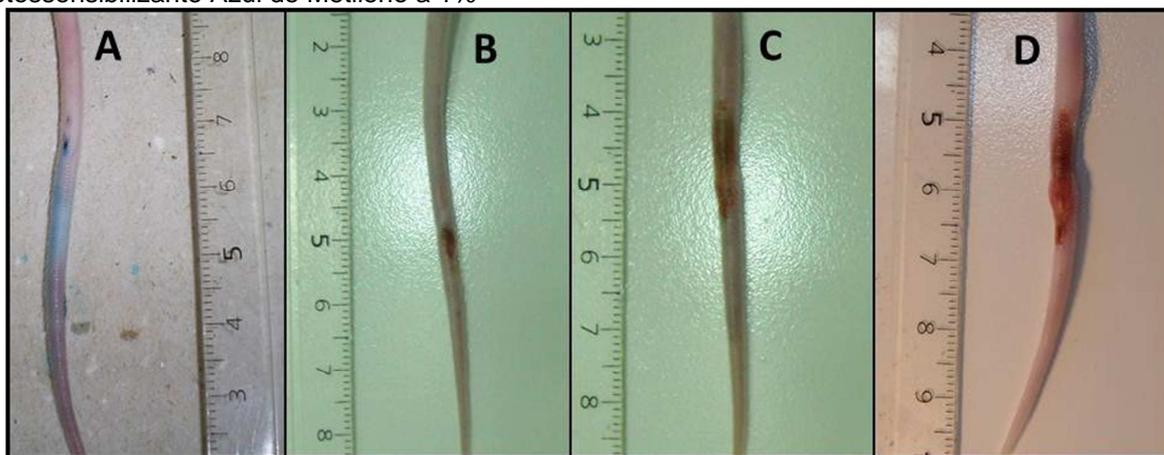
5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

O protocolo de PDT utilizado foi capaz de induzir, imediatamente após a sua realização, os efeitos vasculares da PDT, sendo estes observados como uma área de coloração esbranquiçada presente no local do tratamento (Figura 18A).

Transcorridas vinte e quatro horas do tratamento foi possível observar área em processo de necrose, que apresentou aumento gradativo com o transcorrer dos cinco dias, demonstrado na figura 18 B, C e D. Nos animais não tratados não se observou tal evolução do processo de necrose.

Figura 18 - Fotografias da cauda de animal tratado com a Terapia fotodinâmica utilizando o fotossensibilizante Azul de Metileno a 1%

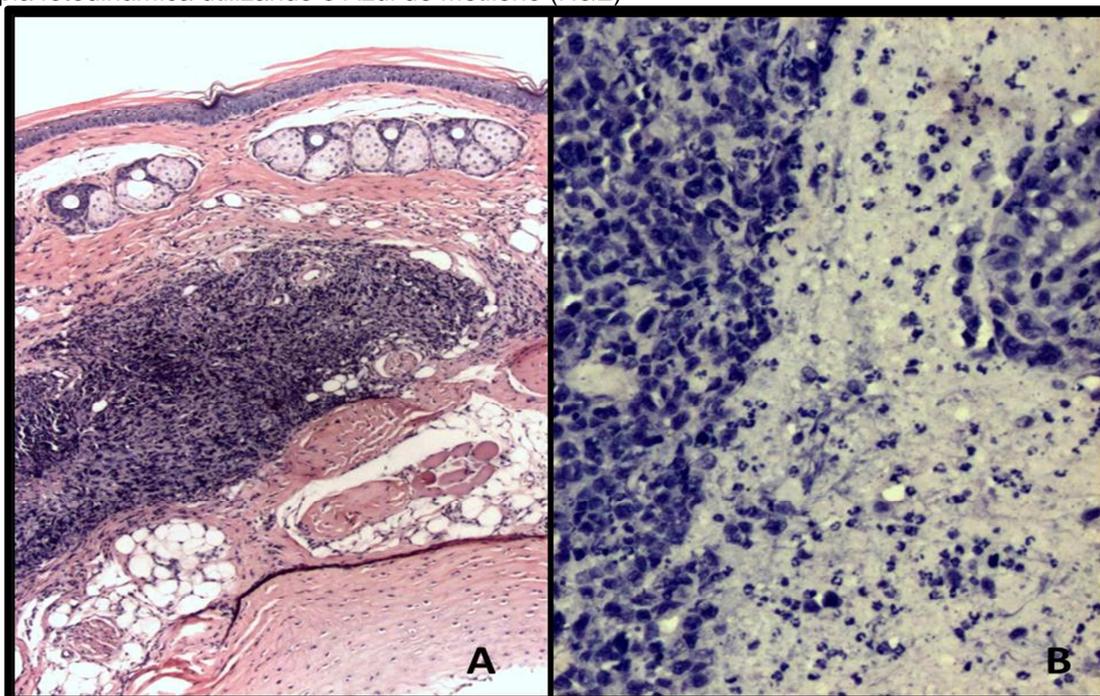


(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Nota: Imediatamente após irradiação da luz (A), 24 horas após (B), 72 horas após (C) e 5 dias após (D).

A análise histopatológica do tumor de Ehrlich implantado na cauda de camundongos tratados com a terapia fotodinâmica determinou a presença de áreas de proliferação tumoral com o parênquima indiferenciado e estroma delicado. As células neoplásicas são arredondadas e apresentam citoplasma escasso, núcleo central redondo ou ovoide, com nucléolos conspícuos e pleomorfismo celular evidente, apresentando frequentemente figuras de mitose aberrante. Há regiões com áreas em necrose e presença de grande infiltrado inflamatório com polimorfonucleares, monócitos e macrófagos presentes (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografia do tumor de Ehrlich na cauda de animal cinco dias após ser tratado com a terapia fotodinâmica utilizando o Azul de Metileno (H&E)



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Nota: A: É possível observar região tumoral bem delimitada, com presença de infiltrado inflamatório ao redor (H&E objetiva 4x). B: observa-se área de necrose em meio as células tumorais pleomórficas, de citoplasma escasso, núcleo redondo ou ovoide de diferentes tamanhos. Observa-se infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares, monócitos e macrófagos (H&E objetiva 40x).

5.2 Experimento 2

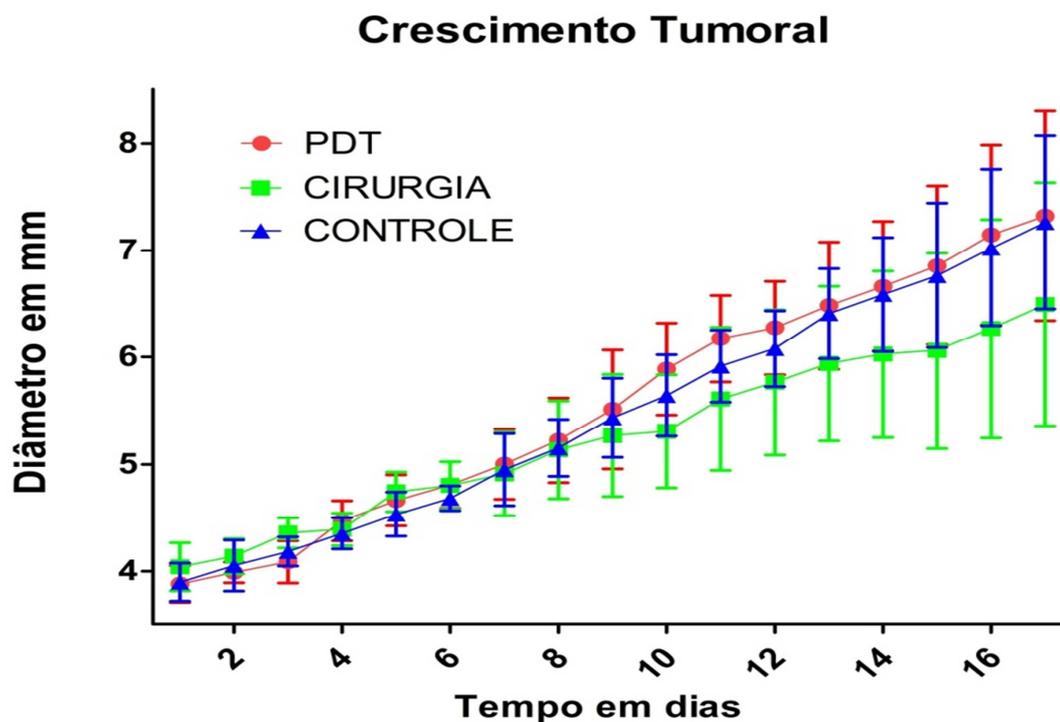
5.2.1 Mensuração diâmetro dorso-plantar do coxim esquerdo durante crescimento do tumor de Ehrlich sólido

A Tabela 1 mostra e o Gráfico 1 ilustra os dados referentes ao diâmetro do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral neste mesmo coxim. A ANOVA de duas vias da curva de crescimento do diâmetro tumoral revelou não haver diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Média e desvio padrão do diâmetro dorso-plantar do coxim esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral

GRUPO/DIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
CIRURGIA (n=11)	4,038 ±0,225	4,157 ±0,164	4,334 ±0,141	4,381 ±0,153	4,69 ±0,184	4,77 ±0,220	4,758 ±0,390	5,11 ±0,456	5,334 ±0,568	5,209 ±0,527	5,446 ±0,665	5,789 ±0,676	6,234 ±0,723	6,359 ±0,779	6,278 ±0,913	6,582 ±1,019	6,73 ±1,135
PDT (n=11)	3,846 ±0,173	3,989 ±0,096	4,078 ±0,198	4,489 ±0,187	4,663 ±0,238	4,89 ±0,216	5,013 ±0,326	5,222 ±0,394	5,451 ±0,553	5,882 ±0,429	6,217 ±0,404	6,289 ±0,438	6,356 ±0,597	6,499 ±0,605	6,748 ±0,742	6,961 ±0,840	7,068 ±0,979
CONTROLE (n=10)	3,9125 ±0,178	4,106 ±0,238	4,1495 ±0,136	4,3145 ±0,146	4,5305 ±0,206	4,678 ±0,115	4,904 ±0,335	5,0925 ±0,265	5,513 ±0,368	5,7085 ±0,378	6,046 ±0,336	6,168 ±0,354	6,465 ±0,422	6,6005 ±0,534	6,737 ±0,676	7,008 ±0,729	7,0485 ±0,811

Gráfico 1 - Curva de crescimento do diâmetro (mm) do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle), pelo tempo (dias) nos diferentes grupos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA duas vias $p > 0,05$)



5.2.2 Morfometria

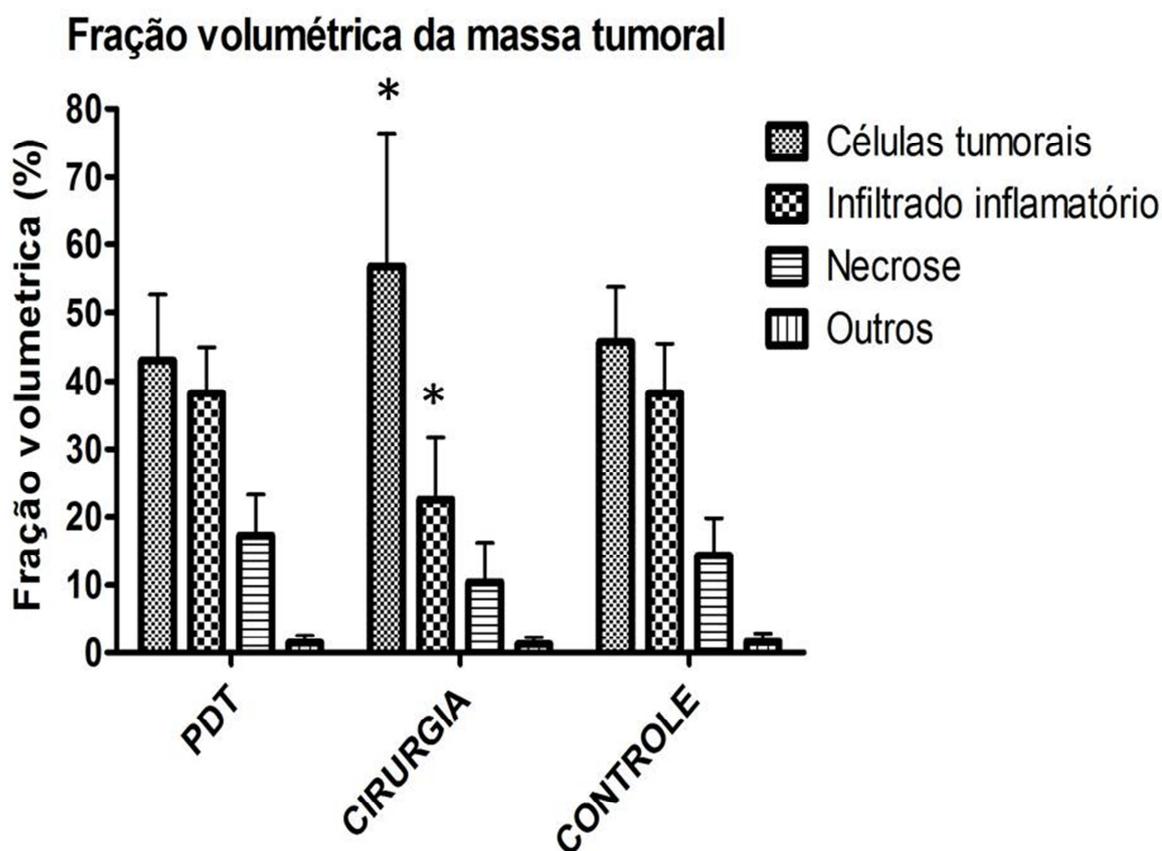
5.2.2.1 Fração volumétrica dos componentes da massa tumoral

A Tabela 2 mostra e a figura 20 ilustra os dados referentes à fração volumétrica (FV) dos componentes da massa tumoral. Os dados são expressos em porcentagem. Os componentes considerados foram células tumorais, infiltrado inflamatório, necrose e outras estruturas presentes (vasos, músculos, etc.). A análise de variância ANOVA revelou haver diferenças significantes na FV das células tumorais ($p < 0,0001$) e do infiltrado inflamatório ($p < 0,0001$). O pós teste de Turkey mostrou que a FV de células tumorais é significativamente maior no grupo cirurgia ($p < 0,05$), sendo a FV de infiltrado inflamatório significativamente menor neste grupo ($p < 0,05$). A FV de necrose não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0669$).

Tabela 2 – Média e desvio padrão da fração volumétrica (em %) apresentando células tumorais, infiltrado inflamatório, necrose ou outras estruturas da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral

Fração Volumétrica dos componentes da massa tumoral (%)				
GRUPOS	Células tumorais	Infiltrado inflamatório	Necrose	Outros
PDT (n=11)	43,03 ± 9,47	38,22 ± 6,71	17,31 ± 5,98	1,42 ± 1,12
CIRURGIA (n=11)	62,48 ± 5,73*	24,75 ± 5,69*	11,42 ± 5,02	1,33 ± 1,04
CONTROLE(n=10)	45,76 ± 8,04	38,23 ± 7,27	14,38 ± 5,44	1,57 ± 1,24

Figura 20 – Fração volumétrica de cada componente da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos quanto a quantidade de células tumorais e infiltrado inflamatório (ANOVA, $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto a necrose (ANOVA $p = 0,0669$)



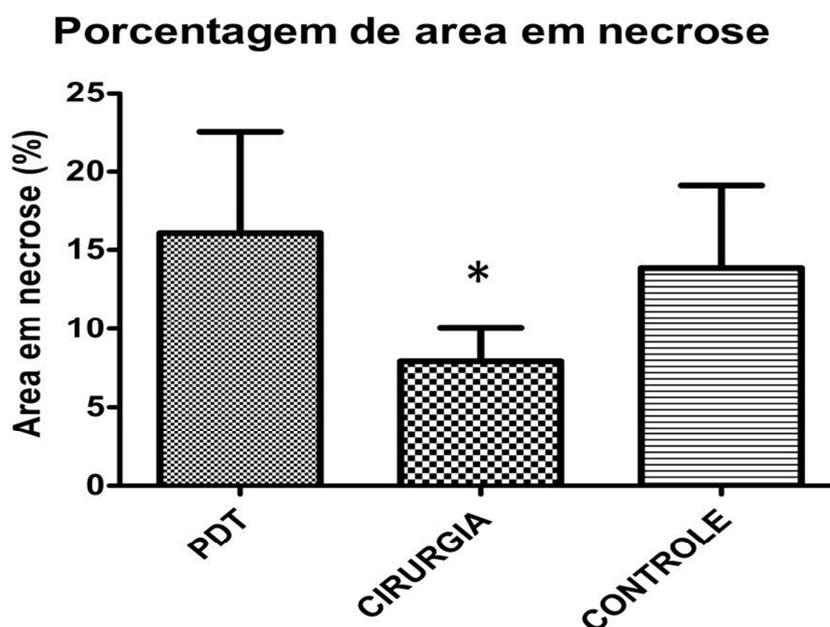
5.2.2.2 Área em necrose na massa tumoral do coxim plantar esquerdo

A Tabela 3 mostra e a figura 21 ilustra os dados referentes a área em necrose na massa tumoral do coxim plantar esquerdo após 17 dias da inoculação do tumor de Ehrlich em camundongos previamente inoculados com o tumor de Ehrlich e tratados com a PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle). O teste de Kruskal-Wallis revelou haver diferença significativa na área ocupada por necrose nos diferentes grupos ($p = 0,0007$). O teste de Dunn mostrou uma área de necrose significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo cirurgia quando comparado aos grupos PDT e controle.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem de área ocupada por necrose na massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral

Grupo	Média da área em necrose (%)	Desvio Padrão
PDT (n=11)	16,05	± 6,46
CIRURGIA (n=11)	7,91*	± 2,11
CONTROLE (n=10)	13,84	± 5,27

Figura 21 – Área em necrose (%) da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis, $p = 0,0007$)



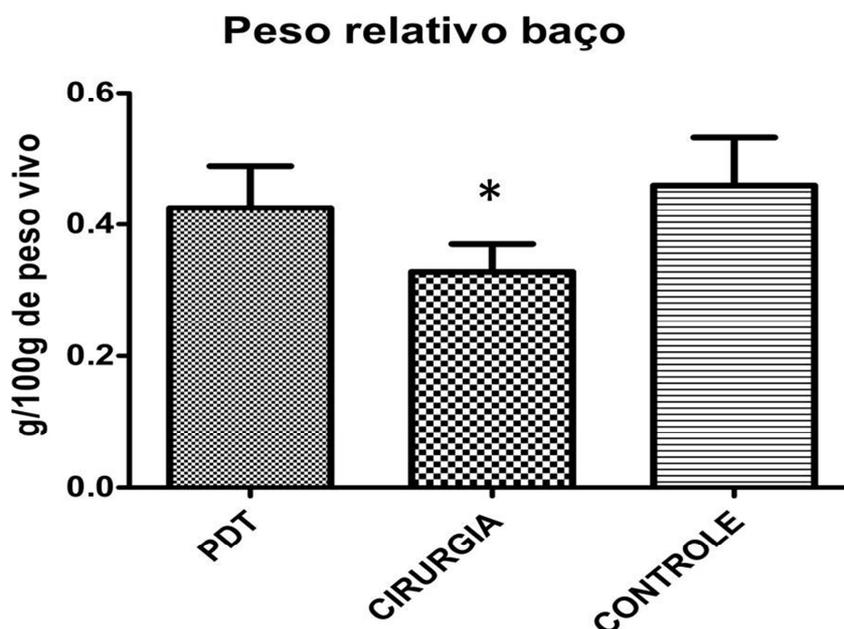
5.2.3 Peso relativo do baço

A Tabela 4 mostra e a figura 22 ilustra os dados referentes ao peso relativo do baço de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral no coxim plantar esquerdo. A ANOVA revelou haver diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). O pós teste de Turkey mostrou que o peso relativo do baço no grupo cirurgia foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos PDT e controle.

Tabela 4 - Média e desvio padrão do peso relativo do baço em g por 100g de peso vivo (PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dia de nova inoculação tumoral

Grupo	Média peso relativo baço (g/100g de PV)	Desvio Padrão
PDT (n=11)	0,4252	$\pm 0,063$
CIRURGIA (n=11)	0,3280*	$\pm 0,042$
CONTROLE (n=10)	0,4596	$\pm 0,072$

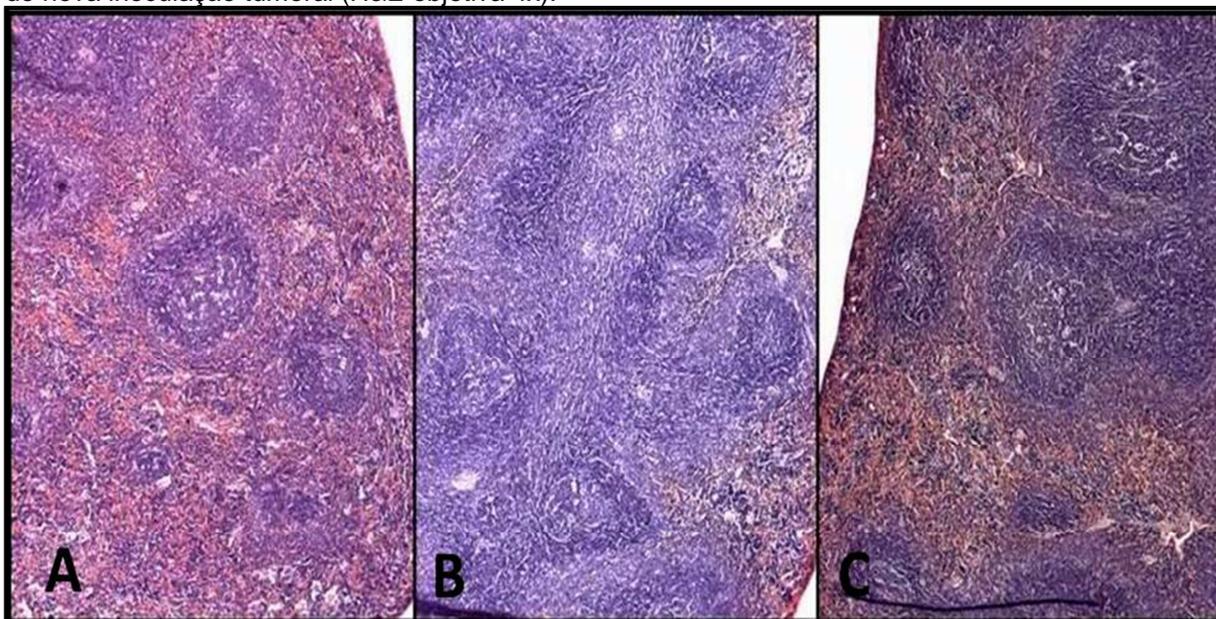
Figura 22 – Peso relativo do baço (g/100g de PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,001$)



5.2.4 Análise histopatológica do baço

A figura 23 ilustra o padrão histológico encontrado no baço dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral no coxim plantar esquerdo. Os animais do grupo cirurgia não apresentaram alterações morfológicas importantes nas estruturas do órgão (Figura 23 A). Nos animais que receberam o tratamento com a PDT (Figura 23 B) e nos animais que não receberam tratamento algum (Figura 23 C) observou-se que a arquitetura do órgão manteve-se preservada, entretanto os folículos linfóides, os respectivos centros germinativos e zona marginal apresentavam-se aparentemente mais proeminentes, com áreas de coalescência dos folículos. Observou-se a manutenção da arquitetura das regiões de polpa vermelha. Os achados sugerem uma discreta hiperplasia linfóide do baço nestes animais.

Figura 23 - Fotomicrografia de corte histológico do baço de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral (H&E objetiva 4x).



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Nota: em A, animal tratado cirurgicamente, com manutenção da arquitetura do órgão. Em B, animais tratados com a PDT e em C animais não tratados. Em ambos observa-se hiperplasia linfóide discreta, com coalescência das áreas de folículo germinativo.

5.2.5 Peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo

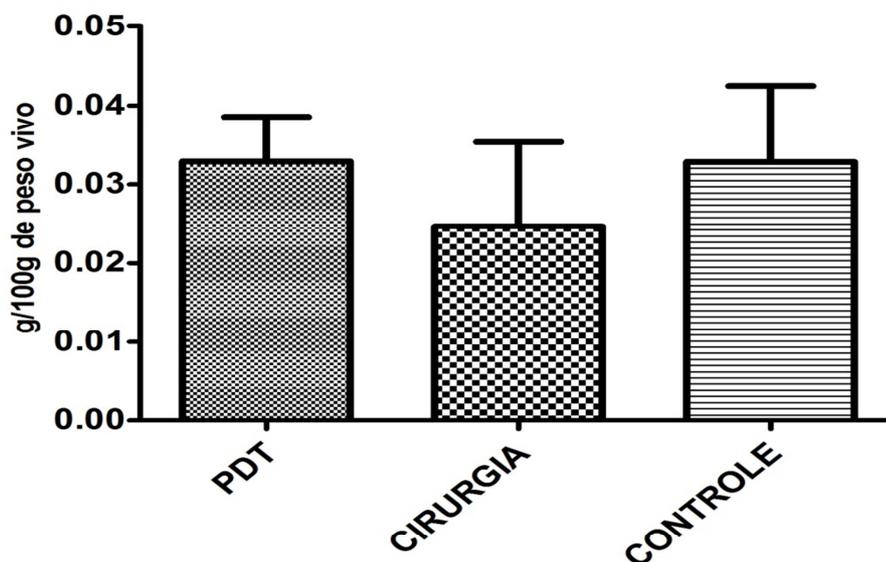
A Tabela 5 mostra e a figura 24 ilustra os dados referentes ao peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral no coxim plantar esquerdo. A ANOVA revelou não haver diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0622$).

Tabela 5 - Média e desvio padrão do peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo em g por 100g de peso vivo (PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral

Grupo	Peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo (g/100g de PV)	Desvio Padrão
PDT (n=11)	0,0328	$\pm 0,0056$
CIRURGIA (n=11)	0,0246	$\pm 0,0106$
CONTROLE (n=10)	0,0328	$\pm 0,0096$

Figura 24 - Peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo (g/100g de PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p = 0,0622$)

Peso relativo linfonodo poplíteo esquerdo



5.2.6 Tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo

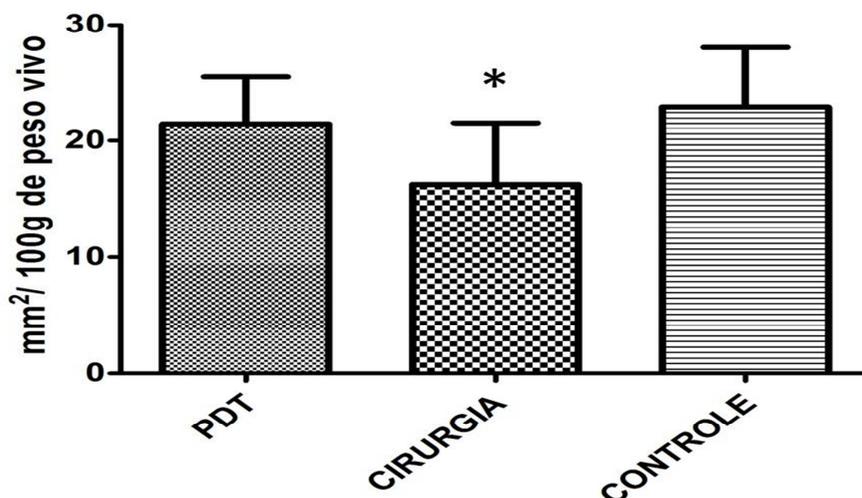
A Tabela 6 mostra e a figura 25 ilustra os dados referentes ao tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral no coxim plantar esquerdo. A ANOVA revelou haver diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0087$). O pós teste de Turkey mostrou que o tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo no grupo cirurgia foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos PDT e controle.

Tabela 6 - Média e desvio padrão do tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo em mm^2 por 100g de peso vivo (PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral

Grupo	Tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo ($\text{mm}^2/100\text{g de PV}$)	Desvio Padrão
PDT n=11	21,46	$\pm 4,049$
CIRURGIA n=11	16,25*	$\pm 5,297$
CONTROLE n=10	22,93	$\pm 5,117$

Figura 25 - Tamanho relativo do linfonodo poplíteo esquerdo ($\text{mm}^2/100\text{g de PV}$) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. * Houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p = 0,0087$)

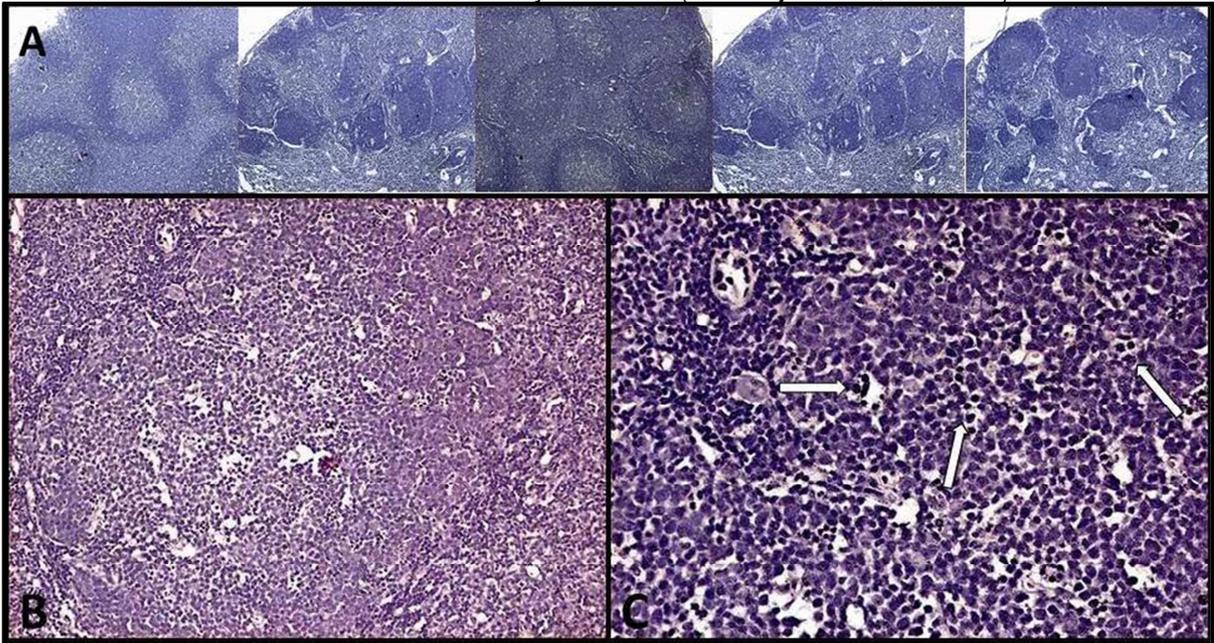
Tamanho relativo linfonodo poplíteo esquerdo



5.2.7 Análise histopatológica do linfonodo poplíteo esquerdo

Nos cortes histológicos dos linfonodos poplíteos dos animais foi observado padrão semelhante entre os grupos (Figura 26 A), onde são marcantes a hiperplasia dos folículos linfóides e centro germinativo desenvolvido (Figura 26 B) e há muitas células mononucleares fagocitando restos celulares (“tingible body macrophages” ou macrófagos com corpos cromófilos) nos folículos linfóides (Figura 26 B). O aspecto histopatológico é característico de hiperplasia reacional dos linfonodos. Observa-se hiperplasia da região paracortical e interfolicular pelo aumento de células linfóides com o núcleo excêntrico, semelhantes à plasmócitos. Ocorre também hiperplasia dos cordões medulares e hiperplasia dos seios medulares, preenchidos por células reticulares, caracterizando histiocitose sinusoidal. Em todos os grupos células com as características fenotípicas do TE, incluindo mitoses atípicas, são observadas nas regiões subcapsular e interfolicular (Figura 27), entretanto não foram encontrados focos de grande proliferação tumoral que caracterizariam metástases do TE.

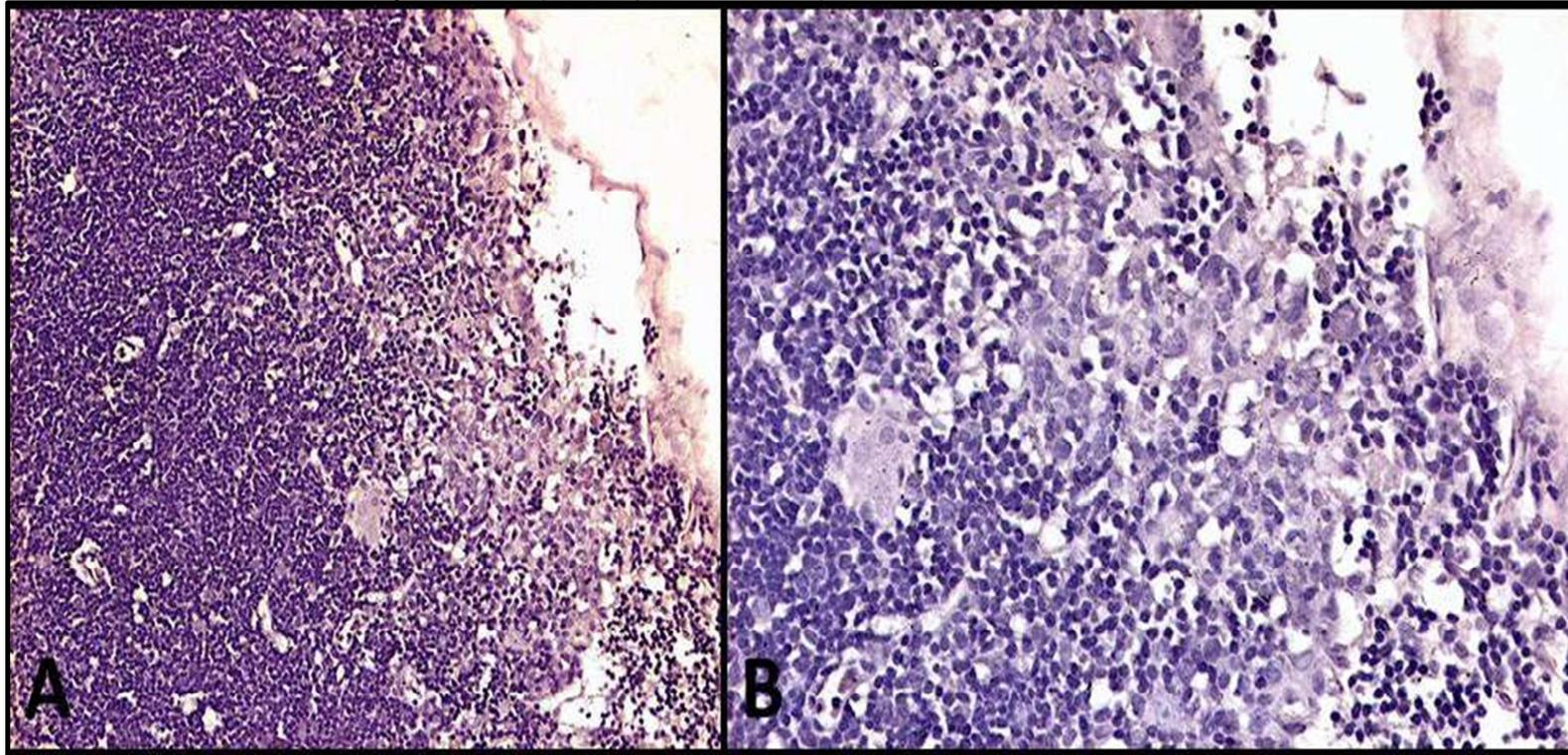
Figura 26 - Fotomicrografias do linfonodo poplíteo esquerdo em vários aumentos de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral (H&E objetiva 4x, 10x e 20x).



Fonte: (DEL-GRANDE, 2013)

Nota: Em A, visão geral do padrão histológico dos diferentes grupos experimentais (H&E 4x). Em B, hiperplasia de folículo linfóide com centro germinativo (H&E objetiva 10x). Em C, detalhe da seta mostrando os macrófagos com os corpos cromófilos (H&E objetiva 20x)

Figura 27 – Fotomicrografia do linfonodo poplíteo esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com a excisão cirúrgica após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral (H&E objetiva 10x e 20x)



Fonte: (DEL-GRANDE, 2013)

Nota: Em A, presença de células com características do tumor de Ehrlich em região subcapsular (linfonodo poplíteo esquerdo de camundongo do grupo cirurgia) (H&E objetiva 10x). Em B, detalhes das células do tumor de Ehrlich pleomórficas e com figuras de mitose atípicas (H&E objetiva 20x)

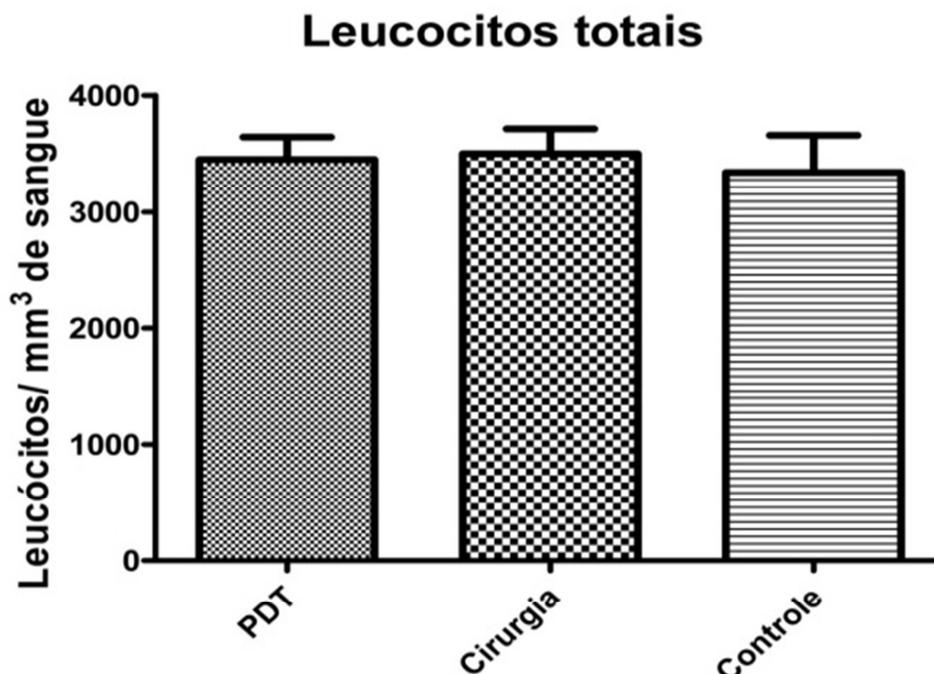
5.2.8 Contagem total de leucócitos sanguíneos

A Tabela 7 mostra e a figura 28 ilustra os dados referentes a contagem total de leucócitos sanguíneos de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral no coxim plantar esquerdo. A ANOVA revelou não haver diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Média e desvio padrão da contagem total de leucócitos sanguíneos por mm^3 em camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral

Grupo	Leucócitos por mm^3	Desvio Padrão
PDT	3450	$\pm 430,11$
CIRURGIA	3500	$\pm 478,27$
CONTROLE	3340	$\pm 711,86$
n=5		

Figura 28 – Contagem total de leucócitos sanguíneos por mm^3 em camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$)



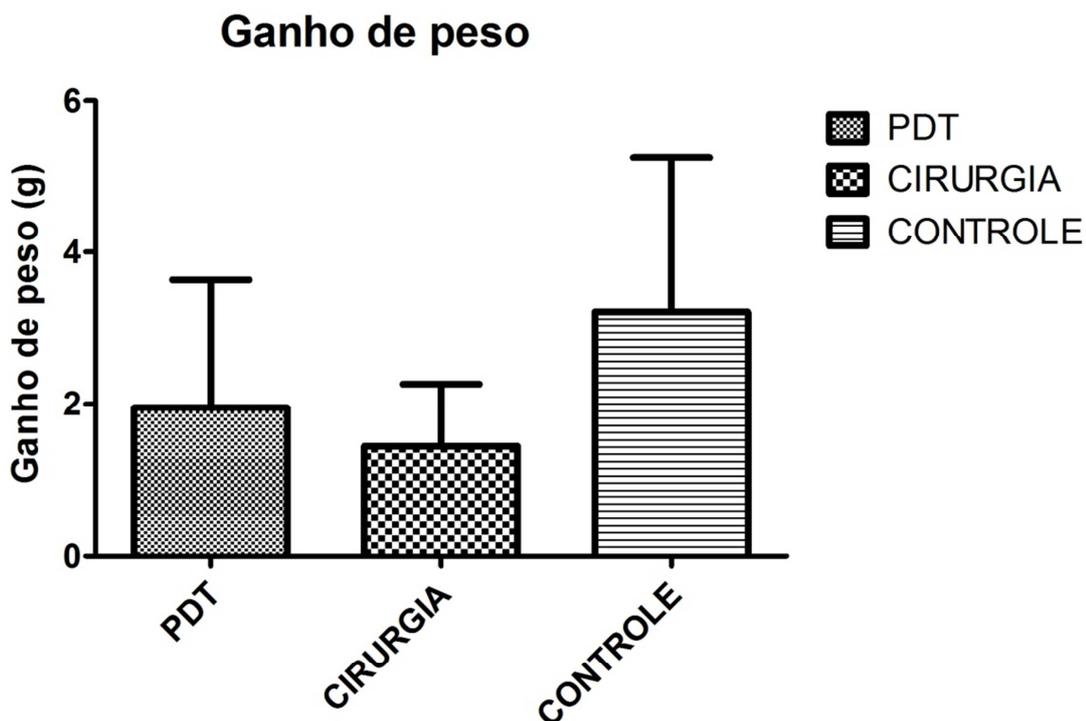
5.2.9 Ganho de peso dos animais durante crescimento do tumor secundário

A Tabela 8 mostra e a figura 29 ilustra os dados referentes ao ganho de peso de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) durante o desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral no coxim plantar esquerdo. A ANOVA revelou não haver diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0588$).

Tabela 8 – Média e desvio padrão do peso vivo nos dias zero, 17 e o ganho de peso de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral

Grupo	Peso dia Zero	Peso dia 17	Ganho de peso
PDT (n=11)	39,75 ± 2,324	41,675 ± 2,195	1,950 ± 1,686
CIRURGIA (n=11)	41,22 ± 2,175	42,666 ± 1,786	1,444 ± 0,817
CONTROLE (n=10)	38,509 ± 2,378	42,727 ± 1,798	3,218 ± 2,023

Figura 29 – Ganho de peso de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p = 0,0588$)



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O estudo da Terapia Fotodinâmica entrou na ciência moderna há mais de 100 anos com as pesquisas de Raab (1900). Desde o início, o tratamento do câncer foi foco importante nas pesquisas, sendo atualmente um método de tratamento coadjuvante, aprovado e utilizado em diversos países. O seu efeito direto, que leva a ablação tumoral por induzir necrose, já é bem descrito e aceito pela literatura científica internacional.

Os seus efeitos secundários, sobre o sistema imunológico, foram evidenciados, experimentalmente e no tratamento de diversos tipos tumorais, produzindo imunidade tumoral com prolongamento do tempo para recidivas ou metástases, e aumento de sobrevida, quando comparado as técnicas convencionais (KROSL; KORBELIK; DOUGHERTY, 1995; CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006; GARG et al., 2010).

A literatura mostra a existência de um grande número de variáveis, na realização da PDT, que produzem uma enorme gama de resultados finais. Inicialmente os tipos de tumores estudados, experimentais ou em pacientes, são de diversas origens. Cada um destes tipos tumorais apresentam particularidades na forma como metabolizam os fotossensibilizantes, na absorção da luz e na interação com o sistema imunológico que provocam variações na resposta do organismo frente a PDT.

A literatura também mostra a utilização de diversas substâncias fotossensibilizantes, de diferentes estruturas moleculares promovendo alterações na sua localização subcelular, seu tempo de depuração pelo organismo e comprimento de onda melhor absorvido. Mais além existem variações na dose utilizada, via de administração e o intervalo entre administração e irradiação da luz.

Por fim, a fonte de luz para a ativação do agente fotossensibilizante descrita na literatura varia muito em diversas características. Hoje, os mais utilizados são os lasers, mas é descrita a utilização de lâmpadas de xenônio, lâmpadas LED (*Light Emitting Diode*) e utilização de filtros específicos para determinados comprimentos de ondas em lâmpadas halogênicas. Dentro da tecnologia Laser uma miríade de modelos utilizam diferentes substâncias como meio ativo para seu funcionamento, resultando cada uma delas em um comprimento de onda emitido diferente. Os equipamentos de laser ainda possibilitam a escolha de diferentes regimes de irradiação da luz podendo-se alterar a intensidade da luz (em watts), a dose de energia irradiada em determinada área (em joules/cm²) e o tempo de

irradiação. Mantendo-se a mesma dose, porém variando a intensidade ou o tempo de exposição, pode-se obter diferentes resultados (CASTANO et al., 2007).

Tendo em vista a quantidade de variações possíveis na realização da PDT, priorizou-se a utilização de tecnologia acessível no mercado nacional, embasando a escolha do protocolo de tratamento na literatura existente sobre a PDT. Assim sendo, visou-se estudar os efeitos produzidos pela PDT quando realizada com o fotossensibilizante Azul de Metileno (AM) a 1% (disponível e de fácil acesso no mercado), administrado pela via intra-tumoral e associado a um laser de diodo (produzido e comercializado no mercado brasileiro), para o tratamento do Tumor de Ehrlich (TE) na sua forma sólida em camundongos.

Primeiramente camundongos inoculados com o TE sólido na cauda receberam o tratamento com a PDT. A evolução tumoral foi acompanhada durante 5 dias, comparando-se com animais não tratados. Os efeitos vasculares descritos em literatura (FINGAR et al., 1992; CALIN; PARASCA, 2006) foram observados logo após o tratamento e no transcorrer do período foi possível observar áreas de necrose tecidual com ulcerações na massa tumoral, diferente dos animais não tratados que não apresentaram tal aspecto no transcorrer dos 5 dias.

A evolução do diâmetro tumoral não foi levada em consideração, pois o crescimento do tumor foi heterogêneo devido ao fato das células tumorais se espalharem pela cauda no momento da inoculação, entretanto ficou claro que nos animais não tratados a evolução do TE sólido transcorreu sem a ocorrência de necrose.

A análise histopatológica dos tumores confirmou a presença das áreas de necrose tumoral, com a presença de infiltrado inflamatório predominantemente de polimorfonucleares. Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Berg e Junstand (1966) e König et al. (1987) que utilizaram o AM a 1% pra tratar o TE, entretanto utilizando fontes de luz e regimes de irradiação distintos entre si e do presente estudo. Tais autores descreveram a indução de necrose tumoral e a regressão da progressão tumoral com apenas um tratamento, porém, a ablação total dos tumores e a cura dos animais em longo prazo (90 dias) foi obtida somente em animais que receberam mais de um tratamento.

Baran et al. (2010) apesar de utilizarem o AM a 0,5% no tratamento de tumores EMT6 de camundongos, utilizaram um regime de iluminação e um equipamento de laser de diodo semelhantes aos utilizados no presente estudo, obtendo também a indução de necrose, inflamação e taxas de cura de até 55% com apenas um tratamento.

Em nosso estudo foi confirmada a capacidade do protocolo de PDT escolhido em induzir destruição do tecido tumoral, com produção de necrose e consequente resposta inflamatória aguda e ativação da imunidade inata. Sendo esta resposta o gatilho para a

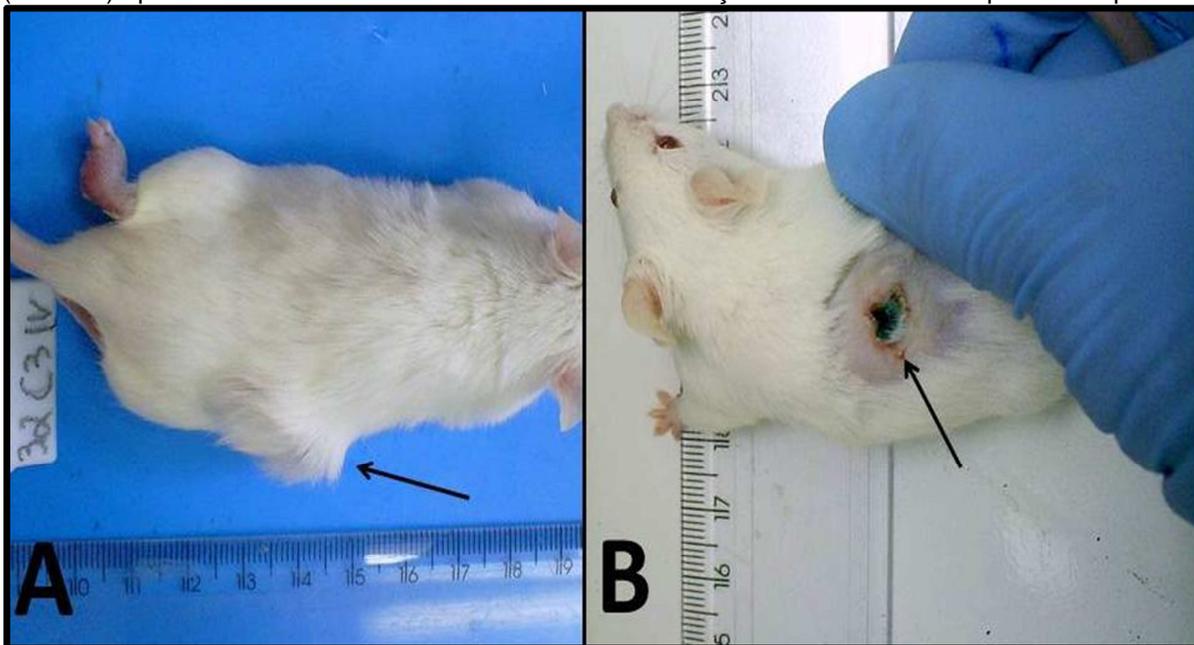
produção de imunidade adaptativa tumoral específica, conforme relatado na literatura (KORBELIK et al., 1996; KOUSIS et al, 2007), passou-se para a próxima fase do estudo.

Camundongos receberam o implante de células do TE na região do dorso. Após 9 dias (dia 0) de evolução os animais do grupo PDT receberam o protocolo com o AM a 1%, os animais do grupo cirurgia foram tratados com a excisão cirúrgica do TE e os animais do grupo controle não receberam tratamento. Após 24 horas (dia 1) os animais receberam uma nova inoculação do TE, agora no coxim plantar esquerdo (tumor secundário) e a evolução deste foi acompanhada durante 17 dias (dia 17).

A evolução do TE inoculado primariamente no dorso dos animais foi observada, transcorrendo da seguinte forma nos diferentes grupos: No grupo cirurgia, houve retirada total do tumor, com cicatrização da ferida cirúrgica em alguns dias (um animal apresentou deiscência dos pontos, com cicatrização da ferida por segunda intenção). No grupo controle (sem tratamento) houve progressão tumoral, com aumento progressivo do diâmetro, sem áreas de aparente necrose no final dos 17 dias de evolução (Figura 30 A). Os animais tratados com a PDT apresentaram os efeitos imediatos característicos, com a presença de ulceração da massa tumoral dentro das primeiras 48 horas (Figura 30 B) e formação de crostas. Houve a cicatrização das úlceras em alguns animais até o final dos 17 dias. Não houve ablação total do TE em nenhum animal tratado com a PDT, pois se observou massa tumoral palpável no dorso dos animais ao final dos 17 dias.

O tumor secundário, inoculado no coxim plantar esquerdo dos animais, após o tratamento do tumor primário, foi mensurado diariamente. A curva de crescimento do TE secundário no coxim plantar dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais no decorrer dos 17 dias, mas percebe-se uma tendência da curva do grupo PDT em se aproximar da curva do grupo controle a partir do 13º dia, ficando a média final do grupo cirurgia abaixo dos demais. Comparando-se apenas este diâmetro final também não houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 30 – Camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT ou sem tratamento (controle) após desenvolvimento de 17 dias de nova inoculação tumoral em coxim plantar esquerdo



(Fonte: DEL-GRANDE, 2013)

Nota: Em A, animal que não recebeu tratamento no TE do dorso, ao final dos 17 de evolução do tumor do coxim. A seta indica o tumor do dorso sem aparente ulceração ou necrose. Em B, animal que recebeu tratamento com a PDT no tumor do dorso após 3 dias apresentando área evidente de necrose tumoral, indicada pela seta.

O aumento do diâmetro do coxim plantar inoculado com o TE se dá principalmente por conta da proliferação das células tumorais, mas a reação inflamatória produzida no local também promove algum aumento de volume. Segundo a literatura, a PDT induz imunidade tumoral adaptativa e as células neoplásicas que não morreram no momento do tratamento serão destruídas posteriormente por linfócitos (principalmente T CD8). A imunidade tumoral é sistêmica, de longo prazo e não se dá somente no tumor primário. Ocorre também contra as metástases e recidivas de tumores espontâneos e em modelos experimentais com células transplantáveis, quando inoculadas em local distante do primário.

Canti et al. (1996) trataram fibrossarcomas MS-2 em camundongos com o fotossensibilizante CASPc e laser de diodo com regime de irradiação semelhante ao presente estudo. Não houve diferença na taxa de sobrevivência dos animais quando comparado ao tratamento cirúrgico, porém quando os animais foram novamente desafiados, os tratados cirurgicamente logo vieram a óbito enquanto os tratados com PDT resistiram por até 100 dias.

Kabingu et al. (2007) utilizaram animais BALBc e tumores transplantáveis (Colon 26 e EMT6), tratando com HpD e laser de Argônio. Tais tumores produzem metástases

pulmonares e estas se apresentaram diminuídas após 10 dias comparando com animais sem tratamento ou tratamento cirúrgico.

No modelo experimental do presente trabalho, esperava-se encontrar uma diferença na curva de crescimento do TE implantado no coxim plantar dos animais previamente tratados com a PDT, excisão cirúrgica ou sem tratamento do tumor primário. A não existência de diferença no diâmetro tumoral pode ser explicada por diferenças existentes no padrão de resposta inflamatória e a consequente variação da proliferação tumoral ou indução de mais destruição tumoral com áreas de necrose. A comparação dos componentes celulares da massa tumoral foi feita através da morfometria dos tumores, comparando a fração volumétrica (FV) de células tumorais, infiltrado inflamatório e necrose. Uma das razões para esta ampla variação da resposta, revelada por elevados valores do desvio padrão, foi a linhagem de camundongos escolhida. Camundongos Swiss não são isogênicos, portanto suas respostas variam mais acentuadamente quando se compara animais do mesmo grupo. É possível que se tivéssemos utilizado camundongos BALB/c teríamos respostas mais homogêneas entre os animais de mesmo grupo, e diferenças estatisticamente significantes poderiam ser mais facilmente observadas.

A média da FV da massa tumoral ocupada por células tumorais do TE foi estatisticamente igual entre o grupo PDT e o controle, mas significativamente menores que a média do grupo cirurgia. A FV ocupada por infiltrado inflamatório apresentou este mesmo padrão, onde os grupos PDT e controle foram semelhantes entre si e significativamente menores que no grupo cirurgia. Na FV ocupada por necrose as médias observadas não apresentaram o nível de significância desejado do 0,05, mas foi muito próximo, sendo este $p = 0,0669$. Isto pode ser explicado pelo fato de a FV em necrose ser a menor dos 3 componentes observado (tumor, inflamação e necrose), não alcançado, portanto, uma amostra suficiente para confirmar estatisticamente a diferença.

Ao se comparar a totalidade da área tumoral e a porcentagem desta ocupada por áreas de necrose a diferença significativa entre os grupos se fez presente, ou seja, a média da porcentagem de área ocupada por necrose na massa do tumor secundário foi estatisticamente igual entre o grupo PDT e o grupo controle, sendo estas significativamente maiores que a do grupo cirurgia.

Apesar de a curva de crescimento tumoral não diferir entre os grupos, a morfometria do TE secundário mostrou haver diferenças nas respostas entre os animais tratados cirurgicamente e os animais tratados com a PDT e os sem tratamento do tumor primário, conforme descreve a literatura (CANTI et al., 1996; CALIN; PARASCA, 2006; KABINGU

et al., 2007). Os animais tratados cirurgicamente apresentaram maior proliferação tumoral, um menor infiltrado inflamatório no local e uma menor produção de necrose da massa tumoral. Estes resultados indicam que os animais tratados com a excisão cirúrgica do tumor primário não passam pela inflamação aguda do sistema imune inato produzida pela PDT e a sua consequente indução de resposta imune celular adaptativa contra o tumor tratado, consequentemente a proliferação tumoral é maior e ocorre sem indução de inflamação importante, ao contrario de como se observou nos animais tratados com a PDT e os sem tratamento.

Os órgãos linfoides e a contagem de leucócitos sanguíneos dos animais foram avaliados no intuito de se estabelecer diferenças provocadas no sistema imunológico dos animais tratados com a PDT ou excisão cirúrgica do tumor. Assim como observado na morfometria dos tumores secundários, a análise dos órgãos linfoides também mostrou a semelhança de respostas entre o grupo PDT e o grupo sem tratamento, diferindo estes do grupo tratado cirurgicamente.

O peso relativo do baço apresentou diferença significativa entre os grupos. Os valores obtidos foram maiores nos grupo PDT e controle, podendo indicar que nestes animais o sistema imunológico mostrava-se mais estimulado. A análise histopatológica mostrou hiperplasia de polpa branca, confirmando a suspeita de um maior estímulo imunológico nestes grupos. Estes resultados corroboram com Koberlik et al. (1996), quando demonstraram o papel das células esplênicas na indução da imunidade tumoral produzida pela PDT ao transferir células esplênicas de animais previamente tratados com a PDT para animais imunossuprimidos. Nestes animais a PDT não promove curas, porem ao receber tais células do baço as taxas de cura voltam aos níveis dos animais sem comprometimento imunológico.

Ao se analisar o linfonodo poplíteo esquerdo, órgão linfoide regional do membro inoculado com as células do TE observou-se que o seu peso relativo não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Entretanto o valor do nível de significância encontrado foi $p = 0,0622$, sendo este bastante próximo do valor considerado significativo para haver diferença estatística entre os grupos. Na análise do tamanho relativo deste mesmo linfonodo, a diferença entre os grupos foi significativa, confirmando a semelhança de respostas entre os grupos PDT e controle, sendo maiores que no grupo cirurgia. Kousis et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar por citometria de fluxo os componentes celulares do linfonodo de animais tratados com a PDT, nestes a população de linfócitos T CD8 no linfonodo regional é maior que em animais tratados com a excisão cirúrgica do tumor. A análise histopatológica dos linfonodos não mostrou diferenças na arquitetura tecidual do

órgão nos diferentes grupos e a presença de células com as características fenotípicas do TE foram observadas ocupando o espaço subcapsular em todos os animais inoculados no coxim plantar, conforme observado anteriormente por Dagli (1989).

A contagem total dos leucócitos sanguíneos não apresentou diferença significativa entre os grupos, assim como o ganho de peso dos animais durante o período de experimentação. A média de peso dos animais sem tratamento do tumor primário apesar de não ser estatisticamente significativa, ficou acima dos demais. Nestes animais o tumor primário teve um crescimento progressivo, enquanto nos outros dois grupos houve uma menor progressão tumoral (grupo PDT) ou nenhuma progressão (grupo cirurgia), explicando esse ligeiro aumento do peso vivo final nos animais não tratados.

A análise dos resultados obtidos mostra, claramente, que os animais tratados com a excisão cirúrgica de um TE primário quando desafiados com uma nova inoculação de células tumorais apresentam uma resposta imunológica local e sistêmica diferente dos animais tratados com a PDT e os animais que não foram tratados, conforme amplamente descrito na literatura.

A semelhança das respostas entre os animais tratados com a PDT e os que não receberam tratamento do tumor primário, pode ser explicada pelo fato de o tumor de Ehrlich ser imunogênico. Conforme relatado por Guerra (1983), animais inoculados com o TE na sua forma sólida quando inoculados novamente em um segundo local, após 12 dias da primeira inoculação, não haverá progressão do tumor secundário.

No presente trabalho os animais foram tratados com 9 dias de progressão do tumor primário. Nos animais tratados com a excisão cirúrgica, o estímulo imunológico cessou antes dos 12 dias necessários para induzir imunidade, portanto houve crescimento do tumor secundário e menor ativação do sistema imunológico (observado na análise dos órgãos linfoides e morfometria) frente ao novo desafio com células tumorais.

Nos animais que não receberam tratamento as células do tumor primário continuaram presentes até o 12º dia, alcançando o tempo necessário para produção de imunidade tumoral. Com isso observa-se que nestes animais o tumor secundário sofreu maior ação do sistema imunológico, apresentando menos proliferação, mais inflamação e mais necrose da massa tumoral. A análise dos órgãos linfoides também mostrou uma maior ação do sistema imune nestes animais quando comparados aos animais do grupo cirurgia.

Nos animais tratados com a PDT observamos resposta semelhante aos animais não tratados. Quando comparados aos animais do grupo cirurgia apresentaram menos proliferação tumoral e mais inflamação e necrose do tumor secundário, além da maior resposta sistêmica

vista na análise dos órgãos linfoides. Tais resultados são compatíveis com a literatura consultada. Entretanto, como mencionado anteriormente, os animais tratados com a PDT não apresentaram ablação total das células do tumor primário, portanto as células remanescentes podem ainda ter exercido papel importante na indução da imunidade tumoral, podendo esta ser a explicação para a semelhança com o grupo controle sem tratamento.

A literatura científica mundial mostra claramente a obtenção de ablação tumoral pela terapia fotodinâmica e a sua capacidade de promover imunidade tumoral, tanto em modelos experimentais como tumores espontâneos. A sua utilização clínica é aprovada em diversos países e vem crescendo conforme alcança visibilidade pela comunidade médica e novos protocolos mais efetivos são desenvolvidos. O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica no tratamento do câncer já é bem descrito e aceito na comunidade científica, porém com lacunas a serem preenchidas pelas pesquisas futuras.

O presente trabalho demonstra a capacidade da PDT em produzir destruição das células tumorais. Mostra também a indução de resposta inflamatória do sistema imune inato, levando possivelmente a ativação do sistema imune adaptativo. Tais informações complementam o conhecimento já adquirido sobre o uso da PDT no tratamento do câncer e fortalecem a busca por métodos cada vez mais eficientes no tratamento de tumores sólidos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A terapia fotodinâmica foi capaz de produzir efeitos sobre o crescimento do tumor de Ehrlich sólido inoculado em camundongos, induzindo necrose e inflamação aguda, assim como produziu diferenças no padrão de resposta imunológica quando comparado aos animais tratados cirurgicamente.

REFERÊNCIAS

- BABTISTA, M. S.; TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F. Methylene Blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.
- BAGNATO, V. S. Fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, v. 2, n. 2, p. 4-9, 2001.
- BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L. G.; SIBATA, C. H.; ALISSON, R. R. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic therapy**, v. 2, p. 107-118, 2005.
- BARAN, T. M.; GIESSELMAN, B. R.; HU, R.; BIEL, M. A.; FOSTER, T. H. Factors influencing tumor response to photodynamic therapy sensitized by intratumor administration of methylene blue. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, p. 728-735, 2010.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. **Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações**, [2004]. Disponível em: < <http://www.direxlim.fm.usp.br/download/transc.pdf> >. Acessado em: 24 Jan. 2013.
- BEREMBLUM, I. The nature of tumor growth. In: FLOREY, L. **General pathology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1970. cap. 21, p. 645-667.
- BLUM, H. F. The role of oxygen in photodynamic action. In: _____. **Photodynamic action and diseases caused by light**. New York: Rhinehold, 1941. cap. 6, p. 65-75.
- BLUM, H. F. **Photodynamic action and diseases caused by light**. New York: Rhinehold, 1941. 309 p.
- BURNET, F. R. S. Cancer – A biological approach. **British Medical Journal**, v. 30, p. 841-847, 1957.
- BURNET, F. R. S. The concept of immunological surveillance. **Progress in Experimental Tumor Research**, v. 13, p. 1-27, 1970.
- CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Photodynamic therapy in oncology. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 8, n. 3, p. 1173-1179, 2006.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279-293, 2004.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizers pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 91-106, 2005.
- CASTANO A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 535-545, 2006.

CECIC, I.; SERRANO, K.; GYONGYOSSY-ISSA, M.; KORBELIK, M. Characteristics of complement activation in mice bearing Lewis lung carcinomas treated by photodynamic therapy. **Cancer Letters**, v. 225, p. 215-223, 2005.

CHELI, R.; ADDIS, F.; MORTELLARO, C. M.; FONDA, D.; ANDREONI, A.; CUBEDDU, R. Hematoporphyrin derivative photochemotherapy of spontaneous animal tumors: Clinical results with optimized drug dose. **Cancer Letters**, v. 23, p. 61-66, 1984.

CHELI, R.; ADDIS, F.; MORTELLARO, C. M.; FONDA, D.; ANDREONI, A.; CUBEDDU, R. Photodynamic therapy of spontaneous animal tumors using the active component of hematoporphyrin derivative (DHE) as photosensitizing drug: clinical results. **Cancer Letters**, v. 38, p. 101-105, 1987.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich Ascites tumor cells. **Nature**, v. 225, p. 734-735, 1970.

COLUSSI, V. C. **Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos**. 1997. 100 f. Tese (Doutorado em neurociências) – Instituto de física “Gleb Wathaghin”, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 1997.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Neoplasia. In: _____. **Robbins pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2005. cap. 7, p. 269-342.

DAGLI, M. L. Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: Estudo experimental**. São Paulo, 1989. 148 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

DIGHE, A. S.; RICHARDS, E.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN- γ receptors. **Immunity**, v. 1, p. 447-456, 1994.

DOUGHERTY, T. J. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, p. 219-221, 1996.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

DOUGHERTY, T. J.; GRINDEY, G. B.; WEISHAUPT, K. R.; BOYLE, D. G. Photoradiation therapy II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, p. 115-121, 1975.

DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. H.; GOLDFARB, A.; WEISHAUPT, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v. 38, p. 2628-2635, 1978.

DOUGHERTY, T. J.; LAWRENCE, G.; KAUFMAN, J. H.; BOYLE, D.; WEISHAUP, K. R.; GOLDFARB, A. . Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 62, p. 231-237, 1979.

DOUGHERTY, T. J.; THOMA, R. E.; BOYLE, D. G; WEISHAUP, K. R. Interstitial photoradiation therapy for primary solid tumors in pet cats and dogs. **Cancer Research**, v. 41, p. 401-404, 1981.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immuniediting. **Annual rRviews in Immunology**, v. 22, p. 329-60, 2004.

EHRlich, P. **Collected studies on immunity**. New York: First thousand, 1906.

EMILIO, C. P. **Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevulínico com a de seu metil éster utilizando-se a PDT no tratamento de carcinoma espinocelular felino**. São Paulo, 2008. 127 f. Tese (Doutorado em tecnologia nuclear - materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

EVANS, H. J. Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Frank Rose Lecture. **British Journal of Cancer**, v. 68, n. 6, p. 1051-1060, 1993.

EVENSEN, J. F.; MOAN, J. Photodynamic action and chromosomal damage: a comparison of haematoporphyrin derivative (HpD) and light with X-irradiation. **British Journal of Cancer**, v. 45, n. 3, p. 456-465, 1982.

FINGAR, V. H.; TABER, S. W.; HAYDON, P. S.; HARRISON, L. T.; KEMPF, S. J.; WIEMAN, T. J. Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. **InVivo**, v. 14, p. 93-100, 2000.

FINGAR, V. H.; WIEMAN, T. J.; WIEHLE, S. A.; CERRITO, P. B. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. **Cancer research**, v. 52, n. 18, p. 4914-4921, 1992.

GABRILOVICH, D. I.; BRONTE, V.; CHEN, S. H. The Terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Research**, v. 67, p. 425, 2007.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de hematologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Ed Varela, 2005. 206 p.

GARG, A. D.; NOWIS, D.; GOLAB, J.; AGOSTINIS, P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. **Apoptosis**, v. 15, p. 1050-1071, 2010.

GIBSON, S. L.; MURANT, R. S.; CHAZEN, M. D.; KELLY, M. E.; HILF, R. In vitro photosensitization of tumour cell enzymes by Photofrin II administered in vivo. **British Journal of Cancer**, v. 59, p. 47-53, 1989.

GIROTTI, A. W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. **Photochemistry and Photobiology**, v. 51, p. 497-509, 1990.

GLOBAL CANCER, 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>> . Acessado em: 14 dez. 2012.

GOMER, C. J. ;FERRARIO, A. ;MURPHREE, A. L. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 56, p. 27-32, 1987.

GOMER, C. J.; RUCKER, N.; MURPHREE, A. L. Differential cell photosensitivity following porphyrin photodynamic therapy. **Cancer Research**, v. 48, n. 16, p. 4539-4542, 1988.

GORES, B. R. Foreword. In: BERGER, N.; EEG, P. H. **Veterinary laser surgery: A practical guide**. Iowa: Blackell Publishing, 2006.

GRANVILLE, D. J.; CARTHY, C. M.; JIANG, H. LEVY, J. G.; MCMANUS, B. M.; MATROULE, J. Y.; PIETTE, J.; HUNT, D. W. C. Nuclear factor-kappaB activation by the photochemotherapeutic agent verte-porfin. **Blood**, v. 95, p. 256-262, 2000.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de ehrlich**. 1983. 79 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 7, p. 57-70, 2000.

HANDERSON, B. W.; FINGAR, V. H. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. **Cancer Research**, v. 47, n. 12, p. 3110-3114, 1987.

HENDERSON, B. W.; DONOVAN, J. M. Release of prostaglandin E2 from cells by photodynamic treatment in vitro. **Cancer Research**, v. 49, p. 6896-6900, 1989.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>> . Acessado em: 14 dez. 2012

KAPLAN, H. S. Role of immunologic disturbance in human oncogenesis: some facts and fancies. **British Journal of Cancer**, v. 25, p. 620-634, 1971.

KENNETH, R.; WEISHAUP, C. J.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. **Cancer Research**, v. 36, p. 2326-2329, 1976.

KONIG, K.; BOCKHORN, V.; DIETEL, W. SCHUBERT, H. Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer methylene blue using a krypton laser. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 113, p. 301-303, 1987.

KORBELIK M. Induction of Tumor Immunity by Photodynamic Therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, n. 5, p. 329-334, 1996.

KORBELIK, M.; CECIC, I. Complement activation cascade and its regulation: relevance for the response of solid tumors to photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 93, p. 53-59, 2008.

KORBELIK, M.; KROSL, G.; KROSL, J.; DOUGHERTY, G. J. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. **Cancer Research**, v. 56, p. 5647-5652, 1996.

KORBELIK, M.; SUN, J.; CECIC, I. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response. **Cancer Research**, v. 65, p. 1018-1026, 2005.

KOUSIS, P. C.; HENDERSON, B. W.; MAIER, P. G.; GOLLNICK, S. O. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. **Cancer Research**, v. 67, n. 21, p. 10501-10510, 2007.

KRAMMER, B. Vascular effects of photodynamic therapy. **Anticancer Research**, v. 21, p. 4271-4277, 2001.

KROSL, G.; KORBELIK, M.; DOUGHERTY, G. J. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by Photofrin-based photodynamic therapy **British Journal of Cancer**, v. 71, p. 549-555, 1995.

LALA, P. K. Dynamics of leukocyte migration into the mouse ascites tumor. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 7, n. 3, p. 293-304, 1974.

LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; GRAY, M. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Cancer**, v. 20, p. 2255-2257, 1967.

LUCROY, M. D. Photodynamic therapy for companion animals with cancer. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, n. 3, p. 693-702, 2002.

LUCROY, M. D.; MAGNE, M. L.; PEAVY, G. M.; MADEWELL, B. R.; EDWARDS, B. F. Photodynamic therapy in veterinary medicine: current status and implications for Applications in human disease. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, n. 5, p. 305-310, 1996.

LUCROY, M. D.; RIDGWAY, T. D.; PEAVY, G. M.; KRASIEVA, T. B.; HIGBEE, R. G.; CAMPBELL, G. A.; BLAIK, M. A. Preclinical evaluation of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for canine transitional cell carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2000.

- MAGNE, M. L.; RODRIGUEZ, C. O.; EDWARDS, B. F.; THEON, A. P.; MADEWELL, B. R. Photodynamic therapy of facial squamous cell carcinoma in cats using a new photosensitizer. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 20, p. 202-209, 1997.
- MALIK, Z.; BABUSHKIN, T.; SHER, S.; HANANIA, J.; LADAN, H.; NITZAN, Y.; SALZBERG, S. Collapse of K⁺ and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 10, p. 1399-1506, 1993.
- MATROULE, J. Y.; BONIZZI, G.; MORLIERE, P. PAILLOUS, N.; SANTUS, R.; BOURS, V.; PIETTE, J. Pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photosensitization activates transcription factor NF-kappaB through the interleukin-1 receptor-dependent signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 2988-3000, 1999.
- MCCAWE, D. L.; POPE, E. R.; PAYNE, J. T.; WEST, M. K.; TOMPSON, R. V.; TATE, D. Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 7, p. 1297-1299, 2000.
- MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochemistry and photobiology**, v. 53, p. 549-553, 1991.
- MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the history of PDT. In: PATRICE, T. (Ed.). **Photodynamic therapy**. Cambridge: The Royal society of chemistry, 2003. cap. 1, p. 1-18.
- MOAN, J.; WAKSVIK, H.; CHRISTENSEN, T. DNA single-strand breaks and sister chromatid exchanges induced by treatment with hematoporphyrin and light or by x-rays in human NHK 3025 cells. **Cancer rResearch**, v. 40, n. 8, p. 2915-2918, 1980.
- MODIANO, J. F.; BREEN, M. The etiology of cancer. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Withrow and MacEwen's Small animal clinical oncology**. 4ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. cap. 1, p. 3-30.
- MORITZ, A. **Oral laser application**. Berlin: Ed. Quintessenz, 2006.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.
- OLEINICK, N. L.; AGARWAL, M. L.; CLAY, M. E.; EVANS, H. H.; ANTUNEZ, A. R. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 21, p. 5993-5996, 1991.
- ORTH, K.; RUCK, A.; STANESCU, A.; BERGER, H. Intraluminal treatment of inoperable oesophageal tumors by intralesional photodynamic therapy with methylene blue. **Lancet**, v. 345, p. 519-520, 1995.
- PARHAR, R. S.; LALA, P. K. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumour development: 2. The mechanism of suppression of NK activity. **Cellular Immunology**, v. 93, p. 265-279, 1985.

PARRISH, J. A.; FITZPATRICK, T. B.; TENENBAUM, L.; PATHAK, M. A. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxalen and longwave ultraviolet light. **New England Journal of Medicine**, v. 291, p. 1207-1211, 1974.

PENNING, L. C.; LAGERBERG, J. W.; VAN-DIERENDONCK, J. H.; DUBBELMAN, T. M.; VAN-STEVENINCK, J. The role of DNA damage and inhibition of poly(ADP-ribose)ylation in loss of clonogenicity of murine L929 fibroblasts, caused by photodynamically induced oxidative stress. **Cancer Research**, v. 54, n. 21, p. 5561-5567, 1994.

PESTON, A. E.; LEACH, M. W.; HIGGINS, R. J. Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 8, p. 1261-1265, 1993.

PREMIO NOBEL, 2013. **Nobel prize in physics 1921**: Albert Einstein, 2012. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1921/einstein.html>. Acessado em: 14 dez. 2012.

PREMIO NOBEL, 2013. **Nobel prize in physiology or medicine 1903**: Niels Ryberg Finsen, 2013. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/finsen.html>. Acessado em: 16 jan. 2013.

RIBEIRO, S. M.; ZECELL, D. M. Laser de baixa intensidade. In: GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C. P. **A Odontologia e o Laser**. 4. ed. São Paulo: Ed. Quintessence, 2004. cap. 5, p. 217-237.

RIEF, J.S. The epidemiology and incidence of cancer. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. cap. 4, p. 68-76.

ROBERTS, W. G.; KLEIN, M. K.; LOOMIS, M.; WELDY, S.; BERNS, M. W. Photodynamic therapy of spontaneous cancers in felines, canines, and snakes with chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 83, n. 1, p. 18-23, 1991.

SANFORD, B. H., KOHN, H. I., DALY, J. J.; SOO, S. F. Long-term spontaneous tumor incidence in neonatally thymectomized mice. **Journal of Immunology**, v. 110, p. 1437-1439, 1973.

SCHREIBER, R. D., DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 991-998, 2002.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MARQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, p. 111-115, 2000.

SELLERS, R.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 751-755, 2007.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A. T.; WHITE, M.; SWANSON, P. E.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. IFN- γ and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, p. 1107-1111, 2001.

SPIKEST, J. D. Historical review photodynamic action: from paramecium to photochemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, p. 142-147, 1997.

STUTMAN, O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. **Science**, v. 183, p. 534-536, 1974.

SUBIZA, J. L.; COLL, J.; ALVAREZ, R.; VALDIVIESO, M.; DE-LA-CANCHA, E. IgM response and resistance to ascites tumor growth. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 25, p. 87-92, 1987.

TARDIVO, J.; PASCHOAL, L.; BAPTISTA, M. New photodynamic protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 528-531, 2006.

TARDIVO, J.; PASCHOAL, L.; ITO, A.; BAPTISTA, M. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 345-346, 2004.

THOMA, R. E. Photodynamic therapy. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. (Ed.). **Clinical veterinary oncology**. Philadelphia: JB Lippincott Co. 1989. p. 124-127.

THOMAS, L. On immunosurveillance in human cancer. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 55, p. 329-333, 1982.

URBAN, J. L.; HOLLAND, J. M.; KRIPKE, M. L.; SCHREIBER, H. Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 156, p. 1025-1041, 1982.

UYTTENHOVE, C; VAN-SNICK, J.; BOON, T. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 1175-1183, 1980.

VALADARES, M. C.; KLEIN, S. I.; GUARALDO, A. M. A.; QUEIROZ, M. L. S. Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, p. 191-196, 2003.

VAN-DEN-BROEK, M. F.; KAGI, D.; OSSENDORP, F.; TOES, R.; VAMVAKAS, S.; LUTZ, W. K.; MELIEFFL, C. J. M.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 1781-1790, 1996.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 13-28, 1998.

WEBBER, J.; LUO, Y.; CRILLY, R.; FROMM, D.; KESSEL, D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 35, n. 3, p. 209-211, 1996.

WEIBEL, W. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of Cell Biology**, v, 30, p. 23-38, 1966.

WILLIAMS, J. L.; STAMP, J.; DEVONSHIRE, R.; FOWLER, G. J. Methylene blue and photodynamic therapy of superficial bladder cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 4, n. 2, p. 229-232, 1989.

WITHROW, S. J. Surgical Oncology. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Withrow and MacEwen's Small animal clinical oncology**. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. cap. 10, p. 157-162.

WHO. **Fact sheet number 297: cancer**, 2012. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>> . Acessado em: 14 dez. 2012.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of laboratory animal management and welfare**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2003. 166 p.

YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, p. 115-123, 2006.

ZEZELL, D. M. **Hematoporfirinas e derivados: propriedades ópticas e terapia fotodinâmica de câncer**. 1987. 91 f. Dissertação (Mestrado em física) – Instituto de física “Gleb wathaghin”, Universidade estadual de campinas, Campinas, 1987.

ZEZELL, D. M. **Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores**. 1991. 138 f. Tese (Doutorado em física) – Instituto de física “Gleb wathaghin”, Universidade estadual de campinas, Campinas, 1991.

ZIMMERMANN, V. S.; BENIGNI, F.; MONDINO, A. Immune surveillance and anti-tumor immune responses: an anatomical perspective. **Immunology Letters**, v. 98, p. 1-8, 2005.