MURILO PENTEADO DEL GRANDE

Produção de vacinas antitumorais utilizando a Terapia Fotodinâmica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2019

MURILO PENTEADO DEL GRANDE

Produção de vacinas antitumorais utilizando a Terapia Fotodinâmica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

Versão original.

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor

Del Grande, Murilo Penteado

Produção de vacinas antitumorais utilizando a
Terapia Fotodinâmica / Murilo Penteado Del Grande;
orientadora Maria Lúcia Zaidan Dagli. -- São Paulo,
2019.

128 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Azul de metileno. 3.
melanoma. 4. Imunoterapia. 5. Câncer. I. Zaidan
Dagli, Maria Lúcia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

Candidato: Murilo Penteado Del Grande

Título da Tese: Produção de Vacinas Antitumorais Utilizando a Terapia Fotodinâmica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

A comissão julgadora dos de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ____/____/_____, considerou

() Aprovado

() Reprovado

Examinado(a)r: Assinatura.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinado(a)r: Assinatura.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinado(a)r: Assinatura.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinado(a)r: Assinatura.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinado(a)r: Assinatura.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura.....

Nome:.....

Instituição:.....

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção de vacinas antitumorais Utilizando a Terapia Fotodinâmica", protocolado sob o CEUA nº 2434230215, sob a responsabilidade de **Maria Lucia Zaidan Dagli** e equipe; **Murilo Penteado Del Grande** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/10/2015.

We certify that the proposal "Production of antineoplastic vaccines using photodynamic therapy.", utilizing 80 Isogenics mice (80 males), protocol number CEUA 2434230215, under the responsibility of **Maria Lucia Zaidan Dagli** and team; **Murilo Penteado Del Grande** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/13/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/07/1** a **31/12/1**

Área: **Patologia**

Procedência: **Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **80**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **a**

Resumo: A terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy - PDT) é um método de tratar neoplasias aprovado para uso clínico em diversos países no tratamento de cânceres esofágicos e brônquicos, além de malignidades pré-invasivas e invasivas da cavidade oral, estômago, bexiga, mamas e pele. O mecanismo de ação da PDT é 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. A característica peculiar da PDT em estimular a imunidade vem sendo explorada para a produção de vacinas antitumorais, onde lisados de células ou o sobrenatante contendo variados mediadores inflamatórios e antígenos específicos são produzidos in vitro através da PDT e aplicados nos animais de forma profilática ou terapêutica. Diversos protocolos experimentais com variados fotossensibilizantes, regimes de iluminação, quantidades de células utilizadas, aplicação a distância ou no foco tumoral já foram exploradas, mostrando ser a técnica bastante promissora como adjuvante no tratamento das neoplasias. O presente trabalho visa o desenvolvimento de um protocolo de produção de vacinas antitumorais com o uso da PDT, utilizando fonte de luz laser de fabricação nacional, associado à fotossensibilizante de custo acessível e disponível no mercado Brasileiro.

Local do experimento:

São Paulo, 29 de julho de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. A Fé nos presenteia com um propósito e é Ele que nos permite perseverar mesmo diante do impossível

Agradeço aos meus pais Álvaro Del Grande Filho e Lydia Renata Penteado Del Grande. Suas vidas de esforços, dedicação e trabalho me permitiram vivenciar oportunidades únicas, as quais palavras nunca serão o suficiente para agradecer. O seu exemplo de caráter, honestidade e companheirismo são fonte de inspiração para me tornar um ser humano melhor a cada dia.

Agradeço a minha amada esposa Carolina de Lara Shecaira. Seu incrível companheirismo, suas palavras que me acalmam e seu esforço máximo em dar-me todo o apoio na confecção deste trabalho são evidências claras do quão afortunado sou por tê-la ao meu lado.

Agradeço aos meus irmãos Heitor Penteado Del Grande e Mariana Penteado Del Grande Moré. A vida os escolheu como meus irmãos, eu os escolhi como amigos.

Agradeço a toda a minha família, em especial as minhas avós Maria Jose Sanches e Pascoalina Del Grande e seus falecidos esposos, Francisco Penteado e Álvaro Del Grande.

Agradeço a Kaya, minha querida amiga canina, falecida durante a confecção deste trabalho e que deixou muitas saudades. Obrigado por ter iluminado minha vida, Kaya.

Agradeço do fundo de meu coração a minha querida orientadora Professora Maria Lucia Zaidan Dagli. Sem seus ensinamentos, sua dedicação e sua total confiança no meu potencial nada disso poderia ter sido possível. Muito obrigado por acreditar em mim.

Agradeço ao Programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia – USP – I. Butantan - IPT e a comissão de pós-graduação por todo apoio.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada Jonathan Mackowiak da Fonseca, Ivone Izabel Mackowiak da Fonseca, Márcia Kazumi Nagamine, Gabriela Fernandes de Toledo, Diego Pinha Alves da Paz, Tatícia Ikeda e Daniel Soares Sanches. Em especial para Andréa Midory Myiake por todo companheirismo e amizade.

Agradeço a Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, assim como o departamento de patologia, por disponibilizar toda infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

Agradeço aos professores Bruno Cogliati e Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes pela atenção e ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização do presente trabalho - Código de Financiamento 001.

RESUMO

DEL-GRANDE, M. P. **Produção de Vacinas Antitumorais Utilizando a Terapia Fotodinâmica**. 2019. 128f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

A terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy - PDT) é um método de tratar neoplasias aprovado para uso clínico em diversos países. Seu mecanismo de ação baseia-se na interação entre luz, oxigênio molecular e um agente fotossensibilizante. A característica singular da PDT é a capacidade de induzir resposta imunológica adaptativa contra recidivas tumorais e/ou metástases, determinando uma resposta específica, de longo prazo, para a neoplasia tratada. O presente estudo teve o objetivo de desenvolver um novo tratamento adjuvante para o melanoma baseando-se nos efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre o sistema imunológico. Como objetivos específicos, o estudo visa estabelecer um protocolo de coleta e processamento de amostras de melanoma murino B16 -F10 e serem tratadas *in vitro* com a terapia fotodinâmica, baseada no Azul de Metileno (AM) e Laser vermelho, produzindo assim a vacina e testar a sua eficácia para imunização de camundongos contra o melanoma B16-F10 e testar sua eficácia para o tratamento de melanoma B16-F10 em camundongos. Três experimentos foram realizados sequencialmente, os quais estão organizados em 3 capítulos. No primeiro experimento (**CAPÍTULO 2**) são abordados os procedimentos *in vitro* realizados para, utilizando a PDT-AM, ser obtido o lisado de células do melanoma B16-F10, contendo variados antígenos tumorais e DAMPs (do inglês: Damage Associated Molecular Patterns), podendo assim ser utilizado como uma vacina terapêutica. Com este propósito foram realizados diversos protocolos onde se variou a concentração do AM, assim como a dose de energia com o qual as células foram irradiadas com o laser, sendo então realizadas diversas técnicas analíticas para a interpretação dos resultados e determinação do protocolo mais apropriado. Demonstrou-se que a PTD-AM tem efeito antineoplásico *in vitro* nos melanomas murinos B16-F10, reduzindo a viabilidade celular e induzindo a morte por apoptose, que aumenta de forma diretamente proporcional à concentração do agente fotossensibilizante e a dose de energia irradiada. A PDT-AM é um método promissor no tratamento do melanoma maligno, sendo as concentrações do AM e as doses de energia aqui estabelecidas servindo de base para futuros estudos. Ademais, concluiu-se que a dose de 2 µg/ml do azul de metileno associado a irradiação do laser com dose de energia em 100,8 J, é o regime de tratamento ótimo, onde há cerca de 50% de células em morte celular por apoptose e com um índice de viabilidade celular após 24h de menos de 20%, para produção do lisado

tumoral a ser utilizado como vacina terapêutica. No segundo experimento (**CAPÍTULO 3**) foram avaliados os efeitos da imunização com lisado de células do melanoma B16-F10, produzido *in vitro* com a PDT-AM, sobre a progressão do volume do melanoma B16-F10 em camundongos. Avaliou-se também os efeitos da imunização com lisado de células do melanoma B16-F10 sobre os órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo), e sobre a população de linfócitos T CD3+ dos órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo). Como resultados, demonstrou-se a capacidade imunogênica de lisados de células tumorais da linhagem de melanoma murino B16-F10 produzidos *in vitro* com a PDT-AM, assim como dos lisados produzidos por congelamento. A aplicação do lisado antes da inoculação tumoral foi capaz de atenuar, atrasar e, em parte dos animais, impedir a progressão do melanoma B16-F10 em camundongos BALB/c, além de induzir alterações em baço e linfonodo regional, caracterizando resposta por linfócitos T contra as células neoplásicas. Já no terceiro experimento (**CAPÍTULO 4**), buscou-se estudar o efeito do lisado de células do melanoma B16-F10, removido parcialmente por cirurgia, após inoculação em camundongos C57 BL/6, como vacina antitumoral terapêutica. Da mesma forma, avaliaram-se os efeitos do lisado de células tumorais sobre a progressão tumoral e sobre os órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo) e sobre a população de linfócitos T CD3+ nos órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo). Como resultados, demonstrou-se a capacidade imunogênica de lisados de células do melanoma B16-F10, removido parcialmente por cirurgia, após inoculação em camundongos C57 BL/6, para então ser submetido, *in vitro*, a PDT-AM, assim como dos lisados produzidos por congelamento. A aplicação do lisado como vacina terapêutica foi capaz de atenuar a progressão do melanoma B16-F10 nestes camundongos, além de induzir alterações em baço e linfonodo regional, caracterizando resposta por linfócitos T contra as células neoplásicas. Em conclusão, o presente trabalho utilizou a terapia fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho para produzir lisado de células tumorais do melanoma murino B16-F10, sendo este lisado utilizado para indução de resposta imunológica antitumoral específica. Os resultados encontrados mostram que a técnica foi capaz de gerar efeitos sobre o sistema imunológico, sendo capaz de, ao menos, atenuar a velocidade de progressão do melanoma B16-F10 em camundongos.

Palavras chave: Terapia fotodinâmica. Azul de metileno. Melanoma. Imunoterapia. Oncologia veterinária.

ABSTRACT

DEL-GRANDE, M. P. **Producing Antitumor Vaccines with Photodynamic Therapy** **Produção de Vacinas Antitumorais Utilizando a Terapia Fotodinâmica**. 2019. 128p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Photodynamic Therapy (PDT) is a method of treating neoplasms approved for clinical use in several countries. Its mechanism of action is based on the interaction between light, molecular oxygen and a photosensitizing agent. The unique feature of PDT is the ability to induce an adaptive immune response against tumor recurrence and / or metastasis, determining a long-term, specific response to the treated neoplasm. The present study aimed to develop a new adjuvant treatment for melanoma based on the effects of Photodynamic Therapy on the immune system. As specific objectives, the study aims to establish a protocol for the collection and processing of B16-F10 murine melanoma samples to be treated *in vitro* with photodynamic therapy based on Methylene Blue (MB) and Red Laser, obtaining a vaccine and then test the vaccine's efficacy for the immunization of mice against B16-F10 melanoma and to test the vaccine's efficacy for the treatment of B16-F10 melanoma in mice. Three experiments were performed sequentially, which are organized in 3 chapters. In the first experiment (**CHAPTER 2**) the procedures performed for the use of PDT-MB, producing the lysate of B16-F10 melanoma cells containing various tumor antigens and DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) and can therefore be used as a therapeutic vaccine. For this purpose, several protocols were performed in which the concentration of MB was varied, as well as the dose of energy with which the cells were irradiated with the laser, and several analytical techniques were performed for the interpretation of results and determination of the most efficient and appropriate protocol. PTD-MB has been shown to have an antineoplastic effect *in vitro* on murine B16-F10 melanomas, reducing cell viability and inducing death by apoptosis, which increases directly proportional to the concentration of the photosensitizing agent and the dose of irradiated energy. PDT-MB is a promising method in the treatment of malignant melanoma, with MB concentrations and energy doses being established as the basis for future studies. In addition, it was concluded that the dose of 2 µg / ml of methylene blue associated with laser irradiation with energy dose at 100.8 J is the optimal treatment regimen, where there are about 50% cells in cell death by apoptosis and with a cell viability index after 24h of less than 20%, for the production of the tumor lysate to be used as a therapeutic vaccine. In the second experiment (**CHAPTER 3**) the effects of immunization with lysate of

B16-F10 melanoma cells, produced *in vitro* with PDT-MB, on the progression of melanoma volume B16-F10 in mice. The effects of immunization with B16-F10 melanoma cell lysate on the organs of the immune system (Spleen and Lymph Node), and on the population of CD3 + T lymphocytes of the organs of the immune system (Spleen and Lymph Node) were also evaluated. As results, the immunogenicity of tumor cell lysates from the murine melanoma line B16-F10 produced *in vitro* with PDT-MB, as well as lysates by freeze-thaw. The lysate application prior to tumor inoculation was able to attenuate, delay and, in part of the animals, prevent the progression of B16-F10 melanoma in BALB/c mice, in addition to inducing changes in spleen and regional lymph node, characterizing response by T lymphocytes against neoplastic cells. In the third experiment (**CHAPTER 4**), we aimed to study the effect of B16-F10 melanoma cell lysate, partially removed by surgery, after inoculation in C57BL/6 mice, as a therapeutic antitumor vaccine. Likewise, the effects of tumor cell lysate on tumor progression and on the organs of the immune system (Spleen and Lymph Node) and on the CD3 + T lymphocyte population in the organs of the immune system (Spleen and Lymph Node) were evaluated. As results, it was demonstrated the immunogenic capacity of B16-F10 melanoma cell lysates, partially removed by surgery, after inoculation in C57BL/6 mice, and subjected to *in vitro* PDT-MB, as well as lysates by produced by freeze and thaw cycles. The lysate application as a therapeutic vaccine was able to attenuate the progression of B16-F10 melanoma in these mice, in addition to inducing changes in spleen and regional lymph node, characterizing response by T lymphocytes against neoplastic cells. In conclusion, the present work used photodynamic therapy based on Methylene Blue and Diode Laser emitting red spectrum to produce lysate of murine melanoma B16-F10 tumor cells, this lysate being used to induce specific antitumor immune response. The results show that the technique was able to generate effects on the immune system, being able to at least mitigate the rate of progression of B16-F10 melanoma in mice.

Key-words: Photodynamic Therapy. Methylene Blue. Melanoma. Immunotherapy. Veterinary oncology.

SUMÁRIO

CAPITULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS.....	15
1.1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1.1 Câncer: Medicina humana e veterinária compartilhando o mesmo problema.....	15
1.1.2 O melanoma oral nos cães.....	16
1.1.3 A terapia fotodinâmica.....	17
1.1.3.1 A fonte de luz laser: Dose de energia.....	18
1.1.3.2 A reação fotodinâmica.....	19
1.1.3.3 A terapia fotodinâmica e o sistema imunológico.....	20
1.1.3.4 Efeitos adversos.....	22
1.1.3.5 A terapia fotodinâmica na medicina veterinária: Bons resultados clínicos, mas limitados resultados práticos.....	22
1.1.3.6 O azul de metileno como fotossensibilizante.....	23
1.1.4 As vacinas antitumorais produzidas com a PDT.....	24
1.1.5 O melanoma murino B16-F10 como modelo de estudo.....	27
1.2 OBJETIVOS GERAIS.....	29
1.2.1 Objetivos específicos.....	29
 CAPITULO 2 – PRODUÇÃO DA VACINA ANTITUMORAL: PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DE LISADO TUMORAL PELA PDT.....	 30
2.1 INTRODUÇÃO.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.3.1 Manuseio e manutenção do melanoma murino B16-F10.....	32
2.3.2 Tratamento com a terapia fotodinâmica.....	32
2.3.3 Teste de viabilidade com azul de Trypan.....	33
2.3.4 Determinação da taxa de viabilidade celular pela técnica do MTT.....	34
2.3.5 Microscopia óptica em contraste de fase.....	34
2.3.6 Determinação da morte celular por microscopia de fluorescência: Laranja de acridina e brometo de etídio.....	35

2.3.7	Avaliação da indução de apoptose por imunofluorescência: Anexina V....	38
2.3.8	Determinação da taxa de apoptose por citometria de fluxo.....	38
2.3.9	Análise estatística.....	39
2.4	RESULTADOS.....	40
2.4.1	Teste de viabilidade com azul de Trypan: Variando concentrações do azul de metileno e/ou doses de energia irradiada.....	40
2.4.1.1	Variando concentrações de azul de metileno.....	40
2.4.1.2	Variando doses de energia irradiada e distância focal do feixe de laser.....	42
2.4.1.3	Variando a dose de energia irradiada.....	43
2.4.1.4	Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno....	44
2.4.2	Determinação da taxa de viabilidade celular pela técnica do MTT: Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno.....	46
2.4.3	Microscopia óptica em contraste de fase: Estudo das alterações morfológicas.....	50
2.4.4	Determinação da morte celular por microscopia de fluorescência: Laranja de acridina e brometo de etídio.....	54
2.4.4.1	Estudo das alterações morfológicas.....	54
2.4.4.2	Taxas de necrose e apoptose: Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno.....	56
2.4.5	Avaliação da indução de apoptose por imunofluorescência: Anexina V....	63
2.4.6	Determinação da taxa de apoptose por citometria de fluxo: Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno.....	65
2.5	DISCUSSÃO.....	68
2.6	CONCLUSÃO.....	72

CAPITULO 3 – UTILIZAÇÃO DA VACINA ANTITUMORAL: MODELO ANIMAL DE IMUNIZAÇÃO CONTRA O MELANOMA B16-F10.....73

3.1	INTRODUÇÃO.....	73
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
3.3.1	Delineamento experimental: Modelo animal de imunização.....	75
3.3.2	Animais.....	75
3.3.3	Melanoma murino B16-F10 in vivo: Modelo imunogênico.....	76

3.3.4	Produção do lisado tumoral com a PDT.....	76
3.3.5	Produção do lisado tumoral por congelamento.....	77
3.3.6	Eutanásia e coleta de material biológico.....	77
3.3.7	Análise histopatológica.....	77
3.3.8	Análise imuno-histoquímica dos linfócitos.....	78
3.3.9	Análise estatística.....	78
3.4	RESULTADOS	79
3.4.1	Progressão do volume tumoral.....	79
3.4.2	Peso relativo do baço.....	81
3.4.3	Peso relativo do linfonodo regional (inguinal).....	81
3.4.4	Análise histopatológica.....	82
3.4.4.1	Análise tumoral.....	82
3.4.4.2	Análise do baço.....	84
3.4.4.3	Análise imuno-histoquímica dos linfócitos do baço.....	86
3.4.4.4	Análise linfonodo regional (inguinal).....	88
3.4.4.5	Análise imuno-histoquímica dos linfócitos do linfonodo regional (inguinal).....	88

CAPITULO 4 – UTILIZAÇÃO DA VACINA ANTITUMORAL: MODELO ANIMAL DE TRATAMENTO CONTRA O MELANOMA B16-F10.....92

4.1	INTRODUÇÃO	92
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	93
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	94
4.3.1	Delineamento experimental: Modelo animal de tratamento.....	94
4.3.2	Animais.....	94
4.3.3	Melanoma murino B16-F10 in vivo: Modelo não imunogênico.....	95
4.3.4	Procedimento cirúrgico para excisão tumoral e pós cirúrgico.....	95
4.3.5	Processamento dos fragmentos tumorais para produção do lisado tumoral.....	96
4.3.6	Produção do lisado tumoral com a PDT.....	97
4.3.7	Produção do lisado tumoral por congelamento.....	98
4.3.8	Eutanásia e coleta de material biológico.....	98
4.3.9	Análise histopatológica.....	99
4.3.9.1	Morfometria.....	99

4.3.10	Análise imuno-histoquímica dos linfócitos.....	100
4.3.11	Análise estatística.....	100
4.4	RESULTADOS.....	101
4.4.1	Progressão do volume tumoral.....	101
4.4.2	Avaliação linfonodo regional (inguinal).....	102
4.4.3	Peso relativo do linfonodo regional.....	104
4.4.4	Peso relativo do baço.....	105
4.4.5	Análise histopatológica.....	105
4.4.5.1	Análise tumoral.....	105
4.4.5.1.1	<i>Morfometria áreas de necrose.....</i>	<i>107</i>
4.4.5.2	Análise do baço.....	108
4.4.5.3	Análise imuno-histoquímica dos linfócitos do baço.....	108
4.4.5.4	Análise linfonodo regional (inguinal).....	110
4.4.5.5	Análise imuno-histoquímica dos linfócitos do linfonodo regional (inguinal).....	112
 CAPITULO 5 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO DOS CAPITULOS 3 E 4.....		115
5.1	DISCUSSÃO.....	115
5.2	CONCLUSÕES CAPITULOS 3 E 4.....	120
5.2.1	Conclusões capítulo 3.....	120
5.2.2	Conclusões capítulo 4.....	120
5.3	CONCLUSÕES FINAIS.....	120
 REFERÊNCIAS.....		122

CAPITULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Câncer: Medicina humana e veterinária compartilhando o mesmo problema

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer é a segunda maior causa das mortes no mundo (Figura 1.1), sendo responsável por uma em cada seis mortes. Em 2018, 9,6 milhões de pessoas morreram de câncer (WHO, 2019).

No Brasil, o Instituto nacional do Câncer (INCA) aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer ao ano. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figuram entre os principais (INCA, 2018).

Na Medicina Veterinária, em se tratando dos animais de estimação, principalmente os cães e gatos, observamos nos últimos anos uma mudança de comportamento dos proprietários, que passaram a tratar seus animais como membros da família. Com isso, os cuidados com o bem estar e a saúde dos animais aumentaram, elevando sua expectativa de vida, e com isso a incidência de doenças crônicas e ligadas a senilidade são cada vez maiores na rotina dos médicos veterinários. Dentre estas doenças o câncer é de extrema importância e a literatura mostra que é a principal causa de morte, alcançando 13% das causas de óbito em animais de estimação (RIEF, 2012).

A medicina humana e a medicina veterinária compartilham o mesmo problema e com o avanço das técnicas de biologia molecular temos percebido que as semelhanças são ainda mais profundas. O sequenciamento do genoma canino realizado em 2005 revelou o alto grau de similaridade do DNA e diversas estruturas proteicas dos cães com os seres humanos (LINDBLAD-TOH et al., 2005), explicando a grande quantidade de anticorpos humanos que funcionam bem quando usados em cães para a determinação do diagnóstico e prognóstico de malignidades. É também consenso a similaridade da evolução clínica e características histopatológicas encontradas entre as duas espécies (SIMPSON et al. 2013) e com isso, surge a oportunidade de medicina humana e veterinária trabalharem em conjunto, com estudos

clínicos pareados entre as espécies nos tipos tumorais similares, podendo ser feita a tradução de métodos de tratamento, diagnóstico ou de conceitos etiológicos, acelerando o desenvolvimento tecnológico e otimizando o tratamento dos pacientes (PAOLONI; KHANNA, 2008; WEYDEN et al., 2015).

Figura 1.1 – Taxas de mortalidade pelo câncer padronizada pela idade (Mundo)

Fonte: WHO (2019).

1.1.2 O melanoma oral nos cães

Figura 1.2 – Fotografia do melanoma oral melânico em cão

Fonte: Del-Grande (2019).

Os melanomas são tumores malignos originários dos melanócitos, sendo extremamente agressivos e metastáticos, além de pouco responsivo aos métodos de tratamento atuais. São os tumores malignos mais frequentes na cavidade oral dos cães, sendo o quarto tipo tumoral mais frequentemente encontrado (MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999; DOBSON, 2013). Os melanomas orais caninos são caracterizados por importante invasão local, com acometimento dos ossos acontecendo em 57% das lesões. As metástases

são comuns, podendo ocorrer já em estágios iniciais, acometendo linfonodos regionais e órgãos distantes, principalmente o pulmão. Macroscopicamente (Figura 1.2) são encontrados melanomas uni ou multi lobulados, com diâmetro variando de 1 a 10cm, de coloração marrom a negra (ou rósea nos amelanicos) e normalmente ulcerados. (RAMOS-VARA et al., 2000).

Os melanócitos são células dendríticas da camada basal da epiderme, sendo cercados por queratinócitos, aderidos uns aos outros pelas proteínas adesivas E-caderinas, que normalmente exercem controle sobre a proliferação dos melanócitos. O possível mecanismo de malignização do melanoma é o escape desta relação íntima com os queratinócitos, onde a quebra da homeostase pode levar a proliferação contínua dos melanócitos, que evadem o controle dos queratinócitos e podem assim invadir os tecidos adjacentes com a degradação da matrix extracelular pelas metaloproteinases. Os melanomas têm como principal característica biológica a capacidade de produzir melanina, sendo esta produção regulada pela enzima tirosinase. Entretanto os melanomas possuem dois fenótipos quanto a presença de melanina, havendo os tumores melânicos e os amelanicos (onde não há melanina), sendo este segundo com diagnóstico um pouco mais complexo, dependente da busca por marcadores moleculares específicos (como Melanina-A e PNL2) (MAGRO; CROWSON; MIHM, 2006).

O tratamento do melanoma oral nos cães é baseado principalmente na excisão cirúrgica em bloco da formação tumoral, que pela capacidade de invasão e acometimento ósseo, tornam a cirurgia muitas vezes extremamente mutilante, podendo em alguns casos mais avançados, ou dependendo da proximidade com órgãos vitais, não ser possível de ser realizada. O controle local com radioterapia é uma possibilidade, mas no Brasil está ainda pouco disponível. O tratamento de neoplasias já disseminadas, ou a prevenção de recidivas e metástases utilizando-se drogas antineoplásicas citotóxicas tem sido usado, porém sem a observação de uma real extensão nas taxas de sobrevida (BERGMAN; KENT; FARESE, 2013). Tendo isso em vista, o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento para o melanoma oral canino é um campo importante a ser explorado, sendo este tipo tumoral a inspiração para o desenvolvimento do presente trabalho.

1.1.3 A terapia fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (PDT – do inglês: Photodynamic Therapy) é um método de tratamento de neoplasias baseado na interação entre um agente fotossensibilizante, a luz e o oxigênio molecular. Existem inúmeros tipos de agentes fotossensibilizantes que podem ser administrados pelas vias endovenosa, oral ou tópica. A iluminação do tumor com luz visível

de comprimento de onda específico (obtida geralmente de equipamentos de Laser, e mais recentemente LED), 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 à destruição do tecido tumoral (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Além dos efeitos diretos, a PDT ainda apresenta importante e bastante singular efeito sobre o sistema imunológico, induzindo a uma resposta imunológica adaptativa que atua contra as células tumorais remanescentes e/ou metastáticas, produzindo um controle em longo prazo da proliferação tumoral, resultando em maiores tempos para recidivas e tempo de sobrevida dos pacientes (GOMER; FERRARIO; MURPHREE, 1987; KORBELIK, 1996; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

Nesta seção serão revisados os aspectos relevantes do mecanismo de ação, funcionamento e uso da PDT.

1.1.3.1 A fonte de luz laser: Dose de energia

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 eletronsVolts (eV). A quantidade de energia em um fóton varia conforme o comprimento de onda (λ), medido em nanômetros (nm), e sua frequência de oscilações por segundo (f), medida em Hertz (Hz) (RIBEIRO; ZEZELL, 2004).

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) de forma que, quando direcionado 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. 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. 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. 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).

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 (MORITZ, 2006).

Para a realização da PDT, são utilizados os lasers de baixa intensidade com potência de alguns miliWatts por centímetro quadrado (mW/cm^2), 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 (na terapia com laser de baixa potência) ou exógenos (utilizados para a PDT) (RIBEIRO; ZEZELL, 2004).

Os equipamentos de laser 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/ cm^2) e o tempo de irradiação. Mantendo-se a mesma dose, e variando a intensidade ou o tempo de exposição, podem-se obter diferentes resultados (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). 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.

1.1.3.2 A reação fotodinâmica

Na PDT, a energia dos fótons, do feixe de luz emitido pelo laser, é transmitida para as moléculas do agente fotossensibilizante (S) provocando uma transição eletrônica ao estado singleto 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 relativa longa duração, ocorrendo assim um dos dois tipos de reação possíveis (RIBEIRO; ZEZELL, 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 (3O_2), produzindo o altamente reativo oxigênio singleto (1O_2). 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; ZEZELL, 2004; CALIN; PARASCA, 2006).

Reação do tipo I:

Reação do tipo II:

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 (CALIN; PARASCA, 2006).

Os efeitos diretos da PDT ocorrem principalmente devido à 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 a sua alta reatividade. A morte celular se dá pela oxidação nas células tumorais em termos subcelulares, ou seja, nas proximidades de onde se encontra a substância fotossensibilizante na célula (núcleo, organelas, membrana citoplasmática, mitocôndria, etc) (MOAN; BERG, 1991).

1.1.3.3 A terapia fotodinâmica e o sistema imunológico

A característica singular da PDT no tratamento de neoplasias é a participação ativa do sistema imunológico no combate às células tumorais. Desde a década de 80 quando estudos sobre a utilização clínica da PDT baseada nos derivados das hematoporfirinas (HPD) eram realizados no tratamento dos carcinomas de vesícula urinária, percebeu-se a possível ativação do sistema imunológico como mecanismo importante da técnica. Shumaker e Hetzel (1987)

descreveram a infiltração de linfócitos e macrófagos em tecidos tratados, além da presença de citocinas inflamatórias na urina dos pacientes.

Na década de 1990, o grupo de Thomas Dougherty do Roswell Park Memorial Institute, responsável pela primeira patente e aprovação da PDT-HPD pelo FDA (do inglês: Food and Drug Administration) para uso clínico, iniciou a investigação sobre os efeitos da PDT sobre o sistema imunológico ao observar indícios da produção de resposta imune adaptativa antitumoral, pela observação de cura em longo prazo em modelos animais. O grupo realizou 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 obteve ablação total dos tumores, mas não produziu a cura em logo prazo. Quando células do baço (uma mistura de linfócitos T CD4+, CD8+, B, NK e monócitos) ou o transplante de medula óssea era realizado dos animais BALB/c para os animais SCID (do inglês: 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 linfoides nos efeitos secundários da PDT (KORBELIK et al., 1996).

Atualmente, os mecanismos moleculares de indução da uma resposta imunológica adaptativa, determinando uma resposta específica contra a neoplasia tratada com a PDT, apesar de não completamente esclarecidos, tem como principais atores as chamadas DAMPs (do inglês: Damage Associated Molecular Patterns), principalmente as proteína de choque térmico 70 (HSP70) (KORBELIK; SAN; CECIC, 2005; MERCHANT; KORBELIK, 2010). As DAMPs são compostas por uma grande variedade de moléculas, como a HSP70, a calreticulina, a HMGB1 (do inglês: High-Mobility Group Box 1), produtos da degradação do sistema complemento, entre outros. Normalmente localizadas no ambiente intracelular, são transferidas para o ambiente extracelular nas células que sofrem algum tipo de dano indutor de morte celular iminente, provocando um efeito de estímulo e modulação imunológica quando se ligam em receptores de membrana das células do sistema imunológico. A diversidade das DAMPs esta ligada ao tipo de morte celular, tipo celular e do tecido que sofre a injúria (RUBARTELLI; LOTZE, 2007).

Sendo assim, os efeitos fototóxicos do tratamento com a PDT, provocando a liberação das DAMPs leva 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 liberação de antígenos tumorais para as células dendríticas (DC) e demais células apresentadoras de antígenos (APC). A apresentação

antigênica promove ativação do sistema imune adaptativo e há a sensibilização dos linfócitos T efetores, 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 pode ser sugerida, porém ainda não demonstrada em modelo experimental (GOMER; FERRARIO; MURPHREE, 1987; KORBELIK, 1996; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

1.1.3.4 Efeitos adversos

Os efeitos adversos encontrados com o uso da PDT estão relacionados com as qualidades químicas do agente, a concentração de fotossensibilizante utilizado, com a dose de energia irradiada e com o tecido em que foi aplicado. O efeito adverso mais descrito é a fotossensibilidade prolongada, podendo provocar lesões cutâneas ulcerativas. Além disso, foram relatados efeitos como náusea, vômito e alterações de enzimas hepáticas de caráter transitório em pacientes recebendo agentes de aplicação sistêmica. O tratamento de lesões de pele pode causar também ardência e prurido (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

1.1.3.5 A Terapia fotodinâmica na medicina veterinária: Bons resultados clínicos, mas limitados resultados práticos

Na Medicina Veterinária, o início do uso da PDT no tratamento do câncer foi contemporâneo aos primeiros testes clínicos em humanos, nas décadas de 1980-90. Os estudos iniciais eram justificados pela busca de modelos animais para estudar a PDT nos seres humanos (LUCROY et al., 1996). Há diversos trabalhos pontuais descrevendo o uso da PDT em pacientes veterinários nos mais variados tipos tumorais. Os relatos também variam bastante quanto ao tipo de fotossensibilizante utilizado, a sua concentração e via de administração. Existe ainda uma grande variabilidade na fonte de luz utilizada e a dose de energia irradiada.

Todos esses fatores tornam a padronização dos protocolos difícil, porém os resultados clínicos descritos são positivos para diversos tipos tumorais, como: carcinomas de células escamosas, osteosarcoma, carcinoma oral, melanoma, mastocitoma, fibrosarcoma, carcinomas de células de transição da bexiga, entre outros tipos tumorais. Além disso, os

trabalhos descrevem o uso de fotossensibilizantes variados, como: Derivados da hematoporfirina (HPD), Phthalocianina sulfonada de cloro-alumínio (CASPC), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbideo (HPPH), ácido 5-aminolevulínico (ALA), metilaminolevulínico (MEALA), entre outros (DOUGHERTY et al., 1981; CHELI et al., 1984, 1987; THOMA, 1989; MAGNE et al., 1997; LUCROY et al., 2003; EMILIO, 2008).

As melhores respostas encontradas foram nos tipos tumorais das superfícies epiteliais, como os carcinomas de pavilhão auricular e plano nasal dos felinos (EMILIO, 2008), ou naqueles tumores apresentando-se em estagio inicial, com diâmetros de até 2 cm (MAGNE et al., 1996), onde a penetração do laser é mais eficiente. Os relatos também afirmam a necessidade de mais de uma sessão de PDT, na maior parte dos casos, para a obtenção de uma boa resposta, onde ocorra a ablação total do tumor e a observação posterior da resposta imunológica contra o tumor, representada pela cura ou maiores tempos para recidivas e períodos de sobrevida.

A necessidade de realização de múltiplas sessões pode parecer benigna em se tratando de pacientes humanos, porém os pacientes veterinários precisam estar sob efeito de anestesia geral para a realização das sessões. Pacientes oncológicos em grande parte são animais em idade avançada, sendo comumente acometidos por outras condições crônicas associadas, com isso, a realização de múltiplos procedimentos anestésicos podem se apresentar como um risco maior que os benefícios. Além disso, o tratamento pode se tornar oneroso, inviabilizando que proprietários estejam dispostos a utilizar a terapia.

O que podemos constatar é que apesar dos resultados clínicos da PDT na medicina veterinária apresentarem sucesso para muitos tipos tumorais, com ablação tumoral estética e a indução de resposta imunológica e consequente controle de recidivas e prolongamento do tempo de sobrevida dos animais tratados, o seu uso ainda não se tornou amplamente utilizado na rotina dos médicos veterinários, sendo os efeitos adversos e as dificuldades na realização do tratamento uma possível explicação. O presente trabalho busca uma forma de explorar os efeitos no sistema imunológico tão amplamente relatados em literatura, sem o ônus dos efeitos adversos e das dificuldades encontradas para realizar o tratamento diretamente nos animais.

1.1.3.6 O azul de metileno como fotossensibilizante

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 (TARDIVO et al., 2005).

A localização intracelular do AM foi demonstrada em lisossomos, onde ocorre a liberação de suas enzimas após a irradiação da luz, e nas mitocôndrias, com efeitos na cadeia respiratória celular. O AM apresenta interessante capacidade para se ligar as moléculas de melanina e em células deste tipo tumoral se acumulam nos melanossomos (TARDIVO et al., 2005; LINK et al., 1989; RICE; WAINWRIGHT; PHOENIX, 2000)

A PDT com o AM como fotossensibilizante já foi descrita no tratamento clínico de diversos tipos de tumores. Williams et al. (1989) trataram carcinomas superficiais na bexiga, 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 se tratando de estudo in vitro, Lim et al. (2013) utilizaram diferentes concentrações do AM e diferentes regimes de iluminação em linhagens celulares de adenocarcinomas de pulmão humano e observaram a indução de apoptose, diminuição de proteínas antiapoptóticas, produção de espécies reativas de oxigênio, redução de potencial de membranas das mitocôndrias (MMP) e aumento da fosforilação da proteína quinase de ativação da mitose (MAPK). Os autores estabeleceram que a concentração de 2µg/ml de AM com a dose de 60J foi a mais eficiente em induzir a apoptose, produzir espécies reativas de oxigênio e induzir a maior citotoxicidade das células tumorais.

1.1.4 As vacinas antitumorais produzidas com a PDT

A Terapia Fotodinâmica tem sido utilizada na rotina clínica para o tratamento de pacientes humanos oncológicos desde meados da década de 1990. Diversos fotossensibilizantes e fontes de luz foram relatados e os resultados clínicos são promissores para diversos tipos de tumores, tanto nos pacientes humanos, quanto nos veterinários. Apesar dos benefícios encontrados, a utilização da PDT não alcançou uma maior popularidade e utilização ampla tanto na medicina humana quanto na veterinária, sendo a sua utilização nos animais de estimação bastante esporádica e em grande parte das vezes vinculada a algum estudo sendo realizado.

Como foi descrito nas seções anteriores deste trabalho, uma possível explicação para esse baixo uso seriam os efeitos adversos e as dificuldades na realização do tratamento, como

a fotossensibilização prolongada nos pacientes, a forma de iluminar os tumores não superficiais e o tempo de iluminação algumas vezes elevados, levaram a idealização de novas formas de explorar a PDT e a resposta imunológica produzida pela terapia.

O conceito se baseia em coletar um fragmento tumoral do paciente e trata-lo *in vitro*, induzindo as células tumorais a expressar e liberar as DAMPs, assim como uma grande miríade de antígenos tumorais específicos. Estas substâncias seriam então aplicadas nos pacientes promovendo a indução de uma resposta imunológica, semelhante ao processo que ocorre quando o paciente é tratado diretamente com a PDT porem, sem as adversidades usualmente encontradas (Figura 1.3).

Figura 1.3 – Esquema conceitual da produção e uso da vacina antitumoral com a PDT

Fonte: Del-Grande (2019).

Os primeiros a explorar tal conceito com estudos em modelos animais foram Gollnick, Vaughan e Henderson (2002). Utilizaram a linhagem celular do sarcoma mamário EMT6 de camundongos, tratando as células *in vitro* com a PDT baseada no Photofrin® como agente fotossensibilizante. Depois de 48 horas de incubação o sobrenadante do lisado tumoral foi recolhido e utilizado para imunizar os animais com 4 aplicações profiláticas com intervalos de 7 dias. Quando inoculados com as células tumorais os animais apresentaram proteção significativa contra o desenvolvimento do tumor, quando comparados aos animais controle (sem imunização) e de animais vacinados com lisado produzido por luz Ultra Violeta. Animais desafiados com outras linhagens tumorais não apresentaram proteção, mostrando o caráter específico da vacina.

No ano seguinte, Korbelyk e Cecic (2003) utilizaram uma linhagem de células tumorais menos imunogênicas (a semelhança das malignidades espontâneas) de carcinoma de células escamosas (CCE) da linhagem SCCVII. Também foi usado o Photofrin®, mas não utilizaram apenas o sobrenadante e sim o lisado completo, imediatamente após ser tratado

com a PDT e irradiado com dose letal de raios X. Outro aspecto diferente foi a utilização da vacina em animais já apresentando a formação tumoral, de forma terapêutica e não profilática, sendo a aplicação da vacina na região peritumoral. Houve diminuição significativa na progressão do crescimento tumoral quando comparado aos grupos controle de células apenas lisadas pelos raios X ou por três ciclos de congelamento em nitrogênio.

Em 2005, Korbelik e Sun trabalharam com a mesma linhagem tumoral (CCE SCCVII), porem utilizaram um fotossensibilizante diferente, que necessita um menor período de exposição das células antes de receberam a irradiação (1 hora, sendo do photofrin de 24 horas), o anel A do monoácido derivado da benzoporfirina (BPD). Imediatamente depois de iluminadas as células receberam dose letal de raios X e o lisado completo foi utilizado na vacinação. Neste estudo além de determinar a concentração de BPD mais eficiente, também determinaram que com 2×10^7 /ml seria o número ideal de células utilizadas na vacina.

Continuando os trabalhos com a mesma linhagem CCE SCCVII em camundongos Korbelik, Stott e Sun (2007) realizaram a excisão cirúrgica da formação tumoral dos animais e produziram a vacina com o tecido tumoral, sendo esta também comparada com a vacina das células em cultura. O protocolo utilizou o Clorine e6 como fotossensibilizante e após a irradiação com luz as células ainda permaneceram incubadas por mais 16h para então serem irradiadas com dose letal de raios X, sendo o lisado completo utilizado. A vacina foi aplicada em animais portadores do CCE SCCVII, tanto peritumoral como a distância. A vacina produzida com o tecido tumoral foi tão eficiente quanto a produzida com as células em cultura, mostrando que um fragmento do tecido tumoral do paciente pode ser utilizado para produzir uma vacina individualizada, contendo antígenos tumorais específicos de cada paciente, tornando o tratamento personalizado.

O conceito de vacina produzida com a PDT passou a ser tema de diversos estudos, utilizando variados fotossensibilizantes e suas concentrações ideais, fontes de luz e regimes de irradiação com diferentes doses de energia e variados modelos de tipos tumorais. No presente trabalho o conceito de vacina antitumoral produzida com a PDT foi explorado utilizando o Azul de Metileno (agente de baixo custo e fácil acesso, além de apresentar pouca toxicidade) e um equipamento de laser de fabricação Brasileira. O modelo de estudo utilizado foi com a linhagem de células de melanoma murino B16-F10, com o intuito de se estabelecer um protocolo de produção de lisado tumoral para ser utilizado como vacina antitumoral terapêutica com possibilidade para uso futuro em pacientes veterinários apresentando melanoma oral.

1.1.5 O melanoma murino B16-F10 como modelo de estudo

Modelos animais de estudo do câncer para pesquisa básica ou no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento, ainda que onerosos e consumirem grandes períodos de tempo para serem realizados, são necessários, pois os modelos alternativos *in vitro* ainda apresentam limitações importantes, especialmente na interação tumor hospedeiro. Vale ressaltar que o uso de modelos animais deve sempre respeitar os preceitos éticos de bem estar animal, tendo-se em mente sempre realizar os esforços para se utilizar o mínimo possível de animais.

São inúmeros os modelos de linhagens tumorais derivadas de seres humanos e animais disponíveis para estudo e uma das mais comumente utilizada para estudar os processos de formação das metástases e no desenvolvimento de imunoterapias é o melanoma murino B16, provavelmente devido suas similaridades com os melanomas humanos e as suas características de baixa imunogenicidade.

A linhagem celular de melanoma B16 foi estabelecida de um melanoma de pele do camundongo C57BL/6 (*Mus musculus*) se tornando transplantável depois de seriadas passagens em animais singênicos. Células marcadas com iodo radioativo foram injetadas pela veia da calda e formavam colônias em vários órgãos do corpo, sendo as colônias do pulmão isoladas e denominadas de B16 (FIDLER, 1970). Ademais, as células B16 foram inoculadas novamente na veia dos animais e as colônias do pulmão foram novamente coletadas, sendo este ciclo repetido inúmeras vezes, estabelecendo-se assim diversas sub linhagens da B16, complementadas com a denominação pela letra “F” e o numero de ciclos para obtenção. Cada uma destas sub linhagens apresenta características distintas que podem ser utilizadas conforme o estudo a ser realizado (FIDLER, 1973), estando disponível comercialmente no mundo todo.

O melanoma murinho B16-F10 é uma linhagem bastante agressiva, com rápido crescimento em cultivo celular ou quanto inoculada em animais, possuindo preferencia por colonizar o pulmão quando injetada pela veia (HART, 1979; TALMADGE; FIDLER, 1982). É uma das poucas linhagens de melanoma pigmentado para estudo em camundongos e uma das principais características é o seu baixo ou nenhum grau de imunogenicidade, que é explicado pelo seu baixo nível de expressão dos complexos de histocompatibilidade maior (MHC) do tipo I, não sendo o tumor reconhecido como exógeno, permitindo assim o seu crescimento exponencial (LI et al., 1998). A indução de proteção imunológica contra o

melanoma B16-F10 é bastante difícil de ser produzida, tornando-se um modelo bom para esclarecer a eficiência de terapias que atuam dessa forma (OVERWIJK; RESTIFO, 2001).

A semelhança do melanoma murino B16-F10 com os melanomas humanos é encontrada em diversos antígenos de diferenciação, como melan-A, tyrosinase, HMB-45, S-100, P27 e Ki-67 (OHSIE et al., 2008) estando presentes em ambas espécies, inclusive com a expressão gênica de vários genes homólogos destes marcadores nos camundongos (ROSENBERG, 1999). A Galactina, molécula relacionada com a agressividade dos melanomas de pele humano, com participação nos processos da regulação da resposta imunológica, na adesão, migração, neoangiogênese e metástases, também é expressa pelo B16 (MATHIEU et al., 2012).

O melanoma B16-F10, assim como o humano, apresenta também semelhanças com melanoma oral canino em diversos destes marcadores, como o S-100 (SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1985; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002) e a melan-A (RAMOS-VARA et al., 2000). Mais semelhanças podem ocorrer, porém nos cães são poucos os estudos que confirmam a presença destes mesmos marcadores, entretanto como comentado na seção sobre o melanoma canino, há importante grau de homologia entre o código genético humano e canino, havendo possivelmente tais semelhanças em se tratando do perfil genético do melanoma.

Apresentadas tais características, o melanoma murinho B16-F10 foi o modelo escolhido para realização do presente estudo, tanto para os experimentos *in vitro*, quanto para os *in vivo*.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem por objetivo de desenvolver um novo tratamento adjuvante para o melanoma baseando-se nos efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre o sistema imunológico.

1.2.1 Objetivos específicos

1.2.1.1

Estabelecer protocolo de coleta e processamento de amostras de melanoma murino B16 -F10 as quais serão tratadas *in vitro* com a terapia fotodinâmica, baseada no Azul de Metileno e Laser vermelho, obtendo-se assim um lisado de células tumorais para ser utilizado como vacina antitumoral terapêutica.

1.2.1.2

Testar a eficácia da vacina, produzida pela exposição de células de melanoma B16-F10 à terapia fotodinâmica com azul de metileno *in vitro* para imunização de camundongos contra o melanoma B16-F10.

1.2.1.3

Testar a eficácia da vacina, produzida pela exposição de células de melanoma B16-F10 à terapia fotodinâmica *in vitro* para tratamento de melanoma B16-F10 em camundongos.

CAPITULO 2 – PRODUÇÃO DA VACINA ANTITUMORAL: PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DE LISADO TUMORAL PELA PDT

2.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo são abordados os procedimentos realizados para, utilizando a terapia fotodinâmica com o Azul de metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, ser obtido o lisado de células do melanoma B16-F10, contendo variados antígenos tumorais e DAMPs (do inglês: Damage Associated Molecular Patterns), podendo assim ser utilizado como uma vacina preventiva ou terapêutica.

Conforme a literatura sobre a produção de vacinas antitumorais com a PDT previamente consultada (GOLLNICK; VAUGHAN; HENDERSON, 2002; KORBELIK; CECIC, 2003; KORBELIK; SUN, 2006; KORBELIK; STOTT; SUN, 2007; KORBELIK; MERCHANT, 2012), que utilizaram diferentes fotossensibilizantes e equipamentos de laser dos aqui utilizados, determinou-se que o protocolo ótimo para a produção do lisado tumoral a ser utilizado na imunização dos animais deveria apresentar cerca de 50% de células em morte celular por apoptose e com um índice de viabilidade celular após 24h de menos de 20%.

Com este propósito foram realizados diversos protocolos onde se variou a concentração do Azul de Metileno, assim como a dose de energia com o qual as células foram irradiadas com o laser, sendo então realizadas diversas técnicas analíticas para a interpretação dos resultados e determinação do protocolo mais apropriado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar os efeitos *in vitro* do tratamento com a Terapia Fotodinâmica baseada no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho sobre as células do Melanoma murino B16-F10.

Determinar as taxas de viabilidade celular do melanoma B16-F10 em diferentes regimes de tratamento com a Terapia Fotodinâmica baseada no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho.

Determinar as taxas de indução de morte celular (necrose e apoptose) em diferentes regimes de tratamento com a Terapia Fotodinâmica baseada no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho.

Determinar o regime de tratamento ótimo (concentração de Azul de Metileno e dose de energia irradiada) para produção do lisado tumoral a ser utilizado como vacina terapêutica.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Manuseio e manutenção do melanoma murino B16-F10

As células de melanoma murino B16-F10 são estocadas e congeladas em tanques de nitrogênio líquido, em pequenas alíquotas dentro de frascos criogênicos estéreis de 2 ml, fundo em “u” e com tampa rosca interna (Corning®). Para descongelá-las, o frasco criogênico é retirado do nitrogênio líquido e aquecido, sem agitação, em banho Maria 37°C.

Terminado o descongelamento, o frasco é lavado com meio de cultivo DMEM (Do inglês: Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®) e o seu conteúdo transferido para um tubo cônico de 15 ml, de polipropileno e com tampa vedadora (Corning®), com 8 ml de meio de cultura. O tubo é centrifugado por 5 min a 1.000 rotações por minuto. O sobrenadante é desprezado e as células são ressuspensas em 8 ml de meio de cultivo DMEM acrescido em 10% com soro fetal bovino (SFB), penicilina (50 UI/ml) e estreptomicina (50 mg/ml) (DMEM+SFB10%+PS), sendo transferidas para a garrafa de cultivo celular. O conteúdo da garrafa é homogeneizado levemente, observado ao microscópio invertido e, a seguir, a garrafa é mantida em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 5% CO₂ e umidade relativa de 100%. Quando a garrafa atinge 80 a 90% de confluência o meio de cultura é removido e as células são lavadas duas vezes com PBS-EDTA. A seguir adicionam-se 2 ml de solução de tripsina-EDTA aquecida a 37°C. A garrafa é mantida em estufa durante 5 a 10 minutos e as células são desprendidas, batendo-se o frasco contra a palma da mão suavemente. Meio DMEM acrescido em 10% de SFB é adicionado para neutralização da tripsina, sendo as células ressuspensas e realocadas em placas de cultivo de 6 ou 96 poços, nas concentrações necessárias para cada protocolo experimental a ser realizado.

2.3.2 Tratamento com a terapia fotodinâmica

Células do melanoma B16-F10 foram cultivadas conforme descrito na seção anterior e mantidas em incubação durante 24 horas.

As células foram lavadas com PBS por 2 vezes e então receberam meio de cultura DMEM acrescido de Azul de Metileno (AM) em diferentes concentrações que variaram de 0 a 4 µg/ml. As culturas foram mantidas em estufa durante uma hora, sendo o meio com AM removido, realizada lavagem com PBS por 2 vezes e acrescido meio de cultura DMEM acrescido em 10% de SFB.

Para a irradiação com o Laser (figura 2.1) foi utilizado equipamento com meio ativo de InGaAIP, emitindo luz vermelha visível no comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW. As células receberam ciclos de luz que variaram a distância focal do feixe de laser em 3 ou 6 cm, além de tempos de exposição de 3 a 24 minutos, com doses de energia de 16,8 a 100,8 Joules (J) e fluências de 31 a 720 J/cm², sendo estes parâmetros apresentados na seção de resultados de cada experimento apresentado. Após a irradiação a células foram avaliadas por técnicas distintas descritas a seguir.

Figura 2.1 – Fotografia do equipamento de laser e configuração do posicionamento do feixe de luz para tratamento das células com a PDT

Fonte: Del-Grande (2019).

2.3.3 Teste de viabilidade com azul de Trypan

Para a determinação da viabilidade celular e contagem das células após os diferentes regimes de tratamento com a PDT-AM, foi utilizada a coloração com Azul de Trypan a 0,4% em solução salina tamponada (PBS). Tal método possibilita diferenciar células viáveis das inviáveis, pois o corante penetra apenas células que perderam a integridade da membrana plasmática, sendo assim a células inviáveis apresentam coloração azulada (ALTMAN; RANDERS; RAO, 1993).

Células do melanoma B16-F10 foram cultivadas em placas de 30 mm (2×10^5 células), contendo 2 ml de DMEM+SFB10%+PS durante 24 horas. Após receber os diferentes regimes de tratamento e períodos de incubação, as células foram tripsinizadas e recolhidas em tubo cônico. Uma alíquota de 10µl da solução contendo as células foi adicionada a 10µl da solução

de azul de Trypan a 0,4%. No Hemocitômetro de Neubauer contaram-se as células contidas nos quatro quadrantes externos, ou quadrados “brancos” e a contagem celular e a proporções de células inviáveis e viáveis foram determinadas e comparadas entre os grupos.

2.3.4 Determinação da taxa de viabilidade celular pela técnica do MTT

Para a determinação da taxa de viabilidade das células tumorais após os diferentes regimes de tratamento com a PDT-AM foi utilizada a técnica do MTT. O sal tetrazolico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo tetrazolico), solúvel em água e de coloração amarelada, é metabolizado pelas enzimas mitocondriais da família das desidrogenases sendo reduzido ao sal MTT formazan, insolúvel em água e de coloração arroxeadada. Através da detecção colorimétrica, por aparelho de espectrofotometria, da quantidade de MTT formazan é possível determinar a taxa de viabilidade mitocondrial e consequentemente da viabilidade celular, sendo esta diretamente proporcional à quantidade de formazan produzida pelas células viáveis (MOSMANN, 1983; VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Células do melanoma B16-F10 foram cultivadas em placas de 96 poços ($1,5 \times 10^4$ células/poço), contendo 200 µl de DMEM+SFB10%+PS durante 24 horas. Após receber os diferentes regimes de tratamento e períodos de incubação, 20 µl de solução de MTT na concentração de 0,5mg/ml foi adicionada a cada poço, sendo incubadas por 3 horas. Após a incubação as placas foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e acrescentando-se 100 µl de DMSO para diluição do MTT formazan, sendo então realizada a leitura das placas pelo espectrofotômetro.

Para o cálculo da porcentagem de células viáveis em cada amostra foram obtidos a média de absorbância de todos os testes, inclusive do branco (somente meio) e dos controles (sem tratamento com PDT). Posteriormente, foi subtraída a média da absorbância do branco de todos os testes, inclusive do controle, sendo o valor obtido nos controles considerado como 100% de células viáveis. A porcentagem de células viáveis nos grupos tratados foi determinada através do cálculo por regra de três, sendo comparadas as proporções entre os diferentes grupos.

2.3.5 Microscopia óptica em contraste de fase

A Microscopia óptica em contrate de fase foi realizada para análise morfológica das células tratadas com os diferentes regimes com a PDT-AM. Foi utilizado o microscópio Carl

Zeiss Observer A1, com o programa para processamento de imagens AxioVision (Jena, Germany) para obtenção das imagens. Além de uma avaliação estática, foi realizada uma avaliação dinâmica da morfologia celular durante o tratamento com a PDT-AM, para tanto, fotografias seriadas do mesmo campo de observação foram feitas durante e até cerca de 30 minutos após o tratamento, com isso foi possível visualizar as alterações morfológicas de cada célula individualmente enquanto o tratamento foi realizado.

2.3.6 Determinação da morte celular por microscopia de fluorescência: Laranja de acridina e brometo de etídio

Para a determinação da taxa de apoptose das células tumorais após os diferentes regimes de tratamento com a PDT-AM, foi utilizada a microscopia de fluorescência pela coloração com Laranja de Acridina associado ao Brometo de Etídio [do inglês: Acridine Orange and Ethidium Bromide (AO-EB)], método simples e direto no estabelecimento das características morfológicas nos tipos de morte celular. Como descrito em literatura (RENVOISE et al., 1998; RIBBLE et al., 2005), o método de identificação da apoptose pela marcação com AO-EB está baseado na capacidade do Laranja de acridina em penetrar as células com membrana citoplasmática íntegra, difundir-se pelo citoplasma e ligar-se ao DNA de fita dupla, emitindo coloração verde, ou ao RNA de fita simples, emitindo coloração alaranjada. O Brometo de Etídio penetra apenas as células que perderam a integridade da membrana plasmática, ligando-se ao DNA do núcleo e emitindo coloração vermelha. Dessa forma, as células viáveis mostram um núcleo íntegro com a cromatina organizada emitindo coloração verde, havendo áreas alaranjadas pela presença do RNA (Figura 2.2). As células em apoptose inicial possuem a membrana plasmática íntegra, portanto o núcleo apresenta-se verde, porém apresentam alterações morfológicas, como a condensação e a fragmentação da cromatina (Figura 2.3). As células em apoptose tardia apresentam alterações morfológicas do núcleo, porém pela falta de integridade da membrana permitem a entrada do EB, sendo vermelhas. Ademais, As células em morte celular por necrose mostram o núcleo com estrutura de aspecto íntegro, sem alterações em cromatina, porém coradas em vermelho pelo EB (Figura 2.4).

Figura 2.2 – Fotomicrografia de células de melanoma murino B16-F10 consideradas viáveis em cultura celular sob aumento em objetiva de 40x

Legenda: A: Contraste de fase; B: Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio sob filtro dicromático 505 nm LP; C: Fluorescência com AO-EB sob filtro de excitação 480/30 nm; D: Fluorescência com AO-EB sob filtro de barreira 535/40 nm.

Fonte: Del-Grande (2019).

Células do melanoma B16-F10 foram cultivadas em placas de 30 mm (2×10^5 células), contendo 2 ml de DMEM+SFB10%+PS durante 24 horas. Após receber os diferentes regimes de tratamento e períodos de incubação, o meio de cultura foi removido, adicionando-se 100 µl das soluções de AO-BE na concentração de 100 µg/ml, aspirando-se o excesso e observando-se imediatamente ao microscópio Carl Zeiss Observer A1, com o programa para processamento de imagens AxioVision (Jena, Germany) para obtenção das imagens. Foram fotografados ao menos 20 quadrantes na objetiva de 40x com os filtros de excitação 480/30 nm, dicromático 505 nm LP e filtro de barreira 535/40 nm. Contou-se ao menos 200 células para cada tratamento, sendo realizadas três mensurações independentes. As células foram classificadas em viáveis (Figura 2.2), em apoptose (Figura 2.3) e em necrose (Figura 2.4), sendo determinadas as porcentagens e então comparadas entre os grupos.

Figura 2.3 – Fotomicrografia de Células de melanoma murino B16-F10 consideradas em apoptose em cultura celular sob aumento em objetiva de 40x

Legenda: A: Contraste de fase; B: Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio sob filtro dicromático 505 nm LP; C: Fluorescência com AO-EB sob filtro de excitação 480/30 nm; D: Fluorescência com AO-EB sob filtro de barreira 535/40 nm.

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.4 – Fotomicrografia de Células de melanoma murino B16-F10 consideradas em necrose em cultura celular sob aumento em objetiva de 40x

Legenda: A: Contraste de fase; B: Fluorescência com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio sob filtro dicromático 505 nm LP; C: Fluorescência com AO-EB sob filtro de excitação 480/30 nm; D: Fluorescência com AO-EB sob filtro de barreira 535/40 nm.

Fonte: Del-Grande (2019).

2.3.7 Avaliação da indução de apoptose por imunofluorescência: Anexina V

Para avaliação da indução de apoptose das células tumorais após os diferentes regimes de tratamento com a PDT-AM, foi utilizada a microscopia óptica com a marcação das células por imunofluorescência. A Anexina V é um anticoagulante humano, sendo uma proteína de 35–36 kDa dependente de cálcio, com grande afinidade pela Fosfatidilserina (PS) (ANDREE, et al., 1990). Em células vivas a PS esta localizada na face interna da membrana citoplasmática, porém nas células em processo de apoptose a PS é deslocada para a face externa da bicamada fosfolipídica da membrana celular (VAN ENGELAND, et al., 1998). Utilizando a anexina V marcada com um fluoróforo podemos marcar e observar as PS expostas na membrana celular das células em apoptose (KOOPMAN, et al., 1994).

Foi utilizado kit commercial contendo Alexa® Fluor 488 annexin V (Molecular Probes, EUA) e Iodeto de Propídio (PI) para a marcação das células. O kit consiste dos componentes: A- Alexa Fluor® 488 annexin em solução 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4, 0.1% albumina de soro bovino, B – Iodeto de propídio (PI) a 1 mg/mL (1.5 mM) em água deionizada, e C – 5X tampão de ligação da anexina contendo 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂. O componente C é diluído em água deionizada na proporção de 1:4 para obtenção do tampão. O componente B é diluído no tampão na proporção de 1:9, obtendo PI a 100µg/ml. A solução para marcação das células foi preparada sendo adicionado 2 µl do componente A e 1 µl de PI para cada 100 µl de tampão.

Células do melanoma B16-F10 foram cultivadas em placas de 30 mm (2×10^5 células), contendo 2 ml de DMEM+SFB10%+PS durante 24 horas. Após receber os diferentes regimes de tratamento e períodos de incubação, o meio de cultura foi removido, adicionando-se 100 µl da solução anexina/PI, observando-se imediatamente ao microscópio Carl Zeiss Observer A1 na objetiva de 40x com os filtros de excitação 480/30 nm e filtro de barreira 535/40 nm, sendo capturadas imagens com o programa para processamento AxioVision (Jena, Germany).

2.3.8 Determinação da taxa de apoptose por citometria de fluxo

Para avaliação das taxas de apoptose e necrose das células tumorais após os diferentes regimes de tratamento com a PDT-AM, foi utilizada a citometria de fluxo com a marcação por anexina e PI, sendo utilizado o mesmo kit comercial Alexa® Fluor 488 annexin V (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), sendo a preparação da solução anexina/PI em tampão realizada da mesma forma descrita para a microscopia.

Células do melanoma B16-F10 foram cultivadas em placas de 30 mm (2×10^5 células), contendo 2 ml de DMEM+SFB10%+PS durante 24 horas. Após receber os diferentes regimes de tratamento e períodos de incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram tripsinizadas e recolhidas em tubo para citometria, sendo ressuspensas em 100 µl da solução anexina/PI, incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, sendo a aquisição dos dados feita no citometro FACSCalibur® (Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, CA, EUA) medindo-se a emissão de fluorescência em 530 nm e 575 nm com excitação de 488 nm, sendo observado ao menos dez mil eventos e utilizando-se o programa FlowJo® para análise dos dados obtidos.

2.3.9 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram utilizados os programas computacionais 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 Bonferroni 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. As taxas de apoptose, necrose e viabilidade celular nas diferentes técnicas e tempos de incubação foram analisadas 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.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Teste de viabilidade com azul de Trypan: Variando concentrações do azul de metileno e/ou doses de energia irradiada

2.4.1.1 Variando concentrações de azul de metileno

Neste primeiro momento buscaram-se estabelecer algumas possíveis concentrações de AM, baseadas em experiência previa e na literatura consultada, e mantendo-se o regime de irradiação estável. Células de melanoma B16-F10 receberam diversos regimes de tratamento, variando a concentração do AM entre 0 e 4 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml e AM4+ = 4 µg/ml. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L-) enquanto outra parte (L+) recebeu 12 minutos de irradiação, com dose de energia de 50,4 J, fluência de 720 J/cm² com distância focal do feixe para emissão de 3 cm da placa de cultura. As células foram avaliadas imediatamente após os tratamentos.

A figura 2.5 mostra a porcentagem de células consideradas viáveis e inviáveis pelo azul de Trypan, não havendo diferença significativa entre os grupos (ANOVA – 2 Vias: $p > 0,05$).

Figura 2.5 – Gráfico em barras da porcentagem de células viáveis ou inviáveis pelo azul de Trypan das culturas de melanoma murino B16-F10, imediatamente após o tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de luz (L- = 0 Joules, L+ = 50,4 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml e AM4+ = 4 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. Não há variação significativa entre os grupos (ANOVA – 2 Vias: $p > 0,05$).

Fonte: Del-Grande (2019).

Tabela 2.1 – Tabela com a contagem celular das culturas de melanoma murino B16-F10 imediatamente após o tratamento com a PDT

	AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM4+L-	AM-L+	AM1+L+	AM2+L+	AM4+L+
Md	19,88 ±	20,30 ±	19,03 ±	18,95 ±	19,75 ±	18,70 ±	15,35* ±	14,20* ±
DP	1,200	1,625	2,104	2,257	1,273	2,037	2,545	1,625

Legenda: Regimes de luz (L- = 0 Joules, L+ = 50,4 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml e AM4+ = 4 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão do numero de células x10⁴/ml. (ANOVA: * = p<0,05; em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Apesar de não haver diferenças entre os grupos ao se analisar os valores em porcentagem, a contagem de células totais variava entre os grupos, sendo então realizada a análise estatística da contagem absoluta de células em cada grupo. A figura 2.6 e a tabela 2.1 mostram a contagem celular nos diferentes grupos, havendo diferença estatística significativa (ANOVA: P<0,05) dos grupos AM2+L+ e AM4+L+ quando comparados ao grupo sem tratamento (AM-L-).

Figura 2.6 – Gráfico em barras mostrando a contagem celular das culturas de melanoma murino B16-F10 imediatamente após o tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de luz (L- = 0 Joules, L+ = 50,4 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml e AM4+ = 4 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão do numero de células x10⁴/ml. (ANOVA: * = p<0,05; em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

2.4.1.2 Variando doses de energia irradiada e distância focal do feixe de laser

Neste momento, estabeleceu-se a concentração de AM que provocou maior morte celular no experimento anterior, porem observou-se que o feixe de laser a uma distância focal de 3 cm poderia não estar irradiando as bordas da placa de cultivo, portanto optou-se por testar diferentes distâncias, a fim de que o foco de laser pudesse atingir a maior área possível da placa. Sem do assim, células de melanoma B16-F10 receberam regimes de tratamento com a concentração do AM de 0 ou 2 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L- = 0 Joules) enquanto outra parte foi irradiada com duas distancias focais do feixe para emissão, sendo L1+ (3 cm) que recebeu 4 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 J e fluência de 240 J/cm²; L2+ (3 cm) que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 33,6 J e fluência de 480 J/cm²; L3+ (3c cm) que recebeu 12 minutos de irradiação, com dose de energia de 50,4 J e fluência de 720 J/cm²; L1+ (6 cm) que recebeu 4 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 J e fluência de 120 J/cm²; L2+ (6 cm) que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 33,6 J e fluência de 240 J/cm² e L4+ (6 cm) que recebeu 16 minutos de irradiação, com dose de energia de 67,2 J e fluência de 480 J/cm². As células foram avaliadas 4 horas após o tratamento.

Tabela 2.2 – Tabela com a contagem celular das culturas de melanoma murino B16-F10 após 4 horas do tratamento com a PDT

		<u>3 cm</u>			<u>6 cm</u>		
	AM-L-	AM2+L1+	AM2+L2+	AM2+L3+	AM2+L1+	AM2+L2+	AM2+L4+
Md	19,88	15,00	12,38*	9,125*	13,88*	10,13*	7,375*
	±	±	±	±	±	±	±
DP	1,200	4,243	5,423	3,044	4,224	6,198	1,923

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 3 cm ou 6 cm (L- = 0 Joules, L1+ = 16,8 Joules, L2+ = 33,6 Joules, L3+ = 50,4 Joules, L4+ = 67,2 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média (Md) ± Desvio padrão (Dp) do numero de células x10⁴/ml. (ANOVA: * = p<0,05; em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.7 – Gráfico em barras mostrando a contagem celular das culturas de melanoma murino B16-F10 após 4 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 3 cm ou 6 cm (L- = 0 Joules, L1+ = 16,8 Joules, L2+ = 33,6 Joules, L3+ = 50,4 Joules, L4+ = 67,2 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão do número de células x10⁴/ml. (ANOVA: * = p<0,05; em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

A Tabela 2.2 e a figura 2.7 mostram a contagem celular nos diferentes grupos, havendo diferença estatística significativa (ANOVA: P<0,05) dos grupos AM2+L2+ (3cm), AM2+L3+ (3cm), AM2+L1+(6cm), AM2+L2+ (6cm) e AM2+L4+ (6cm) quando comparados ao grupo sem tratamento (AM-L-).

2.4.1.3 Variando a dose de energia irradiada

Neste momento ficou determinado que a distância focal de 6 cm seria a mais eficiente em possibilitar o feixe de laser de irradiar a quase totalidade da área da placa de cultivo de 30 mm, sendo assim deste momento em diante foi utilizada esta distância para os demais experimentos. Células de melanoma B16-F10 receberam diversos regimes de tratamento com a concentração do AM de 0 ou 2 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L- = 0 Joules) enquanto outra parte recebeu ciclos de luz com distancia focal do feixe em 6 cm, sendo L1+ que recebeu 4 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 J e fluência de 120 J/cm²; L3+ que recebeu 12 minutos de irradiação, com dose de energia de 50,4 J e fluência de 360 J/cm² e L5+ que recebeu 20 minutos de irradiação, com dose de energia de 84 J e fluência de 600 J/cm². As células foram avaliadas 24 horas após os tratamentos.

A Tabela 2.3 e a figura 2.8 mostram a contagem celular nos diferentes grupos, havendo diferença estatística significativa (ANOVA: $P < 0,05$) dos grupos AM2+L3+, AM2+L5+ quando comparados ao grupo sem tratamento (AM-L-).

Tabela 2.3 – Tabela com a contagem celular das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

	AM-L-	AM2+L-	AM2+L1+	AM2+L3+	AM2+L5+
Md	20,00 ±	18,63 ±	18,13 ±	10,38* ±	5,875* ±
Dp	4,342	5,655	3,482	2,875	2,031

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L1+ = 16,8 Joules, L3+ = 50,4 Joules, L5+ = 84 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média (Md) ± Desvio padrão (Dp) do número de células $\times 10^4$ /ml. (ANOVA: * = $p < 0,05$; em relação ao grupo sem tratamento AM-L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.8 – Gráfico em barras mostrando a contagem celular das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L1+ = 16,8 Joules, L3+ = 50,4 Joules, L5+ = 84 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média (Md) ± Desvio padrão (Dp) do número de células $\times 10^4$ /ml. (ANOVA: * = $p < 0,05$; em relação ao grupo sem tratamento AM-L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

2.4.1.4 Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno

Com os resultados obtidos em relação a distancia focal e diferentes regimes de irradiação, aqui foi realizado experimento com a combinação de diversas concentrações do AM e diferentes regimes de irradiação com o laser. Células de melanoma B16-F10 receberam tratamento com a concentração do AM entre 0 e 2 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1

$\mu\text{g/ml}$, $\text{AM2+} = 2 \mu\text{g/ml}$. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz ($\text{L-} = 0 \text{ Joules}$) enquanto outra parte recebeu ciclos de luz com distância focal do feixe em 6 cm, sendo L2+ que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 Joules e fluência de 120 J/cm^2 ; L4+ que recebeu 16 minutos de irradiação, com dose de energia de 67,2 J e fluência de 480 J/cm^2 e L6+ que recebeu 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm^2 . As células foram avaliadas 24 horas após o tratamento.

A Tabela 2.4 e a figura 2.9 mostram a contagem celular nos diferentes grupos, havendo diferença estatística significativa (ANOVA: $P < 0,05$) dos grupos AM1+L4+ , AM1+L6+ , AM2+L4+ , AM2+L6+ quando comparados ao grupo sem tratamento (AM-L-).

Tabela 2.4 – Tabela com a contagem celular (numero de células $\times 10^4/\text{ml}$) das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

	AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
Md	19,88	19,50	18,63	18,63	17,13	16,38
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
Dp	4,190	3,625	3,068	4,838	3,137	3,204
	AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
Md	19,00	13,25*	11,00*	20,38	9,50*	8,50*
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
Dp	3,505	1,753	1,309	4,069	1,309	1,773

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm ($\text{L-} = 0 \text{ Joules}$, $\text{L2+} = 16,8 \text{ Joules}$, $\text{L4+} = 67,2 \text{ Joules}$, $\text{L6+} = 100,8 \text{ Joules}$) e concentração do Azul de Metileno ($\text{AM-} = 0 \mu\text{g/ml}$, $\text{am1+} = 1 \mu\text{g/ml}$ e $\text{AM2+} = 2 \mu\text{g/ml}$). Valores expressos em Média (Md) $\pm$ Desvio padrão (Dp) do numero de células $\times 10^4/\text{ml}$. (ANOVA: * = $p < 0,05$; em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.9 – Gráfico em barras mostrando a contagem celular das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules, L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, am1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média (Md) ± Desvio padrão (Dp) do numero de células x10⁴/ml. (ANOVA: * = p<0,05; em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

2.4.2 Determinação da taxa de viabilidade celular pela técnica do MTT: Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno

Células de melanoma B16-F10 cultivadas em placas de 96 poços receberam diversos regimes de tratamento com a concentração do AM entre 0 e 2 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L- = 0 Joules) enquanto outra parte recebeu ciclos de luz com distancia focal do feixe em 6 cm, sendo L2+ que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 Joules e fluência de 120 J/cm²; L4+ que recebeu 16 minutos de irradiação, com dose de energia de 67,2 J e fluência de 480 J/cm² e L6+ que recebeu 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm². Ademais, as culturas celulares foram avaliadas com períodos de incubação após o tratamento de 3, 6 e 24 horas.

A Tabela 2.5 e a figura 2.10 mostram as diferentes taxas de células viáveis nos variados regimes de tratamento 03 horas após o tratamento com a PDT, havendo diferença estatística significativa das taxas de células viáveis (ANOVA – 1 Via: p<0,05) dos grupos AM1+L2+, AM2+L2+, AM1+L4+, AM2+L4+, AM1+L6+ e AM2+L6+ quando comparados ao grupo sem tratamento AM-L-. Não houve diferença significativa nos demais grupos analisados.

Tabela 2.5 – Tabela com os valores das taxas de viabilidade celular pelo MTT das culturas de melanoma murino B16-F10 após 3 horas do tratamento com a PDT

3 horas					
AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
98,75±0,52	95,94±2,25	96,20±2,03	99,21±0,77	88,06±3,58*	88,35±1,613*
AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
99,04±0,44	62,06±0,58*	40,82±2,04*	97,76±2,41	44,02±2,382*	17,00±1,179*

Legenda: regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA: * = P<0,05 em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.10 – Gráfico em barras das taxas de viabilidade celular pelo MTT das culturas de melanoma murino B16-F10 após 3 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA: * = P<0,05 em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

A Tabela 2.6 e a figura 2.11 mostram as diferentes taxas de células viáveis nos variados regimes de tratamento 06 horas após o tratamento com a PDT, havendo diferença estatística significativa das taxas de células viáveis (ANOVA – 1 Via: p<0,05) dos grupos AM1+L2+, AM2+L2+, AM1+L4+, AM2+L4+, AM1+L6+ e AM2+L6+ quando comparados ao grupo sem tratamento AM-L-. Não houve diferença significativa nos demais grupos analisados.

Tabela 2.6 – Tabela com os valores das taxas de viabilidade celular pelo MTT das culturas de melanoma murino B16-F10 após 6 horas do tratamento com a PDT

6 horas					
AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
98,00±2,18	96,92±2,042	97,82±1,337	97,46±2,40	85,57±2,749*	82,72± 6,082*
AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
98,47±1,18	58,86±3,11*	23,04±1,175*	97,91±1,90	23,17±1,459*	12,47±2,120*

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA: * = P<0,05 em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.11 – Gráfico em barras das taxas de viabilidade celular pelo MTT das culturas de melanoma murino B16-F10 após 6 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA: * = P<0,05 em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

A Tabela 2.7 e a figura 2.12 mostram as diferentes taxas de células viáveis nos variados regimes de tratamento 24 horas após o tratamento com a PDT, havendo diferença estatística significativa das taxas de células viáveis (ANOVA – 1 Via: p<0,05) dos grupos AM1+L2+, AM2+L2+, AM1+L4+, AM2+L4+, AM1+L6+ e AM2+L6+ quando comparados ao grupo sem tratamento AM-L-. Não houve diferença significativa nos demais grupos analisados.

Tabela 2.7 – Tabela com os valores das taxas de viabilidade celular pelo MTT das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

24 horas					
AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
98,50± 1,51	97,70± 2,828	97,19± 2,711	97,06± 2,6	82,89± 2,803*	82,82± 1,978*
AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
98,15± 1,46	48,73± 2,384*	45,13± 1,251*	97,98± 1,3	24,19± 1,855*	22,58± 1,121*

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA: * = P<0,05 em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.12 - Gráfico em barras das taxas de viabilidade celular pelo MTT das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA: * = P<0,05 em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

2.4.3 Microscopia óptica em contraste de fase: Estudo das alterações morfológicas

Células de melanoma B16-F10 receberam diversos regimes de tratamento com a concentração do AM entre 0 e 2 $\mu\text{g/ml}$, sendo AM- = 0 $\mu\text{g/ml}$, AM1+ = 1 $\mu\text{g/ml}$ e AM2+ = 2 $\mu\text{g/ml}$. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L- = 0 Joules) enquanto outra parte recebeu ciclos de luz com distância focal do feixe em 6 cm, sendo L2+ que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 Joules e fluência de 120 J/cm^2 ; L4+ que recebeu 16 minutos de irradiação, com dose de energia de 67,2 J e fluência de 480 J/cm^2 e L6+ que recebeu 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm^2 . As células foram avaliadas e fotografadas imediatamente após o tratamento e após 3, 6, 12 e 24 horas.

A figura 2.13 e 2.14 mostram o aspecto em menor aumento (objetiva de 10x) das células nos diferentes regimes de tratamento. É possível observar que as células que não receberam tratamento (AM-L-), ou receberam apenas o AM sem irradiação, ou apenas irradiação sem AM, permanecem proliferando, alcançando confluência da placa em 24 horas. Nos grupos tratados podemos observar uma progressiva mudança no aspecto das células conforme se progridem a concentração do AM e a dose de energia irradiada.

Na figura 2.15 podem-se observar as células após 12 horas de tratadas em maior aumento (objetiva de 40x), podendo assim ser visualizado detalhes da morfologia celular. Nas células não tratadas (AM-L-), ou que receberam apenas o AM sem irradiação, ou apenas irradiação sem AM, a membrana citoplasmática permanece íntegra, espalhada e aderida sobre a superfície de cultivo. O núcleo está bem organizado e estruturado, com a fácil visualização dos nucléolos.

Figura 2.13 - Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em contraste de fase (objetiva 10x) após tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.14 - Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em contraste de fase (objetiva 10x) após tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.15 - Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em contraste de fase (objetiva 40x) após tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.16 - Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em contraste de fase (objetiva 40x) após tratamento com a PDT

Legenda: A – antes do tratamento; B – 30 minutos após tratamento com regime de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm, L6+ = 100,8 Joules e concentração do Azul de Metileno AM2+ = 2 µg/ml. (1) e (2) são a mesma célula em A e B. Setas brancas são locais de extravasamento do conteúdo citoplasmático.

Fonte: Del-Grande (2019).

Na figura 2.16 as células foram fotografadas antes do tratamento (figura 2.16-A) com AM2+L6+ e fotografias seriadas do mesmo campo de observação foram feitas durante e até cerca de 30 minutos após o tratamento (figura 2.16-B), com isso foi possível visualizar as alterações morfológicas de cada célula individualmente enquanto o tratamento com a PDT-AM foi realizado.

A célula indicada por 1 (figura 2.16) apresentou retração da membrana citoplasmática, que antes se apresentava espalhada e passou a se apresentar esférica, com aparente perda da aderência a superfície de cultivo, mas sem aparente extravasamento de conteúdo citoplasmático, não sendo mais possível visualizar a estrutura do núcleo e nucléolos de forma bem definida. A célula indicada com 2 (figura 2.16) passou por alterações morfológicas diferentes do número 1, onde houve aparente ruptura da membrana citoplasmática e extravasamento do conteúdo (áreas de forma circular, aparentando “bolhas” ao redor da célula), com diversos fragmentos celulares ao redor do núcleo e com aparente aderência de boa parte a superfície de cultivo. Ainda é possível visualizar o núcleo, porém este se apresenta com menor tamanho em B (figura 2.16) em comparação com A (figura 2.16). As setas brancas indicam locais de extravasamento do conteúdo citoplasmático, por provável ruptura da membrana plasmática durante o tratamento.

2.4.4 Determinação da morte celular por microscopia de fluorescência: Laranja de acridina e brometo de etídio

2.4.4.1 Estudo das alterações morfológicas

A marcação das células com AO EB permite a visualização dos componentes celulares como a membrana citoplasmática e o núcleo, sendo possível assim a visualização de alterações morfológicas das células que receberam o tratamento com a PDT-AM.

A figura 12 mostra o aspecto nas células que não receberam tratamento com a PDT (Figura 2.17: A e B) em comparação as células que receberam o regime de tratamento com AM a 2µg/ml, 24 min irradiação, dose de energia de 100,8 Joules e fluência em 720 J/cm² (AM2+ L6+) imediatamente após a irradiação (Figura 2.17: C e D).

Figura 2.17 - Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em contraste de fase ou em fluorescência pela coloração com AO-EB (objetiva 40x) após tratamento com a PDT

Legenda: Em A e B células sem tratamento (AM-L-) e em C e D células imediatamente após receberem o tratamento com a PDT no regime AM2+ L6+ (24 min irradiação, dose de energia de 100,8 Joules e fluência em 720 J/cm²).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.18 - Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em fluorescência pela coloração com AO-EB (objetiva 40x) após tratamento com a PDT

Legenda: Em A, células sem tratamento (AM-L-), em B células imediatamente após tratadas no regime AM2+ L6+ 6 cm (24 min irradiação, dose de energia de 100,8 Joules e fluência em 720 J/cm²). A seta branca indica morte por necrose e a amarela morte por apoptose. Em C e D células 6 horas após receberem o tratamento com a PDT no regime AM1+ L4+ (16 min irradiação, dose de energia de 67,2 Joules e fluência em 480 J/cm²), apresentando apoptose.

Fonte: Del-Grande (2019).

Nas células sem tratamento a membrana citoplasmática apresenta-se íntegra, espalhada sobre a superfície de cultivo e aderida. O núcleo apresenta membrana e cromatina organizadas e bem definidas. O AO emite fluorescência verde difusa pelo citoplasma e proeminente no núcleo, onde está ligado ao DNA. A coloração alaranjada próxima ao núcleo e em regiões do citoplasma correspondem à ligação do AO em fitas simples de RNA.

Nas células que receberam o tratamento há perda da integridade da membrana citoplasmática, com perda de espalhamento e de aderência a superfície de cultivo. O núcleo não apresenta membrana e nem cromatina bem definidas. Em algumas células observam-se restos celulares amorfos ainda aderidos na superfície de cultivo. Com a perda da integridade da membrana o EB penetrou a célula e se ligou ao DNA e emitindo coloração avermelhada (morte celular por necrose). Algumas células mantiveram a integridade da membrana e apresentam coloração verde, porém observa-se perda da integridade da membrana nuclear e da organização da cromatina, além do menor espalhamento na membrana celular (células com provável evolução para morte celular por apoptose).

Na figura 2.18-A observamos células sem tratamento, apresentando núcleo com membrana e cromatina organizadas e bem definidas. Na figura 2.18-B, imediatamente após tratamento AM2+ L6+, podemos observar duas morfologias distintas. Na seta branca as células em que houve rompimento da membrana citoplasmática e os núcleos apresentam coloração pelo BE (aparece alaranjado no filtro de excitação 480/30 nm), e os mesmos apresentam relativa integridade de membrana e estrutura nuclear. Já na seta amarela as células não apresentaram rompimento da membrana citoplasmática, com o núcleo corado pela AO, apresentando irregularidades e possível extravasamento do conteúdo do núcleo, com formação dos chamados “Blebs”. Nas figuras 2.18-C e D vemos células que receberam o protocolo AM1+ L4+, 6 horas após o tratamento, sendo possível observar a membrana citoplasmática íntegra, sendo o núcleo corado com o AO, estando estes com aspecto de condensação, tendo redução do tamanho do núcleo, com áreas de cromatina condensada e fragmentada.

2.4.4.2 Taxas de necrose e apoptose: Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno

Células de melanoma B16-F10 receberam diversos regimes de tratamento com a concentração do AM entre 0 e 2 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L- = 0 Joules)

enquanto outra parte recebeu ciclos de luz com distância focal do feixe em 6 cm, sendo L2+ que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 Joules e fluência de 120 J/cm²; L4+ que recebeu 16 minutos de irradiação, com dose de energia de 67,2 J e fluência de 480 J/cm² e L6+ que recebeu 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm². Ademais, as culturas celulares foram avaliadas com períodos de incubação após o tratamento de 0, 3, 6 e 24 horas.

A figura 2.19 mostra o aspecto das células nos diferentes regimes de tratamento imediatamente (tempo: 0 horas) após o tratamento com a PDT ou sem tratamento (controles)

A Tabela 2.8 e a figura 2.20 mostram as diferentes taxas de células viáveis, em apoptose e necrose nos variados regimes de tratamento, imediatamente (tempo: 0 hora) após o tratamento com a PDT, havendo diferença estatística significativa das taxas de células viáveis, e em necrose (ANOVA – 2 Vias: $P < 0,001$) dos grupos AM1+L2+, AM2+L2+, AM1+L4+, AM1+L6+, AM2+L4+ e AM2+L6+ quando comparados ao grupo sem tratamento AM-L-, não havendo diferenças na taxa de apoptose (ANOVA – 2 Vias: $P > 0,05$).

Tabela 2.8 – Tabela com os valores das taxas de células viáveis (Vi), em apoptose (Ap) ou em necrose (Ne) das culturas de melanoma murino B16-F10 imediatamente após o tratamento com a PDT

0 horas						
	AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
Vi	99,18±1,7	99,02±1,58	98,81±1,89	99,06±1,49	91,41±2,80*	88,79±3,05*
Ap	0,00±0,00	0,15±0,66	0,40±1,23	0,32±0,99	0,21±0,93	0,27±1,03
Ne	0,82±1,71	0,84±1,53	0,79±1,65	0,62±1,28	8,37±2,57*	10,92±2,68*
	AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
Vi	97,78±2,6	60,19±6,40*	42,09±13,26*	98,39±1,85	49,15±11,58*	24,49±9,76*
Ap	0,00±0,00	0,32±1,16	0,57±1,40	0,20±0,71	0,55±1,49	0,81±1,66
Ne	2,22±2,60	39,48±6,58*	57,33±13,60*	1,42±1,88	50,29±11,85*	74,69±10,36*

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA – 2 Vias: * = $P < 0,001$, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.20 – Gráfico em barras das taxas de células viáveis, em apoptose ou em necrose das culturas de melanoma murino B16-F10 imediatamente após o tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA – 2 Vias: * = P<0,001, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Tabela 2.9 – Tabela com os valores das taxas de células viáveis (Vi), em apoptose (Ap) ou em necrose (Ne) das culturas de melanoma murino B16-F10 após 3 horas do tratamento com a PDT

3 horas						
	AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
Vi	98,23±1,85	97,94±1,92	98,25±1,87	98,10±1,75	89,84±1,78*	88,95±2,75*
Ap	0,75±1,49	0,52±1,34	0,46±1,18	0,25±0,92	0,50±1,28	0,81±1,62
Ne	1,02±1,69	1,53±1,90	1,28±1,84	1,66±1,76	9,64±2,11*	10,23±2,85*
	AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
Vi	98,54 ± 1,52	38,05±7,23*	31,11±4,90*	98,29±1,79	30,82±2,79*	28,36±0,95*
Ap	0,19±0,72	20,62±11,63*	26,46±8,87*	0,48±1,22	28,62±7,89*	29,79±2,43*
Ne	1,26±1,52	41,32±13,96*	42,41±11,86*	1,23±1,73	40,54±9,93*	41,83±2,52*

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA -2 Vias: * = P<0,001, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

A figura 2.21 mostra o aspecto das células nos diferentes regimes de tratamento 3 horas após o tratamento com a PDT ou sem tratamento (controles).

A Tabela 2.9 e a figura 2.22 mostram as diferentes taxas de células viáveis, em apoptose e necrose nos variados regimes de tratamento 3 horas após o tratamento com a PDT, havendo diferença estatística significativa das taxas de células viáveis, em apoptose e em necrose (ANOVA – 2 Vias: $P < 0,001$) dos grupos AM1+L4+, AM1+L6+ e AM2+L4+ e AM2+L6+, quando comparado ao grupo sem tratamento AM-L-. Em AM1+L2+ e AM2+L2+ houve diferença estatística significativa das taxas de células viáveis e em necrose (ANOVA – 2 Vias: $P < 0,001$), mas não em apoptose (ANOVA – 2 Vias: $p > 0,05$), quando comparado ao grupo sem tratamento AM-L-.

A figura 2.23 mostra o aspecto das células nos diferentes regimes de tratamento 6 horas após o tratamento com a PDT ou sem tratamento (controles).

Figura 2.22 – Gráfico em barras das taxas de células viáveis, em apoptose ou em necrose das culturas de melanoma murino B16-F10 após 3 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA -2 Vias: * = $P < 0,001$, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

A Tabela 2.10 e a figura 2.24 mostram as diferentes taxas de células viáveis, em apoptose e necrose nos variados regimes de tratamento 6 horas após o tratamento com a PDT, havendo diferença estatística significativa das taxas de células viáveis, em apoptose e em necrose (ANOVA – 2 Vias: $P < 0,001$) dos grupos AM1+L4+, AM1+L6+ e AM2+L4+ e AM2+L6+, quando comparado ao grupo sem tratamento AM-L-. Em AM1+L2+ e AM2+L2+ houve diferença estatística significativa das taxas de células viáveis e em necrose (ANOVA – 2 Vias: $P < 0,001$), mas não em apoptose (ANOVA – 2 Vias: $p > 0,05$), quando comparado ao grupo sem tratamento AM-L-.

Tabela 2.10 - Tabela com os valores das taxas de células viáveis (Vi), em apoptose (Ap) ou em necrose (Ne) das culturas de melanoma murino B16-F10 após 6 horas do tratamento com a PDT

6 horas						
	AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
Vi	98,68±1,6	98,62±1,75	98,63±1,73	98,50±1,7	88,84±4,12*	88,82±4,18*
Ap	0,48±1,18	0,48±1,17	0,31±0,96	0,47±1,15	1,61±2,27	1,49±2,09
Ne	0,84±1,50	0,90±1,61	1,05±1,66	1,03±1,62	9,53±3,31*	9,68±3,11*
	AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
Vi	98,30±1,8	39,12±4,62*	37,57±5,88*	98,64±1,6	28,16±3,23*	26,22±2,43*
Ap	0,61±1,42	31,41±11,83*	30,87±8,97*	0,57±1,35	38,82±8,06*	50,96±12,15*
Ne	1,09±1,64	29,45±10,97*	31,55±13,26*	0,80±1,38	33,01±9,53*	22,80±14,05*

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA -2 Vias: * = P<0,001, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.24 – Gráfico em barras das taxas de células viáveis, em apoptose ou em necrose das culturas de melanoma murino B16-F10 após 6 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA -2 Vias: * = P<0,001, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

A figura 2.25 mostra o aspecto das células nos diferentes regimes de tratamento 24 horas após o tratamento com a PDT ou sem tratamento (controles).

Tabela 2.11 - Tabela com os valores das taxas de células viáveis (Vi), em apoptose (Ap) ou em necrose (Ne) das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

24 horas						
	AM-L-	AM1+L-	AM2+L-	AM-L2+	AM1+L2+	AM2+L2+
Vi	98,76±2,09	98,56±1,63	97,96±1,59	98,16±1,64	82,88±2,47*	81,30±4,19*
Ap	0,48±1,18	0,50±1,21	0,72±1,43	0,50±1,17	6,717±2,06*	7,50±2,41*
Ne	0,75±1,43	0,95±1,49	1,32±1,59	1,34±1,67	10,39±2,19*	11,19±4,80*
	AM-L4+	AM1+L4+	AM2+L4+	AM-L6+	AM1+L6+	AM2+L6+
Vi	98,02±1,64	48,07±5,29*	45,49±1,27*	98,39±1,68	21,92±6,49*	18,35±2,52*
Ap	0,76±1,44	6,24± 3,04*	8,01±2,86*	0,66±1,32	22,34±5,36*	23,03±4,55*
Ne	1,22±1,62	38,03±9,64*	56,49±3,44*	0,95±1,56	55,73±7,17*	58,61±5,70*

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA -2 Vias: * = P<0,001, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-)

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.26 – Gráfico em barras das taxas de células viáveis, em apoptose ou em necrose das culturas de melanoma murino B16-F10 após 24 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de células. (ANOVA -2 Vias: * = P<0,001, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-)

Fonte: Del-Grande (2019).

A Tabela 2.11 e a figura 2.26 mostram as diferentes taxas de células viáveis, em apoptose e necrose nos variados regimes de tratamento 24 horas após o tratamento com a PDT, havendo diferença estatística significativa das taxas de células viáveis, em apoptose e em necrose (ANOVA – 2 Vias: $P < 0,001$) dos grupos AM1+L2+, AM2+L2+, AM1+L4+, AM1+L6+ e AM2+L4+ e AM2+L6+, quando comparado ao grupo sem tratamento AM-L-.

Figura 2.19 – Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em fluorescência pela coloração com AO-EB (Objetiva 40x) imediatamente após tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.21 – Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em fluorescência pela coloração com AO-EB (Objetiva 40x) após 3 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.23 – Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em fluorescência pela coloração com AO-EB (Objetiva 40x) após 6 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.25 - Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em fluorescência pela coloração com AO-EB (Objetiva 40x) após 24 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

2.4.5 Avaliação da indução de apoptose por imunofluorescência: Anexina V

Células de melanoma B16-F10 receberam diversos regimes de tratamento com a concentração do AM entre 0 e 2 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L- = 0 Joules) enquanto outra parte recebeu ciclos de luz com distância focal do feixe em 6 cm, sendo L2+ que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 Joules e fluência de 120 J/cm²; L4+ que recebeu 16 minutos de irradiação, com dose de energia de 67,2 J e fluência de

Figura 2.27 – Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em contraste de fase e fluorescência com Anexina V/PI (Objetiva 40x) sem tratamento com a PDT

Legenda: Em A: contraste de fase; em B: Fluorescência Anexina V, em C: Fluorescência Iodeto de Propídio e em D Composição das imagens A, B e C.
Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.28 – Fotomicrografias de células de melanoma murino B16-F10 observadas em contraste de fase e fluorescência com Anexina V/PI (Objetiva 40x) após 12 horas do tratamento com a PDT

Legenda: Em A: contraste de fase; em B: Fluorescência Anexina V, em C: Fluorescência Iodeto de Propídio e em D Composição das imagens A, B e C. Setas Brancas: anexina V+/PI-; Setas amarelas: anexina V+/PI+.
Fonte: Del-Grande (2019).

480 J/cm² e L6+ que recebeu 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm². Ademais as células foram avaliadas 12 horas após o tratamento.

Nos grupos sem tratamento, ou seja, AM-L- e os demais grupos que não receberam ou o AM ou a irradiação, a população de células apresentou baixa ou nenhuma marcação pela anexina V na Fosfatidilserina da bicamada lipídica da membrana celular (Figura 2.27).

Nos grupos que receberam o tratamento houve clara marcação pela anexina V na Fosfatidilserina da bicamada lipídica da membrana celular (Figura 2.28), com aumento progressivo desta marcação conforme houve aumento da concentração de AM e da dose de energia. As células marcadas com a anexina V apresentaram duas morfologias distintas, sendo as marcadas apenas com a anexina V (Figura 2.28, seta branca) e as marcadas com anexina V e PI (Figura 2.28, seta amarela). As células marcadas apenas com anexina V configuram apoptose inicial, estando a membrana plasmática ainda íntegra, impedindo a coloração do núcleo com o PI. As células com marcação dupla configuram células em apoptose mais avançada ou necrose, onde a membrana perdeu integridade e o núcleo se cora com o PI.

2.4.6 Determinação da taxa de apoptose por citometria de fluxo: Variando a dose de energia irradiada e a concentração de azul de metileno

Células de melanoma B16-F10 receberam diversos regimes de tratamento com a concentração do AM entre 0 e 2 µg/ml, sendo AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml. Quanto ao regime de irradiação do laser, uma parte não recebeu luz (L- = 0 Joules) enquanto outra parte recebeu ciclos de luz com distância focal do feixe em 6 cm, sendo L2+ que recebeu 8 minutos de irradiação, com dose de energia de 16,8 Joules e fluência de 120 J/cm²; L4+ que recebeu 16 minutos de irradiação, com dose de energia de 67,2 J e fluência de 480 J/cm² e L6+ que recebeu 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm². Ademais as células foram avaliadas 12 horas após o tratamento.

A figura 2.29 mostra os gráficos de aquisição dos parâmetros morfológicos da dispersão frontal e lateral da luz (FSC x SSC) nos diferentes grupos. Nos grupos sem tratamento, ou seja, AM-L- e os demais grupos que não receberam ou o AM ou a irradiação, a população de células permanece estável, havendo apenas uma população bem definida. Nos grupos tratados observa-se gradativa formação de uma segunda população celular conforme o aumento da concentração do AM e a dose de energia irradiada, já sendo observada discretamente em AM1+L2+, atingindo seu nível máximo no grupo AM2+L6+. Essa segunda população apresenta-se com menor tamanho e granularidade em relação à primeira população.

Figura 2.29 – Gráficos de aquisição dos parâmetros morfológicos da dispersão frontal e lateral da luz (FSC x SSC) das culturas de melanoma murino B16-F10 após 12 horas nos diferentes grupos de tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

A figura 2.30 mostra os gráficos de aquisição dos parâmetros de fluorescência (Anexina V x PI) nos diferentes grupos. Os quartis representados são: Q1 – PI+/Anexina- (células em necrose), Q2 – PI+/Anexina+ (células em apoptose tardia ou necrose), Q3 – PI-/Anexina+ (células em apoptose) e Q4 – PI-/Anexina- (células viáveis), e a figura mostra os valores da porcentagem de células em cada quartil. A figura Z mostra a representação gráfica dos valores da porcentagem de células em cada quartil com a comparação entre os grupos de tratamento.

Figura 2.30 – Gráficos de aquisição dos parâmetros de fluorescência (Anexina V x PI) das culturas de melanoma murino B16-F10 após 12 horas nos diferentes grupos de tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 2.31 – Gráfico em barras mostrando as porcentagens de células viáveis (Q4), em apoptose (Q3), em apoptose tardia/necrose (Q2) ou em necrose (Q1) das culturas de melanoma murino B16-F10 após 12 horas nos diferentes grupos de tratamento com a PDT

Legenda: Regimes de iluminação com distância focal do feixe a 6 cm (L- = 0 Joules, L2+ = 16,8 Joules, L4+ = 67,2 Joules e L6+ = 100,8 Joules) e concentração do Azul de Metileno (AM- = 0 µg/ml, AM1+ = 1 µg/ml e AM2+ = 2 µg/ml). Valores expressos em Média da porcentagem de células. (ANOVA -2 Vias: * = p<0,05, em relação ao grupo sem tratamento AM- L-).

Fonte: Del-Grande (2019).

2.5 DISCUSSÃO

No presente capítulo, conforme descrito na seção introdutória, teve como objetivo principal determinar o regime de tratamento ótimo (concentração de Azul de Metileno e dose de energia irradiada) para produção do lisado tumoral a ser utilizado como vacina terapêutica. Ademais, a análise dos efeitos *in vitro* da PDT-AM proporcionou esclarecimentos sobre as alterações morfológicas e os tipos de morte celular envolvidas no mecanismo da reação fotodinâmica nas células do melanoma murinho B16-F10.

A PDT-AM é bastante estudada por seus efeitos antimicrobianos, sendo utilizada em variados campos desde a odontologia até a dermatologia (TARDIVO, 2005). O uso da PDT-AM no tratamento de neoplasias não é algo recente, com relatos acontecendo desde a década de 1990, com resultados variáveis, mas predominantemente promissores, entretanto não se observa atualmente o seu uso clínico amplamente utilizado, seja na medicina humana ou na veterinária. Um dos possíveis motivos se dá pela existência de ampla variedade de protocolos descritos na literatura, utilizando diferentes concentrações de AM, e mais importante uma grande variedade nos regimes de iluminação, com mudanças entre os equipamentos utilizados, a potência de saída dos aparelhos e a dose de energia irradiada. Mais ainda, cada tipo tumoral apresenta particularidades quanto à absorção e a localização subcelular do corante, acarretando na necessidade de se adaptar diferentes protocolos dependendo do tipo de câncer em tratamento (WILLIAMS, 1989; ORTH, 1995; TARDIVO, 2004). Neste trabalho estão demonstrados os efeitos antineoplásicos da PDT-AM e estabelecidas concentrações do corante e as doses de energia com melhor capacidade para induzir morte celular, seja por necrose ou apoptose, no melanoma murinho B16-F10, uma linhagem celular pigmentada por melanina e frequentemente utilizada como modelo para o melanoma humano e também o melanoma oral dos cães, devido importante semelhanças e homologias (OHSIE et al., 2008; ROSENBERG, 1999).

Os ensaios de viabilidade celular com o azul de trypan demonstraram que a PDT-AM foi capaz de matar células tumorais, havendo impacto diretamente proporcional conforme o aumento da concentração do AM e da dose de energia utilizada, fenômeno descrito anteriormente (LIM et al., 2013) utilizando-se a PDT-AM em linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar. Os autores relataram o uso do AM na concentração de 2 µg/ml, a mesma utilizada no presente estudo, porém utilizaram uma dose de energia mais baixa, com irradiação de 60J, enquanto aqui foi utilizado dose de 100,8J para se obter uma redução da viabilidade celular para aproximadamente 50%, quando comparado aos grupos controle sem

tratamento, recebendo apenas luz ou apenas AM. Utilizando a PDT-AM em modelo in vivo de melanoma em camundongos *nude*, Wagner et al. (2012) descreveram a redução da capacidade proliferativa tumoral quando a concentração do AM estava em 2 mg/Kg e uma densidade de energia irradiada em 30J/cm².

Comparando-se os resultados obtidos com a análise da viabilidade celular pelo azul de trypan, com os obtidos nas análises pela técnica do MTT foram observadas discrepâncias discretas nas porcentagens de viabilidade celular encontradas, onde nos testes com o azul de trypan mostravam uma maior proporção de células viáveis após os tratamentos com a PDT-AM. Isso se explica pelo mecanismo de funcionamento das técnicas utilizadas. O azul de trypan penetra apenas nas células com membrana citoplasmática comprometida (ALTMAN; RANDERS; RAO, 1993), sendo determinada a viabilidade pela contagem das células não marcadas, porém, células não marcadas podem ser também as células em estágios iniciais de apoptose, onde ainda não há ruptura da membrana citoplasmática. O método utilizando o MTT funciona pela leitura da absorbância do metabólito MTT formazan originário do metabolismo respiratório nas mitocôndrias das células. É sabido que a PDT-AM provoca disfunção mitocondrial, sendo este um dos mecanismos de indução de morte celular (LU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011), portanto, quando comparamos os resultados das duas técnicas utilizadas, as diferenças se dão pois as células tidas como viáveis pelo trypan, são possivelmente células em processo de apoptose, onde há perda da função mitocondrial e nos resultados do MTT esta fração já é tida como não viável, pois o seu metabolismo energético esta em disfunção, não sendo produzido o metabólito MTT formazan detectado pela colorimetria. Para a confirmação das células em apoptose foram realizados os demais experimentos com a fluorescência pelo AO-EB e detecção da anexina V.

Os estudos de alterações morfológicas por microscopia em contraste de fase demonstrou variabilidade importante entre as possíveis morfologias apresentadas após as células receberam o tratamento com a PDT-AM, sendo também possível confirmar a redução da viabilidade celular conforme o aumento da concentração do AM e a dose de energia utilizada, descrito anteriormente. Interessante observar que células em uma mesma placa de cultivo, recebendo exatamente o mesmo tratamento desenvolvem alterações morfológicas distintas, sendo estas ligadas ao tipo de morte celular ocorrendo, como se comprova com as técnicas do AO-EB e anexina V. Pode se supor que estas alterações são distintas, pois as células tumorais, apesar de serem da mesma linhagem, apresentam variabilidade quanto a sua absorção e localização do AM, além de diferentes concentrações de melanina, que podem modificar a eficiência da reação fotodinâmica (LINK et al., 1989; RICE; WAINWRIGHT;

PHOENIX, 2000; OLIVEIRA et al., 2011) levando algumas células a morte por necrose e outras por apoptose.

A microscopia de fluorescência pela coloração com o AO-EB demonstrou que as características morfológicas de células em processo de necrose ocorrem imediatamente após o tratamento com a PDT-AM com importante disfunção levando a ruptura de membranas citoplasmáticas mesmo com baixas doses de energia (16,8 J), que aumentam de frequência conforme se aumenta a dose de energia, diferente do que foi relatado anteriormente (SANTOS et al., 2018), onde não encontram tais alterações. Em apenas 3 horas após o tratamento com a PDT-AM foi possível a observação de células com características morfológicas de morte por apoptose, sendo estas vistas também nos tempos 6 e 24 horas após o tratamento. O que se observou foram células apresentando integridade da membrana citoplasmática, mesmo com a perda de aderência à placa de cultivo, mas apresentando alterações nucleares em sua forma e tamanho, com condensação e fragmentação da cromatina, sendo observada a formação de “blebs”. As “blebs” são característica encontrada em células em apoptose inicial, causadas em parte pela contração da actina-miosina, e estão relacionadas com a liberação das DAMPs (WICKMAN et al., 2013) nas células apoptóticas em iminência da perda da integridade da membrana. A formação das “blebs” foi descrita anteriormente em células tratadas com a PDT baseada em outros fotossensibilizantes (HOTTA et al., 1995; PANZARINI; TENUZZO; DINI, 2009). A confirmação da indução de apoptose pela PDT-AM e as diferentes taxas encontradas conforme o protocolo de tratamento foram confirmadas adiante com a detecção da anexina V por imunofluorescência e citometria de fluxo.

A terapia fotodinâmica é bem reconhecida pela sua capacidade de induzir apoptose (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004) e no presente estudo determinou-se as diferentes taxas de células em apoptose e necrose das células de melanoma B16-F10 após receberam o tratamento com a PDT-AM. A anexina V é um anticoagulante humano que apresenta afinidade pela fosfatidilserina (PS) (ANDREE et al., 1990). Em células vivas a PS esta localizada na face interna da membrana citoplasmática, portanto não há marcação com a anexina V, porém nas células em processo de apoptose a PS é deslocada para a face externa da bicamada fosfolipídica da membrana celular, sendo então possível identificar as células em apoptose (KOOPMAN, et al., 1994; VAN ENGELAND, et al., 1998), como foi feito por meio da imunofluorescência em microscópio óptico, e determinar as proporções das taxas de células em apoptose, feito por citometria de fluxo. Como observado anteriormente (LIM et al., 2013), onde a PDT-AM foi capaz de induzir apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar, no presente trabalho demonstramos que as taxas de apoptose e

necrose aumentam proporcionalmente ao aumento das concentrações do AM e da dose de energia irradiada, alcançando aproximadamente 30-40% de apoptose com a concentração de 2 µg/ml do AM, porém com uma dose de energia maior (100,8 J), sendo esta diferença explicada pelas características particulares de cada linhagem celular, que promovem uma diferenciada localização e absorção do corante, além da presença da pigmentação por melanina das células utilizadas aqui.

Quando comparamos as taxas de viabilidade celular encontradas nas análises por citometria de fluxo, observamos que estas são maiores que as obtidas nas análises pelo MTT e pela fluorescência com AO-EB. Isso ocorre, pois grande parte das células que sofreram morte por necrose apresenta um grau elevado de degradação da membrana citoplasmática, e quando estas células são recolhidas por tripsinização para análise (procedimento não realizado no MTT e no AO-EB) tem sua integridade totalmente perdida, não sendo visualizadas na leitura pelo citometro, onde se pode observar, nos gráficos de aquisição da citometria (figura 2.30), que as células com marcação negativa para anexina V e positiva para o PI, ou seja, as células em necrose são bem pouco detectadas, com isso há uma aparente maior proporção de células viáveis, pois as necróticas não são totalmente visualizadas.

2.6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra que a PTD-AM tem efeito antineoplásico nos melanomas murinos B16-F10, reduzindo a viabilidade celular e induzindo a morte por apoptose que aumenta de forma diretamente proporcional à concentração do agente fotossensibilizante e a dose de energia irradiada. A PDT-AM é um método promissor no tratamento do melanoma maligno, sendo as concentrações do AM e as doses de energia aqui estabelecidas servindo de base para futuros estudos.

Ademais, se concluiu que a dose de 2 µg/ml do azul de metileno associado a irradiação do laser com dose de energia em 100,8 J, é o regime de tratamento ótimo, onde há cerca de 50% de células em morte celular por apoptose e com um índice de viabilidade celular após 24h de menos de 20%, para produção do lisado tumoral a ser utilizado como vacina terapêutica.

CAPITULO 3 – UTILIZAÇÃO DA VACINA ANTITUMORAL: MODELO ANIMAL DE IMUNIZAÇÃO CONTRA O MELANOMA B16-F10

3.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo o protocolo de terapia fotodinâmica com o Azul de metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, determinado no capítulo anterior, foi utilizado *in vitro* nas células de melanoma B16-F10, obtendo-se assim o lisado de células tumorais para ser utilizado como vacina antitumoral em modelo animal.

O modelo experimental utilizado neste momento foi de realizar a imunização prévia dos animais, para posterior inoculação de células tumorais, podendo assim ser avaliada a indução de imunização contra o melanoma B16-F10. Neste modelo foram utilizados camundongos BALB/c, que não são singênicos à linhagem de camundongos da qual o melanoma B16-F10 é derivado, portanto são capazes de desenvolver resposta imunológica naturalmente quando inoculados com as células desta linhagem, apresentando crescimento exponencial da formação tumoral até aproximadamente 15 dias, para depois haver regressão progressiva até a cura. Este modelo sendo usado pode-se diferenciar a resposta imunológica que ocorreria naturalmente daquela provocada (ou não) pela vacina antitumoral produzida pela PDT.

3.2 OBEJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o uso do lisado de células do melanoma B16-F10, produzido *in vitro* com a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, para induzir imunidade contra o melanoma B16-F10 em camundongos BALB/c.

Estudar os efeitos da imunização com lisado de células do melanoma B16-F10, produzido *in vitro* com a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, sobre a progressão do volume tumoral.

Estudar os efeitos da imunização com lisado de células do melanoma B16-F10, produzido *in vitro* com a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, sobre os órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo).

Estudar os efeitos da imunização com lisado de células do melanoma B16-F10, produzido *in vitro* com a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, sobre a população de linfócitos T CD3+ dos órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Delineamento experimental: Modelo animal de imunização

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, sendo o grupo controle ($n = 8$) que recebeu solução salina, o grupo F/T ($n = 8$) que recebeu lisado por ciclos de congelamento e descongelamento e o grupo PDT ($n = 8$) que recebeu a imunização pelo lisado produzido com a PDT. Os animais receberam a inoculação subcutânea de 200 μ l de solução a cada 3 dias durante 15 dias, totalizando 6 doses. Após 7 dias de descanso os animais receberam a inoculação de 1×10^6 células de melanoma murino B16-F10 no subcutâneo, sendo feito o acompanhamento do crescimento tumoral durante 15 dias, quando os animais foram eutanasiados para coleta de material biológico (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Demonstração gráfica do delineamento experimental do protocolo de imunização prévia com lisado de células tumorais

Fonte: Del-Grande (2019).

3.3.2 Animais

Camundongos BALB/c, 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 foi de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ), sob protocolo nº 2434230215.

3.3.3 Melanoma murino B16-F10 in vivo: Modelo imunogênico

O melanoma murino B16-F10 é derivado da de camundongos da linhagem isogênica C57 BL/6, apresentando baixa expressão de moléculas MHC do tipo I, porém quando utilizado em animais da linhagem BALB/c imunocompetentes são halogênicos, portanto o sistema imunológico dos animais é capaz de montar resposta inata contra as células neoplásicas, possibilitando assim o estudo de tal resposta.

As células do melanoma murino B16-F10 em cultura foram recolhidas na fase exponencial de crescimento e suspendidas em PBS na concentração de 1×10^7 células/ml, acondicionadas em tubo cônico e mantidas em gelo. Os animais foram contidos fisicamente e com o auxílio de seringas e agulhas estéreis descartáveis, receberam 100 µl de suspensão, contendo 1×10^6 células tumorais, no subcutâneo da região do flanco direito. O crescimento do volume tumoral foi acompanhado através da mensuração com paquímetro digital dos três eixos de crescimento (altura, largura e espessura), sendo utilizada a formula:

$$V = (A \times L \times E \times \pi) \div 6 \quad (1)$$

(onde altura = A, largura = L e espessura = E) para a determinação do volume tumoral em mm^3 .

3.3.4 Produção do lisado tumoral com a PDT

A suspensão de células do melanoma B16-F10 na concentração de 1×10^7 células/ml contendo meio de cultura DMEM acrescido de Azul de Metileno na concentração de 2 µg/ml permaneceu em incubação durante 1 hora em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 5% CO_2 e umidade relativa de 100%.

O tubo foi centrifugado por 5 min a 1.000 rotações por minuto. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em meio DMEM, sendo transferidas para placas de cultivo celular de 30 mm, onde foram irradiadas com o feixe de laser a uma distancia focal de

6 cm, durante 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm². As células foram então incubadas em estufa durante 24 horas.

As células e o meio foram então recolhidos em tubo cônico que foi centrifugado por 5 min a 1.000 rotações por minuto. O sobrenadante foi recolhido e congelado em freezer -80°C para uso posterior.

3.3.5 Produção do lisado tumoral por congelamento

A suspensão células do melanoma B16-F10 na concentração de 1×10^7 células/ml contendo meio de cultura DMEM foi acondicionada em tubo cônico de 15 ml. O tubo foi congelado através de imersão em nitrogênio líquido durante 5 minutos com posterior descongelamento em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo realizados 3 ciclos de congelamento e descongelamento (F/T, do inglês: Freeze and Thaw). A suspensão celular foi então transferida para placas de cultivo de 30 mm, permanecendo em estufa durante 24 horas.

As células e o meio foram então recolhidos em tubo cônico que foi centrifugado por 5 min a 1.000 rotações por minuto. O sobrenadante foi recolhido e congelado em freezer -80°C para uso posterior.

3.3.6 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, através de sobre dose de anestésico intraperitoneal com cloridrato de cetamina (100mg/kg) associado a xilazina (20mg/kg). Os órgãos internos foram pesados e acondicionados em formaldeído 10%, assim como a massa tumoral, para posterior processamento e confecção das laminas para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

3.3.7 Análise histopatológica

Os fragmentos tumorais e órgãos foram processados para inclusão em parafina, com posterior confecção dos blocos que foram cortados em micrótomo manual (Leica® RM2235) na espessura de 5 µm, sendo então preparadas as laminas para coloração histológica com Hematoxilina e Eosina, conforme técnica rotineira.

3.3.8 Análise imuno-histoquímica dos linfócitos

Os fragmentos de baço e linfonodos foram processados para inclusão em parafina, com posterior confecção dos blocos que foram cortados em micrótomo manual (Leica® RM2235) na espessura de 5 µm, sendo então preparadas as lamina para marcação imuno-histoquímica (IHQ) dos Linfócitos T CD3+ anticorpos monoclonais “Anti-CD3 antibody [SP7] ab16669” da marca Abcam®, seguindo a técnica especificada pelo fabricante, e sendo realizada contra coloração nuclear com Hematoxilina, conforme técnica rotineira.

3.3.9 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram utilizados os programas computacionais 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 do peso relativo do baço e linfonodo foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni para comparação entre os grupos experimentais. A curva do crescimento do volume tumoral foi analisada pelo teste ANOVA de duas vias. A tabela de contingência da presença hiperplasia linfoide em baço foi analisada pelo teste exato de Fisher. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Progressão do volume tumoral

A figura 3.2 mostra o aspecto dos tumores da linhagem do melanoma murino B16-F10 quando inoculado no subcutâneo de camundongos BALB/c, nos grupos controle (n=8), que recebeu solução salina, grupo F/T (n=8), que recebeu lisado tumoral por congelamento e grupo PDT (n=8), que recebeu lisado tumoral por PDT (Azul de metileno a 2 µg/ml e irradiação com feixe de laser a uma distancia focal de 6 cm, durante 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm²).

Figura 3.2 - Fotografias das massas tumorais do melanoma murino B16-F10 depois de 15 dias inoculado no subcutâneo de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Fonte: Del-Grande (2019).

Tabela 3.1 – Progressão do volume tumoral (mm³) do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

	Controle	F/T	PDT
Dia 6	1,388 ± 0,673	1,028 ± 0,883	0,000 ± 0,00
Dia 8	5,952 ± 4,315	4,318 ± 3,586	0,000 ± 0,00
Dia 10	24,512 ± 13,870	5,756 ± 4,773	0,174 ± 0,244*
Dia 12	38,283 ± 14,961	7,481 ± 6,198**	0,768 ± 0,873**
Dia 14	65,415 ± 36,939	7,776 ± 6,44**	2,188 ± 1,856**
Dia 15	104,520 ± 57,05	10,069 ± 8,342**	3,319 ± 2,753**

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão do volume tumoral em mm³. (ANOVA – 2 Vias: * = P<0,01 e ** = P<0,001, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

A tabela 3.1 e a figura 3.3 mostram a progressão do volume tumoral (mm^3) nos diferentes grupos experimentais e nos respectivos dias após a inoculação tumoral.

No grupo controle, a partir do dia 6 da inoculação os tumores se tornaram palpáveis, havendo crescimento progressivo dos tumores em todos os animais.

No grupo F/T os tumores progrediram tornando-se palpáveis a partir do dia 6, como no grupo controle, porém 3 animais não apresentaram crescimento tumoral. No dia 12, 14 e 15 o volume tumoral médio do grupo se apresentou significativamente menor (ANOVA – 2 Vias: $p < 0,001$) em relação ao controle.

No grupo PDT os tumores progrediram de forma mais lenta, tornando-se palpável, apenas a partir do dia 10 após a inoculação, não havendo crescimento tumoral em 3 animais. No dia 10 o volume tumoral médio do grupo se apresentou significativamente menor (ANOVA – 2 Vias: $p < 0,01$) em relação ao controle, assim como nos dias 12, 14 e 15 (ANOVA – 2 Vias: $p < 0,001$).

Comparando-se o grupo F/T com o grupo PDT não houve diferença significativa na progressão do volume tumoral (ANOVA – 2 Vias: $p > 0,05$).

Figura 3.3 – Gráfico em barras com a progressão do volume tumoral (mm^3) do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em Média $\pm$ Desvio padrão. (ANOVA – 2 Vias: * = $P < 0,01$ e ** = $P < 0,001$, em relação ao grupo controle e).

Fonte: Del-Grande (2019).

3.4.2 Peso relativo do baço

A tabela 3.2 e a figura 3.4 mostram o peso relativo do baço (g/100g) nos diferentes grupos experimentais. Nos grupos F/T e PDT o peso relativo do baço foi significativamente maior (ANOVA: $p < 0,05$) em relação ao controle. Comparando-se o grupo F/T com o PDT não houve diferença significativa (ANOVA: $p > 0,05$).

Tabela 3.2 – Peso relativo do baço (g/100g) de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

	Controle	F/T	PDT
Peso relativo (g/100g)	0,4003 ± 0,0221	0,4552 ± 0,0399*	0,4635 ± 0,0445*

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão. (ANOVA: * = $P < 0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 3.4 – Gráfico em barras do peso relativo do baço (g/100g) de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão. (ANOVA: * = $P < 0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

3.4.3 Peso relativo do linfonodo regional (inguinal)

A tabela 3.3 e a figura 3.5 mostram o peso relativo do linfonodo regional inguinal (g/100g) nos diferentes grupos experimentais. Nos grupos F/T e PDT o peso relativo do linfonodo foi significativamente maior (ANOVA: $p < 0,05$) em relação ao controle. Comparando-se o grupo F/T com o PDT não houve diferença significativa (ANOVA: $p > 0,05$).

Tabela 3.3 – Peso relativo do linfonodo (g/100g) de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

	Controle	F/T	PDT
Peso relativo (g/100g)	0,0500 ± 0,0027	0,0569 ± 0,0049*	0,0579 ± 0,0055*

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão. (ANOVA:* = P<0,05, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 3.5 – Gráfico em barras do peso relativo do linfonodo (g/100g) de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão. (ANOVA:* = P<0,05, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

3.4.4 Análise histopatológica

3.4.4.1 Análise tumoral

A figura 3.6 mostra o aspecto histológico pela coloração por H&E das formações tumorais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Em todos os grupos experimentais, nos animais onde houve progressão tumoral, é possível a observação de massa tumoral infiltrada em região de derme e hipoderme, com eventual infiltração da camada submuscular, e evidente proliferação tumoral desorganizada, além da presença de vasos sanguíneos decorrentes de neovascularização (Figura 3.7 – Setas amarelas), havendo extensas áreas com tecido necrótico e infiltrado inflamatório (Figura 3.7 –

Setas escuras). Em maior aumento (Figura 3.6) observa-se infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário.

Figura 3.6 – Fotomicrografias do melanoma murino B16-F10 15 dias depois de inoculado no subcutâneo de camundongos BALB/c que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E)

Fonte: Del-Grande (2019).

Nos animais que não apresentaram progressão tumoral importante (nos grupos tratados F/T e PDT), o exame histopatológico mostrou região de intenso infiltrado inflamatório onde se observa presença de macrófagos apresentando depósitos de melanina em seu citoplasma (Figura 3.8 – Setas brancas).

Figura 3.7 – Fotomicrografia do melanoma murino B16-F10 15 dias depois de inoculado no subcutâneo de camundongos BALB/c que não receberam imunização prévia com lisado de células tumorais (Controle) (H&E objetiva 20x)

Legenda: Seta escura: infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário. Setas amarelas: neovascularização.

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 3.8 – Fotomicrografia do melanoma murino B16-F10 15 dias depois de inoculado no subcutâneo de camundongos BALB/c que recebeu imunização prévia com lisado de células tumorais por PDT (H&E objetiva 20x)

Legenda: Seta branca: Macrófagos apresentando depósitos de melanina.

Fonte: Del-Grande (2019).

3.4.4.2 Análise do baço

A figura 3.9 mostra o aspecto histológico pela coloração por H&E do baço dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os animais do grupo controle não apresentaram

alterações morfológicas importantes nas estruturas do órgão. Nos animais imunizados com os lisados, tanto o F/T quanto por PDT, observou-se que a arquitetura do órgão manteve-se preservada, entretanto os folículos linfoides, 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 3.9 - Fotomicrografia do baço de camundongos BALB/c 15 dias depois de inoculados com o melanoma B16-F10 no subcutâneo e que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E).

Fonte: Del-Grande (2019).

A figura 3.10 mostra a tabela de contingência da presença de hiperplasia linfóide em baço no dia 15 do delineamento (eutanásia) nos diferentes grupos experimentais. No grupo controle 2 animais apresentaram hiperplasia (+) e 6 animais não apresentaram hiperplasia (-). No grupo F/T 5 animais apresentaram hiperplasia (+) e 3 animais não apresentaram hiperplasia (-). No grupo PDT 6 animais apresentaram hiperplasia (+) e 2 animais não apresentaram hiperplasia (-). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Teste exato de Fisher: $p > 0,05$).

Figura 3.10 – Gráfico de barras da presença hiperplasia linfoide em baço de camundongos BALB/c 15 dias depois de inoculados com o melanoma B16-F10 no subcutâneo e que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em número de animais. (Teste exato de Fisher: $p > 0,05$).
 Fonte: Del-Grande (2019).

3.4.4.3 Análise imuno-histoquímica dos linfócitos do baço

A figura 3.11 demonstra a marcação Imuno-histoquímica na membrana citoplasmática dos receptores de linfócito do tipo T CD3+ em menor e maior aumento sob microscopia ótica, sendo observada uma maior concentração destes tipos linfocitários na região peri arteriolar dos folículos linfoides. A Figura 3.12 demonstra a análise comparativa entre os grupos controle, F/T e PDT não indicando diferenças aparentes significativas na quantidade ou distribuição do referido tipo linfocitário.

Figura 3.11 - Fotomicrografia do baço de camundongos BALB/c com marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ 15 dias depois de inoculados com o melanoma B16-F10 no subcutâneo e que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (Contra coloração: Hematoxilina)

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 3.12 - Fotomicrografia do baço de camundongos BALB/c com coloração por H&E e marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ (Contra coloração: Hematoxilina) 15 dias depois de inoculados com o melanoma B16-F10 no subcutâneo e que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Fonte: Del-Grande (2019).

3.4.4.4 Análise do linfonodo regional (inguinal)

A figura 3.13 mostra o aspecto histológico pela coloração por H&E do linfonodo regional (inguinal) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações morfológicas importantes nas estruturas do órgão. Os animais dos grupos tratados (F/T e PDT) apresentaram as regiões paracortical e cortical mais proeminentes, assim como os folículos linfoides com presença de centros germinativos (região de linfócitos tipo B). Em nenhum animal foi encontrado indício de metástases em linfonodos regionais.

Figura 3.13 - Fotomicrografia do linfonodo regional (Inguinal) de camundongos BALB/c 15 dias depois de inoculados com o melanoma B16-F10 no subcutâneo e que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E - Objetivas de 4x e 10x)

Legenda: Os animais controle receberam solução salina, os do grupo Freeze/Thaw, o lisado por congelamento e os do grupo PDT, o lisado pela Terapia Fotodinâmica (Azul de metileno a 2 µg/ml e irradiação com feixe de laser a uma distancia focal de 6 cm, durante 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm²).

Fonte: Del-Grande (2019).

3.4.4.5 Analise imuno-histoquímica dos linfócitos do linfonodo regional (inguinal)

A figura 3.14 demonstra a marcação Imuno-histoquímica na membrana citoplasmática dos receptores de linfócito do tipo T CD3⁺ em menor e maior aumento sob microscopia ótica, sendo observada uma maior concentração destes tipos linfocitários na região para cortical (figura 3.14 A e B - setas brancas). Há também importante número de células marcadas na

região medular (figura 3.14 A e C - seta preta). Pode-se observar baixa ou nenhuma marcação nas regiões de folículo linfoide (figura 3.14 A e B - setas amarelas). Na figura 3.14 D observa-se em objetiva de 100x os detalhes da marcação citoplasmática nos linfócitos do tipo T CD3+, com células apresentando maior ou menor intensidade de marcação.

Figura 3.14 - Fotomicrografias do linfonodo de camundongos BALB/c com marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ 15 dias depois de inoculados com o melanoma B16-F10 no subcutâneo e que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (Contra coloração: Hematoxilina)

Legenda: A-objetiva 4x; B e C-objetiva 40x; D-objetiva 100x. Setas brancas: região paracortical. Setas amarelas: região folicular. Seta preta: região medular.
 Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 3.15 – Fotomicrografias do linfonodo inguinal de camundongos BALB/c com coloração por H&E e marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ (Contra coloração: Hematoxilina) 15 dias depois de inoculados com o melanoma B16-F10 no subcutâneo e que receberam imunização prévia com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Fonte: Del-Grande (2019).

A Figura 3.15 demonstra a análise comparativa entre os grupos controle, F/T e PDT indicando diferenças aparentes no volume da região cortical e para cortical nos grupos tratados, havendo nestas áreas grande quantidade de marcação dos linfócitos CD3+, indicando expansão clonal deste tipo linfocitário.

CAPITULO 4 – UTILIZAÇÃO DA VACINA ANTITUMORAL: MODELO ANIMAL DE TRATAMENTO CONTRA O MELANOMA B16-F10

4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo o protocolo de terapia fotodinâmica com o Azul de metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho determinado no capítulo 1 e utilizado *in vivo* no capítulo 2 (com uma abordagem de imunização prévia a inoculação) foi adaptado para ser realizado em um modelo animal que buscou mimetizar a abordagem clínica-cirúrgica que um paciente oncológico (veterinário ou humano) poderia ser submetido. Ou seja, o paciente oncológico diagnosticado com um melanoma é encaminhado para procedimento cirúrgico para excisão da formação neoplásica. Uma amostra tumoral é coletada neste momento para ser processada conforme o protocolo de Terapia fotodinâmica estabelecido, sendo assim produzido o lisado tumoral a ser utilizado como vacina terapêutica. A vacina é então administrada no paciente, podendo ser pela via intratumoral, se houver remanescente (como por exemplo, em casos avançados, com infiltração neoplásica em locais que impossibilitam a completa excisão do tecido tumoral), ou pela via subcutânea (mesmo distante do foco tumoral), com o intuito de estimular a indução de resposta imunológica contra as células neoplásicas remanescentes, ou possíveis locais de metástases já existentes no momento do tratamento, e ainda resposta imunológica contra células neoplásicas de uma possível recidiva da formação.

O modelo utilizado para tanto foi o de inoculação do melanoma murinho B16-F10 em camundongos C57 BL/6, que são singênicos aos animais que originaram essa linhagem tumoral, portanto apresentam baixa expressão de moléculas MHC do tipo I, não sendo capazes de desenvolver resposta imunológica naturalmente contra as células tumorais, havendo crescimento progressivo exponencial da massa tumoral. Com isso pode-se averiguar a capacidade da vacina antitumoral terapêutica de induzir uma resposta imunológica contra as células tumorais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar a aplicação como vacina antitumoral terapêutica do lisado de células do melanoma B16-F10, removido parcialmente por cirurgia, após inoculação em camundongos C57 BL/6, para então ser submetido, *in vitro*, a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho.

Estudar os efeitos da aplicação como vacina antitumoral terapêutica do lisado de células do melanoma B16-F10, removido parcialmente por cirurgia, após inoculação em camundongos C57 BL/6, para então ser submetido, *in vitro*, a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, sobre a progressão tumoral e sobre os órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo).

Estudar os efeitos da aplicação como vacina antitumoral terapêutica do lisado de células do melanoma B16-F10, removido parcialmente por cirurgia, após inoculação em camundongos C57 BL/6, para então ser submetido, *in vitro*, a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, sobre a população de linfócitos T CD3+ nos órgãos do sistema imunológico (Baço e Linfonodo).

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Delineamento experimental: Modelo animal de tratamento

Vinte e quatro animais receberam a inoculação do melanoma B16-F10 no subcutâneo do flanco direito. O crescimento do volume tumoral foi acompanhado através da mensuração com paquímetro digital. Quando o volume tumoral atingiu aproximadamente 100 mm^3 os animais foram anestesiados para a remoção cirúrgica de cerca de 75% do tumor.

Figura 4.1 – Delineamento experimental

Fonte: Del-Grande (2019).

Após 24 horas do procedimento cirúrgico os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, sendo o grupo controle ($n = 8$) sem tratamento, o grupo F/T ($n = 8$) recebendo 3 doses (200 µl a cada 3 dias) do lisado por ciclos de congelamento e descongelamento e o grupo PDT ($n = 8$) recebendo 3 doses (200 µl a cada 3 dias) do lisado produzido com a PDT. Os animais foram acompanhados sendo medido o volume tumoral durante 15 dias, quando os animais foram eutanasiados para coleta de material biológico (Figura 4.1).

4.3.2 Animais

Camundongos C57 BL/6, isogênicos, machos, pesando de 25 a 30 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 foi de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ), sob protocolo nº 2434230215.

4.3.3 Melanoma murino B16-F10 in vivo: Modelo não imunogênico

O melanoma murino B16-F10 é derivado da de camundongos da linhagem isogênica C57 BL/6, apresentando baixa expressão de moléculas MHC do tipo I, quando utilizado em animais dessa mesma linhagem celular o sistema imunológico dos animais não é capaz de montar resposta inata contra as células neoplásicas, possibilitando assim que a formação tumoral cresça exponencialmente de volume, com baixa ou nenhuma indução de resposta imunológica natural, possibilitando assim o estudo da possível indução de imunidade quando aplicado o lisado como vacina terapêutica.

As células do melanoma murino B16-F10 em cultura foram recolhidas na fase exponencial de crescimento e suspendidas em PBS na concentração de 1×10^7 células/ml, acondicionadas em tubo cônico e mantidas em gelo. Os animais foram contidos fisicamente e com o auxílio de seringas e agulhas estéreis descartáveis, receberam 100 µl de suspensão, contendo 1×10^6 células tumorais, no subcutâneo da região do flanco direito. O crescimento do volume tumoral foi acompanhado através da mensuração com paquímetro digital dos três eixos de crescimento (altura, largura e espessura), sendo utilizada a formula:

$$V = (A \times L \times E \times \pi) \div 6 \quad (1)$$

(onde altura = A, largura = L e espessura = E) para a determinação do volume tumoral em mm³.

4.3.4 Procedimento cirúrgico para excisão tumoral e pós cirúrgico

Para a remoção cirúrgica de 3/4 do melanoma B16-F10 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 antisepsia do local realizada com álcool iodado. O tumor foi parcialmente excisado com auxílio de bisturi, removendo-se a região do tumor aderida na pele e mantendo-se a região aderida ao subcutâneo do animal (Figura 4.2). A sutura da pele foi realizada com fio de nylon (4-0) em pontos simples separados. Os animais receberam 2 mg/Kg de cloridrato de tramadol pela via subcutânea para controle da dor imediatamente após a cirurgia e foram avaliados diariamente recebendo novas doses conforme a necessidade.

4.3.5 Processamento dos fragmentos tumorais para produção do lisado tumoral

O fragmento tumoral removido cirurgicamente em condições assépticas recebeu um banho rápido em álcool 70°, um banho em PBS acrescido de penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100 mg/ml) e foram acondicionados em tubo cônico com meio DMEM acrescido de SFB (10%) e de penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100 mg/ml), sendo mantido em gelo por no máximo 2 horas.

Os fragmentos foram levados ao fluxo laminar sendo transferidos para placas de petri onde, com o auxílio de lâminas de bisturi, foram devidamente fragmentados (Figura 4.3). As células foram recolhidas em tubo cônico e homogeneizadas veementemente, sendo então centrifugadas por 5 min a 1.000 rotações por minuto e ressuspensas em PBS, repetindo-se o processo por duas vezes.

Para o cálculo da quantidade de células o tubo cônico foi pesado sem as células (p), recebendo então a suspensão de células, que foi centrifugada, sendo o sobrenadante descartado, para a pesagem do tubo cônico com as células (P), sendo o peso em células obtido subtraindo-se p de P. Células de melanoma B16-F10 cultivadas em garrafas foram anteriormente pesadas e constatou-se que para cada 30 mg correspondem a $1,5 \times 10^6$ células, sendo assim a suspensão de células coletadas dos animais foram ajustadas para conter 1×10^7 células/ml.

Figura 4.2 – Procedimento de remoção cirúrgica do melanoma B16-F10

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.3 – Procedimento de fragmentação da amostra tumoral

Fonte: Del-Grande (2019).

4.3.6 Produção do lisado tumoral com a PDT

A suspensão de células contendo meio de cultura DMEM acrescido de Azul de Metileno na concentração de 2 $\mu\text{g/ml}$ foi acondicionada em tubo cônico e permaneceu em incubação durante 1 hora em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 5% CO_2 e umidade relativa de 100%.

O tubo foi centrifugado por 5 min a 1.000 rotações por minuto. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio DMEM, sendo transferidas para placas de cultivo celular de 30 mm, onde foram irradiadas com o feixe de laser a uma distancia focal de 6 cm, durante 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm^2 (Figura 4.4). As células foram então incubadas em estufa durante 24 horas.

As células e o meio foram então recolhidos em tubo cônico que foi centrifugado por 5 min a 1.000 rotações por minuto. O sobrenadante foi recolhido e congelado em freezer -80°C para uso posterior.

Figura 4.4 – Amostra tumoral sendo irradiada com laser vermelho

Fonte: Del-Grande (2019).

4.3.7 Produção do lisado tumoral por congelamento

A suspensão células contendo meio de cultura DMEM foi acondicionada em tubo cônico de 15 ml. O tubo foi congelado através de imersão em nitrogênio líquido durante 5 minutos com posterior descongelamento em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo realizados 3 ciclos de congelamento e descongelamento (F/T, do inglês: Freeze and Thaw). A suspensão celular foi então transferida para placas de cultivo de 30 mm, permanecendo em estufa durante 24 horas.

As células e o meio foram então recolhidos em tubo cônico que foi centrifugado por 5 min a 1.000 rotações por minuto. O sobrenadante foi recolhido e congelado em freezer -80°C para uso posterior.

4.3.8 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, através de sobre dose de anestésico intraperitoneal com cloridrato de cetamina (100mg/kg) associado a xilazina (20mg/kg). Os órgãos foram pesados e acondicionados em formaldeído 10%, assim como a massa tumoral, para posterior processamento e confecção das laminas para análise histopatológica e imuno-histoquímica. Foram coletados dados macroscópicos da presença ou ausência de metástases em linfonodo regional inguinal (confirmada por histopatológico) para comparação entre os grupos.

4.3.9 Análise histopatológica

Os fragmentos tumorais e órgãos foram processados para inclusão em parafina, com posterior confecção dos blocos que foram cortados em micrótomo manual (Leica® RM2235) na espessura de 5 µm, sendo então preparadas as lamínas para coloração histológica com Hematoxilina e Eosina, conforme técnica rotineira.

A formação tumoral foi avaliada por morfometria quanto a porcentagem de necrose, sendo comparados entre os grupos.

O Baço foi avaliado quanto a presença ou ausência de hiperplasia linfóide, sendo comparados entre os grupos.

O linfonodo inguinal regional foi avaliado qualitativamente quanto a presença de metástases, sendo comparados entre os grupos.

4.3.9.1 Morfometria

Para a realização da morfometria para determinação da porcentagem de necrose presente nas massas tumorais dos diferentes grupos, foram realizados cortes histológicos

Figura 4.5 - Fotomicrografia do melanoma murino B16-F10 com a grade digital para realização da morfometria

Legenda: Seta branca indicando pontos em necrose

Fonte: Del-Grande (2019).

seriados, sendo aleatoriamente selecionados 10 cortes. Cada corte foi fotografado com objetiva de 4x em microscópio de luz Nikon® eclipse E800, acoplado com câmera fotográfica Nikon® DXM 1200c. Com o uso do programa ImageJ uma grade com 100 pontos foi

sobreposta a cada imagem (Figura 4.5), sendo contados os pontos apresentando necrose, sendo assim determinada a porcentagem de necrose e comparada entre os grupos experimentais (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966).

4.3.10 Análise imuno-histoquímica dos linfócitos

Os fragmentos de baço e linfonodos foram processados para inclusão em parafina, com posterior confecção dos blocos que foram cortados em micrótomo manual (Leica® RM2235) na espessura de 5 µm, sendo então preparadas as laminais para marcação imuno-histoquímica (IHQ) dos Linfócitos T CD3+ anticorpos monoclonais “Anti-CD3 antibody [SP7] ab16669” da marca Abcam®, seguindo a técnica especificada pelo fabricante, e sendo realizada contra coloração nuclear com Hematoxilina, conforme técnica rotineira. A intensidade e localização das marcações foram comparadas entre os grupos experimentais.

4.3.11 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram utilizados os programas computacionais 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 Bonferroni 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 volume tumoral 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.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Progressão do volume tumoral

A figura 4.6 mostra o aspecto dos tumores da linhagem do melanoma murino B16-F10 quando inoculado no subcutâneo de camundongos C57 BL/6, nos grupos controle (n=8), que recebeu solução salina, grupo F/T (n=8), que recebeu lisado tumoral por congelamento e grupo PDT (n=8), que recebeu lisado tumoral por PDT (Azul de metileno a 2 µg/ml e irradiação com feixe de laser a uma distancia focal de 6 cm, durante 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm²).

Figura 4.6 - Fotografias das massas tumorais do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos C57 BL/6 que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Fonte: Del-Grande (2019).

A tabela 4.1 e a figura 4.7 mostram os valores do volume tumoral (mm³) nos diferentes grupos experimentais e nos respectivos dias após a inoculação tumoral.

Em todos os grupos o volume tumoral aumentou progressivamente até o dia 15, entretanto a progressão tumoral dos grupos F/T e PDT apresentaram-se estatisticamente menores nos dia 12 e 15 (ANOVA – 2 Vias: $p < 0,001$) em comparação ao grupo controle.

Comparando-se o grupo F/T com o grupo PDT não houve diferença significativa na progressão do volume tumoral (ANOVA – 2 Vias: $p > 0,05$).

Tabela 4.1 – Progressão do volume tumoral (mm^3) do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos C57 BL/6 que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

	Controle	F/T	PDT
Dia 6	291,12 $\pm$ 62,88	289,54 $\pm$ 46,26	288,91 $\pm$ 40,32
Dia 8	673,80 $\pm$ 145,54	670,15 $\pm$ 107,07	668,69 $\pm$ 93,32
Dia 10	1056,44 $\pm$ 228,18	916,69 $\pm$ 146,46	881,25 $\pm$ 122,99
Dia 12	1890,07 $\pm$ 408,24	1456,71 $\pm$ 232,75*	1312,28 $\pm$ 183,14*
Dia 15	2096,91 $\pm$ 452,92	1612,80 $\pm$ 257,40*	1450,63 $\pm$ 202,45*

Legenda: Valores expressos em Média $\pm$ Desvio padrão do volume tumoral em mm^3 . (ANOVA – 2 Vias: * = $P < 0,001$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.7 – Gráfico de barras com a progressão do volume tumoral (mm^3) do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos C57 BL/6 que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em Média $\pm$ Desvio padrão do volume tumoral em mm^3 . (ANOVA – 2 Vias: * = $P < 0,001$, em relação ao grupo controle e).

Fonte: Del-Grande (2019).

4.4.2 Avaliação linfonodo regional (inguinal)

O linfonodo regional, ou seja, o inguinal direito, dos animais dos diversos grupos experimentais foram avaliados durante a necropsia quanto ao indício da presença de metástases, sendo verificado o peso, volume e coloração. A confirmação da presença de metástases foi realizada posteriormente pela análise histopatológica. A figura 4.8 representa animais onde não foi observada a presença de metástases (figura 4.8 A) e de animais onde houve a presença de metástases em linfonodo inguinal (figura 4.8 B).

Figura 4.8 – Linfonodos inguinais de camundongos C57 BL/6 depois de inoculado no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: A: Animal apresentando linfonodo inguinal direito com indícios de metástases do melanoma B16-F10. B: animal apresentando linfonodo inguinal direito sem indícios de metástases.

Fonte: Del-Grande (2019).

A figura 4.9 mostra a tabela de contingência da presença de metástases em linfonodo inguinal direito no dia 15 do delineamento (eutanásia) nos diferentes grupos experimentais. No grupo controle 6 animais apresentaram metástases (+) e 2 animais não apresentaram metástases (-). No grupo F/T e no PDT 4 animais apresentaram metástases (+) e 4 animais não apresentaram metástases (-). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Teste exato de Fisher: $p > 0,05$).

Figura 4.9 – Gráfico de barras da presença de metástases em linfonodo regional (inguinal direito) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em número de animais. (Teste exato de Fisher: $p > 0,05$).

Fonte: Del-Grande (2019).

4.4.3 Peso relativo do linfonodo regional

A tabela 4.2 e a figura 4.10 mostram o peso relativo do linfonodo regional (g/100g) nos diferentes grupos experimentais. Nos grupos F/T e PDT o peso relativo do baço foi significativamente menor (ANOVA: $p < 0,05$) em relação ao controle. Comparando-se o grupo F/T com o PDT não houve diferença significativa (ANOVA: $p > 0,05$).

Tabela 4.2 – Tabela com os valores do peso relativo do linfonodo regional (g/100g) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

	Controle	F/T	PDT
Peso relativo (g/100g)	0,05984 ± 0,0123	0,04193 ± 0,01278*	0,04245 ± 0,0089*

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão do peso relativo do baço. (ANOVA: * = $P < 0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.10 – Gráfico em barras do peso relativo do linfonodo (g/100g) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

LegendaValores expressos em Média ± Desvio padrão do peso relativo do baço. (ANOVA: * = $P < 0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

4.4.4 Peso relativo do baço

A tabela 4.3 e a figura 4.11 mostram o peso relativo do baço (g/100g) nos diferentes grupos experimentais. Não havendo diferenças estatísticas significantes entre os grupos (ANOVA: $p>0,05$).

Tabela 4.3 – Peso relativo do baço (g/100g) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

	<i>Controle</i>	<i>F/T</i>	<i>PDT</i>
Peso relativo (g/100g)	0,5590 ± 0,1433	0,5719 ± 0,1468	0,5844 ± 0,1261

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão do peso relativo do baço. (ANOVA: * = $P>0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.11 – Gráfico em barras do peso relativo do baço (g/100g) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão do peso relativo do baço. (ANOVA: * = $P<0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

4.4.5 Análise histopatológica

4.4.5.1 Análise Tumoral

A figura 4.12 mostra o aspecto histológico pela coloração por H&E das formações tumorais. Em todos os grupos experimentais houve progressão tumoral, sendo possível a observação de massa tumoral com intensa pigmentação por melanina infiltrada em região de

derme e hipoderme, com pronunciada infiltração da camada submuscular em algumas amostras, evidente proliferação tumoral desorganizada, além da presença de vasos sanguíneos decorrentes de neovascularização, havendo extensas áreas com tecido necrótico, sendo em alguns animais mais proeminente e em outros menos (figura 4.13) e infiltrado inflamatório polimorfo nuclear e mononuclear linfocitário (Figura 4.14).

Figura 4.12 – Fotomicrografia do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos C57 BL/6 que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E)

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.13 - Fotomicrografia do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos C57 BL/6 que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E). Representação dos graus de necrose encontrados

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.14 - Fotomicrografia do melanoma murino B16-F10 depois de inoculado no subcutâneo de camundongos C57 BL/6 que receberam tratamento com lisado de células por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E).

Legenda: Setas brancas indicando região de infiltrado inflamatório.

Fonte: Del-Grande (2019).

4.4.5.1.1 Morfometria áreas de necrose

A tabela 4.4 e a figura 4.15 mostram a porcentagem (%) de áreas em necrose nas formações tumorais dos diferentes grupos experimentais. Nos grupos F/T e PDT a porcentagem de necrose foi significativamente maior (ANOVA: $p < 0,05$) em relação ao controle. Comparando-se o grupo F/T com o PDT não houve diferença significativa (ANOVA: $p > 0,05$).

Tabela 4.4 – Porcentagem de áreas em necrose de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

	Controle	F/T	PDT
Porcentagem Necrose (%)	17,24 ± 4,948	24,60 ± 3,980*	25,33 ± 4,828*

Legenda: Valores expressos em Média ± Desvio padrão da porcentagem de necrose. (ANOVA: * = $P < 0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.15 – Gráfico em barras da porcentagem de áreas em necrose de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle)

Legenda: Valores expressos em Média $\pm$ Desvio padrão da porcentagem de necrose. (ANOVA: * = $P < 0,05$, em relação ao grupo controle).

Fonte: Del-Grande (2019).

4.4.5.2 Análise do baço

A figura 4.16 mostra o aspecto histológico pela coloração por H&E do baço dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os animais de todos os grupos apresentaram alterações morfológicas discretas nas estruturas do órgão, observando-se que a arquitetura do órgão manteve-se preservada, entretanto os folículos linfoides, os respectivos centros germinativos e zona marginal apresentavam-se aparentemente mais proeminentes, com áreas de coalescência dos folículos. Os achados sugerem uma discreta hiperplasia linfoide do baço nestes animais. Observou-se a manutenção da arquitetura das regiões de polpa vermelha.

4.4.5.3 Análise imuno-histoquímica dos linfócitos do baço

A figura 4.17 demonstra a marcação Imuno-histoquímica na membrana citoplasmática dos receptores de linfócito do tipo T CD3+ em menor e maior aumento sob microscopia ótica, sendo observada uma maior concentração destes tipos linfocitários na região peri arteriolar dos folículos linfoides.

Figura 4.16 - Fotomicrografia do baço de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E)

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.17 - Fotomicrografia do baço de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) com marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ (Contra coloração: Hematoxilina)

Fonte: Del-Grande (2019).

A Figura 4.18 demonstra a análise comparativa entre os grupos controle, F/T e PDT não indicando diferenças aparentes significativas na quantidade ou distribuição do referido tipo linfocitário.

Figura 4.18 – Fotomicrografia do baço de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) com marcação por H&E e Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ (Contra coloração: Hematoxilina)

Fonte:

Del-Grande (2019).

4.4.5.4 Análise linfonodo regional (Inguinal)

A figura 4.19 mostra o aspecto histológico pela coloração por H&E do linfonodo regional (inguinal) dos animais nos grupos experimentais, que apresentaram ou não metástases.

Nos animais que não apresentaram metástases no linfonodo regional, ou seja, em animais dos grupos tratados (F/T e PDT), foram observadas alterações indicando linfonodo reativo, onde se podem observar folículos linfóides com centros germinativos proeminentes (Figura 4.19 A – setas escuras), ademais, nestes animais não foram observadas alterações morfológicas importantes nas demais estruturas do órgão. Alguns animais apresentaram

intensa presença de pigmentação por melanina acumulada nos macrófagos da região medular, mesmo sem a presença de metástases (Figura 4.21).

Nos animais apresentando metástases (Figura 4.19 B e Figura 4.20) é possível observar que a massa tumoral pigmentada por melanina comprimiu as estruturas do linfonodo, havendo importante comprometimento das regiões para cortical e cortical, e em alguns casos a ruptura a cápsula do órgão. Nestes animais não são visualizados os centros germinativos tão proeminentes quanto os observados nos animais sem metástases.

Figura 4.19 - Fotomicrografia do linfonodo regional (Inguinal) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E)

Legenda: Setas escuras: Centros germinativos proeminentes nos folículos linfoides.
Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.20 - Fotomicrografia do linfonodo regional (Inguinal) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E)

Legenda: As setas brancas indicam a região de tecido linfóide cortical. As setas escuras indicam a região de metástases do melanoma B16-F10.
Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.21 - Fotomicrografia do linfonodo regional (Inguinal) de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (H&E)

Legenda: As setas brancas indicam a região de tecido linfoide cortical. As setas escuras indicam a região de pigmentação por melanina em células linfocitárias da região medular.
Fonte: Del-Grande (2019).

4.4.5.5 Análise imuno-histoquímica dos linfócitos do linfonodo regional (Inguinal)

A figura 4.22 demonstra a marcação Imuno-histoquímica na membrana citoplasmática dos receptores de linfócito do tipo T CD3+ dos animais nos grupos experimentais, que apresentaram ou não metástases.

Figura 4.22 - Fotomicrografia do linfonodo regional (Inguinal) com marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento, PDT ou solução salina (Controle) (Contra coloração: Hematoxilina).

Fonte: Del-Grande (2019).

Figura 4.23 - Fotomicrografia do linfonodo regional (Inguinal) com marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 e que receberam tratamento com lisado de células tumorais por congelamento ou PDT (Contra coloração: Hematoxilina).

Legenda: Seta escura indicando macrófago.

Fonte: Del-Grande (2019).

Nos animais que não apresentaram metástases no linfonodo regional, ou seja, em animais dos grupos tratados (F/T e PDT), foi observada a marcação por CD3+ na região medular do órgão, assim como em para cortical. Ademais, houve marcação CD3+ em região folicular de centro germinativo (Figura 4.23), estando estes mais proeminentes como observado anteriormente pelo H&E. Nos centros germinativos ainda pode-se observar a presença de macrófagos rodeados por linfócitos T CD3+ (Figura 4.23 C – Seta escura).

Nos animais apresentando metástases, ou seja, os animais do grupo controle sem tratamento foi observada a marcação por CD3+ na região medular e região para cortical, não havendo marcação importante em folículo linfoide (Figura 4.22). A Figura 4.24 mostra a região para cortical sofrendo invasão e compressão pela massa tumoral do melanoma B16-F10 (Figura 4.24 – Seta escura) é possível observar células T CD3+ (Figura 4.24 – Seta branca).

Figura 4.24 - Fotomicrografia do linfonodo regional (Inguinal) com marcação Imuno-histoquímica de Linfócitos T CD3+ de camundongos C57 BL/6 inoculados no subcutâneo com o melanoma murino B16-F10 que não foram tratadas com lisado (Controle)

Fonte: Del-Grande (2019).

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO CAPÍTULOS 3 E 4 E CONCLUSÕES FINAIS

5.1 DISCUSSÃO

Nos capítulos 3 e 4 do presente trabalho o objetivo principal foi utilizar *in vivo* em modelos animais, de forma inédita, a vacina antitumoral composta pelo lisado de células tumorais do melanoma murino B16-F10 produzido com o protocolo de terapia fotodinâmica baseada no azul de metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho (660 nm) definido no capítulo 2.

No capítulo 3, foi utilizado um modelo animal de imunização contra o melanoma B16-F10, onde o lisado foi produzido *in vitro*, incubando-se as células desta linhagem durante uma hora em meio de cultivo contendo Azul de Metileno na concentração de 2 µg/ml, sendo então irradiadas com o feixe de laser a uma distancia focal de 6 cm, durante 24 minutos de irradiação, com dose de energia de 100,8 J e fluência de 720 J/cm² e posterior incubação por 24 horas para coleta do sobrenadante a ser utilizado como vacina. O modelo animal utilizado possibilitou a descrição dos efeitos sobre a progressão tumoral e sobre o sistema imunológico quando a vacina é utilizada de forma profilática, ou seja, aplicada para induzir nos animais imunidade prévia, capacitando-os para uma resposta adaptativa quando do desafio com a inoculação das células tumorais.

No capítulo 4, o modelo adotado foi o de uma abordagem de tratamento contra o melanoma B16-F10, sendo o protocolo de produção da vacina adaptado para ser realizado em um modelo animal que buscou mimetizar a abordagem clinica-cirúrgica que um paciente oncológico poderia ser submetido. Desta forma, animais portadores do melanoma B16-F10 foram submetidos ao procedimento cirúrgico de excisão parcial da formação tumoral, sendo o material coletado individualmente de cada animal e processado conforme o protocolo de PDT-AM estabelecido para obtenção da vacina, sendo então estas aplicadas nos animais de forma terapêutica. O modelo deste capítulo possibilitou assim a descrição dos efeitos sobre a progressão tumoral após a aplicação intratumoral da vacina e os subseqüentes efeitos sobre a resposta imunológica.

No presente estudo buscou-se elucidar os fatores corroborando com a hipótese de que o lisado tumoral produzido pela PDT-AM tem capacidade imunogênica, ou seja, quando aplicado de forma profilática ou terapêutica poderá induzir resposta imunológica adaptativa contra as células neoplásicas. O primeiro fator decisivo para a confirmação da eficiência de uma nova terapia para o câncer em fase pré-clínica de estudos é a observação do seu efeito

sobre a progressão tumoral em modelos animais. Em ambas as abordagens de utilização da vacina descritas nos capítulos 3 e 4 a avaliação da progressão do volume tumoral dos diferentes grupos experimentais demonstrou que nos animais que receberam a vacina (grupos F/T e PDT) houve atenuação da progressão tumoral comparado ao grupo controle.

No modelo de imunização prévia (capítulo 3), 3 (n=8) animais de cada grupo tratado não apresentaram progressão tumoral e no grupo PDT houve ainda atraso para o surgimento de tumores palpáveis e apesar de não haver nível de significância indicando diferenças estatísticas entre a curva de progressão tumoral dos dois grupos tratados, a progressão no grupo PDT iniciou-se dois dias após o grupo F/T e o controle, ou seja, nos dias 6 e 8 após a inoculação há diferença estatística entre o grupo PDT e os grupos F/T e controle (ANOVA - 2 vias: $p < 0,05$). No modelo de tratamento (capítulo 4), todos os animais apresentaram aumento de volume progressivo da formação tumoral, sendo observada apenas a atenuação dessa progressão nos animais nos grupos tratados (F/T e PDT), sendo o volume tumoral final no grupo PDT discretamente menor, porém sem diferenças estatísticas significativas.

A progressão tumoral sendo atrasada, atenuada e até impedida em alguns animais nos grupos vacinados é indicativa da capacidade imunogênica do lisado de células, fenômeno explicado pela presença não só de variados antígenos tumorais, mas também pela expressão e liberação das DAMPs, resultante do efeito fototóxico que a PDT-AM promove nas células tumorais (KORBELIK; SAN; CECIC, 2005; MERCHANT; KORBELIK, 2010; GARG et al., 2010), sendo este o mesmo mecanismo de indução de resposta imunológica antitumoral observada quando a PDT é aplicada diretamente no paciente. Ou seja, as DAMPs induzem inflamação e a invasão por neutrófilos, macrófagos e células NK; e associado a grande quantidade de antígenos tumorais presente no lisado, promove-se a condição ideal para a apresentação antigênica para as células dendríticas. A apresentação antigênica promove ativação do sistema imune adaptativo e há a sensibilização dos linfócitos T efetores, determinando uma resposta específica para as células neoplásicas em questão (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006). Correlacionado com tal mecanismo, é interessante observar que no modelo de tratamento com o lisado, a morfometria das formações tumorais mostrou que as áreas de necrose foram significativamente maiores nos grupos tratados com a vacina (F/T e PDT), demonstrando que a atenuação da progressão tumoral nestes animais se deu pela ocorrência de morte das células neoplásicas.

O lisado produzido com o congelamento das células também demonstrou a sua capacidade imunogênica, sendo este fato explicado pelo mecanismo de morte celular induzido pelo congelamento ser semelhante ao processo induzido pela PDT, havendo com o

congelamento semelhante expressão e liberação das DAMPs (BROK et al., 2006; SABEL, 2009; SIDANA, 2014). A discreta diferença observada, onde a progressão tumoral do grupo PDT foi menor que a do grupo F/T já foi descrita anteriormente na literatura por autores trabalhando com o conceito de vacina antitumoral baseada na PDT (GOLLNICK; VAUGHAN; HENDERSON, 2002; BAE et al., 2007).

A diversidade das DAMPs que são expressas pelas células neoplásicas em processo de morte celular esta ligada ao tipo de morte celular, ao tipo celular e também ao tecido que sofre a injúria em se tratando da sua observação *in vivo* (RUBARTELLI; LOTZE, 2007). Durante um grande período de tempo na história do estudo da morte celular, onde se analisava e classificava os tipos de morte pela morfologia celular, a apoptose foi considerada como tolerogênica, ou seja, incapaz de estimular resposta imunológica. Entretanto, com o avanço das tecnologias da biologia molecular, as classificações de morte celular passaram a contar com métodos capazes de quantificar de forma mais objetiva as características funcionais das células, com isso ficou claro que: (1) a apoptose não é somente um tipo de morte celular que regula o desenvolvimento embrionário e a homeostase; (2) a necrose também pode acontecer de forma regulada como a apoptose; (3) assim como a necrose, a apoptose pode ser detectada pelo sistema imune e desencadear resposta adaptativa a antígenos das células mortas. Portanto, mesmo que a apoptose como processo fisiológico não seja capaz de estimular uma resposta imune adaptativa, alguns estímulos específicos podem induzir uma variante da morte celular programada que é imunogênica, mesmo sendo morfologicamente e bioquimicamente compatível com a apoptose fisiológica. O termo “morte celular imunogênica” (ICD, do inglês: Immunogenic cell death) foi primeiramente utilizada em 2005 por Casares et. al. quando trataram *in vitro* linhagens de carcinoma coloretal CT26 e fibrossarcoma MCA205 murinos com doses letais de doxorubicina e após inocular as células em apoptose (morfologicamente e expressando caspase) nos camundongos produziram imunidade a uma aplicação tumorigênica das mesmas linhagens. O que se prega hoje em relação aos mecanismos de indução da ICD é que os estímulos provocando a morte da célula devem respeitar a liberação de sinais coordenados dentro de um espaço tempo, sendo estes sinais convertidos especificamente pelas DAMPs, sendo as principais já definidas a calreticulina, a liberação do ATP e a HMGB1 (CASARES, et al., 2005; KEPP; SENOVILLA, 2014).

As análises realizadas no baço dos animais corroboram com a tese de indução de resposta imunológica adaptativa dos animais vacinados com ambos os lisados, entretanto os resultados obtidos no modelo de tratamento são menos expressivos. No modelo de imunização, foi observado um número significativamente maior da ocorrência de hiperplasia

dos folículos linfóides dos animais vacinados, observada também macroscopicamente pelo maior peso relativo do baço destes animais. Já no modelo de tratamento todos os animais, inclusive os do grupo controle apresentaram alterações morfológicas compatíveis com discreta hiperplasia dos folículos linfóides do baço. Isto possivelmente se dá, pois a progressão do melanoma B16-F10 nesse modelo é extremamente agressiva, havendo inclusive ulceração secundária a ruptura da pele pela massa tumoral (Figura 4.6), sendo assim estes animais apresentam alterações decorrentes da resposta inflamatória ativa ocorrendo com possível infecção bacteriana.

Em ambos os modelos, a marcação IHQ dos linfócitos do tipo T, com o anticorpo do tipo CD3 mostrou que essa população de tipo linfocitário permaneceu estável mesmo havendo hiperplasia do folículo, portanto tratando-se esta hiperplasia de um aumento do número dos linfócitos negativos a marcação por CD3, ou seja, tipos linfocitários do grupo de células B. Tais achados corroboram com resultados encontrados anteriormente, tanto para a imunidade decorrente do uso clínico da PDT (GOMER; FERRARIO; MURPHREE, 1987; KORBELIK, 1996; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006), quanto aos efeitos encontrados em modelos de vacinas tumorais baseadas na PDT, porem utilizando-se outros agentes fotossensibilizantes, fontes de luz e regimes de irradiação onde se descreve um aumento importante de variadas subpopulações linfocitárias nos animais vacinados (GOLLNICK; VAUGHAN; HENDERSON, 2002; KORBELIK; CECIC, 2003; KORBELIK; SUN, 2005; KORBELIK; STOTT; SUN, 2007).

Os resultados encontrados na avaliação do linfonodo regional (inguinal) somam-se aos demais fatores encontrados para corroborar com a hipótese de imunogenicidade antitumoral com indução de resposta imunológica adaptativa por células do tipo T e B quando os lisados são utilizados como vacina, seja profilática ou terapêutica. Os linfonodos são órgãos onde ocorre a interação dos linfócitos T e B e as células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. O órgão possui uma compartimentalização dos tipos celulares facilitando essa interação. Os linfócitos B, localizados nos folículos da região cortical, proliferam quando estimulados, formando os centros germinativos. Os Linfócitos T interagem com as células dendríticas na região medular e paracortical interfolicular, e quando estimulados proliferam havendo aumento de volume destas áreas (WILLARD-MACK, 2006).

Desta forma, no modelo de imunização os achados nos linfonodos determinam a ocorrência da indução de resposta imunológica nos animais tratados, ao ser observado que nos grupos F/T e PDT tal órgão apresentou-se reativo, com um maior peso relativo, justificado pelo maior volume encontrado nas zonas cortical e paracortical identificado no exame

histopatológico pela coloração com H&E. No modelo de tratamento, os animais tratados com as vacinas apresentaram uma menor ocorrência de metástases do melanoma B16-F10, com isso o peso relativo do linfonodo dos animais do grupo controle apresentando metástases foi significativamente maior (ANOVA: $p < 0,05$). Contudo, a avaliação histopatológica comparativa entre os animais com e sem metástases nos diferentes grupos experimentais demonstrou que nos animais tratados foram observadas alterações indicando linfonodo reativo, onde se podem observar folículos linfóides com centros germinativos proeminentes; fato não encontrado nos animais com metástases do grupo controle.

Ademais, o resultado das marcações IHQ da população de linfócitos T CD3+ em ambos os modelos mostram um grande número desse tipo celular, indicando expansão clonal ativa dos linfócitos T ocorrendo nos animais tratados com as vacinas. Estes achados são o esperado conforme o mecanismo de ação da vacina e também quando se aplica a PDT in vivo, onde conforme descrito em literatura há sensibilização e ativação de Linfócitos T auxiliares e citotóxicos (KORBELIK, 1996; KORBELIK; KROSL; DOUGHERTY, 1996; CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006; GOLLNICK; VAUGHAN; HENDERSON, 2002; KORBELIK; CECIC, 2003; KORBELIK; SUN, 2005; KORBELIK; STOTT; SUN, 2007; KOUSIS et al., 2007).

O presente trabalho utilizou a terapia fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho para produzir lisado de células tumorais do melanoma murinho B16-F10, sendo este lisado utilizado para indução de resposta imunológica antitumoral específica. Os resultados encontrados mostram que a técnica foi capaz de gerar efeitos sobre o sistema imunológico, sendo capaz de, ao menos, atenuar a velocidade de progressão tumoral.

Em se tratando do tratamento do melanoma oral dos cães, um tumor maligno, extremamente agressivo e pouco responsivo aos tratamentos atualmente utilizados, a utilização da vacina produzida com a terapia fotodinâmica pode, futuramente, ser uma alternativa de tratamento adjuvante, sendo o protocolo aqui estabelecido passível de tradução para ser utilizado na espécie canina em modelo de estudo clínico.

5.2 CONCLUSÕES CAPÍTULOS 3 E 4

5.2.1 capítulo 3

O capítulo 3 demonstra a capacidade imunogênica de lisados de células tumorais da linhagem de melanoma murinho B16-F10 produzidos *in vitro* com a terapia fotodinâmica baseado no azul de metileno e laser de diodo emitindo espectro vermelho, assim como dos lisados por produzidos por congelamento. A aplicação do lisado antes da inoculação tumoral foi capaz de atenuar, atrasar e, em parte dos animais, impedir a progressão do melanoma B16-F10 em camundongos BALB/c, além de induzir alterações em baço e linfonodo regional, caracterizando resposta por linfócitos T contra as células neoplásicas.

5.2.2 Conclusões capítulo 4

O capítulo 4 demonstra a capacidade imunogênica de lisados de células do melanoma B16-F10, removido parcialmente por cirurgia, após inoculação em camundongos C57 BL/6, para então ser submetido, *in vitro*, a Terapia Fotodinâmica baseado no Azul de Metileno e Laser de diodo emitindo espectro vermelho, assim como dos lisados por produzidos por congelamento. A aplicação do lisado como vacina terapêutica foi capaz de atenuar a progressão do melanoma B16-F10 nestes camundongos, além de induzir alterações em baço e linfonodo regional, caracterizando resposta por linfócitos T contra as células neoplásicas.

5.3 CONCLUSÕES FINAIS

5.3.1

Padronizou-se a técnica e as doses necessárias para a obtenção do lisado de células de melanoma B16-F10.

5.3.2

Demonstrou-se, em camundongos, a capacidade imunogênica de lisados de células tumorais da linhagem de melanoma murino B16-F10 produzidos *in vitro* com a terapia fotodinâmica baseado no azul de metileno e laser de diodo emitindo espectro vermelho, assim como dos lisados por produzidos por congelamento.

5.3.3

Demonstrou-se que a aplicação do lisado como vacina terapêutica foi capaz de atenuar a progressão do melanoma B16-F10 em camundongos, além de induzir alterações em baço e linfonodo regional, caracterizando resposta por linfócitos T contra as células neoplásicas.

5.3.4

Conclui-se que o uso de PDT com azul de metileno e laser diodo tem potencial para ser usado como novo tratamento adjuvante para o melanoma baseando-se nos efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre o sistema imunológico

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, S. A.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Biotechnology Progress**, v. 9, n. 6, p.671-674, nov. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp00024a017>.
- ANDREE, H. A.; REUTELINGSPERGER, C. P.; HAUPTMANN, R.; HEMKER, H. C.; HERMENS, W. T.; WILLEMS, G. M. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 265, p. 4923-4928, 1990.
- BAE, S. et al. Photodynamic therapy-generated tumor cell lysates with CpG-oligodeoxynucleotide enhance immunotherapy efficacy in human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells. **Cancer Science**, v. 98, n. 5, p.747-752, maio 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00447.x>.
- BAGNATO, V. S. Fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, v. 2, n. 2, p. 4-9, 2001.
- BERGMAN, P. J.; KENT, M. S.; FARESE, J. P. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2013, p. 321–334.
- BROK, M. H. M. G. M. D. et al. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity. **British Journal Of Cancer**, v. 95, n. 7, p.896-905, 5 set. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603341>.
- CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Photodynamic therapy in oncology. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 8, n. 3, p. 1173-1179, 2006.
- CASARES, N et. al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. **Journal of experimental medicine**, v.202, p. 1691-1701, 2005.
- 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, n. 4, p.279-293, dez. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00007-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00007-4).
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p.91-106, jun. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00060-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00060-8).
- CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R.. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p.535-545, jul. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1894>.

CHELI, R. et al. Hematoporphyrin derivative photochemotherapy of spontaneous animal tumors: Clinical results with optimized drug dose. **Cancer Letters**, v. 23, n. 1, p.61-66, maio 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(84\)90062-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(84)90062-4).

_____. Photodynamic therapy of spontaneous animal tumors using the active component of hematoporphyrin derivative (DHE) as photosensitizing drug: Clinical results. **Cancer Letters**, v. 38, n. 1-2, p.101-105, dez. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90205-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(87)90205-9).

DOBSON, J. M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. **Isrn Veterinary Science**, v. 2013, p.1-23, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/941275>.

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

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.

FIDLER, I. J. Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2' -deoxyuridine. **Journal Of The National Cancer Institute**, v. 45, n. 4, p.773-782, 01 out. 1970. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/45.4.773>.

_____. Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. **Nature New Biology**, Philadelphia, v. 242, n. 1, p.148-149, 04 abr. 1973.

GARG, A. D. et al. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. **Apoptosis**, v. 15, n. 9, p.1050-1071, 10 mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-010-0479-7>.

GOLLNICK, S. O.; VAUGHAN, L.; HENDERSON, B. W. Generation of Effective Antitumor Vaccines Using Photodynamic Therapy. **Cancer Research**, New York, v. 62, n. 6, p.1604-1608, fev. 2002.

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.

HART, I. R. The Selection and Characterization of an Invasive Variant of the B16 Melanoma. **American Journal Of Pathology**, 1, v. 97, n. 3, p.587-600, dez. 1979.

HOTTA, S. et al. Immediate changes in subcellular structures of transplanted tumors following photodynamic and laser hyperthermic therapy. **Lasers In Surgery And Medicine**, v. 16, n. 3, p.262-271, 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.1900160308>.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

KEPP, O.; SENOVILLA, L. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. **OncoImmunology**, v.3, n.9, p. e955691, 2014.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**. v. 84, p. 1415-1420, 1994.

KORBELIK, M. Induction of Tumor Immunity by Photodynamic Therapy. **Journal Of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, n. 5, p.329-334, out. 1996. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/clm.1996.14.329>.

KORBELIK, M.; CECIC, I. Mechanism of Tumor Destruction by Photodynamic Therapy. In: NALWA, Hari Singh. **Handbook of Photochemistry and Photobiology**. Japan: Hitachi, 2003. Cap. 4. p. 39-77.

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, n.24, p.5647-5652, 1996.

KORBELIK, M.; MERCHANT, S. Photodynamic therapy-generated cancer vaccine elicits acute phase and hormonal response in treated mice. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 9, p.1387-1394, 24 jan. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-012-1206-8>.

KORBELIK, M.; SUN, J. Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 55, n. 8, p.900-909, 8 out. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-005-0088-4>.

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, n. 3, p. 1018-1026, 2005.

KORBELIK, M; STOTT, B; SUN, J. Photodynamic therapy-generated vaccines: relevance of tumour cell death expression. **British Journal Of Cancer**, v. 97, n. 10, p.1381-1387, 30 out. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604059>.

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.

LI, M. et al. Ecotropic C-type retrovirus of B16 melanoma and malignant transformation of normal melanocytes. **International Journal Of Cancer**, v. 76, n. 3, p.430-436, 4 maio 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980504\)76:33.0.co;2-d](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980504)76:33.0.co;2-d).

LIM, E. J. et al. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 30, n. 2, p.856-862, 24 maio 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2013.2494>.

LINDBLAD-TOH, K. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, n. 7069, p.803-819, dez. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04338>.

LINK, E. M. et al. Uptake and Therapeutic Effectiveness of 125I- and 211At-Methylene Blue for Pigmented Melanoma in an Animal Model System. **Cancer Research**, New York, v. 49, n. 15, p.4332-4337, ago. 1989.

LU, Y. et al. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa Cell. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 6, p.1451-1460, 15 dez. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21965>.

LUCROY, M. D. et al. 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, out. 1996. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/clm.1996.14.305>.

_____. 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, jun. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1476-5829.2003.00010.x>.

MAGNE, M. L. et al. Photodynamic therapy of facial squamous cell carcinoma in cats using a new photosensitizer. **Lasers In Surgery And Medicine**, v. 20, n. 2, p.202-209, 1997. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9101\(1997\)20:23.0.co;2-h](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9101(1997)20:23.0.co;2-h).

MAGRO, C. M.; CROWSON, A N.; MIHM, M. C. Unusual variants of malignant melanoma. **Modern Pathology**, v. 19, n. 2, p.41-70, 17 jan. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800516>.

MATHIEU, V. et al. Galectin-1 in Melanoma Biology and Related Neo-Angiogenesis Processes. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 9, p.2245-2254, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.142>.

MERCHANT, S.; KORBELIK, M. Heat shock protein 70 is acute phase reactant: response elicited by tumor treatment with photodynamic therapy. **Cell Stress And Chaperones**, v. 16, n. 2, p.153-162, 24 set. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-010-0227-5>.

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, n. 4, p.549-553, abr. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x>.

MODIANO, J. F.; RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J. The Molecular Basis of Canine Melanoma: Pathogenesis and Trends in Diagnosis and Therapy. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p.163-174, maio 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.1999.tb02173.x>.

MORITZ, A. **Oral laser application**. Berlin: Ed. Quintessenz, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, dez. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

OHSIE, S. J. et al. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal Of Cutaneous Pathology**, v. 35, n. 5, p.433-444, maio 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0560.2007.00891.x>.

OLIVEIRA, C. S. et al. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 51, n. 4, p.824-833, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.023>.

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.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current Protocols In Immunology**, p.1-20, maio 2001. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>.

PANZARINI, E.; TENUZZO, B.; DINI, L. Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis of HeLa Cells. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1171, n. 1, p.617-626, ago. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04908.x>.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 2, p.147-156, fev. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2273>.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p.597-608, nov. 2000. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1354/vp.37-6-597>.

RENVOIZE, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**. n. 2, v.14, p. 111-120, 1998.

RIBBLE, D. et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **Bmc Biotechnology**, v. 5, n. 12, p.1-7, maio 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-5-12>.

RIBEIRO, S. M.; ZEZELE, 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.

RICE, L.; WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A. Phenothiazine photosensitizers. III. Activity of methylene blue derivatives against pigmented melanoma cell lines. **Journal Of Chemotherapy**, London, v. 12, n. 1, p.94-104, fev. 2000.

RIEF, J.S. The epidemiology and incidence of cancer. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2012. cap. 4, p. 68-76.

ROSENBERG, S. A. A New Era for Cancer Immunotherapy Based on the Genes that Encode Cancer Antigens. **Immunity**, v. 10, n. 3, p.281-287, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80028-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80028-x).

RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T.. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. **Trends In Immunology**, v. 28, n. 10, p.429-436, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2007.08.004>.

SABEL, M. S. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. **Cryobiology**, v. 58, n. 1, p.1-11, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.10.126>.

SANDUSKY, G. E.; CARLTON, W. W.; WIGHTMAN, K. A.. Immunohistochemical Staining For S100 Protein in the Diagnosis of Canine Amelanotic Melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 6, p.577-581, nov. 1985. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/030098588502200611>.

SANTOS, G. M. P. et al. ROS-induced autophagy reduces B16F10 melanoma cell proliferative activity. **Lasers In Medical Science**, v. 33, n. 6, p.1335-1340, 2 abr. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-018-2489-6>.

SHUMAKER, B. P.; HETZEL, F. W.. CLINICAL LASER PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE TREATMENT OF BLADDER CARCINOMA. **Photochemistry And Photobiology**, v. 46, n. 5, p.899-901, nov. 1987. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb04866.x>.

SIDANA, A. Cancer immunotherapy using tumor cryoablation. **Immunotherapy**, v. 6, n. 1, p.85-93, jan. 2014. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/imt.13.151>.

SIMPSON, R. M. et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p.37-47, 21 nov. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pcmr.12185>.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M.. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p.651-678, nov. 2002. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1354/vp.39-6-651>.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. Cancer metastasis is selective or random depending on the parent tumour population. **Nature**, v. 297, n. 1, p.593-594, 17 jun. 1982.

TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p.175-191, set. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00097-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00097-9).

_____. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p.345-346, dez. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00005-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00005-0).

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

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L. J.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**. v.31, p. 1-9, 1998.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Methods In Molecular Biology**, p.237-245, 2011. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.

WAGNER, M. et al. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clinical And Experimental Dermatology**, v. 37, n. 5, p.527-533, 2 fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2230.2011.04291.x>.

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

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.

WEYDEN, L. et al. Cross-species models of human melanoma. **The Journal Of Pathology**, v. 238, n. 2, p.152-165, 9 out. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4632>.

WICKMAN, G R et al. Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 10, p.1293-1305, 21 jun. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.69>.

WILLARD-MACK, C. L.. Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p.409-424, ago. 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230600867727>.

WILLIAMS, J. L. et al. Methylene blue and the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 4, n. 2, p.229-232, nov. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344\(89\)80010-7](http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344(89)80010-7).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheet number 297: cancer, 2018. Disponivel em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acessado em: 10 jan. 2019.