

Maria Carla Petrellis

**Avaliação dos Efeitos do Azul de Metileno Fotoativado no Modelo
Experimental do Tumor de Walker 256**

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro B. L. Martins.

Versão original

RESUMO

PETRELLIS, M. C. **Avaliação dos efeitos do azul de metileno fotoativado no modelo experimental do tumor de Walker 256.** 2014. 158 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade São Paulo, São Paulo, 2014.

A TFD é considerada como uma nova modalidade terapêutica minimamente invasiva destinada ao tratamento localizado e destruição seletiva de diversos tipos de cânceres e desordens malignas. Esta terapia esta baseada na captação e retenção seletiva do agente fotossensibilizante em sítios alvos que por sua vez sofre ativação através da irradiação de uma fonte externa de luz levando à geração de efeitos citotóxicos induzindo a morte das células tumorais. O azul de metileno é um corante que pertence à classe dos corantes fenotiazínicos e que deperta grande interesse devido às suas propriedades eletrocatalíticas em face da NADH₄, que é uma coenzima do grupo das dehidrogenases Além disso, o mesmo têm-se mostrado como um potente agente fotossensibilizante com excelentes propriedades fotoquímicas em função de possuir alto rendimento na geração de ¹O₂ e EROs na presença de agentes redutores. Devido às suas características fotodinâmicas e fototóxicas e demonstrar alta afinidade com a membrana mitocondrial celular, o azul de metileno têm-se destacado como um efetivo fotossensibilizante de grande potencial para à aplicação médica como agente terapêutico na TFD. Objetivo principal deste estudo foi avaliar se os efeitos do azul de metileno fotoativado podem desencadear processos inflamatórios interferindo no desenvolvimento e na progressão tumoral empregando como modelo experimental o Tumor de Walker 256. Dessa forma investigamos a regulação e a expressão de mediadores inflamatórios, COX -1 e COX -2 por RT-PCR; a produção de prostanóides, citocinas, bem como a geração de EROs pelo método de TBAR e a presença neutrofílica pela análises da MPO na massa tumoral sólida. Além disso, verificamos as alterações morfológicas peri e intra-tumoral utilizando método histológico com coloração em H.E. Nossos resultados demosntraram que o grupo tratado com 0.1% de azul de metileno + 1J provocou um aumento extremamente expressivo e que foi estatisticamente diferente quando comparado em relação aos diferentes grupos tratado e o controle, nos níveis dos diferentes marcadores inflamatório IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , bem como na quantificação da expressão gênica de COX-1, COX-2, iNOS e na geração EROS e PGE₂. A análise histológica também complementou com os resultados anteriores, indicando que no grupo tratado com 0.1% azul de metileno + 1J pode-se verificar alterações morfológicas representadas por grandes áreas de necrose na massa tumoral sólida com presença neutrofílica. Com bases em nossos resultados podemos concluir que há indícios que o tratamento com azul de metileno 0.1% + 1J foi capaz de gerar efeitos citotóxicos na geração de EROs que por consequência aumentando a expressão de mediadores inflamatórios promovendo inflamação e finalmente induzindo morte celular por necrose. Em decorrência deste fato podemos também verificar a possibilidade de haver uma resposta imune tumoricida em decorrência da presença de neutrófilios sugerindo um controle imunitário á longo prazo no tratamento contra o câncer.

Palavras-chave: Terapia Fotodiâmica. Laser. Agentes Fotosensibilizantes. Azul de Metileno. Câncer. Tumor de Walker 256.

ABSTRACT

PETRELLIS, M. C. **Evaluation of the effects of methylene blue photoactivated in experimental model of Tumor Walker 256.** 2014. 158 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade São Paulo, São Paulo, 2014.

PDT is considered as a new minimally invasive therapeutic modality for the treatment localized and selective destruction of various types of cancers and malignant disorders. This therapy is based on the selective uptake and retention of the photosensitizing agent into target sites which in turn undergoes activation by irradiation of an external source of light leading to the generation of cytotoxic effects by inducing tumor cell death. Methylene blue is a dye which belongs to the class of phenothiazine dyes and great interest due to their electrochemical properties in the face of NADH₄, which is a coenzyme of the group of dehydrogenases. Moreover, the same have been shown to be a potent agent photosensitizer with excellent photochemical properties due to having high yield and ROS generation of ¹O₂ in the presence of reduced agents. Due to its photodynamic - phototoxic properties and show high affinity for mitochondrial membrane, methylene blue have been highlighted as an effective photosensitizer of great potential for medical application as a therapeutic agent in PDT. Main objective of this study was to evaluate the effects of photoactivated methylene blue may trigger inflammatory processes interfering with development and tumor progression using an experimental model of the Walker 256 tumor. Thus investigate the regulation and expression of inflammatory mediators COX-1 and COX - 2 by RT-PCR , the production of prostanoids , cytokines and ROS generation by the method of the present TBAR and neutrophils presence by MPO analyzes of the tumor mass solid . Furthermore , we checked the peri-and intra - tumor morphological changes using histological analysis by HE coloration. Our results showed that treated group with 0.1 % methylene blue + 1J provoked an extremely significant increase , which was statistically different when compared for the different treated groups and the control on the levels of several inflammatory markers IL - 1 β , IL - 6 , IL - 10 and TNF - α as well as the quantification of gene expression of COX - 1 , COX - 2 , iNOS and ROS generation and PGE₂ . Histological analysis also complemented with previous results , indicating that the group treated with 0.1 % methylene blue + 1J can observe morphological changes represented by large areas of necrosis in the mass tumor solid with neutrophils presence. Based on our results we can conclude that treatment with 0.1% methylene blue + 1J was able to generate cytotoxic effects by increasing ROS which consequently increasing the expression of inflammatory mediators, promoting inflammation triggering cell death by necrosis. Due to this fact we can see that there is evidence of an immune response tumoricidal by neutrophils presence suggesting an immune response on control long term in cancer treatment.

Keywords: Photodynamic Therapy. Laser. Photosensitizers Agents. Methylene Blue. Cancer. Walker Tumor 256

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

1.1.1 Panorama do Câncer no Mundo e no Brasil

O processo global de industrialização ocorrido principalmente no século passado conduziu uma crescente integração das economias e das sociedades dos vários países desencadeando a redefinição de padrões de vida com a uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo (GUERRA et al., 2005; WALTERS, 2001). Assim, a industrialização e a urbanização contribuíram de forma significativa na alteração demográfica mundial devido à redução nas taxas de natalidade e mortalidade com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional (GUERRA et al., 2005).

Este processo de reorganização global determinou importantes modificações nos padrões de saúde-doença, e tais modificações são conhecidas como transições epidemiológicas que foram caracterizadas pela mudança no perfil de mortalidade com a diminuição da taxa de doenças infecciosas e concomitantemente o aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas especialmente as doenças cardiovasculares e o câncer (ALBALA et al., 1997; JEMAL et al., 2008; LAURENTI, 1990; WHO, 2002). Esta transformação do perfil epidemiológico das populações vem tornando-se ao longo dos anos, cada vez mais complexa e de difícil entendimento em função do aparecimento de novas doenças e o ressurgimento de antigos agravos à saúde como, AIDS/HIV, malária, dengue, tuberculose entre outras no cenário da saúde pública mundial (GUERRA et al., 2005; SUSSER; SUSSER, 1998; WALTERS, 2001).

Dessa forma a urbanização, a industrialização juntamente com as mudanças dos hábitos de vida e aumento da expectativa de vida preponderou consideravelmente para o aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas em virtude da exposição dos seres humanos a agentes carcinogênicos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2001, 2005; RISI; NOGUEIRA, 2002; SANTOS; CRUZ, 2001). Apesar dos avanços tecnológicos na área da Medicina, a incidência e a mortalidade por câncer têm aumentado nas últimas décadas e desta forma importantes pesquisas científicas na área médica, esforços e medidas adotadas

devem ser mobilizados para o combate, na cura e prevenção do câncer (FERNANDEZ; MAFRA, 2005; SANTOS; CRUZ, 2001).

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento e segundo as estimativas da Organização Mundial da Saúde (O.M.S.), desde o ano de 2000, o mesmo é responsável por mais de 6 milhões de óbitos a cada ano, 10,9 milhões de casos incidentes e 26 milhões de casos prevalentes. Além disso, o câncer representa cerca de 12.0 % de todas as causas de morte no mundo, possuindo a maior taxa de mortalidade quando comparado às outras taxas de mortalidade causadas por HIV/AIDS, tuberculose e malária (GUERRA et al., 2005; WHO, 2002; WHO, 2008).

Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos 10 milhões de casos novos anuais de câncer, 5.5 milhões são diagnosticados nos países em desenvolvimento (GUERRA et al., 2005; WHO, 2002; WHO, 2003). Contudo, a O.M.S. estima um aumento de 50.0% nas taxas de incidência desta patologia para o ano de 2020, sendo que mais de um terço dos casos ocorrerão tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (WHO, 2003).

No período do ano de 2005, dados da taxa de mortalidade informaram que um total de 35 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7.5 milhões de óbitos representando cerca de 22.0% do total de mortes ocorridas por esta condição patológica (WHO, 2005). No ano 2008, a Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (IARC) da O.M.S., estimou que a ocorrência de 12.4 milhões de casos novos e 7.6 milhões de óbitos no mundo (WHO, 2008). Em 2012, as estimativas do projeto Globoan 2012 desta mesma organização apontaram o surgimento de 14,1 milhões de casos novos em um total de 8,2 milhões de óbitos de câncer em todo mundo. Também há projeções para o ano de 2020 um número maior de novos casos anuais que sejam na ordem de 15 milhões e até o ano de 2030 o câncer deverá alcançar a maior carga global correspondendo um total de 21,4 milhões de casos novos e 17 milhões de óbitos atingindo a maior taxa de mortalidade quando comparado às outras doenças e até então consideradas como de maior ocorrência (BRAYAND; MOLLER, 2006; INCA/MS, 2012; INCA/MS, 2014; JEMAL et al., 2007; JEMAL et al., 2008; WHO, 2008). Para o ano de 2050, estima-se 24 milhões de novos casos, mais do que o dobro dos casos estimados em 2002

na ordem de 10.8 milhões (JEMAL et al., 2008; SANDHU et al., 2010; THUN et al., 2010; WHO, 2007).

Desde o ano de 2000, considerando as causas de morte por doenças, excluindo as causas externas e as causas não definidas, o câncer vem sendo definido como a terceira causa de mortalidade mundial, correspondendo 11.84% do total de óbitos. Segundo a O.M.S. têm constantemente alertado a presença de um fenômeno crescente na incidência anual o qual o câncer vem atingindo cerca de 9 milhões de pessoas e mata aproximadamente 5 milhões, sendo também considerado como a segunda causa de mortalidade depois das doenças cardiovasculares, correspondendo 27.63% do total de óbitos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (CUPPARI, 2005; INCA/MS, 2006; JEMAL et al., 2007; PISANI et al., 2002; SILVA, 2006; WUNSCH; MONCAU, 2002).

A distribuição epidemiológica global do câncer demonstra um aumento entre os tipos de cânceres de maior prevalência associados ao status socioeconômico, em países desenvolvidos como os de pulmão, mama, próstata, cólon-reto, quanto aos cânceres relacionados à pobreza presentes nos países em desenvolvimento, tais como os de colo uterino, pênis, estômago e cavidade oral (GUERRA et al., 1997; INCA/MS 2001; INCA/MS, 2002; INCA/MS, 2005; KOIFMAN; KOIFMAN, 2003; RISI; NOGUEIRA, 2002).

Além disso, sua distribuição epidemiológica pode ser avaliada de acordo com o sexo, onde cânceres mais incidentes e que acometem os homens são os de próstata, pulmão e estômago e entre as mulheres os mais prevalentes são os de mama, colo uterino e cólon-reto (INCA/MS, 2014; WHO, 2008). Dentre os diferentes sítios primários de tumores, o câncer de mama representa o segundo tipo mais frequente na população mundial e o mais prevalente entre as mulheres (PARKIN, BRAY, DEVESA, 2001).

Vale destacar, que segundo a O.M.S., sobressaem-se, entre os cinco tipos de câncer mais frequentes, os tumores de pulmão, de cólon-reto e de estômago, tanto nos países industrializados, quanto nos países em desenvolvimento. Com relação ao sexo, a prevalência de câncer entre homens e mulheres é muito similar nos países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento, a prevalência nas mulheres é de 25% maior, o que reflete o predomínio, em homens, de localizações de câncer com pior sobrevida, tais como fígado, esôfago e estômago (PISANI; BRAY; PARKIN, 2002).

Assim, o contínuo crescimento populacional bem como o seu envelhecimento afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países em desenvolvimento devido à contínua presença de fatores como as disparidades socioeconômicas, carência nas condições de saneamento básico, de moradia, de serviços de atenção à saúde, heterogeneidade cultural e questões de variações geográficas que impedem o acesso aos serviços sociais e de saúde pública. Em 1975, os índices de câncer no mundo inteiro representavam 51% em países de médio e baixo desenvolvimento. Porém, esta proporção aumentou para 55% em 2007 e está projetada para alcançar 61% em 2050, fato este se deve apenas pelo crescimento populacional e o envelhecimento, como também por fatores de risco modificáveis como o tabagismo, inatividade física e o lento declínio em cânceres relacionados à doenças infecciosas (INCA/MS, 2009; THUN et al., 2010; WHO, 2008).

Nos países que fazem parte da América Latina, do contrário dos países desenvolvidos, a transição epidemiológica ainda não se completou, observando um aumento na ocorrência de doenças crônico-degenerativas, enquanto que a frequência de doenças infecciosas e de doenças transmissíveis por vetores biológicos como, malária e dengue permanecem elevadas, além da presença constante de desnutrição. (ALBALA; YANES, 1997; GUERRA et al., 2005; LAURENTI, 1990). Atualmente, considera-se a América Latina como a mais urbanizada das regiões menos desenvolvidas do mundo, sendo que esta urbanização tem sido acompanhada de pobreza urbana maciça que têm contribuído para um agravamento das disparidades sociais (PARKIN et al., 2001). Deve-se levar em consideração também, a repercussão da rápida mudança na condição nutricional desta região, desencadeada pelo processo de industrialização o que afetou de sobremaneira a prevalência de doenças crônicas como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, doenças de Alzheimer e outros agravos relacionados ao envelhecimento e a obesidade (ALBALA et al., 2001; GUERRA et al., 2005; WALTERS, 2001).

Contudo, ainda observa-se a presença de menores taxas de mortalidade por cânceres quando comparadas às taxas dos países da Europa Ocidental, Estados Unidos e Canadá, mas de uma maneira, nestas últimas décadas houve uma redução da taxa de mortalidade por câncer de pulmão, estômago, útero e cânceres

tabaco-relacionado. Porém é notória a ocorrência de um aumento na mortalidade por cânceres de pulmão e mama acometidos nas mulheres (WHO, 2003).

Em virtude das desigualdades sociais existentes na América Latina, o mapa global de distribuição dos tipos de câncer nesta região segue uma superposição semelhante à encontrada no perfil de morbimortalidade global (GUERRA et al., 1997).

O Brasil destaca-se como uma área interessante para o monitoramento e controle das tendências na incidência de câncer, assim como para estudo das variações geográficas nos padrões de doença. Entretanto a população brasileira vem experimentando mutações significativas no seu perfil demográfico em decorrência da queda da taxa de fecundidade e o aumento da expectativa de vida devido às melhorias nas condições sanitárias que fizeram com que houvesse um progressivo aumento na população de idosos (ROSAS et al., 2013). Em 1930, dados de registros de base populacional de saúde indicavam que as doenças infecto-parasitárias representaram 45,7% dos óbitos informados no Brasil, e em 1999, foram responsáveis por apenas 5,9% das mortes com causas definidas (INCA/ MS 2001; INCA/MS, 2005; RISI; NOGUEIRA, 2002). Portanto, a distribuição epidemiológica do câncer no Brasil vem seguindo a mesma tendência mundial e encontra-se em transição epidemiológica acelerada passando do predomínio das doenças infecto-parasitárias para doenças crônico-degenerativas (INCA/MS 2012; ROSAS et al., 2013).

Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se a segunda causa de morte na população, representando quase 17% (140 mil) dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (MS/INCA, 2009). Apenas as doenças circulatórias matam mais que o câncer, em torno de 27,9% do total de mortes no mundo (MS/INCA, 2003). Têm-se observado o aumento entre os tipos de câncer normalmente associados ao status socioeconômico, tais como o câncer de mama, de próstata e do cólon-reto e, simultaneamente a presença de taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente relacionados à pobreza, como os cânceres de colo uterino, pênis, estômago e cavidade oral (INCA/MS, 2012; KOIFMAN; KOIFMAN, 2003; ROSAS et al., 2013). Esta distribuição certamente resulta da exposição a um grande número de diferentes fatores de risco ambientais relacionados também ao processo de industrialização – agentes químicos, físicos e

biológicos e de exposição a outros fatores relacionados às disparidades sociais. (GUERRA et al., 2005; ROSAS et al., 2013).

No ano de 2005, as doenças cardiovasculares, as neoplasias, as causas externas e o diabetes representaram 55,2% do total de óbitos com importante contribuição das neoplasias em especial ao câncer de colo uterino (INCA/MS, 2001; INCA/MS, 2005; RISI; NOGUEIRA, 2002). De acordo com os dados de dez registros de câncer de base populacional no Brasil, os tumores mais frequentes são os de próstata, pulmão, estômago, cólon-retos e esôfago na população masculina. Em mulheres, predomina o câncer de mama, seguido pelos cânceres de colo uterino, cólon-retos, pulmão e estômago (INCA/MS, 2012; ROSAS et al., 2013). Considerando as principais causas de morte por câncer no Brasil desde 2001 podemos citar os tumores de pulmão, próstata, estômago, esôfago, boca e laringe em homens e tumores de mama, pulmão, cólon-retos, colo uterino e estômago em mulheres (MS/BRASIL, 2004).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 e 2011, apontaram para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer/ano, sendo 236.240 para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Para o período de 2012 e 2013, as expectativas indicavam o aparecimento de 518.510 mil casos novos de câncer (INCA/MS, 2009). Nos próximos anos também há projeções que indicarão à ocorrência de 576 mil casos novos impulsionados pelo constante crescimento populacional bem como o seu envelhecimento (INCA/MS, 2009; INCA/MS, 2012; INCA/MS, 2014; ROSAS et al., 2013). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, foram os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo uterino no sexo feminino. Dentre a população feminina, o câncer de mama apresenta uma estimativa de 49.240 novos casos e 11.194 mortes (MS/INCA, 2009).

O câncer de mama representa o segundo tipo mais frequente na população geral e o mais comum entre as mulheres (PARKIN et al., 2001). No Brasil, a doença constitui a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres (BOING et al., 2007). No período de 1979 a 2000, a taxa de mortalidade por câncer de mama entre as mulheres brasileiras apresentou um aumento considerável, passando de 5,77/100.000 a 9,74/100.000, correspondendo a uma variação percentual relativa de 80,3% (MS/INCA, 2003). Segundo dados do Ministério da Saúde, a taxa de mortalidade nas mulheres por câncer de mama no Brasil no período de 1979 a 2004

aumentou 38,62%. Na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100.000 habitantes (MS/INCA, 2009).

1.1.2 Etiologia do Câncer

A palavra câncer vem do grego “*karkinos*” que significa caranguejo, referência a sua capacidade de crescimento infiltrante comparado às pernas do crustáceo, que as introduzem na areia ou na lama com finalidade de fixar-se e dificultar a sua remoção (INCA/MS, 2012; KUMAR et al., 2008).

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças incluindo tumores malignos e benignos de diferentes localizações (INCA/MS 2002; INCA/MS, 2009; INCA/MS, 2012). Também é definido como uma enfermidade multifatorial crônica caracterizada pela presença de alterações genéticas nas células que crescem de forma anormal em virtude da perda do controle da proliferação celular. Em alguns casos como nos tumores malignos, apresentam ganho da capacidade de invadir tecidos adjacentes sadios ou de sofrer metastatização disseminando-se para outras estruturas orgânicas distantes (FENECH, 2002; FERREIRA; ROCHA, 2004; INCA/MS, 2002; INCA/MS, 2008; INCA/MS, 2009; INCA/MS, 2012; KOWATA et al., 2009; MAFRA; FERNANDEZ, 2005; RIBEIRO et al., 2003).

As neoplasias podem ser classificadas como benignas e malignas, dependendo de suas características celulares (OLIVEIRA et al., 2007). As neoplasias malignas são caracterizadas por constituintes celulares que apresentam alto grau de diferenciação celular em relação ao comportamento biológico, possui um crescimento desordenado refletindo-se na formação de um novo tecido denominado de neoplasma ou tumor maligno. Também, as suas células cancerosas se proliferam com alta autonomia e diferenciação celular invadindo tecidos adjacentes sadios e frequentemente apresentam alta metastatização em tecidos sadios ou em estruturas orgânicas distantes do tumor primário e normalmente oferecem risco de vida ao paciente (ALBERTS et al., 2002; HANNAHAN; WEINBERG, 2000; OLIVEIRA et al., 2007; SHACTER; WEITZMAN, 2002).

Diferentemente dos cânceres malignos, as neoplasias benignas são caracterizadas por uma massa tissular bem definida contendo células cancerosas

que se multiplicam lentamente e que se assemelha ao tecido de origem. Possui comportamento biológico não invasivo e raramente fornecem risco de vida ao paciente (ALMEIDA et al., 2005; INCA/MS, 2002; OLIVEIRA et al., 2007; PLAYER et al., 2004; ROBBINS; CONTRAN, 2005; WEINBERG, 2008).

Em relação à nomenclatura das neoplasias, normalmente o tipo de tumor é denominado conforme o nome do tecido em que se originou e, portanto, a designação é feita indicando o nome do tecido seguido pelo sufixo OMA. Por exemplo, linfoma designa um tumor do tecido linfático. Assim essa nomenclatura primária pode ser utilizada para nomear tanto tumores benignos quanto malignos.

Quando tumores malignos surgem do tecido mesenquimal, eles são denominados de sarcomas, como ocorre nos tecidos de sustentação, tais como ossos, tecido gorduroso, músculos e tecidos fibrosos. Os neoplasmas malignos originários das células epiteliais são denominados de carcinomas. Estes constituem o tipo mais comum de câncer maligno incluindo cânceres de pele, intestino, bexiga, útero, ovários, ductos mamários, próstata e pâncreas. Além disso, carcinomas que possuem padrão glandular recebem ainda a terminologia de adenocarcinoma (ALBERTS et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005; ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Sabemos que o corpo humano é composto de por milhões de tipos de células que crescem e dividem-se de forma controlada com a finalidade de produzir mais células necessárias para a manutenção saudável corporal. Quando estas células tornam-se velhas ou danificadas, elas morrem e são substituídas por novas células saudáveis. Contudo, este processo pode ocorrer de forma anormal e dessa forma o material genético celular danificado ou alterado passa a produzir mutações que afetam o crescimento de células neoplásicas levando a formar uma massa de tecido chamada de tumor (INCA/MS, 2009). Além disso, estas células cancerosas passam a se comportar de forma anormal, multiplicando-se rapidamente e desordenadamente em relação às células saudáveis presentes nos tecidos adjacentes, invadindo-os e levando ao desenvolvimento de microvasos a partir das células endoteliais presentes nos capilares situados próximos às células neoplásicas. Dessa forma estabelecendo o processo de angiogênese, necessário para a manutenção e do suprimento de oxigênio e nutrientes para a massa tumoral sólida. Observamos também que algumas células neoplásicas adquirem a capacidade de se destacar da massa tumoral sólida e disseminar através dos vasos sanguíneos e linfáticos

promovendo o surgimento de metástases (FERREIRA; ROCHA, 2004; INCA/MS, 2009; OPPENHEIMER, 2006).

Assim o câncer é uma doença que surge a partir de uma célula normal que sofreu um acúmulo progressivo de mutações em seu material genético, as quais acarretam em importantes alterações essenciais na fisiologia celular e que coletivamente contribuem para o crescimento de malignidades. Dentre estas alterações essenciais podemos citar (1) suficiência em relação aos fatores de crescimento, (2) resistência à apoptose, (3) potencial ilimitado de replicação celular, (4) angiogênese sustentada, invasão tecidual e disseminação à distância (DIXON; KOPRAS, 2004; HANNAHAN; WEINBERG, 2000; SHACHAF; FELSHER, 2005; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2003).

O câncer sendo considerado como uma doença multifatorial, podemos destacar que as causas primárias que levam ao aparecimento dessa patologia ainda não estão totalmente esclarecidas. Porém sabemos que os fatores ambientais possuem um importante papel na etiologia do câncer. Dentre eles podemos destacar a presença de agentes cancerígenos físicos (radiações UV e ionizantes), químicos (tabaco, álcool, xebobióticos, metais pesados, compostos aromáticos, pesticidas e etc.), bem como agentes infecciosos (vírus, bactérias e parasitas), também hábitos e estilo de vida. Portanto tais fatores contribuem para a desordem do ciclo celular acarretando na formação de agrupamentos de clones de células neoplásicas, ou seja, em tumores (ANAND et al., 2008; COTRAN et al., 2000; FERRARI; TORRES, 2003; INCA/MS, 2002; IRIGARAY et al., 2007; MAFRA; FERNANDES, 2005; SILVA et al., 2004).

Também o câncer pode ser definido como uma doença genética, uma vez que é desencadeado por alterações ou mutações no DNA celular. No entanto, ao contrário das síndromes genéticas humanas, o câncer não é necessariamente uma doença hereditária. Sabemos que os cânceres na sua maioria são de origem somática resultantes da interação entre os fatores genéticos, envelhecimento e as influências do ambiente externo (BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001; CHEN; HUNTER, 2005; COHEN et al., 1992; CURI et al., 2002; FOOTE, 2005; INCA/MS, 2012; KUMAR et al., 2008; PERERA, 1997; WHO, 2009). No caso do câncer hereditário, as mutações germinativas estão diretamente associadas à predisposição genética familiar para o desenvolvimento de tumores e nestes casos específicos, o câncer é considerado uma doença genética e hereditária (CAMARGO

et al., 1999). Cerca de 5 á 10% dos cânceres são hereditários provenientes de mutações nas linhagens germinativas e diversos genes vem sendo identificados e investigados como sendo importantes alvos na etiologia destes tumores (FEARON, 1997; MINAMOTO et al., 1999).

Durante o processo da carcinogênese, uma célula sadia passa por várias etapas sendo estas, iniciação, promoção, progressão e manifestação tumoral (ALBERTS et al, 2010; CHAMMAS et al., 2004; COHEN, 1991; GUTIÉRREZ; SALSAMENDI, 2000; HASEGAWA et al., 1998; MEHTA, 1995; OLIVEIRA et al., 2007; TANNOCK; HILL, 1998; TROSKO, 2001).

A iniciação é o primeiro estágio que envolve passos nos quais o DNA de uma célula sadia acumula uma série de mutações ou alterações genéticas induzidas por agentes cancerígenos e, dessa maneira alterando suas respostas ao ambiente celular (BRASILEIRO FILHO et al., 2006; HANNAHAN; WEINBERG, 2000; OLIVEIRA et al., 2007; PLAYER et al., 2004; SANTELLA et al., 2005; SHACTER; WEITZMAN, 2002; TROSKO, 2001; TROSKO, 2003).

Em geral, estas mutações genéticas incluem alterações de sequência, perdas, ganhos, mutações pontuais, rearranjos cromossômico simples ou complexos, os quais são responsáveis por sucessivas divisões celulares anormais acarretando num processo de evolução clonal (CAVENEY; WHITE, 1995; CHAMMAS et al., 2004; ESTELLER; HERMAN, 2002; FERREIRA; ROCHA, 2004; GREAVES, M., 2000; POIRIER, 2004; SINGH; FARMER, 2006).

Atualmente entende-se que o câncer é causado em sua grande maioria dos casos pela ação dos agentes cancerígenos, por erros durante a replicação do DNA celular ou no reparo das lesões cromossômicas que alteram geneticamente e funcionalmente os principais genes responsáveis pelo controle da homeostasia celular (COTRAN et al., 2000; COUPIER; PUJOL, 2005; LOURO, 2000; SILVA et al., 2004). Portanto, as ações destes fatores resultam em importantes modificações progressivas afetando não só em diferentes fases do ciclo celular bem como na interação do comportamento biológico da célula com o meio extracelular (HANNAHAN; WEINBERG, 2000; OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2004).

Contudo, ainda existem genes responsáveis e que participam dentro do processo da carcinogênese principalmente tanto na ativação dos proto-oncogenes quanto na inativação de genes supressores de tumores (CHANG et al., 1995; CHEN; HUNTER, 2005; DELFINO et al., 1997, HANNAHAN; WEINBERG, 2000; LUCH,

2005; OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2004). Neste sentido, progressos no entendimento das bases dos mecanismos da carcinogênese têm sido feito a partir das descobertas e investigações dos papéis fundamentais dos proto-oncogeneses, genes supressores de tumores e oncogeneses (STRAHM; CAPRA, 2005).

Os proto-oncogeneses são genes celulares normais que participam do controle das funções vitais celulares como proliferação, diferenciação, migração e morte celular. Assim agem no controle positivo, estimulando e codificando várias proteínas do complexo sinalizador que permite à célula normal a responder aos fatores de crescimento celular e dessa forma tais genes são capazes de induzir e manter a diferenciação celular. Além disso, estes proto-oncogeneses podem tornar-se oncogeneses por meio de mutações resultantes da exposição aos agentes cancerígenos, e sua ativação pode ocorrer por meio de translocações cromossômicas, ampliações gênicas ou mutações de ponto de maneira que modificações em um único alelo são suficientes para transformá-los em oncogeneses, contribuindo na transformação maligna (COOPER, 1994; CARRENÑO et al., 1999; IRISH; BERNSTEIN, 1993; MCKINNELL, 1998; SILVA et al., 2004).

Os genes supressores de tumores atuam codificando proteínas com funções específicas, por exemplo, agem impedindo o acúmulo de mutações no DNA celular ou controlando a progressão da célula ao longo das fases do ciclo celular e, portanto garantindo a integridade genômica. Além disso, possuem a habilidade de induzir a morte celular programada (apoptose) suprimindo o crescimento de células tumorais que contenham múltiplas alterações genéticas (ALFANO, 2006; CHAMMAS et al., 2004; GOTTLIEB; KOPNIN, 2000; OREN, 1998; VELCULESCU; EL-DEIRY, 1996; WEINBERG, 1994). Dentre os genes supressores tumorais podemos destacar aqueles genes que regulam a transcrição nuclear e o ciclo celular (Rb, p53, BRCA-1 e BRCA-2), os genes que regulam a transdução de sinais (NF-1, APC), os receptores da superfície celular (receptor TGF β e caderinas), e os genes que impedem (Bcl 2, Bcl-xl) ou induzem (Bax, Bad) à morte celular (BABENKO et al., 2006; COOPER, 1995; COTRAN et al., 2000; DELFINO et al., 1997; DENG; BRODIE, 2001; HANAWALT et al., 2003; INGVARSSON, 2001, KLAUNING et al., 2000; LOURO, 2000; LUCH, 2005; MAREEL; LEROY, 2003; PERATONI, 1998; SILVA et al., 2004).

Recentemente, alterações em genes que estão associados aos mecanismos de reparo do DNA, reparo por excisão de bases (BER) e reparo por excisão de

nucleotídeos (NERB), tem sido relatados em diferentes tipos de cânceres, sendo frequentemente associados às síndromes hereditárias que cursam com o desenvolvimento de tumores (ABBOTTS et al., 2014; ADIMOOLAN; FORD, 2002; CHAMMAS et al., 2004; CHAO; LIPKIN, 2006; FRIEDBERG, 2003; HARMS et al., 2004; TAN; CHU, 2002). Normalmente estes genes são considerados como um terceiro grupo que atuam diretamente ou indiretamente no processo da carcinogênese (BOER; HOEIJMAKERS, 2000; COTRAN et al., 2000; FRIEDBERG et al., 2005; HOEIJMARKERS, 2001; LINDAHL; WOOD, 1999; LOURO, 2000; POIRIER, 2004).

Portanto, a identificação e a caracterização dos genes envolvidos na carcinogênese são de fundamental importância para a compreensão das bases dos mecanismos moleculares desta patologia (BERTRAM, 2001; KLAUNING et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007; PARMIGIANI; CAMARGO, 2004).

Finalmente concluímos que o câncer é a resultante do crescimento de sucessivas populações celulares nas quais, as mutações genéticas acumulam-se em um processo de expansão monoclonal culminando na formação de uma massa tumoral contendo células cancerígenas de diferentes padrões de alterações genéticas com extensa heterogeneidade intratumoral (MICHOR et al., 2001; SCHOR; SCHOR, 2001).

A promoção é a segunda etapa da carcinogênese e que consiste na proliferação ou expansão das células “iniciadas” através da ação dos agentes denominados de onco-promotores (SHILS et al., 2003). Estes agentes são caracterizados por substâncias mediadoras inflamatórias que têm em comum a propriedade de induzir irritação nos tecidos biológicos provocando reações inflamatórias e ação proliferativa tumoral (COUSSENS; WEB, 2002; INCA/MS, 2012; KEMPEN et al., 2006; KUMAR et al., 2008; WEISS, 2002).

Com a permanência dos onco-promotores, ocorre a terceira etapa da carcinogênese, denominada de progressão. Nesta etapa é caracterizada pela presença de alterações fenotípicas, ou seja, as células geneticamente mutadas passam a multiplicar-se desordenadamente, adquirindo autonomia, tornando-se agressivas e invasivas (BRASILEIRO FILHO, 2006; HANNAHAN; WEINBERG, 2000, INCA/MS, 2012; KUMAR et al., 2008)..

A manifestação dos sinais do tumor é o último passo na carcinogênese, podendo levar até décadas para surgir os primeiros sintomas da doença (SHILS et

al., 2003). Dependendo da localização do tumor e da função da estrutura orgânica acometida, os sintomas podem variar desde sangramentos, úlceras, emagrecimento, caquexia, anorexia entre outros (BARACAT et al., 2000).

1.1.3 Tumor de Walker 256

O carcinossarcoma 256 de Walker foi descoberto em 1928 no laboratório de George Walker do John Hopkins University School of Medicine a partir do desenvolvimento espontâneo de um adenocarcinoma de mama em rata, que por sua vez é mantido em vários laboratórios, por sucessivas inoculações (BRITO et al., 2009; DORNELAS et al., 2006). É um dos poucos modelos de tumores, disponíveis para estudos experimentais nas áreas médicas e biológicas em diferentes linhas de pesquisa (BEVILACQUA et al., 1984; BLACK et al., 1994; EARLE, 1935; GUAITANI et al., 1982; HURTADO et al., 1991; KLULBES et al., 1987; MOTA; REZKALLAH-IWASSO, 1981; MUND et al., 2007; PEREIRA; GUASTALE, 1992).

O carcinossarcoma de Walker 256 é uma neoplasia bem caracterizada, facilmente mantida em laboratório com vantagem de ser obtido "in vivo" através da inoculação de células em ratos e, desenvolve-se rapidamente e falhas de inoculação e regressão espontânea são pouco frequentes (CAVALCANTE et al., 2003; FERNANDES et al., 1990; FERNANDES, 1995; MORAES et al., 2000; PEREIRA; GUASTALE, 1992; SCHANOSKI et al., 2004).

Possui comportamento biológico agressivo, sendo localmente invasivo e com alto poder de desenvolver metástase por via linfática e hematogênica (CAVALCANTE et al., 2003; FOLADOR et al., 2009; MORAES et al., 2000; OBA-SHINJO et al., 2003; PAVLAKI et al., 2009; SEELANDER et al., 1996). É amplamente empregado como modelo experimental em diversos estudos em câncer como pulmão, estômago, rins, bexiga, cavidade oral e fígado (ALVES et al., 2004; GUIMARAES et al., 1999; GUIMARAES et al., 2010; NETO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2002; VIDO et al., 2000; ZARUR et al., 2004).

1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD) no Câncer

A luz tem sido empregada como terapia de forma empírica por milhares de anos em função da descoberta de suas propriedades terapêuticas por antigas

civilizações como a egípcia, indiana e a chinesa que utilizavam para o tratamento de várias enfermidades incluindo a psoríase, vitiligo e câncer (ACKROYD et al., 2001; DOLMANS et al., 2003; DANIELL; HILLS, 1991; SPYKES, 1985). Entretanto, foi a partir do final do século 19, que estabeleceu a sua importância terapêutica no tratamento de diversas doenças cutâneas graças às pesquisas iniciadas por Niels Finsen, onde ele observou que a exposição da luz vermelha era capaz de prevenir pústulas da varíola e, portanto, ser utilizada para tratar tal doença. Também em outras investigações, o mesmo utilizou a luz ultravioleta para o tratamento da tuberculose cutânea (FINSEL, 1901). Assim, seus trabalhos científicos pioneiros puderam contribuir de forma significativa na área médica e ganharam importância e reconhecimento, tanto que em 1903 Finsel foi contemplado pelo Prêmio Nobel por suas descobertas.

Na mesma época, outros pesquisadores, Oscar Raab e Von Tappeiner iniciaram estudos científicos onde foi observado que em combinação com a luz, certas substâncias químicas eram capazes de induzir morte celular em seres unicelulares. Eles demonstraram que em certos comprimentos de onda da luz, os compostos químicos podiam desencadear suas propriedades tóxico-fluorescentes, por exemplo, empregaram acrinidina em combinação com a luz, levando a exercer seus efeitos letais em espécies de protozoários do tipo Paramecium (ACKROYD et al., 2001; RAAB, O.,1900). Dessa forma, concluíram que somente a captação da energia solar na forma de fótons pelo composto químico era capaz de produzir fluorescência, sendo condição necessária para que o mesmo exerça seus efeitos tóxicos em organismos unicelulares. Em conclusão deste achado, o potencial terapêutico da aplicação do efeito de fluorescência dos compostos químicos na Medicina, ganhou grande importância e notoriedade, sendo considerado como uma nova ferramenta terapêutica dentro do conjunto do arsenal de armas na terapia médica (ACKROYD et al., 2001; DOLMANS et al., 2002; DOLMANS et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008; JUZCNIENE et al., 2007; VON TAPPEINER, 1900).

No mesmo período, o neurologista francês J. Prime observou que em pacientes epiléticos tratados com eosina oralmente desenvolviam dermatite em áreas da pele expostas ao sol (ACKROYD et al., 2001; PRIME, 1900). Esta descoberta levou ao desenvolvimento da primeira aplicação médica da interação entre o efeito fluorescente da substância química e a luz que, em trabalhos posteriores em conjunto com outros pesquisadores, Von Tappeiner e Jesioneck,

empregaram a eosina topicamente em combinação com a luz branca no tratamento de tumores de pele, por exemplo, o carcinoma de células basais da pele (TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Mais tarde, estes mesmos pesquisadores trabalhando em colaboração com outro pesquisador Jodlbauer, demonstraram que a presença de oxigênio era uma condição necessária para efetivar a reação de foto sensibilização. Assim em 1907, este grupo de pesquisadores puderam descrever este fenômeno e introduzir o termo “Ação Fotodinâmica” (ACKROYD et al., 2001; BLUM, 1941; PERVAIZ, 2001; TAPPEINER; JESIONECK, 1903; TAPPEINNER; JODLBAUER, 1904; TAPPEINER; JODLBAUER, 1907; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

De fato, a principal aplicação biomédica da ação fotodinâmica é a Terapia Fotodinâmica (TFD), que representa uma recente modalidade terapêutica para o tratamento paliativo e curativo de algumas formas de cânceres e lesões pré-cancerosas. Embora Tappeiner e Jesioneck fossem os primeiros pesquisadores a utilizarem a terapia fotodinâmica no tratamento contra o câncer de pele, empregando a luz juntamente com a eosina aplicada topicamente, foi Figge e colaboradores que em 1950 demonstraram em suas investigações as propriedades seletivas de retenção das Hematoporfirinas (HP) em tecidos tumorais por análises de detecção de imagem por iluminescência.

Muitos agentes fotossensibilizantes que têm sido avaliados desde que a TFD foi proposta, são baseados à partir de moléculas que apresentam núcleo semelhante aos das porfirinas, composto por quatro anéis pirrólicos conectados por pontes de metila ligadas em uma configuração espacial cíclica e com uma cadeia lateral normalmente metálica (DETTY et al., 2004).

Durante a década de 60, Richard Lipson e seus colaboradores iniciaram a era moderna da Terapia Fotodinâmica voltada em aplicações terapêuticas na Clínica Mayo nos Estados Unidos, onde novas avaliações culminaram para o desenvolvimento de novos tratamentos e o surgimento de novos compostos fotossensibilizantes. O primeiro agente fotossensibilizante utilizado em estudos experimentais na TFD foi a Hematoporfirina (HP) e posteriormente surgiram compostos a partir da mistura de diferentes porfirinas com propriedades fluorescentes composta por mono, di e oligômeros da hematoporfirina que foi denominada mais tarde de “Derivado de Hematoporfirina” (HPd) (JUARRANZ et al., 2008; JUZCNIENE et al., 2007; KELLY; SNELL, 1976; KESSEL et al., 1985).

Neste cenário, Lipson e seus colaboradores ainda deram continuidade em suas investigações e demonstraram através de dados achados a confirmação que tanto a hematoporfirina como seus derivados apresentam propriedades seletivas de retenção em tecidos tumorais utilizando técnicas de análises de detecção de imagem pelo método de captação de fluorescência. Dessa forma este fato levou a abrir novas perspectivas não só na otimização da análise diagnóstica por imagem para detecção de tumores como também no uso clínico de tais compostos em combinação com a luz vermelha destinados no tratamento e erradicação de tumores malignos de mama e bexiga inicialmente aplicados em modelos experimentais (DOLMANS et al., 2002; DOLMANS et al., 2003; DOUGHERTY et al., 1978; DOUGHERTY et al., 1998; GOMER et al., 2006; KELLY; SNELL, 1976; SCHWARTY et al., 1955; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Já na década de 70, várias preparações de derivados hematoporfirínicos começaram a ser testados para o uso em terapia fotodinâmica, culminando no desenvolvimento do Photofrin[®] (Pinnacle Biologics Inc., USA), composto por uma mistura sódica de derivados hematoporfirínicos. Em 1994, a Terapia Fotodinâmica foi previamente aprovada para o uso clínico no Canadá utilizando como agente fotossensibilizante o Photofrin[®] (Pinnacle Biologics Inc., USA) (JUARRANZ et al., 2008; JUZCNIENE et al., 2007; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Embora a ativação sob a luz visível de compostos químicos tem sido aplicada experimentalmente na Terapia Fotodinâmica com o objetivo de foto destruir tecidos neoplásicos desde que foi introduzida no início de século 20, atualmente muitos dos resultados obtidos na clínica têm sido cada vez mais promissores e, portanto, a TFD vem ganhando maior reconhecimento como uma nova modalidade terapêutica efetiva contra o câncer e enfermidades não malignas (DOUGHERTY, 2002; GARCIA-ZUAZAGA et al., 2005; HAMBLIN; HASAN, 1996; SARIKA et al., 2007 .

Contudo, os mecanismos foto dinâmicos da TFD em tumores ainda continuam sendo largamente investigados e, portanto com base em achados científicos recém-publicados, atualmente a TFD vêm recebendo cada vez maior aprovação por órgãos regulamentadores de saúde em diversos países no tratamento de um grande número de enfermidades malignas que acometem severamente a população mundial (SARIKA et al., 2007).

Em alguns países, tais como o Canadá e Estados Unidos, a TFD tem sido aprovada para o uso na terapia primária nos casos de neoplasias e malignidades que se encontram em estágios iniciais e como terapia paliativa em cânceres em estágios avançados. Também, a TFD pode ser utilizada como adjuvante terapêutico em procedimentos cirúrgicos no tratamento de cânceres de pulmão, bexiga, esôfago e estômago em diversos países. Além disso, a TFD é extensivamente avaliada em testes clínicos para o tratamento de muitos outros tipos de cânceres incluindo, os de mama, cólon-retos, vesícula biliar e cérebro (DOUGHERTY et al., 1998; MAKOWISKI et al., 2003; MCBRIDGE, 2002).

Atualmente os regimes de tratamento que são adotados com TFD, normalmente têm como finalidade ação paliativa, entretanto, em função do tipo de neoplasia e o estágio que se encontra a patologia, melhorias na resposta terapêutica poderão ser alcançadas dispondo de ferramentas terapêuticas alternativas com aplicação localizada ou segmentada que podem ser necessárias quando estão envolvidos sítios anatômicos de maior complexidade localizados em estruturas anatômicas intrínsecas e de conformidades tridimensionais, por exemplo, tumores presentes nas cavidades abdominais e torácicas. Neste caso, alguns tipos de cânceres já estão sendo tratados com TFD endoscopicamente tais como, cânceres de pulmão, bexiga, neoplasias do trato gastrointestinal e ginecológico (JUARRANZ et al., 2008; SARIKA et al., 2007). Assim, um pleno conhecimento da terapia bem como o amplo desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas aliados ao desenvolvimento de novos agentes fotossensibilizantes mais potentes e eficazes, protocolos terapêuticos mais específicos e a modernização tecnológica de equipamentos para área médica, serão de grande importância e necessários e contribuirão de forma positiva na otimização e o melhoramento na eficácia terapêutica na luta contra o câncer (HASAN et al., 2003; MCBRIDGE, 2002; SARIKA et al., 2007).

A TFD é definida como tratamento localizado contra o câncer e está baseado na captação e retenção seletiva do composto fotossensibilizante em sítios alvos que por sua vez sofre fotoativação por intermédio de um comprimento de onda da luz visível levando à geração de efeitos citotóxicos de forma direcionada e que por consequência induzindo a morte das células tumorais (CALIN et al., 2005; DOUGHERTY, 1987; JUARRANZ et al., 2008; SARIKA et al., 2007). Também, a TFD pode ser considerada como uma nova modalidade terapêutica minimamente

invasiva, amplamente testada e aplicada na Clínica Médica destinada ao tratamento e destruição seletiva de diversos tipos de cânceres e desordens não malignas (DOUGHERTY et al., 1998; GOMER et al., 1989; HSI et al., 1999; KESSEL, 1992; PERVAIZ, 2001).

O tratamento consiste na administração sistêmica ou local do agente fotossensibilizante não tóxico que se acumula de forma seletiva nos tecidos tumorais. A ativação do agente fotossensibilizante se dá através da exposição à irradiação do espectro da luz na região alvo, preferencialmente em um comprimento de onda apropriado, normalmente na faixa do vermelho do espectro da luz ($\lambda \geq 600\text{nm}$), onde os tecidos biológicos são mais suscetíveis à ação da luz vermelha, dessa forma, a mesma atinge com mais facilidade as camadas mais profundas dos tecidos biológicos. A energia da luz vermelha captada pelo agente fotossensibilizante na forma excitável é transferida para o oxigênio molecular, convertendo-o em oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e promovendo também a geração de espécies reativas de oxigênio. Durante este processo, é de extrema importância destacar o papel fundamental do $^1\text{O}_2$ sendo responsável por causar os efeitos citotóxicos mais severos diretamente nas células tumorais e contribuir para a regressão tumoral (MAKOWSKI et al., 2003; SHARMAN et al., 2000).

Além disso, os fotos produtos citotóxicos gerados pelo processo da TFD, iniciam uma cascata de eventos bioquímicos no microambiente tumoral induzindo danos irreversíveis e importantes além de morte celular. (ACKROYD et al., 2001; DANIELL; HILLS, 1991; DOLMANS et al., 2003; GARCIA-ZUAZAGA et al., 2005; JUARRANZ et al., 2008; MAKOWSKI et al., 2003; MOAN; BERG, 1991; SARIKA et al., 2007; SHARMAN et al., 2000; TAMIETTI et al., 2007).

Portanto, para produzir os efeitos desejáveis na TFD, é necessária a presença dos três componentes e que atuem simultaneamente para garantir uma eficácia terapêutica, sendo estes, a luz (FOSTER et al., 1993; HENDERSON et al., 2006), oxigênio em quantidade suficiente no tecido biológico (CHEN et al., 2002; FOSTER et al., 1991) e o agente fotossensibilizante (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992).

As principais vantagens da TFD em comparação aos tratamentos convencionais contra o câncer são: (1) baixa toxicidade sistêmica, pelo fato do agente fotossensibilizante ser somente foto ativado na presença da luz vermelha e possuir rápida eliminação corporal, (2) habilidade de destruir s células tumorais

seletivamente, (3) a TFD pode ser aplicada isoladamente ou em combinação com outras modalidades terapêuticas, tais como quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e procedimentos cirúrgicos. Além disso, os agentes fotossensibilizantes podem ser aplicados sistemicamente ou localmente dependendo do tipo de tumor e sua localização (JUARRANZ et al., 2008).

Os resultados ou as respostas terapêuticas alcançadas pela TFD são vários, que vão desde o retardamento do crescimento tumoral nos casos de neoplasias malignas em estágios avançados acompanhado da melhora na qualidade e no aumento da expectativa de vida do paciente até a completa regressão tumoral (DOLMANS et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008; PERVAIZ; OLIVO, 2006).

1.2.1 Agentes Fotossensibilizantes

Geralmente é aceito um bom composto fotossensibilizante na TFD quando o mesmo atende as seguintes condições: (1) pureza química e uma estrutura química bem definida, (2) alta afinidade na captação e retenção por sítios alvos de tecidos tumorais, (3) baixa toxicidade em condições no “escuro”, (4) rápida eliminação corporal, (5) seja citotóxico quando sofre alta sensibilização por meio de uma fonte externa de luz, (6) possuir estado tripleto e que seja suficientemente de longa duração, (7) alto rendimento na geração do 1O_2 , (8) seja suficientemente solúvel nos fluidos biológicos dos tecidos corporais e (9) alto coeficiente de extinção molar e alta absorvância da luz na faixa do comprimento de onda do vermelho até o infravermelho ($\lambda = 600-800$ nm) onde a luz penetra com mais facilidade até as camadas mais profundas dos tecidos biológicos; neste caso, o composto químico também deve apresentar um grau de permeabilidade relativo nos tecidos biológicos (CALIN et al., 2005; DOUGHERTY et al., 1998; JUARRANZ et al., 2008; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Com base nas propriedades ideais de um bom agente fotossensibilizante, um número de compostos tem sido avaliado em teste *in vitro* e *in vivo* e alguns deles já se encontram presentes em etapas avançadas em teste clínicos e ou aprovados para o uso clínico no tratamento contra o câncer (DETTY et al., 2004; SARIKA et al., 2007; SHARMAN et al., 1999).

Os primeiros agentes fotossensibilizantes utilizados na TFD foram denominados como Agentes Fotossensibilizantes de 1ª Geração, nesta classe estão

incluídos as hematoporfirinas e seus derivados. Como representante principal desta classe, podemos destacar o Photofrin[®] (Pinnacle Biologics Inc., USA), que é constituído por uma mistura sódica de diferentes derivados das hematoporfirinas e que apresenta uma alta seletividade por tecidos tumorais e dessa forma, possuindo uma boa ação tumoricida em combinação com a luz vermelha (DOUGHERTY et al.,1975; LIPSON et al.,1961). O Photofrin[®] (Pinnacle Biologics Inc., USA) possui indicações clínicas para o tratamento de diversas formas de cânceres em estágios iniciais e avançados, entre eles podemos citar os cânceres de bexiga, pulmão, do trato gastrointestinal e principalmente o Câncer de Barrett do esôfago (DOUGHERTY et al., 1978; JUARRANZ et al., 2008; KELLY; SNELL, 1976; SARIKA et al., 2007; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Com relação aos agentes fotosensibilizantes de 2ª Geração, podemos destacar o ácido aminolevulínico (ALA) cujo nome comercial Levulan[®] (DUSA Pharmaceuticals, Inc., USA), foi aprovado na Clínica Médica em 1999 destinado ao tratamento de queratoses actínicas e cânceres de pele, da cavidade oral e do trato gastrointerstinal. Outro derivado do ALA, o éster metílico do ALA (Metevix[®], Galderma Pharma, USA), foi aprovado em 2001 pelos órgãos regulamentadores de saúde da União Européia e do Japão com indicação terapêutica no tratamento paliativo de cânceres de cabeça e pescoço. Já a verteporfirina (Visudyne[®], Novartis Pharma, USA), outro agente fotossensibilizante de segunda geração têm sido aprovado para o tratamento da degeneração macular senil (AZAB et al., 2005).

As principais vantagens do emprego dos agentes fotossensibilizante de segunda geração em relação aos de primeira geração são: (1) apresentam melhor seletividade ao tumor, (2) possuem rápida eliminação corporal, causando menos efeitos adversos, (3) podem ser administrados oralmente ou topicamente (BOURRE et al., 2002; DOUGHERTY, 2002; MA et al., 1994; REZZOUG et al.,1996; SARIKA et al., 2007; TRIESSCHEIJN et al., 2006; VAN GEEL et al.,1995; YOW et al., 2000).

Desde o início do século passado, têm-se despertado um grande interesse em investigar o fenômeno da foto sensibilização de substâncias com ação potencialmente tumoricida e para fins de diagnóstico, graças às pesquisas pioneiras iniciadas por Tappeiner e Jesioneck, o qual avaliou se o efeito da exposição à irradiação da luz na presença de eosina e posteriormente na década de 60 trabalhos realizados por Lipson e Schwartz empregando o uso das hematoporfirinas e seus derivados em testes de detecção por imagem de tumores. Dessa forma contribuíram

significativamente para a inclusão de novos compostos químicos de diversas naturezas com potencial ação fotosensibilizante para a TFD (DOUGHERTY et al., 1998; JUARRANZ et al., 2008; PERVAIZ; OLIVO, 2006; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Entretanto, a procura por novos compostos fotossensibilizantes de última geração ainda permanece em curso, especialmente na busca de estabelecer novos agentes fotossensíveis que possam ser fotoativados em longos comprimentos de onda da luz e que provoquem uma efetiva ação de fotosensibilização e que possuem alta especificidade por tecidos tumorais (DETTY et al., 2004; DOUGHERTY et al., 1998; JUARRANZ et al., 2008; TRIESSCHEIJN et al., 2006). Assim, muitos compostos fotossensibilizantes têm sido avaliados em teste clínicos, porém ainda existem poucos resultados satisfatórios publicados na comunidade científica. Atualmente têm-se proposto uma gama de agentes fotossensíveis de diversas naturezas com potencial para a TFD, entre eles estão as porfirinas sintéticas, benzoporfirinas, clorinas, bacterioclorofilas, feoforbidas, cianinas nos caso das ftalocianinas e naftalocianinas, cromóforos naturais das hidroquinonas em especial as hipericinas, porfícenes (isômeros das porfirinas), purinas, xantinas e oxzinas (ANDERSON et al., 1997; BROWN; MELLISH, 2001; CHAN et al., 2005; DIWU; LOWN, 1994; FERREIRA et al., 2004; GARBO, 1996, KAPLAN et al., 1998; KRYSKO et al., 2001; de LAEY et al., 2000; LUI et al., 2001; MANG et al., 1998; PANDEY et al., 1991; STOCKERT et al., 2007; TABER et al., 1998; VERIGOS et al., 2006).

1.2.2 Princípio da TFD

Com o advento da teoria quântica e as modernas pesquisas na área da fotoquímica, tornou-se claro que os processos fotobiológicos são dependentes dos limites da absorção do espectro da luz de diversas substâncias químicas com propriedades fotossensibilizantes. Assim, para que uma substância química seja um eficiente agente fotossensibilizante, a mesma deve ser capaz de tornar-se excitável quando exposta à irradiação da luz e dessa forma, convertendo-se em um estado altamente energético e relativamente de longa duração na forma tripleto (PERVAIZ, 2001; VOGELMANN; KRAMER, 1976).

A TFD envolve a administração local ou sistêmica do agente fotossensibilizante seguido posteriormente pela irradiação da luz em um comprimento de onda apropriado no sítio alvo para fotoativar o composto químico (TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Uma vez que a energia da luz é captada na forma de fótons pelo componente químico, iniciam-se reações intercruzadas dentro da estrutura química, levando ao salto de elétrons para um nível orbital altamente energético, seguido por uma inversão em alta rotação orbital de elétrons, convertendo então o componente químico em um estado altamente excitável na forma tripleto (CALIN et al., 2005; DOLMANS et al., 2003; DOUGHERTY, 1992; HERDERSON; PERVAIZ, 2001; JUARRANZ et al., 2008; OCHSNER, 1997; TRIESSCHEIJN et al., 2006; VERMEERSCH et al., 1991).

Quando o componente químico retorna ao seu estado energético de repouso, ele emite a energia sob forma de calor ou fluorescência, sendo esta última propriedade utilizada na Clínica Médica para detecção de diversas patologias por exames de diagnóstico por imagem (JUARRANZ et al., 2008; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

O agente fotossensibilizante estando na forma tripleto, ele pode sofrer dois tipos de reações. Na primeira reação (Reação Tipo 1), o composto químico fotossensibilizante pode reagir diretamente com o substrato biológico que pode ser membranas celulares e biomoléculas (lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e etc.) transferindo prótons (íons hidrogênio) ou elétrons, levando à geração de radicais iônicos que por sua vez, interagem com o oxigênio produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como, superóxido aniônico ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), culminando em danos importantes celulares (CALIN et al., 2005; DOLMANS et al., 2003; FOOTE, 1976; JUARRANZ et al., 2008; PATHAK, 1982; PERVAIZ, 2001; TRIESSCHEIJN et al., 2006; VERMEERSCH et al., 1991). Na segunda reação (Reação Tipo 2), a energia produzida pelo composto químico na forma tripleto é transferida diretamente para o oxigênio molecular, convertendo em 1O_2 , sendo este considerado como uma das espécies altamente reativas e extremamente eletrofílico, responsável por causar importantes alterações nas membranas celulares, proteínas e DNA, levando à geração de danos severos e citotóxicos até a morte celular durante o processo da TFD. Dessa forma, os danos

ocasionados em membranas celulares são de particular interesse para o processo da TFD, uma vez que os compostos fotossensibilizantes tendem a acumular se seletivamente em membranas celulares e ou organelas, e quando são fotoativados produzem danos e morte celular. Em termos químicos, as alterações nos fosfolipídeos de membranas e ou organelas celulares ocorrem devido à reação de peroxidação lipídica que se inicia em consequência da formação de radicais livres e oxigênio singleto (BALZANI; SCANDOLA, 1987; CALIN et al., 2005; CLAYTON, 1970; DOLMANS et al., 2003; DOUGHERTY et al., 1998; FOOTE, 1976; FOOTE, 1991; JUARRANZ et al., 2008; PERVAIZ, 2001; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Embora os mecanismos da ação da TFD ainda não são completamente elucidados, normalmente é aceito que todos os efeitos citotóxicos gerados pela fotoativação dos compostos químicos são dependentes da presença de oxigênio e dessa forma, a reação de fotosensibilização não ocorre em áreas com anóxia nos tecidos biológicos. Estudos *in vivo* demonstram que a indução de hipóxia do tecido biológico por meio de clamping, abole os efeitos da TFD (DOLMANS et al., 2003; GOMER; RAZUM, 1984).

Durante o processo da TFD, ambas as reações tipo 1 e 2 ocorrem simultaneamente, contudo, a razão entre as duas reações e suas contribuições para o desencadeamento dos processos de estress oxidativos levando à peroxidação lipídica e por consequência gerando importantes efeitos citotóxicos até a morte celular, são dependentes de alguns fatores tais como, natureza química do composto químico fotossensibilizante, afinidade de retenção às estruturas intracelulares e extracelulares, presença de oxigênio tissular e o tipo de substrato biológico.

Estudo experimentais na TFD demonstram que em condições de hipóxia tissular, a geração de radicais livres oriundos da reação de fotossensibilização Tipo 1 são primariamente responsáveis pela sensibilização. Porém, em condições de média oxigenação tissular, o 1O_2 gerado pela reação Tipo 2, desempenha um papel fundamental por mediar amplamente todo o processo de fotossensibilização e também dar suporte a ação dos radicais livres produzidos pela reação tipo 1 na geração dos efeitos citotóxicos (JUARRANZ et al., 2008).

Devido à alta reatividade e a curta vida de duração das espécies reativas de oxigênio, somente áreas próximas aos locais onde foram produzidos os efeitos da

TFD são afetados diretamente, pois a meia vida de duração do $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos é menor que $0.04\mu\text{s}$ (micro segundos) e seu raio de ação é menor que $0.02\ \mu\text{m}$ (micrômetro) (DOLMANS et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008; PERVAIZ, S., 2001; MOAN; BERG, 1991). Portanto, a extensão do foto dano é multifatorial e depende do tipo do agente fotossensibilizante, da retenção seletiva extracelular ou intracelular, do total da dose posológica do agente fotossensibilizante, da dose total de exposição à irradiação da luz, da taxa de fluência da luz, da disponibilidade de oxigênio tissular e do tempo entre a administração do agente fotossensibilizante e a exposição à irradiação da luz (ACKROYD et al., 2001; DOLMANS et al., 2003).

1.2.3 Efeitos da TFD em Tumores

A TFD tem demonstrado possui efeitos a nível celular (HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY; MALONE, 1984) e subsequentemente atua na geração de importantes alterações na vascularização tumoral contribuindo para a destruição de tumores (ACKROYD et al., 2001; JUARRANZ et al., 2008; STAR et al., 1986).

Sabe-se que há três principais mecanismos pelos quais a TFD media a destruição do tecido canceroso (DOLMANS et al., 2003; DOUGHERTY et al., 1998; HASAN et al., 2003). No primeiro mecanismo, as EROs e principalmente o $^1\text{O}_2$ gerados durante o processo de fotossensibilização da TFD produzem danos severos diretamente às células tumorais promovendo à destruição tumoral (DOLMANS et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008). No segundo mecanismo, a TFD também pode gerar danos relevantes nos vasos sanguíneos, prejudicando a vascularização tissular levando ao colapso e falência vascular originando um quadro de severa hipóxia. Dessa forma, a resposta vascular atua desempenhando um importante papel na morte celular devido ao comprometimento do aporte de oxigênio e nutrientes necessários para a manutenção e sobrevivência celular e também corroborando na redução do fluxo sanguíneo possibilitando a ocorrência da formação de trombos (ACKROYD et al., 2001; DOLMANS et al., 2003; REED et al., 1989; STAR et al., 1986). E finalmente, o último mecanismo pelo qual a TFD atua é ativando a resposta imune contra as células tumorais remicentes do processo de fotossensibilização (DOLMANS et al., 2003; DOUGHERTY et al., 1998; HENDERSON; GOLLNICK; SNYDER et al., 2004; JUARRANZ et al., 2008; SOLBAN; RIZVI; HASANT, 2006;

TRIESSCHEIJN et al., 2006). Portanto a contribuição de cada um desses mecanismos durante o processo de fotosensibilização depende de vários fatores os quais podemos incluir a natureza do agente fotossensibilizante, local de retenção dentro do tecido tumoral, dose de exposição da luz adotada, tipo de tumor e seu grau de vascularização (JUARRANZ et al., 2008; TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Desde 1991, pesquisas experimentais têm mostrados que a TFD causa nas células neoplásicas uma resposta de morte celular tanto por meio de apoptose quanto de necrose (AGARWAL et al., 1991) fornecendo amplas bases na avaliação da eficácia terapêutica da TFD. Normalmente, a apoptose é definida como um processo de energia dependente que ocorre na maioria das células e que atua regulando o processo de morte celular programada. Têm-se sugerido que o processo apoptótico é causado primariamente pelo dano mitocondrial (KESSEL; LUO, 1998). Entretanto, injúrias fotooxidativas desencadeadas durante o processo da TFD também estimulam um número de respostas, os quais incluíram efeitos citotóxicos diretos dentro do microambiente tumoral (MOOR, 2000) e danos relevantes nas células endoteliais vasculares que podem estar em combinação ou não resultando em um colapso vascular que por consequência levando à morte celular por severa hipóxia (ACKROYD et al., 2001; FINGAR, 1996; REED et al., 1989). Portanto tais efeitos são imprescindíveis para o início da ablação da massa tumoral no processo da TFD e que são determinantes na regulação da resposta imunitária tanto no processo de ativação quanto na supressão. Além disso, os processos inflamatórios são caracterizados pela geração de uma ampla variedade de mediadores pró-inflamatórios e vem acompanhado pelo recrutamento leucocitário e que normalmente ocorrem após o processo da TFD. Assim as amplificações de suas ações, bem como a indução da resposta inflamatória aguda e a geração da resposta imunitária tumor-específica desempenham um papel decisivo para garantir o controle da resposta imunitária a longo prazo durante o processo da TFD (DOLMANS et al., 2003; KORBELIK, 1996; KORBELIK; CECIC, 1999).

- **Ação Letal Direta nas células tumorais**

Em experimentos com modelos tumorais *in vivo* utilizando a TFD observa-se uma redução do número de células tumorais clonogênicas em virtude do foto dano pela geração de EROs decorrentes da ação de peroxidação lipídica, foto oxidação

das bases de guanina do DNA e danos nas membranas do citoesqueleto e de outros sítios intracelulares, dessa forma, desencadeando o processo de morte celular e a destruição do tecido biológico (CASTANO et al., 2005; DOLMANS et al., 2003; HUANG et al., 2005; KÜBLER, A.C., 2005; TAMIETTI et al., 2007).

Contudo, várias membranas celulares têm sido postuladas como sítios alvos em potencial de interesse para a TFD com aplicação para os diferentes tipos de agentes fotossensibilizantes entre elas podem citar membrana plasmática, mitocondrial, nuclear, do lisossoma, do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático e estruturas biomoleculares do cito esqueleto (ACKROYD et al., 2001; ASSUNÇÃO GUIMARÃES, C.; LINDEN, 2004; BUCKMANN et al., 2001; CANDAL et al., 2005; CASTANO et al., 2004; CREGAN et al., 2002; HUANG, et al., 2005; JUARRANZ et al., 2008; KLIONSKY; EMR, 2000; KÜBLER, 2005; PENG et al., 1996; TAMIETTI et al., 2007). Assim, tais sítios têm sido extensivamente considerados como um importante local constituído por biomoléculas que são fortemente suscetíveis ao ataque do oxigênio singlete $^1\text{O}_2$ e EROs geradas a partir da ação de peroxidação lipídica durante o processo de fotossensibilização da TFD (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; PENG et al., 1996; PERVAIZ, 2001). Portanto, o dano letal está intrinsecamente relacionado tanto ao processo de peroxidação lipídica mediado pela ação do $^1\text{O}_2$ como importantes modificações oxidativas de proteínas presentes nas membranas celulares (DAS; MUKHTAR et al., 1985; DAVIES, 1987; PERVAIZ, 2001).

Os principais mecanismos de morte celular, apoptose e necrose têm sido descritos após o emprego da TFD e parecem estarem relacionados com o local de retenção celular do composto fotossensibilizante no tecido biológico (JUARRANZ et al., 2008). A necrose é normalmente caracterizada pelo modo de morte celular que está associado com a perda da homeostasia em decorrência do aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular. Assim durante o processo da necrose, o conteúdo celular é liberado causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória no local. Por outro lado, processo de morte celular por apoptose que é regulado geneticamente, há à ocorrência da perda do volume celular, formação de *Blebbing* na membrana plasmática, condensação nuclear, agregação da cromatina e degradação endonucleocítica do DNA em

fragmentos nucleossomais e formação de corpos apoptóticos. Tais mudanças celulares ocorrem após uma cascata de sinalização celular e eventos mediados por caspases que regulam a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas

Posteriormente os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar comprometimento às estruturas vizinhas e inflamação (GRIVICICH et al., 2007; HU; KANAVAGH, 2003; RUPNARAIN et al., 2006; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ZONG; THOMPSON, 2006; WILLIAMS; SMITH, 1993).

Contudo a mitocôndria parece desempenhar um papel crucial no processo de apoptose pela geração de fatores apoptóticos tais como cytochrome c (Cyt c) e fatores intermembranários presentes no citoplasma celular. Este processo ocorre em função da ação de peroxidação da cardiolipina (CL), um fosfolípido essencial que atua no metabolismo energético de organismos celulares e pluricelulares, presente na membrana mitocondrial e que está envolvida nos mecanismos fisiológicos e em alterações patológicas onde a via de síntese e metabólica desempenha um papel chave na manutenção estrutural e funcional da mitocôndria e por consequência na sobrevivência celular (TAMIETTI et al., 2007).

Embora o mecanismo de destruição direta da TFD nas células neoplásicas ainda continua sendo objeto de investigação têm-se sugerido que a ação do 1O_2 durante a TFD apresenta tendência a induzir a morte celular por apoptose, enquanto que a geração de danos celulares pelas EROs levam ao processo de morte celular por necrose (FRUTOS; CORN, 1998; KOICHEVAR et al., 2000; LIN, 2000). Assim, dependendo do sítio de geração do fotodano provocado pela ativação do composto fotossensibilizante, tanto o mecanismo de apoptose quanto o de necrose estão intimamente envolvidos na morte celular e que são descritos em trabalhos com células e tecidos neoplásicos tratados com TFD (DAHLE et al., 1999; DAVIES, 1987; PERVAIZ, 2001; VILLANUEVA et al., 1999).

Muitos trabalhos experimentais indicam que os agentes fotossensibilizantes que se ligam em organelas celulares tais como, mitocôndria e retículo endoplasmático são melhores indutores ao processo de apoptose, pois levam principalmente à indução transitória da permeabilidade da membrana mitocondrial liberando fatores pró-apoptóticos dentro do citosol celular e dessa forma desencadeando a morte celular por apoptose (JUARRANZ et al., 2008; KESSEL;

LUO, 1999; KROEMER et al., 1997; KROEMER, 2003; PERVAIZ, 2001; TAMIETTI et al., 2007). Por outro lado, agentes fotossensibilizantes que se ligam predominantemente em membranas plasmáticas, lisossomos e estruturas do complexo de Golgi ou que ficam totalmente difundidos no citosol celular tendem a desencadear a morte celular por necrose (BUYTAERT et al., 2007; JUARRANZ et al., 2008; KESSEL; LUO, 1999; KESSEL; VICENTE; REINERS, 2006; KROEMER et al., 1997; KROEMER, 2003; OLEINICK et al., 2002; PERVAIZ, 2001; VILLANUEVA et al., 2003).

Considerando que $^1\text{O}_2$ apresenta uma curta vida de duração, vale destacar que o alvo primário a ser atacado deve estar necessariamente bem próximo do agente fotossensibilizante para que ocorra uma ação efetora de fotodano. Além disso, realocização do agente fotossensibilizante a nível celular têm sido observado durante o processo de irradiação, desta forma, afetando outros alvos secundários. Neste caso, a localização do sítio primário pode não ser decisiva para desencadear morte celular, mas sim provocar um efetivo fotodano que possa amplificar seus efeitos em sites secundários onde o agente fotossensibilizante é realocado (BUYTAERT et al., 2007; JUARRANZ et al., 2008; KESSEL, 2002).

Portanto a eficácia na TFD é multifatorial e dependente da natureza química, das propriedades físico químicas e da concentração dos agentes fotossensibilizantes empregados, da via de administração adotada, do tempo de incubação, da dose de energia da luz utilizada e finalmente do tipo de tumor e o seu grau de vascularização tissular. Todos estes fatores descritos são extremamente relevantes e determinam o sítio de retenção e geração tanto do $^1\text{O}_2$ como das EROs no processo de fotoativação do componente fotossensibilizante levando ao desencadeamento de danos celulares até a morte celular (JUARRANZ et al., 2008; PERVAIZ, 2001).

- **Danos na Vascularização tumoral**

A viabilidade das células tumorais é dependente principalmente da manutenção do suprimento de oxigênio e nutrientes presentes nos vasos sanguíneos e dessa forma, a formação e o controle da angiogênese são mediados

pela ação dos fatores de crescimento produzidos pelo ambiente tumoral (DOLMANS et al., 2003).

Contudo, a vascularização é considerada como uma rota comum permitindo à disseminação das células cancerosas para outros órgãos distantes do sítio primário tumoral levando ao processo de metastatização. Além disso, a mesma tem como finalidade garantir a viabilidade celular promovendo o aporte de oxigênio e nutrientes necessários para a manutenção celular (DOLMANS et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008). Assim, a vascularização tumoral é apontada como uma importante e promissora abordagem do ponto de vista terapêutico contra câncer (CARMELIET; JAIN, 2000; DOLMANS et al., 2003; JAIN; CARMELIET, 2001; JUARRANZ et al., 2008). Neste sentido, o dano vascular tem sido largamente investigado auxiliando de certa forma no suporte e na garantia de se obter resultados mais confiáveis e eficazes na aplicação da TFD com diversos tipos de agentes fotossensibilizantes na terapêutica contra o câncer (DOLMANS et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008).

Em experimentos iniciais com TFD têm descrito que normalmente todos os agentes fotossensibilizantes invariavelmente induzem vasoconstrição e formação de trombos pela ativação dos fatores de agregação plaquetária, dessa forma, limitando o suprimento de oxigênio e nutrientes para as células neoplásicas e finalmente promovendo o colapso ou falência vascular levando a um quadro de severa hipóxia ou anóxia tissular (BUSCH et al., 2002; CHEN et al., 1996; DOLMANS et al., 2002; DOLMANS et al., 2003; FINGAR et al., 1997; FINGAR et al., 1999; HENDERSON; FINGAR, 1987; JUARRANZ et al., 2008; STAR et al., 1986).

Também Henderson e seus colaboradores demonstraram em suas pesquisas no modelo de fibrosarcoma o qual o Photofrin[®] (Pinnacle Biologics Inc., USA), induzido pela TFD causa falência vascular com diminuição do aporte de oxigênio e nutrientes no tecido tumoral (HENDERSON; FINGER, 1989). Em outros estudos pré-clínicos com TFD os quais foram utilizados outros compostos fotossensibilizantes tais como, derivados da Hematoporfirina, da feoforbida e da benzoporfirina descrevem que a resposta ao dano vascular possui caráter bifásico. Geralmente é observada uma vasoconstrição de efeito imediato e após 3 horas do processo da TFD, uma resposta secundária e de longo prazo é caracterizada pela ocorrência de formação de trombos retardando o crescimento tumoral (DOLMANS et al., 2003).

Assim tais efeitos que estão associados ao dano vascular são determinantes para a inibição ou retardamento da progressão tumoral (CASTANO et al., 2006;

DOLMANS et al., 2002; DOLMANS et al., 2003; GOMER et al., 2006; JUARRANZ et al., 2003; TOZER; KANTHON; BAGULEY, 2005). Além disso, nota-se durante o processo de fotossensibilização há a ocorrência de danos as células endoteliais vasculares em tumores tratados com TFD e que ativam uma cascata de eventos levando à vasodilatação, alterações na permeabilidade vascular pelo aumento dos fatores de adesão molecular, ativação de fatores de agregação plaquetária e finalmente desencadeando um quadro inflamatório agudo, sendo este responsável por atuar modulando a resposta imunológica (CASTANO et al., 2006; GOMER et al., 2006; JUARRANZ et al., 2008). Assim a resultante da injúria vascular, uma vez caracterizada pela resposta inflamatória aguda induzida pela TFD é também responsável pela morte das células neoplásicas tanto pelo processo de necrose quanto de apoptose, as quais são eliminadas rapidamente por macrófagos, granulócitos e pelo infiltrado leucocitário presente no ambiente tumoral (JUARRANZ et al., 2008). Contudo, os restos celulares resultantes do processo de fotossensibilização da TFD estimulam o microambiente tumoral na ativação e no aumento da expressão dos fatores pró-inflamatório tais como, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), cicloxigenase-2 (COX-2), prostaglandinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), integrinas, interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) e proteínas de choque térmico (HSPs), promovendo dessa forma na viabilização de antígenos necessários para sensibilização e na atração de macrófagos e células dendríticas oriundos dos nódulos linfáticos ativando a resposta imunológica. Contudo, sugerem-se estudos adicionais que serão necessários para se determinar com mais precisão os efeitos dos danos vasculares induzidos pela TFD no controle da resposta imune a longo prazo (DOLMANS et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008).

- **Resposta Imunológica**

A inflamação aguda é gerada a partir do dano celular (necrose/apoptose) induzida pela TFD e que pode potencializar a resposta imunitária anti-tumoral específica através da atração leucocitária ou seja, por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células dendríticas para dentro do ambiente tumoral e conseqüentemente aumentando o reconhecimento de antígenos (CASTANO et al., 2006).

Um dos principais marcadores celulares induzíveis pelo processo TFD e posteriormente liberado pelos restos celulares tumorais em decorrência do dano celular é a proteína extracelular 70 de choque térmico (HSP70). Esta proteína é eficientemente ativada após o estresse oxidativo celular e a mesma permanece intracelularmente prevenindo a morte celular pela inibição da agregação de proteínas celulares (YENARI et al., 2005). Esta propriedade não só permite a inibição da morte celular, mas também promove a formação de um complexo estável com antígenos citoplasmáticos das células tumorais. Estes complexos podem ser expressos na superfície celular e escapam intactamente dos restos celulares interagindo com as células apresentadoras de reconhecimento de antígenos (APCs) estimulando a resposta imune (KORBELIK, M.; SUN, J.; CECIC, I., 2005). Portanto, as chaperonas em especial a HSP70 atua ligando-se aos receptores de alta afinidade de superfície das células APCs, promovendo a ativação, sensibilização das células dendríticas, permitindo a apresentação cruzada do peptídeo do antígeno de carga HSP70 das APCs para as células linfócitas citotóxicas tipo CD8+ (TODRYK et al., 1999).

Dessa forma este processo leva a sensibilização não só das células dendríticas, mas também, macrófagos, linfócitos, neutrófilos que migram dos nódulos linfáticos para o sítio tumoral ativando a resposta imune (Juarranz *et al.*, 2008). São previstas alterações induzidas pela TFD caracterizadas pelo aumento da expressão da transcrição de fatores como NFκB (fator nuclear kappa B) e proteína ativadora 1 (AP-1) que estimulam a ativação da transcrição de genes que codificam diversas proteínas imunoreguladoras e pró-inflamatórias por consequência do dano oxidativo celular (BAEUERLE; HENKEL, 1994; CASTANO et al., 2006; HAEFNER, 2002; SUN; XIAO, 2003). Também há relatos que o processo inflamatório induzido pela TFD é controlado pelo aumento da expressão de mediadores inflamatórios tais como IL-1 β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 e MIP-2), prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas, COX-2, proteinases, peroxidases, EROs, substâncias vasoativas, componentes do complemento (C3 e C5), fatores de coagulação plaquetária, integrinas e fatores de crescimento (TGFβ, VEGF). (CASTANO et al., 2006; DOLMANS et al., 2003; EVANS et al., 1990; EVANS et al., 2001; GOLLNICK et al., 1997; GOLLNICK et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008; KICK et al., 1995; KORBELICK; KROSL, 1994; NSEYO et al., 1990; STEUBING et al., 1991).

Pesquisas têm sugerido que o recrutamento neutrofílico para os sítios tumorais que receberam tratamento com TFD é fortemente controlado não só pela ação dos mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos residentes e células do estroma e células endoteliais do tumor sólido mas também por alterações na permeabilidade vascular e no aumento da expressão de fatores de adesão vascular (E-Selectina) e intracelular (ICAM-1) que colaboram nas etapas da cascata de adesão celular necessárias para a diapedese neutrofílica, e dessa forma contribuindo para uma efetiva resposta tumorocida (BHUVANESWARI et al., 2009; BOZIC et al., 1995; BUTCHER; PICKER, 1996; CASTANO et al., 2006; CHEN et al. 2006; DI CARLO et al., 2002; GOLLNICK et al., 2003; MACKAY, 2001)

Embora o dano vascular e a ocorrência de hipoxia após a TFD contribui para uma efetiva resposta inflamatória no ambiente tumoral, reduções dos níveis de oxigênio tissular durante o tratamento podem limitar a eficácia no controle de progressão tumoral, induzindo à produção de marcadores inflamatórios pró-angiogênicos tais como VEGF, TGF β , COX-2, metaloproteinases entre outros levando à ressurgência tumoral. (BHUVANESWARI et al., 2009). Portanto é importante gerar dados no perfil das citocinas inflamatórias e outros marcadores em sítios tumorais tratados com TFD desde que possam auxiliar a estabelecer adequados parâmetros no esquema de tratamento e que garantem uma correta resposta imunitária anti-tumoral específica tanto inata bem como adaptativa (CASTANO et al., 2006; FERRARIO et al., 2000; FERRARIO et al., 2004; FERRARIO et al., 2005; GARG et al., 2010).

1.3 Azul de Metileno

O azul de metileno é um corante que pertence à classe dos corantes fenotiazínicos e que desperta grande interesse devido às suas propriedades eletrocatalíticas em face da NADH₄, que é uma coenzima do grupo das dehidrogenases (SCHIRMER et al., 2011; WAINWRIGHT; AMARAL, 2005). Além disso, o mesmo têm-se mostrado como um potente agente fotossensibilizante com excelentes propriedades fotoquímicas em função de possuir alto rendimento na geração de ¹O₂ e EROs na presença de agentes redutores (CHEN et al., 2008; GABRIELLI et al., 2004; PELOI et al., 2008; TARDIVO et al., 2004; TARDIVO et al.,

2005). Devido às suas características fotodinâmicas e fototóxicas e demonstrar alta afinidade com a membrana mitocondrial celular, o azul de metileno têm-se destacado como um efetivo fotossensibilizante de grande potencial para à aplicação médica como agente terapêutico na TFD. Em face de suas propriedades físico-químicas, o mesmo quando está na forma fotoativada, liga-se significativamente na membrana mitocondrial, causando importantes alterações funcionais levando ao quadro de falência mitocondrial que por consequência promovendo morte celular por apoptose (BALL et al., 1998; CHEN et al., 2008; NOODT et al., 1998; ORTH et al., 2000).

O azul de metileno também é definido como um inibidor da óxido nítrico sintase e da guanilato ciclase, tendo diversas aplicações terapêuticas tanto na Medicina como na Veterinária (AUERBACH et al., 2010; BURROWS, 1984; JENA; CHAINY, et al., 2008; SHIRMER et al., 2011). Também um de seus empregos na área médica está baseado no seu papel como transportador de elétrons em sistemas inativos da metemoglobina redutase dependente de NADPH (BURROWS, 1984; SMITH, 1980) como implicações clínicas no tratamento de várias formas da metemoglobinemia, mas principalmente na forma adquirida, que é uma manifestação severa da infecção por malária levando ao quadro de uma profunda anemia que pode levar ao óbito. Portanto, o azul de metileno é utilizado classicamente como um efetivo agente antimalárico, principalmente nos países onde há um aumento da resistência do *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), pelo uso de agentes antimaláricos de primeira geração relacionados ao grupo da cloroquina e da pirimetamina-sulfadoxina (GINIMUGE; JYOTHI, 2010; MEISSNER et al., 2006; SCHIRMER et al., 2003).

Como agente antiparasitário, o mesmo apresenta peliotropismo; primeiro ele age interferindo no metabolismo da hemoglobina e do grupo heme presente nas organelas digestivas do parasita, impedindo o seu crescimento e desenvolvimento. Por último, o azul de metileno atua como inibidor seletivo da enzima glutatona redutase, promovendo depleção dos níveis de glutatona dentro do citosol parasitário, revertendo o quadro de sensibilização *P. falciparum* à ação da cloroquina, e também prevenindo a reação de polimerização do grupo heme em hemozoin semelhante à ação dos agentes antimaláricos derivados de 4-aminoquinolina (AKOMPONG et al., 2000; ATAMNA et al., 1996; BECKER et al.,

2003; DAVIOUD – CHARVET et al., 2001; GINIMUGE; JYOTHI, 2010; MEISSNER et al., 2006; MÜLLER et al., 2001; RIDLEY, 2002; SCHIRMER et al., 2003).

Embora, o emprego do azul de metileno como agente antimalárico tenha sido utilizado desde 1891 por Guttman e Erlich exclusivamente no tratamento contra a malária, atualmente suas indicações clínicas têm sido amplamente revisadas (COULIBALY et al., 2009; FÄBER et al., 1998; SCHIRMER et al., 2011; VANNERSTROM et al., 1995). Desde 2010, houve mais de 11.000 acessos de procura do azul de metileno nas bases de dados científicos na área médica, e observamos que tais ferramentas de pesquisa ainda não foram totalmente cobertas por trabalhos anteriormente publicados ao uso do banco de dados e, portanto, levando à aquisição de poucas informações relacionadas ao azul de metileno (SCHIRMER, et al., 2011).

Recentemente as indicações terapêuticas do azul de metileno têm sido aprovadas pelo FDA e estão sendo direcionadas não só para o tratamento de diversas formas da metemoglobinemia (hereditária, aguda e adquirida), mas também estão sendo introduzidas clinicamente no tratamento de diversas condições tais como na síndrome de vasoplegia refratária, em distúrbios cardiovasculares relacionados ao choque séptico, na encefalopatia induzida pela isofosfamida em pacientes com câncer e na síndrome hepatopulmonar que causa severa hipoxemia (AUERBACH et al., 2010; GINIMUGE; JYOTHI, 2010; JENA; CHAINY, 2008; KWOL; HOWES, 2006; PATEL, 2006; PELGRIMS et al., 2000; SCHIRMER et al., 2011; SHANMUGAM, 2005). Contudo o azul de metileno ainda tem despertado grande interesse na área médica por apresentar grande potencial uso terapêutico no tratamento contra a doença de Alzheimer (AUERBACH et al. 2010; GINIMUGE; JYOTHI, 2010; SCHEINDLIN, 2008).

Além disso, os efeitos do azul de metileno têm sido amplamente investigados na TFD com destaque principalmente contra o câncer (GINIMUGE; JYOTHI, 2010; WONDRAK, 2007).

Considerando o azul de metileno como um pigmento com ação redutora, o mesmo também apresenta atividade ant-fúngica, antimicrobiana e antiviral, sendo muito efetiva sua utilização na clínica médica na prevenção de infecções no trato urinário em pacientes idosos, no tratamento de úlceras e feridas que apresentam resistência bacteriana, psoríases e afecções causadas pelo vírus da hepatite C e do HIV em combinação com uma fonte de luz externa (CALZAVARA-PINTON et al.,

2005; GINIMUGE; JYOTHI, 2010; PELOI et al., 2008; PHOENIX et al., 2003; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002).

Atualmente as doses recomendadas em diferentes condições clínicas variam de acordo com a indicação terapêutica e posologia (GINIMUGE et al., 2011; SCHIRMER et al., 2011). Em humanos o azul de metileno quando administrado, o mesmo apresenta boa tolerância, excelente absorção e é amplamente difundido para outros tecidos e órgãos tais como, coração, pulmão, fígado, rins e também atravessa a barreira hematoencefálica. Sua biodisponibilidade é aproximadamente de 73% e sua eliminação é exclusivamente renal na forma leuco- azul de metileno e metabólitos demetilados (azure a e b) (AUERBACH et al., 2010; GAUDETTE; LODGE, 2005; PETER et al., 2000; SCHIRMER et al., 2011; WALTER-SACK et al., 2009). Reações adversas podem ocorrer quando o azul de metileno é administrado em altas doses acima de 7mg/kg peso corporal (i.v), entre elas podemos citar náuseas, distúrbios gastrointestinais, dores abdominais e peitorais, cianose, sudorese, cefaleias, tonturas, confusão mental e metemoglobinemia (AUERBACH et al., 2010; CLIFTON; LEIKIN, 2003; SCHIRMER et al., 2011).

6 DISCUSSÃO

A Análise Estatística de Sobrevida têm sido amplamente empregada no tratamento de dados de sobrevivência em estudos de laboratórios, ou seja, ela avalia, por exemplo, o tempo em que um indivíduo sobrevive a um determinado tratamento e o tempo de resposta a um dado tratamento e por meio desta análise, os quais buscam novos produtos farmacêuticos e terapias mais adequados para cada situação.

Em relação ao presente estudo, os resultados da análise da sobrevida dos diferentes grupos tratados com azul de metileno na massa tumoral sólida apresentaram valores do tempo mediano de sobrevida de 30 dias para os grupos tratados com azul de metileno nas concentrações de 0.1% e 0.3%, caracterizando uma probabilidade maior de sobrevida, Em relação aos grupos tratados com azul de metileno nas concentrações de 1.0% e 3.0%, apresentaram tempos medianos de sobrevida de 21 dias e 15 dias, respectivamente, sendo semelhante o tempo mediano de sobrevida do grupo controle e, portanto mantendo o mesmo padrão e a dinâmica do tempo de sobrevida do Tumor de Walker 256 que varia de 15 a 20 dias quando implantado via subcutânea. Na análise do teste para igualdade das curvas estimadas de Kaplan- Meier, entre os diferentes grupos tratados com azul de metileno observa-se nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.9241$ – Teste Long-rank e $p < 0.6762$ - Teste Long-rank for trend) quando comparado com o grupo controle. Os resultados da estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos diferentes grupos tratados com azul de metileno quando comparado com o grupo controle, podemos verificar que os grupos tratados com azul de metileno nas concentrações de 0.1% e 0.3% mostraram uma maior probabilidade de sobrevida quando comparado o grupo controle. Com relação aos grupos tratados com azul de metileno nas concentrações de 1.0% e 3.0% promoveram a mesma probabilidade de sobrevida quando comparados com o grupo controle. Com base nestes dados podemos concluir que os tratamentos nas concentrações de 0.1% e 0.3% do azul de metileno demonstraram uma maior probabilidade de sobrevida do animal quando comparado aos grupos controle e nas concentrações de 1.0% e 3.0%.

Em relação aos grupos das concentrações de 1.0% e 3.0% do azul de metileno não apresentaram diferenças significativas na probabilidade de sobrevida quando

comparado ao grupo controle, o que podemos sugerir indícios de efeitos de uma toxicemia, visto que dados encontrados na literatura recomenda-se a dose terapêutica do azul de metileno na faixa de 1-2 mg/kg peso (i.v).

Muitos medicamentos empregados rotineiramente na clínica podem apresentar como reação colateral indesejável, a agressão ao fígado, o que poderá limitar seu uso e os benefícios esperados. O dano hepático induzido por medicamentos pode ser hepatocelular, o que se traduzirá por aumento das transaminases pirúvica e oxalacética (ALT e AST), ou colestático, o que levará ao aumento de bilirrubinas, da fosfatase alcalina e da gama-glutaril transferase (G-GT).

Desde 1950, têm-se procurado teste de avaliações das condições do fígado para determinar o potencial hepatotóxico de medicamentos empregados na terapêutica. As determinações bioquímicas prontamente disponíveis e usadas universalmente são testes das transaminases (ALT e AST) e gama-GT. As aminotransferases são um indicativo de integridade celular e são enzimas intercelulares. As provas de laboratório para medir essas enzimas baseiam-se na ação sobre diferentes substratos que no final vão fornecer os substratos alanina glutamato ou aspartato. A ALT é a enzima mais utilizada para medir processo inflamatório ou necrótico no fígado. A mesma é encontrada no fígado e está localizada no citosol da célula hepática. A AST é uma enzima que se encontra tanto no citoplasma como nas mitocôndrias dos hepatócitos. Esta enzima está presente em muitos órgãos além do fígado, incluindo coração e músculos. Segundo Gayoto e Alves (2001) a AST é muito útil na caracterização de doenças hepáticas crônicas.

A gama glutamil transferase (gama GT) é uma enzima envolvida na transferência de um resíduo gama glutamil de alguns peptídeos para outros compostos (água, aminoácidos e outros peptídeos menores). Fisiologicamente, está envolvida na síntese protéica e peptídica, regulação dos níveis teciduais de glutathione e transporte de aminoácidos entre membranas. É encontrada em vários tecidos: rins, cérebro, pâncreas e fígado (quase a totalidade da gama GT corpórea está presente nos hepatócitos). No fígado, esta enzima está localizada nos canalículos das células hepáticas e particularmente nas células epiteliais dos ductos biliares. Devido a esta localização característica, a enzima aparece elevada em quase todas as desordens hepatobiliares, sendo um dos testes mais sensíveis no diagnóstico destas condições. Nas células do parênquima hepático, a enzima é localizada tipicamente

no retículo endoplasmático liso, estando sujeita a indução microsomal hepática e fazendo dela um marcador sensível a agressões hepáticas induzidas por medicamentos e álcool. Valores aumentados de gama GT são indicativos de doenças hepáticas em geral (hepatites agudas e crônicas, carcinomas, cirrose, colestase, metástases etc.), pancreatites, infarto agudo do miocárdio, lúpus eritematoso sistêmico, obesidade patológica, hipertireoidismo, estados pós-operatórios, carcinoma de próstata, uso de medicamentos hepatotóxicos ou capazes de ativar indução enzimática (barbituratos, fenitoína, antidepressivos tricíclicos, acetaminofen).

Apesar de não ser o objetivo principal do nosso projeto, avaliamos a hepatotoxicidade do tratamento com azul de metileno nas concentrações empregadas de 0.1%, 0.3%, 1.0% e 3.0% no modelo tumoral, pois surgiu uma grande preocupação quanto ao emprego e segurança de tais concentrações, visto que se encontram muito acima dos limites de dose terapêutica recomendada pela literatura que é de 1-2 mg/kg de peso (i.v). Além disso, dados encontrados na literatura informam que o tecido tumoral é caracterizado presença de alta angiogênese, ou seja, neovascularização para o aporte de oxigênio e nutrientes no desenvolvimento e progressão tumoral. Assim, também surgiu o fato da possibilidade da dose via intratumoral (i.t) das quatro concentrações de azul de metileno poder alcançar à corrente sanguínea e exercer seus efeitos toxicêmicos. Portanto, nossos resultados da avaliação da hepatotoxicidade puderam demonstrar que o emprego das concentrações de 0.1%, 0.3%, 1.0% e 3.0% de azul de metileno bem como a via de administração adotada não apresentaram nenhum aumento estatisticamente significativos nos níveis dos marcadores de lesão hepática, AST, ALT e gama- GT quando comparado ao grupo controle. Com bases nos resultados obtidos, podemos concluir que o azul de metileno apresentou uma segurança e tolerância quanto ao emprego das quatro concentrações, bem como na sua via da administração, sem causar efeito hepatotóxico pelo aumento dos níveis de AST, ALT e gama-GT.

Atualmente a TFD é considerada como uma nova modalidade terapêutica minimamente invasiva e suas aplicações têm sido direcionadas ao tratamento localizado bem como na destruição seletiva de diversos tipos de cânceres e desordens malignas (DOUGHERTY et al., 1998; GOMER et al., 1989; HSI et al., 1999; KESSEL, D., 1992; PERVAIZ, S., 2001). Esta terapia está baseada na

captação e retenção seletiva do agente fotossensibilizante em sítios alvos que por sua vez sofre ativação através da irradiação de uma fonte externa de luz levando à geração de efeitos citotóxicos induzindo a morte das células tumorais. (CALIN et al., 2005; DOUGHERTY et al., 1987; JUARRANZ et al., 2008; SARIKA et al., 2007).

Os principais mecanismos pelos quais a TFD media a destruição do tecido canceroso são, primeiro as espécies reativas de oxigênio (EROs) e principalmente o $^1\text{O}_2$ gerados durante o processo de fotossensibilização da TFD produzem danos severos diretamente às células tumorais promovendo à destruição tumoral (DENNIS et al., 2003; DOUGHERTY T. et al., 1998; HASAN et al., 2003; JUARRANZ et al., 2008). No segundo mecanismo, a TFD atua gerando danos relevantes nos vasos sanguíneos levando a formação de trombos e dessa maneira, prejudicando a vascularização tissular levando ao colapso e falência vascular originando um quadro de severa hipóxia. Também, a resposta ao dano vascular atua desempenhando um importante papel na ação tumoricida por induzir alterações na permeabilidade dos vasos sanguíneos estimulando a ativação dos fatores de adesão molecular (E-selectina/ ICAM) colaborando para a diapedese neutrofílica (ACKROYD et al., 2001; DENNIS et al., 2003; REED et al., 1989; STAR et al., 1986). E finalmente, o último mecanismo pelo qual a TFD atua é ativando a resposta imune contra as células tumorais reminiscetes em decorrência do dano oxidativo celular pelo aumento da expressão de proteínas imunoreguladoras e pró-inflamatórias sensibilizam não só das células dendríticas, mas também, macrófagos, linfócitos, neutrófilos que migram dos nódulos linfáticos para o sitio tumoral (DOUGHERTY et al., 1998; DOLMANS et al., 2003; HENDERSON, B.W., GOLLNICK, S.O., SNYDER, J.W. et al., 2004; JUARRANZ et al., 2008; SOLBAN, N.; RIZUI, I.; HASANT, T., 2006; TRIEESSCHEIJIN et al., 2006).

O azul de metileno é um corante que pertence à classe dos corantes fenotiazínicos e que desperta grande interesse devido às suas propriedades eletrocatalíticas em face da NADH₄, que é uma coenzima do grupo das dehidrogenases (SCHIRMER et al., 2011; WAINWRIGHT; AMARAL, 2005). Além disso, o mesmo têm-se mostrado como um potente agente fotossensibilizante com excelentes propriedades fotoquímicas em função de possuir alto rendimento na geração de $^1\text{O}_2$ e EROs na presença de agentes redutores. Devido às suas

características fotodinâmicas e fototóxicas e demonstrar alta afinidade com a membrana mitocondrial celular, o azul de metileno têm-se destacado como um efetivo fotossensibilizante de grande potencial para à aplicação médica como agente terapêutico na TFD (CHEN et al., 2008; GABRIELLI et al., 2004; PELOI et al., 2008; TARDIVO et al., 2004; TARDIVO et al., 2005).

Em nosso trabalho avaliamos a expressão dos principais mediadores pró-inflamatórios na massa tumoral sólida nos tratamentos tanto com azul de metileno em diferentes doses bem como com laser aplicado em diferentes energias e em associação com azul de metileno na concentração fixa de 0.1% com o objetivo de investigar se seus efeitos podem desencadear processos inflamatórios interferindo no desenvolvimento e na progressão tumoral.

Assim nossos resultados demonstraram que o tratamento com azul de metileno na concentração de 0.1% na massa tumoral desencadeou um processo inflamatório pela elevação não só dos níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α como na expressão gênica de COX-1, COX-2, iNOS e eNOS, sugerindo que há indícios da ocorrência de efeitos citotóxicos em decorrência da alta afinidade do azul de metileno pela membrana mitocondrial mas também de uma resposta imune tumorocida contra as células tumorais o que levaria a desencadear morte celular. Com relação aos tratamentos com azul de metileno nas concentrações de 0.3%, 1.0% e 3.0%, os dados dos mediadores envolvidos em processos inflamatórios na massa tumoral sólida, foram semelhantes em relação ao grupo controle, o que podemos indicar uma possível perda do efeito farmacológico devido à saturação de tais concentrações nos ligantes da membrana mitocondrial. Este fato também pode corroborar de forma consistente com os dados da análise de sobrevida do tratamento do azul de metileno de diferentes concentrações na massa tumoral sólida, onde foi observada uma menor probabilidade do tempo de sobrevida dos grupos tratados com azul de metileno nas concentrações de 1.0% e 3.0% quando comparado com o tempo de sobrevida do grupo controle, sugerindo a permanência da progressão tumoral nestas condições. Diferentemente em relação aos grupos tratados com 0.1% e 0.3% que tiveram uma probabilidade do tempo de sobrevida maior que o do grupo controle. Também estes dados puderam complementar de forma contundente no sentido de descartar qualquer dúvida sobre a ocorrência de

efeitos toxicêmicos no emprego das quatro concentrações do azul de metileno do tratamento na massa tumoral sólida.

Com relação aos resultados prévios do tratamento com Laser, no grupo de 1J observou um aumento bem expressivo nos níveis de IL-1 β , na expressão gênica de COX-1, COX-2 e iNOS e uma redução na expressão gênica de eNOS em relação aos demais grupos. Este fato leva a presumir a existência de um quadro inflamatório agudo, sugerindo indícios da ocorrência de uma resposta imunitária contra a massa tumoral sólida. Além disso, os dados dos níveis de IL-6 também corroboram para este fato, pois no grupo tratado com 1J foi observada uma redução dos níveis de IL-6 quando comparado ao grupo de 3J, e com isto tendo menor ocorrência de inflamação crônica. Neste mesmo grupo de 1J nota-se também uma menor resposta biológica da massa tumoral sólida frente ao tratamento, em decorrência da redução dos níveis de IL-10 quando comparado aos outros grupos de tratamento, dessa forma mantendo a massa tumoral sólida em estado de inflamação aguda, possibilitando a uma melhor resposta imune contra o tumor. Também foram observadas reduções dos níveis de TNF- α no grupo de 1J quando comparado com as outras energias e conseqüentemente podemos indicar indícios de uma redução do efeito necrótico severo, o que poderia ativar o aumento da expressão de fatores de crescimento levando a estimular a proliferação das células remanescentes tumorais do dano celular e com isso favorecer a progressão ou ressurgência tumoral.

De acordo com nossos resultados, podemos sugerir a energia do laser de 1J como mais favorável para aplicação na TFD no tratamento de tumores, pois nesta condição demonstrou-se a ocorrência de um quadro inflamatório agudo gerado a partir do dano celular pelo aumento da expressão de IL-1 β , COX-1, COX-2, iNOS, colaborando na sensibilização neutrofílica e com isto desencadeando uma resposta imunitária contra o tumor. Por outro lado nas energias de 3 e 6J, nestas condições um quadro inflamatório crônico com necrose pode ser observado pelo aumento dos níveis de IL-6, IL-10, TNF- α e redução da expressão gênica de eNOS, caracterizado por danos mais severos não só celular como vascular, o que não seria bom do ponto de vista terapêutico pois pode levar ao aumento da expressão de antígenos ativando fatores de crescimento e fatores angiogênicos estimulando a proliferação das células tumorais remanescentes e dessa forma permitindo a ressurgência tumoral.

Os resultados do protocolo de tratamento com azul de metileno na concentração de 0.1% em diferentes energias do laser pode-se verificar que no grupo 0.1% azul de metileno + 1J um aumento extremamente expressivo nos níveis de importantes marcadores envolvidos no processo inflamatório tais como, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , COX-2, iNOS, PGE₂ quando comparado com os demais grupos. Além disso, dados da quantificação de EROs por TBARS e da atividade da MPO na massa tumoral sólida também corroboraram com os resultados anteriores onde também pode-se demonstrar elevados níveis de TBARS e na atividade da MPO no grupo 0.1% azul de metileno +1J quando comparado em relação aos outros grupos tratados. Este fato nos leva a indicar que nesta condição há ocorrência de uma efetiva ação fotodinâmica do azul metileno na massa tumoral sólida em decorrência da geração não só de radicais livres como do ¹O₂ responsáveis por causar importantes danos oxidativos no ambiente tumoral, os quais foram confirmados pela análise de TBARS. Conseqüentemente resultados de elevados níveis dos mediadores inflamatórios também foram confirmados ocorrendo inflamação necessária para a sensibilização das células dendríticas, macrófagos, linfócitos, neutrófilos que migram dos nódulos linfáticos para o sítio tumoral e dessa forma contribuindo para uma resposta imunitária tumoricida sendo esta última confirmada através da análise da MPO, sugerindo a presença neutrofílica. A Análise histológica também complementou com os resultados das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α), COX-2, iNOS, PGE₂ e MPO, onde no grupo 0.1% azul de metileno + 1J observa-se grande áreas de necrose com presença de neutrófilos.

Com bases em nossos resultados podemos concluir que existem evidências de uma ação tumoricida do azul de metileno em associação com 1 J de energia do laser, em virtude da geração de importantes danos oxidativos celulares no ambiente tumoral levando à morte celular, no aumento da expressão de importantes marcadores pró-inflamatórios desencadeando inflamação que por sua vez colaborando para sensibilização e atração neutrofílica numa efetiva resposta imunitária tumoral específica. Entretanto, sugere-se a adição de novas pesquisas no sentido de investigar outros parâmetros principalmente relacionados não só a fatores de crescimento como indicadores de morte celular apoptose/necrose com o objetivo de estabelecer uma efetiva ação terapêutica de controle a longo prazo contra o câncer.

REFERÊNCIAS*

- ABBOTTS, R.; THOMPSON, N.; MADHUSUDAN, S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. **Cancer Manag. Res.**, v.19, n.6, p.77-92, 2014.
- ACKROYD, R.; KELLY, C.; BROWN, N.; MALCOLM, R. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656–669, 2001.
- ADIMOOLAM, S.; FORD, J.M. p53 and DNA damage inductible expression of xeroderma pigmentosum group C gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.99, p.12985-12990, 2002.
- AGARWAL, M.L.; CLAY, M.E.; HARVEY, E.J.; EVANS, H.H.; ANTUNEZ, A.R.; OLEINICK, N.L. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. **Cancer Res.**, v.51, p. 5993–5996, 1991.
- AKOMPONG, T.; GHORI, N.; HALDAR, K. *In vitro* activity of riboflavin against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 88 - 96, 2000.
- ALBALA, C.; VIO, F.; KAIN, J.; UAUY, R.; Nutrition transition in Latin America: the case of Chile. **Nutr. Rev.**, v. 59, n. 6, p. 170-6, 2001.
- ALBALA, C.; VIO, F.; YANEZ, M. Transición epidemiológica em America Latina: comparación de cuatro países. **Rev. Med. Chil.** v.125, n. 6, p. 719-727, 1997.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p.1256-1257, 2002.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALFANO, F.D. A stochastic model of oncogene expression and the relevance of this model to cancer therapy. **Theoret. Biol. Med. Model.**, v.3, n. 5, p.1-7, 2006.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 118-129, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures**, 2nd Edition, Atlanta, 2011.

*De Acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**. v.25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

ANDERSON, C.; HRABOVSKY, S.; MCKINLEY, Y.; TUBESING, K.; TANG, H. P.; DUNBAR, R.; MUKHTAR, H.; ELMETS, C.A. Phythalocyanine photodynamic therapy: disparate effects of pharmacologic inhibitors on cutaneous photosensitivity and on tumor regression. **Photochem. Photobiol.**, v.65, p. 895–901, 1997.

ASSUNÇÃO-GUIMARÃES, C.; LINDEN, R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative degradation. **Eur. J. Biochem.**, v.271, p.1638–1650, 2004.

ATAMNA, H.; KRUGLIAK, M.; SHALMIEV, G.; DEHARO, E.; PESCARMONA, G.; GINSBURG, H. Mode of antimalarial effect of methylene blue and some analogues on *Plasmodium falciparum* in culture and their inhibition of *P. vinckei petteri* and *P. yoelii nigeriensis* in vivo. **Biochem. Pharmacol.**, v.51, p.693-700, 1996.

AUERBACH, S.S.; BRISTOL, D.W.; PECKHAM, J.C.; TRAVLOS, G.S.; HÉBERT, C.D.; CHHABRA, R.S. Toxicity and carcinogenetic studies of methylene blue trihydrate in F344N rats and B6C3F1 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 169-177, 2010.

AZAB, M.; BOYER, D.S.; BRESSLER, N.M.; BRESSLER, S.B.; CIHELKOVA, I.; HAO, Y.; IMMONEN, I.; LIM, J.I.; MENCHINI, U. et al. Verteporfin therapy of subfoveal minimally classic choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: 2- year results of a randomized clinical trial. **Arch. Ophthalmol.**, v. 123, p. 448–457, 2005.

BABENKO, V.N.; BASU, M.K.; KONDRASHOV, F.A.; ROGOZIN, I.B.; KONNIN, E.V. Signs of positive selection of somatic mutations in human cancers detected by EST sequence analysis. **BMC Cancer**, v.9, p. 26-36, 2006.

BAEUERLE, P.A.; HENKEL, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p. 141–179, 1994.

BALL, D.J.; LUO, Y.; KESSEL, D. et al. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.42, p. 159-63, 1998.

BARACAT, F.F.; FERNANDES, J.H.J; SILVA, M.J. Um enfoque multidisciplinar. **Cancerologia Atual**, Roca, São Paulo, p. 548, 2000.

BECKER, K.; RAHLFS, S.; NICKEL, C.; SCHIRMER, R.H. Glutathione-function and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum* **Biol. Chem.**, v.384, p. 551-566, 2003.

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects. Med.**, v.21, p.167-223, 2001.

BEVILACQUA, R.G.; GOMES, M.C.C.; BEVILACQUA, L.R.; MARGARIDO, N.F.; WAITZBERG, D.L.; GONÇALVES, E.L. Efeitos da utilização de dieta hiperlipídica

sobre o desenvolvimento tumoral: estudo experimental com o Carcinossarcoma de Walker 256. **Rev. Paul. Med.**, v.102, p.249-55, 1984.

BHUVANESWARI, R.; GAN, Y.Y; SOO, K.C.; OLIVO, M. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.66, p. 2275–2283, 2009.

BLACK, J.M; NESHEIM, M.C.; KINSELLA, J.E. Dietary level of maize oil affects growth and lipid composition of Walker 256 carcinosarcoma. **Br. J. Nutr.**, v.71, n.2, p. 283-294, 1994.

BLUM, H.F. **Photodynamic Action and Diseases caused by Light**, Reinhold, New York, 1941.

BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v.411, n. 6835, p.355-65, 2001.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, J.H. Nucleotide excision repair and human syndromes carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, p. 453-460, 2000.

BOING, A.F.; VARGAS, S.A.L.; CRISPIM-BOING, A. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade entre 2002-2004. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v.53, n. 4, p. 317-322, 2007.

BOSSETI, C.; LEVI, F.; FERLAY, J.; LUCCHINI, F.; LA VECCHIA, C. Trends in câncer mortality in the Americas, 1970-2000. **Annals of Oncology**, v.16, n.1, p. 489-511, 2005.

BOURRE, L.; ROUSSEF, N.; THIBAUT, S. et al. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. **Apoptosis**, v.7, p. 221–230, 2002.

BOZIC, C.R.; KOLAKOWSKI, L.F.; GERARD, N.P.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; VON UEXKULL-GULDENBANC; C.; CONKLYN, M.J.; BRESLOW, R.; SHOWELL, H.J.; GERARD, C. Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. **J. Immunol.**, v.154, p. 6048–6057, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2003**. Rio de Janeiro: 2003. <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2007. <http://www.inca.gov.br/cancer>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações sobre mortalidade – 2002**. Rio de Janeiro: 2002. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtmmap.htm>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p.98, 2009.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro Filho, G. **Bogliolo: Patologia**, 7 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap. 8, p. 188 - 236, 2006.

BRAYAND, F., MOLLER, B. Predicting the future burden of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.6, p. 63–74, 2006.

BRITO, N.M.B.; CARVALHO, R.K.V.; MATOS, L.T.M.B.; LOBATO, R.C.; BRITO, R.B. The oophorectomy effect on Walker 256 tumor inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. **Acta Cir Bras.**, v.24, n.1, p.26-29, 2009.

BROWN, S.B.; MELLISH, K.J. Verteporfin: a mile-stone in ophthalmology and photodynamic therapy. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v.2, p.351–361, 2001.

BUCKMAN, J.F.; HERNANDEZ, H.; KRESS, G.J. et al. Mito – Tracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. **J. Neurosci. Methods**, v.104, p.165–176, 2001.

BURROWS, G.E. Methylene blue: effects and disposition in sheep. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.7, p.225-231, 1984.

BUSCH, T.M. et al. Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen. **Cancer Res.**, v.62, p.7273–7279, 2002.

BUTCHER, E.C.; PICKER, L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**, v. 272, p.60–66, 1996.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M., AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1776, p.86–107, 2007.

CALIN, M.A.; GRUTA, M. I.; HERASCU, N.; COMAN, T. Photodynamic Therapy of Walker Tumors by Multiple Laser Irradiation. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, n.4, p. 405–409, 2005.

CALZAVARA-PITON, P.G.; VENTURI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.78, p.1-6, 2005.

CAMARGO, A.A.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G. Mutação e câncer. In: **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**, 1 ed, Rossi, B.M e Pinho, M. (eds.), Livraria e Editora Marina, Brasil, p.111-123,1999.

CANDAL, E; ANADON, R.; DEGRIP, W.J. et al. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of brown trout. **Brain Res.**, v.154, p. 101–119, 2005.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases: from genes to function to therapy. **Nature**, v.407, p.249–257, 2000.

CARREÑO, M.S.R.; PEIXOTO, S.; GIGLIO, A. Reposição hormonal e câncer de mama. **Rev. Soc. Bras. Canc.**, v.7, p.41-50, 1999.

CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v.1, p.279–293, 2004.

CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular localization, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v.2, p.1–23, 2005.

CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nat. Rev. Cancer**, v.6, p.535–545, 2006.

CAVENNEE, W.K.; WHITE, R.L. The genetic basis of câncer. An accumulation of genetic defects can apparently cause normal cells to become cancerous and cancerous cells to become increasingly dangerous. **Scientific American**, v.272, p. 72-9, 1995.

CAVALCANTI, T.C.; GREGORINI, C.C.; GUIMARÃES, F.; RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A.N. Changes in red Blood cell osmotic fragility induced by total plasma and fractions from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, p.887-95, 2003.

CHAMMAS, R.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B; TEIXEIRA, V.R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. **Dieta e Câncer**, 1 ed., Editora Atheneu, São Paulo, v.1, p.79-87, 2004.

CHAN, A.L.; JUAREZ, M.; ALLEN, R. et al. Pharmacokinetics and clinical effects of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) photodynamic therapy in adult patients with primary or secondary cancer of the skin and mucosal surfaces. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** v.21, p.72–78, 2005.

CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v.13, p.1009-1022, 1995.

CHAO, E.C.; LIPKIN, S.M. Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. **Nucleic Acids Res.**, v.34, n. 3, P. 840 – 852, 2006.

CHEN, Q.; CHEN, H.; HETZEL, F.W. Tumor oxygenation changes post-photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.** v.63, p.128–131, 1996.

CHEN, Q.; HUANG, Z.; CHEN, H.; SHAPIRO, H.; BECKERS, J.; HETZEL, F.W. Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.76, p.197–203, 2002.

CHEN, B.; POGUE, B.W.; LUNA, J.M.; HARDMAN, R.L.; HOOPEES, P.J.; HASAN, T. Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. **Clin. Cancer Res.**, v.12, p.917–923, 2006.

CHEN, Y.; ZHENG, W.; LI, Y.; ZHONG, J.; JI, J.; SHEN, P. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Sci.**, v.99, n.10, p. 2019-2027, 2008.

CHEN, Y.C.; HUNTER, D.J. Molecular Epidemiology of Cancer. **CA Cancer J Clin.**, v.55, n.1, p.45–54, 2005.

CLIFTON, J.; LEIKIN, J.B. Methylene blue. **Am. J. Ther.**, v.10, p.289-291, 2003.

COOPER, G.M. **Elements of human cancer**. 1 ed. Jones and Barlett Publishers, Boston, 1994.

COOPER, G.M. 1995. **Oncogenesis**. 2 ed. Jones and Barlett Publishers, Boston, 1995.

COHEN, S.M. Analysis of modifying factors in chemical carcinogenesis. **Prog.Exp.Tumor Res.**, v.33, p.21-40, 1991.

COHEN, S.M. Role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. **Food Chem. Toxicol.**, v.33, p.715-730, 1995.

COHEN, S.M. Cell proliferation and carcinogenesis. **Drug Metab. Rev.**, v.30, p.339-357, 1998.

COHEN, S.M.; ELLWEIN, L.B. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.51, p.6493-6505, 1991.

COHEN, S.M.; GARLAND, E.M.; ELLWEIN, L.B. Cancer enhancement by cell proliferation. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.374, p.213-229, 1992.

COTRAN, R.S; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**, e 6 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1400, 2000.

COULIBALY, B.; ZOUNGRANA, A.; MOCKENHAUPT, F.P.; SCHIRMER, R.H.; KLOSE, C.; MANSMANN, U.; MEISSNER, P.E.; MULLER, O. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomized controlled trial. **PLoS. One**, v.4, p. e5318, 2009.

COUPIER, I.; PUJOL, P. Hereditary predispositions to gynaecological cancers. **Gynécologie, Obstétrique & Fertilité**, v.33, p. 851-856, 2005.

COUSSENS, L.M; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420, p. 860-867, 2002.

CREGAN, S.P.; FORTIN, A.; MACLAURIN, J.G. et al. Apoptosis inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **J. Cell. Biol.**, v. 158, p. 507–517, 2002.

CUPPARI, I. Nutrição clínica no adulto. **Guia de Nutrição**, 2 ed., Manole, São Paulo, p.243-246, 2005.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Manole, São Paulo, p. 580, 2002.

DAHLE, J.; STEEN, H.B.; AND MOAN, J. The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. **Photochem. Photobiol.**, v.70, p. 363-367, 1999.

DANIELL, M.D.; HILL, J.S. A history of photodynamic therapy. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v.61, p.340–348, 1991.

DAS, M.; MUKHTAR, H.; GREENSPAN, E.R.; BICKERS, D.R. Photoenhancement of lipid peroxidation associated with the generation of reactive oxygen species in

hepatic microsomes of hematoporphyrin derivative-treated rats. **Cancer Res.**, v.45, p.6328-6330, 1985.

DAVIES, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. **J. Biol. Chem.**, v.262, p. 9895–9901, 1987.

DAVIOUD-CHARVET, E.; DELARUE, S.; BIOT, C. et al. A prodrug from of a *Plasmodium falciparum* glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. **J. Med. Chem.**, v.44, p.4268-4276, 2001.

DELAEY, E.; VAN LAAR, F.; DE VOS, D.; KAMUHABWA, A.; JACOBS, P.; WITTE, P. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 55, p. 27 – 36, 2000.

DELFINO, A.B.; BARRETO, E.C.; da SILVA JR.; MENDONÇA, R.G.; ORNELLAS, M.H. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose – carcinogênese. **Rev. Bras. Canc.**, v. 43, n. 3, p.173-186, 1997.

DENG, C.; BRODIE, S.G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Cancer Biol.**, v.11, p.387-394, 2001.

DETTY, M.R.; GIBSON, S.L.; WAGNER, S.J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **J. Med. Chem.**, v.47, p.3897–3915, 2004.

DICARLO, E.; FORNI, G.; LOLLINI, P.; COLOMBO, M.P.; MODESTI, A.; MUSIANI, P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. **Blood**, v.97, p.339–345, 2002.

DIXON, K.; KOPRAS, E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v.14, n.6, p. 441-448, 2004.

DIWU, Z.; LOWN, J.W. Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins. **Pharmacol. Ther.**, v.63, p.1–35, 1994.

DOLMANS, E.J.G.J.D.; FUKUMURA, D.; RAKESH, K.J. Photodynamic therapy for cancer. **Nature**, v.3, p.380–87, 2003.

DOLMANS E.J.G.J.D.; KADAMBI, A.; HILL, J.S; WATERS, C.A.; ROBINSON, B.C.; WALKER, J.P.; FUKUMURA, D.; JAIN, K.R. Vascular Accumulation of a Novel Photosensitizer, MV6401, Causes Selective Thrombosis in Tumor Vessels after Photodynamic Therapy. **Cancer Research**, v.62, p.2151–2156, 2002.

DORNELAS, C.A.; ALMEIDA, P.R.; NASCIMENTO, G.L.; LIMA, E.B.; MORAES, M.O. Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder. **Acta Cir. Bras.**, v.21, p.38-42, 2006.

DOUGHERTY, T.J. An update on photodynamic therapy applications. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.20, p.3–7, 2002.

DOUGHERTY, T.J. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. **Photochem. Photobiol.**, v.45, p.879–889, 1987.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W. et al. Photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, p. 889–905, 1998.

DOUGHERTY, T.J.; GRINDEY, G.B.; FIEL, R. et al. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.55, p.115–121, 1975.

DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.*, v.38, p.2628–2635, 1978.

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary Carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, v.24, p.566-612, 1935.

ESTELLER, M.; HERMAN, J.C. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **The Journal of Pathology**, v.196, n.1, p.1-7, 2002.

EVANS, S.; MATTHEWS, W.; PERRY, R.; FRAKER, D.; NORTON, J.; PASS, H.I. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 82, p. 34 – 39, 1990. [PubMed: 2293654] Shows that PDT produces TNF α from macrophages.

EVANS, S.S.; WANG, W.C.; BAIN, M.D.; BURD, R.; OSTBERG, J.R.; REPASKY, E. A. Fever-range hyperthermia dynamically regulates lymphocyte delivery to high endothelial venules. **Blood**, v.97, p.2727–2733, 2001.

FARBER, P.M.; ARSCOTT, L.D.; WILLIAMS, C.H.JR.; BECKER, K.; SCHIRMER, R.H. Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. **FESB Lett.**, v.422, p.311-314, 1998.

FEARON, E.R. Human câncer syndromes: clues to the origin and nature of câncer. **Sciences**, v.278, p.1043-1050, 1997.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to câncer. **Drug Discovery Today**, v.7, n.22, p.1128-37, 2002.

FERNANDES, L.C. Alterações Metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos. Tese de Doutorado, USP, SãoPaulo, 1995.

FERNANDES, L. C.; NOGUEIRA, C.R.; MACHADO, U.F.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol.**, v.258, p.1033-1036, 1990

FERRARI, C.B.K.; TORRES, E.A.F.S. Novos Compostos dietéticos com propriedades carcinogênicas. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.48, p.375-82, 2002.

FERRARIO, A.; CHANTRAIN, C.F.; VON TIEHL, K.F. et al. The matrix metalloproteinase inhibitor Prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. **Cancer Res.**, v.64, p.2328–32, 2004.

FERRARIO, A; FISHER, A.M.; RUCKER, N. et al. Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors. **Cancer Res.**, v.65, p.9473–9478, 2005.

FERRARIO, A; VON TIEHL, K.F.; RUCKER, N.; SCHWARZ, M.A.; GILL, P.S.; GOMER, C.J. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. **Cancer Res.**, v.60, p.4066–4069, 2000.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**, Atheneu, São Paulo, p. 3, 2004.

FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA, G. et al. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AlpcS4. **Lasers Med. Sci.**, v.18, p.207–212, 2004.

FINGAR, V.H. Vascular effects of photodynamic therapy. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.14, p.323–328, 1996.

FINGAR, V.H.; WIEMAN, T.J.; HAYDON, P.S. The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin. **Photochem. Photobiol.**, v.66, p.513–517, 1997.

FINGAR, V.H. et al. Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). **Br. J. Cancer**, v.79, p.1702–1708, 1999.

FINSEN, N.R. **Phototherapy**, Edward Arnold, London, 1901.

FOLADOR, A.; DE LIMA-SALGADO, T.M.; HIRABARA, S.M.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; MARTINS, E.F.; DE OLIVEIRA, H.H.; PIZATTO, N.; KANUNFRE, C.C.; PERES, C.M.; FERNANDES, L.C.; CURI, R. Effect of fish oil supplementation for two generations on changes of lymphocyte function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. **Nutr. Cancer**, v.61, n.5, p.67-679, 2009.

FOOTE, C.S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In: **Radicals in Biology**, W. A. Pryor eds., Academic Press, New York, p.85–102, 1976.

FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.**, v.54, p.659, 1991.

FOOTE, M. Oncology Basis. Part 1 What is Cancer?. **American Medical Writers Association Journal**, v.20, n.2, p.52-58, 2005.

FOSTER, T.H.; HARTLEY, D.F.; NICHOLS, M.G.; HILF, R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. **Cancer Res.**, v.53, p.1249–1254, 1993.

FOSTER, T.H.; MURANT, R.S.; BRYANT, R.G.; KNOX, R.S.; GIBSON, S.L.; HILF, R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. **Radiat. Res.**, v.126, p.296–303, 1991.

FRIEDBERG, E.C. Feature DNA damage and repair. **Nature**, v.421, p.436-440, 2003.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A.; ELLENBERGER, T. **DNA Repair and Mutagenesis**. 2 ed., ASM Press, Washington, USA, 2005.

GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D. et al. Biding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochem. Photobiol.**, v.79, p.227-32, 2004.

GARBO, G.M. Purpurins and benzochlorins as sensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.34, p. 109–116, 1996.

GARCIA-ZUAZAGA, J.; COOPER, K.D.; BARON, E.D. Photodynamic therapy in dermatology: Current concepts in the treatment of skin câncer. **Expert. Rev. Anticancer**, v.5, p.791–800, 2005.

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

GAUDETTE, N.F.; LODGE, J.W. Determination of methylene blue and leucomethylene blue in male and female Fischer 344 rat urine and B6C3F1 mouse urine. **J. Anal. Toxicol.**, v.29, p. 28-33, 2005.

GINIMUGE, P.R.; JYOTHI, S.D. Methylene Blue: Revisited. **J. Anaesth. Clin. Pharmacol.**, v.26, n.4, p.517-520, 2010.

GOLLNICK, S.O; EVANS, S.S; BAUMANN, H.; OWCZARCZAK, B.; MAIER, P. et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. **British Journal of Cancer**, v.88, p.1772–1779, 2003.

GOLLNICK, S.O.; LIU, X.; OWCZARCZAK, B.; MUSSER, D.A.; HENDERSON, B.W. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. **Cancer Res.**, v.57, p.3904–3909, 1997.

GOMER, C.J.; FERRARIO, A.; LUNA, M. et al. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. **Lasers Surg. Med.**, v.38, p.516–521, 2006.

GOMER, C.J.; RAZUM, N.J. Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization underoxic and anoxic conditions. **Photochem. Photobiol.**, v.40, p. 435–439, 1984.

GOMER, C.J.; RUCKER, N.; FERRARIO, A.; WONG, S. Properties and applications of photodynamic therapy. **Radiat. Res.**, v.120, p.1–18, 1989.

GOMES-NETO, A.; PESSOA, B.B.G.P; AGUIAR, A.S.; FURTADO, B.M.; MORAES, M.O.; RIBEIRO, R.A. Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker. **Acta Cir. Bras.**, v.17, n.1, p.12-22, 2002.

GONÇALVES, E.L.; BEVILACQUA, R.G.; MARGARIDO, N.F.; WAITZBERG, D.L.; BEVILACQUA, L.R.; GOMES, M.C.C. Tumor maligno experimental: aspectos biológicos e nutricionais. Prêmio "ROCHE"- **Hospital Central da Aeronáutica**, v.1, p.01-146, 1984.

GOTTLIEB, T.M.; OREN, M. p53 A and apoptosis. **Semin. Cancer Biol.**, v.8, p.359 - 68, 1998.

GREAVES, M. **Cancer - the Evolutionary Legacy**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

GRIVICICH, I.; ANDRÉA REGNER, A.; DA ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.53, n.3, p.335–343, 2007.

GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCCHETTI, M.; BARTOSEK, I.; GARATTINI, S. Walker Carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology**, v.39, p.173-8, 1982.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.3, p.227-234, 2005.

GUIMARÃES, F.; SCHANOSKI, A.S.; CAVALCANTI, T.C.S.; JULIANO, P.B.; VIERA-MATOS, A.N.; RETTORI, O. Tumor Growth Characteristics of the Walker 256 AR, a Regressive Variant of the Rat Walker 256 A tumor. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 53, n.5, p.1101-1108, 2010.

GUIMARÃES, F.; RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, N.A.; FERNANDES, G.A. The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.32, n.3, p.309-17, 1999.

GUTIÉRREZ, J.B.; SALSAMENDI, A.L. **Fundamentos de ciência toxicológica**, Dias Santos, Madri, p.155-177, 2001.

HAEFNER, B. NF- κ B: arresting a major culprit in cancer. **Drug Discov. Today**, v.7, p.653–663, 2002.

HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Advances in photodynamic theory [therapy]. **Optics Photonics News**, v.7, p.16 –21, 1996.

HANAHAN, D.; WEINGBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell.**, v.100, p.57-70, 2000.

HANAWALT, P.C.; FORD, J.M.; LLOYD, D.R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. **Mutat. Res.**, v.544, p.107-114, 2003.

HARMS, K.; NOZELL, S.; CHEN, X. The common and distinct target genes of p53 family transcription factors. **Cell Mol. Life Sci.**, v.61, p.822-842, 2004.

HASAN, T.; ORTEL, B.; MOOR, A.; POGUE, B. Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancer Medicine**, eds Kufe, D. et al., B.C. Decker, Inc., Hamilton, Ontario, p. 605 – 622, 2003.

HASEGAWA, R; FUTAKUCHI, M.; MIZOGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T.; SHIRAI, T.; ITO, N.; LIJINSKY, W. Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds. **Cancer Letters**, v.123, p.185-191, 1998.

HENDERSON, B.W.; BUSCH, T.M.; SNYDER, J.W. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. **Lasers Surg. Med.**, v.38, p.489–493, 2006.

HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy works? **Photochem. Photobiol.**, v.55, p.145–157, 1992.

HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J.; MALONE, P.B. Studies on the mechanism of tumor destruction by photoradiation therapy. In: **Porphyrin Localization and Treatment of Tumors**, Edited by D. R. Doiron and C. J. Gomer, A. R. Liss, New York, p.301–314, 1984.

HENDERSON, B.W.; FINGAR, V.H. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. **Cancer Res.**, v.47, p. 3110–3114, 1987.

HENDERSON, B.W.; GOLLNICK, S.O; SNYDER, J.W. et al. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. **Cancer Res.**, v.64, p.2120–2126, 2004.

HIS, R.A.; ROSENTHAL, D.I.; GLATSTEIN, E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. **Drugs**, v.57, p.725–743, 1999.

HOEIJMAKERS, H.J.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v.411, p.366-374, 2001.

HU, W.; KAVANAGH, J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **The Lancet Oncology.**, v.4, p.721-729, 2003.

HUANG, H.F.; CHEN, Y.Z.; WU, Y. ZnPcS2P2-based photodynamic therapy induces mitochondria - dependent apoptosis in K563 cells. **Acta. Biochim. Biophys. Sin.**, v. 37, p.488–494, 2005.

HURTADO, J.; ESBRIT, P.; RAPADO, A. Relative role of bone and kidney in the hypercalcemic associated with the rat Walker Carcinoma 256. **Eur. J. Cancer**, v.27, p.76-9, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer no Brasil; dados dos registros de base populacional.** v.3, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço.** Rio de Janeiro (Brasil), 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Fisiopatologia do câncer.** In:Ações de enfermagem para o controle do câncer. 2. ed., Rio de Janeiro, p. 52, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativas 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil), 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativas 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil), 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer no Brasil: dados do Registro de Câncer de Base Populacional.** Rio de Janeiro (Brasil), 2002

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativas de mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil), 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil), 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas da Mortalidade por câncer de 1979-1999**. Rio de Janeiro (Brasil), 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**, p.94,2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer**. Rio de Janeiro (Brasil), 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativas 2008, [http:// www.inc.gov.br](http://www.inc.gov.br) ,2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil 2009, [http:// www.inc.gov.br](http://www.inc.gov.br) ,2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2010, [http:// www.inc.gov.br](http://www.inc.gov.br) ,2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2012, [http:// www.inc.gov.br](http://www.inc.gov.br) ,2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2014, [http:// www.inc.gov.br](http://www.inc.gov.br) ,2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Incidência do Câncer no Brasil. São Paulo (Brasil), [http:// www.inc.gov.br](http://www.inc.gov.br) , 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ABC do Câncer – Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**, 2 ed. revisada e atualizada, São Paulo (Brasil), [http:// www.inc.gov.br](http://www.inc.gov.br) , 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Handbooks of Cancer Prevention**, [http:// www.iarc.fr](http://www.iarc.fr), Lyon, p.327, 2002.

INGVARSSON, S. Breast cancer: introduction. **Cancer Biol.**, v.11, p.323-326, 2001.

IRIGARAY, P.; NEWBY, J.A.; CLAPP, R.; HARDELL, L.; HOWARD, V.; MONTAGNIER, L.; EPSTEIN, S.; BELPOMME, D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. **Biomed. Pharmacother.**, v.61, p.640–58, 2007.

IRISH, J.C.; BERNSTEIN, A. Oncogenes in head and neck cancer. **Laryngoscope**, v.103, p.42-52, 1993.

JAIN, R.K.; CARMELIET, P.F. Vessels of death or life. **Sci. Am.**, v.285, p.38–45 2001.

JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., MURRAY, T., XU, J., THUN, J. Cancer statistics 2007. **CA Cancer J. Clin.**, v.57, p.43–66, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, J.M. Cancer Statistics, 2008. **CA Cancer J. Clin.**, v.58, p.71-96, 2008.

JENA, S.; CHAINY, G.B.N. Effect of methylene blue on oxidative stress and antioxidant defence parameters of rat hepatic and renal tissue. **Indian J. Physiol Pharmacol.**, v.52, n.3, p.293-296, 2008.

JUARRANZ, A.; JAEN, P.; SANZ-RODRÍGUES, F.; CUEVAS, C.; GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of câncer. Basic principles and applications. **Clin. Transl. Oncol.**, vol.10, p.148–154, 2008.

JUZCNIENE, A.; PENG, Q.; MOAN, J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. **Photochem. Photobiol. Sci.** vol. 6, p.1234–1245, 2007.

KAPLAN, M.J.; SOMERS, R.G.; GREENBERG, R.H. et al. Photodynamic therapy in the management of metastatic cutaneous adenocarcinomas: case reports from phase 1/2 studies using tin ethyl etiopurpurin (SnET2). **J. Surg. Oncol.**, v.67, p.121–125, 1998.

KELLY, J.F.; SNELL, M.E. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. **J. Urol.**, v.115, p.150–151, 1976.

KEMPEN, L.C.L.; VISSERC, K.E.; COUSSENS, L. Inflammation, proteases and cancer. **Eur. J. Cancer**, v.42, p.728-734, 2006.

KESSEL, D. Photodynamic therapy and neoplastic disease. **Oncol. Res.**, v.4, p.219 – 225, 1992.

KESSEL, D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.1, p.837–840, 2002.

KESSEL, D.; CHANG, C.K.; MUSSELMAN, B. Chemical, biologic and biophysical studies on 'hematoporphyrin derivative'. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.193, p.213–227, 1985.

KESSEL, D.; LUO, Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.42, p.89–95, 1998.

KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death Differ.**, v.6, p. 28–35, 1999.

KESSEL, D.; VICENTE, M.G.; REINERS, J.J.JR. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. **Autophagy**, v.2, p.289–290, 2006.

KICK, G.; MESSER, G.; GOETZ, A.; PLEWIG, G.; KIND, P. Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF- κ B DNA binding. **Cancer Res.**, v.55, p.2373–2379, 1995.

KLAUNING, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Hum. Exp. Toxicol**, v.19, p.543-555, 2000.

KLIONSKY, D.J.; EMR, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v.290, p.1717-1721, 2000.

KLUBES, P.; HIRAGA, S.; CYSYK, R.L.; OWENS, E.S.; BLASBERG, R.G. Attempts to increase intratumoral blood flow in the rat solid Walker 256 tumor by the use of the

perfluorocarbon emulsion fluosol-da. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v.23, p.1859-67, 1987.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. **Mutat. Res.**, v.544, n.2-3, p.305-11, 2003.

KOPNIN, B.P. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. **Biochemistry**, v.65, n.1, p.05-33, 2000.

KOWATA, C.H.; BENEDETTI, G.V.; TRAVAGLIA, T.; ARAÚJO, E.J.A. Fisiopatologia da Caquexia no Câncer: Uma Revisão. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR.**, v.13, n.3, p. 267–272, 2009.

KORBELIK, M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.14, p.329–334, 1996.

KORBELIK, M.; CECIC, I. Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. **Cancer Lett.**, v.137, p.91–98, 1999.

KORBELIK, M.; KROSL, G. Enhanced macrophage cytotoxicity against tumor cells treated with photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.60, p.497–502, 1994.

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

KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.304, p.433-435, 2003.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol. Today**, v.18, p.44-51, 1997.

KRYSKO, D.V.; ROELS, F.; LEYBAERT, L. et al. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.**, v.49, p.1277–1284, 2001.

KÜLBLE, A.C. Photodynamic therapy. **Med. Laser Appl.**, v.20, p.37–45, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**, 8 ed., Rio de Janeiro, 2008.

KWOK, E.S.H.; HOWES, D. Use of methylene blue in sepsis: A Systematic Review. **J. of Intensive Care Medicine**, v.21, p.359-63, 2006.

LAURENTI, R. Transição demográfica e transição epidemiológica. **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Epidemiologia**, set 2-6, p.143-65, 1990.

LINDAHL, T.; WOOD, R.D. Quality control by DNA repair. **Science**, v.286, p.1897–1905, 1999.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. The use of a derivative of hematoporphyrin detection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.26, p.1–11, 1961.

LOURO, I.D. Oncogenética. **Rev. Soc. Bras. Canc.**, v.11, p.36-42, 2000.

LUCH, A. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v.5, n.2, p.113-125, 2005.

LUI, H.; HOBBS, L.; TOPE, W.D. et al. Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and red light-emitting diodes: two-year results evaluating tumor response and cosmetic outcomes. **Arch. Dermatol.**, v.140, p.26–32, 2004.

MA, L.; MOAN, J.; BERG, K. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: a comparison of its photobiological properties with those of other photosensitizers. **Int. J. Cancer**, v.57, p. 883–888, 1994.

MACKAY, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nature Immunol.**, v. 2, p.95–101, 2001.

MAFRA, D.; FERNANDES, A.G. Zinco e Câncer: Uma revisão. **Rev. Saúde. Com.**, v.1, n. 2, p.144-156, 2005.

MAKOWSKI, M.; GRZELA, T.; NIDERLA, J.; LAZARCZYK, M; et al. Inhibition of Cyclooxygenase – 2 Indirectly Potentiates Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Mice. **Clin. Cancer Res.**, v.9, p.5417–5422, 2003.

MANG, T.S.; ALLISON, R.; HEWSON, G. et al. A phase II/III clinical study of tinethyl etiopurpurin (Purlytin)-induced photodynamic therapy for the treatment of recurrent cutaneous metastatic breast cancer. **Cancer J. Sci. Am.**, v.4, p.378–384, 1998.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol. Rev.**, v.83, p.337-376, 2003.

MATTOS, M.C.F.I. Carcino – sarcoma 256 de Walker: disseminação metastática em duas linhagens do tumor. **Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.**, v.12, p.147-53, 1979.

McBRIDGE, G. Studies expand potential uses of photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.94, p.1740–1742, 2002.

McKINNELL, R.G. Cancer genetics. In: **The biological basis of cancer**, Cambridge University, Cambridge, p.79-114, 1998.

MEHTA, R. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. **Cancer Letters**, v.93, p.85-102, 1995.

MEISSNER, P.E.; MANDI, G.; COULIBALY, B. ET AL. Methylene blue for malaria in Africa: results from dose-finding study in combination with chloroquine. **Malaria Journal**, v.5, p.84, 2006.

MICHOR, F.; IWASA, Y.; VOLGELSTEIN, B.; LENGAUER, C.; NOWAK, M. A. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? **Seminars in Cancer Biology**, v.15, p.43-49, 2005.

MILLAR, F.K.; WHITE, J.; BROOKS, R.H.; MIDER, G.B. Walker Carcinosarcoma 256 tissue as a dietary constituent. I. Stimulation of appetite and growth in the tumor-bearing rat. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.19, p.957- 67, 1957.

MINAMOTO, T.; MAI, M.; RONAI, Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep. **Carcinogenesis**, v.20, p.219-527, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações de saúde: estatísticas vitais/mortalidade geral. Disponível em: [http:// www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br), 2004.

MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem. Photobiol.**, v.53, p.549–553, 1991.

MOOR, A. C. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.57, p.1–13, 2000.

MOTA, N.G.S.; REZKALLAH-IWASSO, M.T. Contribuição ao estudo da imunidade humoral e celular em ratos com carcino-sarcoma 256 de Walker. **Rev. Ciênc. Bioméd. São Paulo**, v.2, p.55-60, 1981.

MORAES, S.P.; CUNHA, A.; NETO, J.A.R.; BARBOSA, H.; RONCOLATTO, C.A.P.; DUARTE, R.F. Modelo Experimental de Tumor de Walker. **Acta Cir. Bras.**, v.15, n. 4, on line, 2000.

MULLER, S.; GILBERGER, T.W.; KRNAJSKI, Z.; LUERSEN, K.; MEIERJOHANN, S. WALTER, R.D. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Protoplasma**, v.217, p.43-49, 2001.

MUND, R.C.; PIZZATO, N.; BONATTO, S.; NUNES, E.; VICENZI, T.; TANHOFFER, T.; OLIVEIRA, H.P.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.76, n.2, p.113-120, 2007.

NETO, A.; PESSOA, B.B.G.P.; AGUIAR, S.A.; FURTADO, B.M.; MORAES, M.O.; RIBEIRO, R.A. Modelo de tumor de pulmão com o carcinosarcoma de Walker. **Acta Cir. Bras.**, v.17, p.1-16, 2002.

NOODT, B.B.; RODAL, G.H.; WAINWRIGHT, M. et al. Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. **Int. J. Cancer**, v.75, 941-8, 1998.

NSEYO, U.O.; WHALEN, R.K.; DUNCAN, M.R.; BERMAN, B.; LUNDAHL, S.L. Urinary cytokines following photodynamic therapy for bladder cancer. **Urology**, v.36, p.167–171, 1990.

OBA-SHINJO, S.M.; BERTO, A.G.A.; PASSEROTTI, C.C.; BARBOSA, C.D.; SAMPAIO, L.O. Decorin is one of the proteoglycans expressed in Walker 256 rat mammary carcinoma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.8, p.1079-1089, 2003.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.39, p.1–18, 1997.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.1 p.1–21, 2002.

OLIVEIRA, A.P.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L.F.P.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.79, n.4, p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA, P.F.M.; HENRIQUES, I.A.; RODRIGUES-FILHO, F.; ALMEIDA, P.R.C.; MORAES, M.O. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. **Acta Cir. Bras.**, v.13, n.4, p.243-8, 1998.

OPPENHEIMER, S.B. Cellular basis of cancer metastasis: a review of fundamentals and new advances. **Acta Histochem.**, v.108, p.327-34, 2006.

ORTH, K; BECK, G.; GENZE, F.; RUCK, A. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.57, p.186-192, 2000.

PANDEY, R.K.; BELLNIER, D.A.; SMITH, K.M.; DOUGHERTY, T.J. Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.53, p.65-72, 1991.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur. J. Cancer**, v.37, suppl.8, p.54-66, 2001.

PARKIN D.M; BRAY F.; FERLAY J.; PISANI P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **Int. J. Cancer**, v. 94, n.2, p.153-6, 2001.

PARMIGIANI, R.B.; CAMARGO, A.A. O genoma Humano e o Câncer. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.C. **Oncologia Molucular**, Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

PATEL, P.N. Methylene blue for management of ifosfamide-induced encephalopathy. **Ann. Pharmacother.**, v.40, p.299-303, 2006.

PATHAK, M. A. Molecular aspects of drug photosensitivity with special emphasis on psoralen photosensitization reaction. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.69, p.163-170, 1982.

PAVLAKI, M.; GIANNOPOULOU, E.; NIARAKIS, A.; RAVAZOULA, P.; ALETRAS, A.J. Walker 256 cancer cells secrete tissue inhibitor of metalloproteinase-free metalloproteinase-9. **Mol. Cell Biochem.**, v.328, p.189-199, 2009.

PELGRIMS, J.; DE FOS, F.; VAN DEN BRANDE, J.; SCHRIJVERS, D.; PROVÉ,A.; VERMORKEN, J.B. Methylene blue in the treatment na prevention of idofodfamide-induced encefalopathy: report of 12 cases and a review of the literature. **British Journal of Cancer**, v.82, p. 291-4, 2000.

PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynammic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci.**, v. 33, p.231-237, 2008.

PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J. M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. **Ultrastruct. Pathol.**, v.20, p.109-129, 1996.

PERATONI, A.O. Carcinogenesis. In McKINNELL et al.: **The biological basis of cancer**, Cambridge University, Cambidge, p.75-114, 1998.

PEREIRA, C.O.M.; GUASTALE, H.A. A sobrevida de ratos com tumor de Walker submetidos previamente à imunogenicidade das células tumorais. **Rev. Ciênc. Bioméd. São Paulo**, v.13, p.63, 1992.

PERERA, F.P. Environment and câncer. Who are susceptible? **Science**, 278, p. 1068-1073, 1997.

PERVAIZ, S. Reaction oxygen – dependent production of novel photochemotherapeutic agents. **The FASEB Journal**, v.15, p.612–617, 2001

PERVAIZ, S.; OLIVO, M. Art and science of photodynamic therapy. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.33, p.551–556, 2006

PESSOA, C.O.; FERREIRA, F.V.A.; MORAES, M.O. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinosarcoma de Walker 256. **Acta Cir. Bras.**, v.19, n.4, p.354-60, 2004.

PETER, C.; HONGWAN, D.; KUPFER, A.; LAUTERBURG, B.H. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.56, p.247-250, 2000.

PHOENIX, D.A.; SAYED,Z.; HUSSAIN, S.; HARRIS, F.; WAINWRIGHT, M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.39, p.17-22, 2003.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimates of the world wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int. J. Cancer**, v.97, n.1, p.72-81, 2002.

PLAYER, A.; BARRET, J.C.; KAWASAKI, E.S. Laser capture micro dissection, microarrays and the precise definition of a cancer cell. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v.4, p.831-840, 2004.

POIRIER, M.C. Chemical induced DNA damage and human cancer risk. **Nature Reviews Cancer**, v.4, n.8, p.630-637, 2004.

PRIME, J. **Les accidents toxiques par l'eosinate de sodium**, Jouve and Boyer, Paris, 1900.

RAAB, O. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Z. Biol.**, v. 39, p. 524 – 546, 1900.

REED, M.W.; WIEMAN, T.J.; SCHUSCHKE, D.A.; TSENG, M.T.; MILLER, F.N. A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation. **Radiat. Res.**, v.119, p.542–552, 1989.

REZZOUG, H.; BARBERI-HEYOB, M.; MERLIN, J.L. et al. [In vitro comparison of the photodynamic activity of meso-tetra (m – hydroxyphenyl) chlorine and hematoporphyrin derivative]. **Bull. Cancer**, v.83, p.816–822, 1996.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

RIDLEY, R.G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. **Nature**, v.415, p.686-693, 2002.

RISI, J.B.; NOGUEIRA, R.B. As condições de saúde no Brasil. In: Finkelman J., editor. Caminhos da saúde pública no Brasil. Rio de Janeiro. Ed. Fio Cruz, p.109-233, 2002.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia Básica – Bases Patológicas das Doenças** 7 ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

ROSAS, M.S.L.; SILVA, B.N.M.; PINTO, R.G.M.P.; SILVA, B.V.; da SILVA, A.R.; GUERRA, L.R.; SOARES, G.C.M.T.; CASTRO, H.C.; LIONE, V.O.F. Incidência do Câncer no Brasil e o Potencial uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental. **Rev. Virtual Quim.**, v.5, n.2, p.243-265, 2013.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, v.385, p.449-64, 2004.

SANDHU, D.S.; SANDHU, S.; KARWASRA, R.K.; MARWAH, S. Profile of breast cancer patients at a tertiary care hospital in north India. **Indian Journal of Cancer**, v. 47, n.1, p.16-22, 2010.

SANTELLA, R.M.; GAMMON, M.; TERRY, M.; SENIE, R.; SHEN, J.; KENNEDY, D.; AGRAWAL, M.; FARAGLIA, B.; ZHANG, F. DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. **Mutat. Res.**, v. 592, p.29-35, 2005.

SANTOS H.S.; CRUZ, W.M. De S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.47, p.303-8, 2001.

SARIKA, V.; WATT, G.M.; MAI, Z.; HASAN, T. Strategies for Enhanced Photodynamic Therapy Effects. **Photochem. Photobiol.**, v.83, p.996–1005, 2007.

SCHANOSKI, A.S.; CAVALCANTI, T.C.; CAMPOS, C.B.L.; VIERA-MATOS, A.N.; RETTORI, O.; GUIMARÃES, F. Walker 256 tumor MHC class I expression during the shift from A variant to the immunogenic AR variant. **Cancer Lett.**, v.211, p.119-27, 2004.

SCHEINDLIN, S. Something old, something blue. **Mol. Intervent.**, v.8, p.268- 273, 2008.

SCHIRMER, R.H.; ADLER, H.; PICKHARDT, M.; MANDELKOW, E. “Lest we forget you – methylene blue”. **Neurobiology of Aging**, v.32, n.12, p. 2325.e7-16. 2011.

SCHIRMER, R.H.; COULIBALY, B.; STICH, A.; SCHEIWEIN, M.; MERKLE, H.; EUBEL, J.; BECKER, K.; BECHER, H.; MULLER, O.; ZICH, T.; SCHIEK, W.; KOUYATÉ, B. Methylene blue as an antimalarial agent. **Redox Report**, v.8, n.5, p. 272-275, 2003.

STEUBING, R.W. et al. Activation of macrophages by Photofrin II during photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.10, p.133–145, 1991.

SCHOR, S.L; SCHOR, A.M. Tumour-stroma interactions. Phenotypic and genetic alterations in mammary stroma: implications for tumour progression. **Breast Cancer Research**, v. 3, n. 6, p. 373 - 379, 2001.

SCHWARTZ, S. K.; ABSOLON, K.; VERMUND, H. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours. **Univ. Minn. Med. Bull.**, v. 27, p. 7 – 8, 1955.

SEELANDER, m.m; AMBRICO, C.; RODRIGUES, M.C.P.S.; BOECKH-HAEBISCH, E.; CURI, R. Hormonal alterations in Walker 256 tumor-bearing rats: possible role of calcium for the maintenance cachaxia. **Cancer Res. Ther. Control.**, v.5, p.29-33, 1996.

SHACHAF, C.M.; FELSHER, D.W. Rehabilitation of cancer through oncogene inactivation. **Trends Mol. Med.**, v.11, n.7, p.316-21, 2005.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S.A. Chronic inflammation and cancer. **Oncology**, v. 6, p. 217-226, 2002.

SHANMUGAM, G. Vasoplegic syndrome – the role of methylene blue. **Eur. J. Cardiothorac.Surg.**, v.28, p.705-710, 2005.

SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. **Method Enzymol.**, v.319, p.376–400, 2000.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. **Drug Discov.Today**, v.4, p.507–517, 1999.

SHILS, M.; OLSON, J.; SHIKE, M.; ROSS, A. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**, ed. 9, Manole, São Paulo, p. 3132, 2003.

SILVA, M.P.N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.52, n.1, p.59-77, 2006.

SINGH, R.; FARMER, P.B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. **Carcinogenesis**, v.27, p.178-196, 2006.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.C. **Oncologia Molucular**, Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasia hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.625-633, 2004.

SILVA, L.F.G.; SOARES, F.S.D.; ANSELMO, J.N.N.; FÉ, D.M.M.; CAVALCANTE, J.L.B.G.; MORAES, M.O.; VASCONCELOS, P.R.L. Modelo de tumor experimental em rim de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.17, n.1, p.62-6, 2002.

SMITH, R.P. Toxic responses of the blood. In: **Casarett and doull's Toxicology**, 2 ed., eds. Doull, J., Klaassen, C.D, & Amdur, M.O., Macmillan Publishing Co. Inc., New York, p. 311-332, 1980.

SOLBAN, N.; RIZVI, I.; HASAN, T. Targeted photodynamic therapy. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, p. 522–531, 2006.

SPIKES, J.D. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. In: **Primary Photoprocesses in Biology and Medicine**. Edited by R. V. Bergasson, G. Jori, E. J. Land and T.G. Truscott, Plenum Press, New York, p. 209–227, 1985.

STAR, W.M.; MARIJNISSEN, H.P.; VAN DEN BERG-BLOK, A.E.; VERSTEEG, J.A.; FRANKEN, K.A.; REINHOLD, H.S. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. **Cancer Res.**, v.46, p. 2532–2540, 1986.

STOCKERT, J.C.; CANETE, M.; JUARRANZ, A. et al. Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. **Curr. Med. Chem.**, v.14, p.997–1026, 2007.

STRAHM, B.; CAPRA, M. Insights into the molecular basis of cancer development. **Current Paediatrics**, v.15, p.333-8, 2005.

SUN, S.C.; XIAO, G. Deregulation of NF- κ B and its upstream kinases in cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v.22, p.405–422, 2003.

SUSSER, M.; SUSSER, E. Um futuro para a epidemiologia. In: Almeida Filho, Barreto ML, Veras RP, Barata RB. Teoria epidemiológica hoje: fundamentos, interfaces, tendências. **Abrasco (Série Epidemiológica 2)**, p.187-212, 1998.

TABER, S.W.; FINGAR, V.H.; COOTS, C.T. et al. Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a phase I clinical study. **Clin. Cancer Res.**, v.4, p.2741–2746, 1998.

TAMIETTI, B.F.P.; MACHADO, A.H.A.; MAFTOUM-COSTA, M.; DA SILVA, N.S.; TEDESCO, A.C.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of Mitochondrial Activity Related to Cell Death after PDT with AIPCS₄. **Photomed. Laser Surg.**, v.25, n.3, p.175–179, 2007.

TAN, T.; CHU, G. p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, p.3247-3254, 2002.

TANNOCK, I.F.; HILL, R.P. **The basis science of oncology**, 3 ed, McGraw-Hill, USA, 1998.

TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; OLIVEIRA, A.C. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basis mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis Photodynamic Ther.**, v.2, p.175-91, 2005.

TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; PASCHOAL, L.H.C. et al. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL 50 light source. **Photodiagnosis Photodynamic Ther.**, v.1, p.345-6, 2004.

TAYEK, J.A; ISTFAN, N.W.; JONES, C.T.; HAMAWY, K.J.; BISTRAN, B.R.; BLACKBURN, G.L. Influence of the Walker 256 Carcinosarcoma on muscle, tumor and whole-body protein synthesis and growth rate in the Cancer-bearing rat. **Cancer Res.**, v.46, p.5649, 1986.

THUN, M.J; DELANCEY, J.O.; CENTER, M.M; JEMAL, A; WARD, E.M. The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 100 - 110, 2010.

TODRYK, S. et al. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. **J. Immunol.**, v.163, p.1398–1408, 1999.

TOZER, G.M.; KANTHOU, C.; BAGULEY, B.C. Disrupting tumour blood vessels. **Nat. Rev. Cancer**, v.5, p.423–435, 2005.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J.H.M.; STEWART, F.A. Photodynamic Therapy in Oncology. **The Oncologist**, v.11, p.1034–1044, 2006.

TROSKO, J.E. Commentary: is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? **Mol. Carcinog.**, v.30, p.131-137, 2001.

TROSKO, J.E. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.36, p.43-48, 2003.

VANGEEL, I.P; OPPELAAR, H.; OUSSEREN, Y.G. et al. Photosensitizing efficacy of MCTHPC-PDT compared to Photofrin-PDT in the RIFI mouse tumor and normal skin. **Int. J. Cancer**, v.60, p.388–394, 1995.

VELCULESCU, V.E.; EL-DEIRY, W.S. Biological and clinical importance of p53 tumor suppressor gene. **Clin. Bioch.**, v.42, n.6, p.858-68, 1996.

VENNERSTROM, J.L.; MAKLER, M.T.; ANGERHOFER, C.K.; WILLIAMS, J.A. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, p.2671-2677, 1995.

VERIGOS, K.; STRIPP, D.C.; MICK, R. et al. Updated results of a phase I trial of motexafin lutetium-mediated interstitial photodynamic therapy in patients with locally recurrent prostate cancer. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.25, p.373–388, 2006.

VERMEERSCH, G.; RONFARD-HARET, J.C.; BAZIN, M.; CARILLET, V.; MORLIERE, P.; SANTUS, R. Type I and type II photosensitization by the antibacterial drug nalidixic acid. A laser flash photolysis study. **Photochem. Photobiol.**, v.54, p.661-666, 1991.

VIDO, A.A.; CAVALCANTI, T.C.; GUIMARÃES, F.; VIEIRA-MATOS, N.A.; RETORRI, O. The hemolytic component of câncer erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.7, p.815-22, 2000.

VILLANUEVA, A.; DOMINGUEZ, V.; POLO, S.; VENDRELL, V.D.; SANZ, C.; CANETE, T.M.; JUARRANZ, A.; STOCKERT, J.C. Photokilling mechanisms induced by zinc(II)-phthalocyanine on cultured tumor cells. **Oncol. Res.**, v.11, p.447-453, 1999.

VILLANUEVA, A.; VIDANIA, R.; STOCKERT, J.C. et al. Photodynamic effects on cultured tumor cells: cytoskeleton alterations and cell death mechanisms. **Handbook of photochemistry and photobiology**, Ed. HS Nalwa, American Scientific Publishers, California, USA, v.4, p.79–117, 2003

VOGELMANN, E.; KRAMER, H.E. Indication of fast triplet formation in bimolecular quenching of excited singlet states studied by conventional flash photolysis. **Photochem. Photobiol.**, v.24, p.595–597, 1976.

VON TAPPEINER, H. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen Von O. Raab. **Muench. Med. Wochenschr.**, v.47, p.5, 1900.

VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. **Muench. Med. Wochenschr.**, v.47, p.2042–2044, 1903.

VON TAPPEINER, H.; JODLBAUER, A. Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoan and Enzyme. **Dtsch. Arch. Klin. Med.**, v. 80, p.427–487, 1904.

VON TAPPEINER, H.; JODLBAUER, A. Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. **Gesammte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung**, F. C. W. Vogel, Leipzig, 1907.

ZARUR, J.M.; BARRETO, M.S.F.; DIÓGENES, C.A.; NASCIMENTO, G.L.; MORAES, M.O. Quimioembolização transarterial hepática: modelo experimental de tumor em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.19, n.5, p.511-6, 2004.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis and Cancer: where we are and where to go. **Seminars in Cancer Biology**, v.13, p.93-95, 2003.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v.19, p.124-28, 2004.

ZONG, W.X.; THOMPSON, C.B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, v.20, p.1 - 15, 2006.

YENARI, M.A. et al. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1053, p.74–83, 2005.

YOW, C.M.; CHEN, J.Y.; MAK, N.K. et al. Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (m-THPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. **Cancer Lett.**, v.157, p.123–131, 2000.

WALTER-SACK, I.; RENGELSHAUSEN, J.; OBERWITTLER, H.; BURHENNE, J.; MULLER, O.; MEISSNER, P.; MIKUS, G. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.65, p.179 - 189, 2009.

WALTERS, W.F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. **J. Community Health**, v.26, n.2, p.79-92, 2001.

WAINWRIGHT, M.; AMARAL, L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. **Trop. Med. Int. Health**, v.10, p.501-511, 2005.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K.B. Methylene blue - a therapeutic dye for all seasons. **J. Chemother.**, v.14, p.431-443, 2002.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, v.254, p.1138-1143, 1991.

WEINBERG, R.A. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cancer J. Clin.**, v.44, p. 160-70, 1994.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer**. Artmed, Porto Alegre, 2008.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 420, p.845, 2002.

WONDRAK, G.T. NQO1-actived phenothiazinium redox cyclers for the targeted bioreductive induction of cancer cell apoptosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v.43, p.178-90, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policies and managerial guidelines for national cancer control program. **Rev. Panam. Salud. Publica**, v.12, n. 5, p.366-70, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Action Against Cancer. 1 ed, p.24, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020.** Geneve: WHO, 2003. <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en>, Acesso em out 2012

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mortality database: tables.** Geneve: WHO, 2007. <http://www.who.int/>. Acesso em: 01 ago. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ask the expert: Online Q&A. 1 April 2008. Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world? <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report 2008. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. <http://www.who.int> , 2009.

WUNSCH F.V.; MONCEAU J.E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.48, n.3, p. 250-7, 2002.